

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE.  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE.

UNIVERSITE DE MOSTAGANEM.

ABDELHAMID IBN BADIS



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES

Filière : Sciences Agronomiques

Spécialité : Physiologie de la nutrition

Présentée par :

Mme BELKACEMI LOUIZA

Sous le thème

**Etude de l'effet du jeûne intermittent sur des paramètres  
biochimiques et organiques liés au métabolisme glucidique et  
lipidique chez des rats atteints du diabète de type 1 (*Albinos albinos*)  
et de type 2 (*Psammomys obesus*)**

Composition du jury de soutenance :

<b>RIAZI ALI</b>	Professeur	Président	Université de Mostaganem
<b>BENALI MOHAMED</b>	Professeur	Examineur	Université de Sidi Belabbès
<b>BOUCHIKHI BENATTOU</b>	Professeur	Examineur	Université de Sidi Belabbès
<b>BOUDEROUA KADDOUR</b>	Professeur	Examineur	Université de Mostaganem
<b>SELSELET-ATTOU GHALEM</b>	Professeur	Directeur de thèse	Université de Mostaganem
<b>SENER ABDULLAH</b>	Professeur	Co-Directeur de thèse	Université libre de Bruxelles

Année universitaire 2012-2013

## *Remerciements*

*Je tiens tout d'abord à remercier mon co-encadreur, le Professeur Senor Abdullah, directeur de l'unité Pancréas endocrine : cytophysiologie et biochimie insulaire, qui m'a accueilli dans son laboratoire. Les 11 mois passés au sein de son unité m'ont permis de réaliser une très grande partie de mon étude. Je lui serais toujours reconnaissante pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de mon stage.*

*Je remercie grandement le Professeur Selselet-Attou Ghalem pour avoir encadré cette thèse et pour sa disponibilité.*

*Mes sincères remerciements au Professeur Boudroua Kaddour pour ses remarques pertinentes et ses conseils. Je le remercie également d'avoir accepté d'examiner mon travail.*

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements aux Professeurs Bouchikhi Benattou et Benali Mohamed, qui m'ont fait l'honneur encore une fois d'évaluer mon travail.*

*Je remercie également le Professeur Riazi Ali, pour sa participation à mon jury de thèse en tant que président.*

*Ma gratitude et mon profond respect au Professeur Malaisse Willy J pour l'intérêt qu'il a témoigné à mes recherches. Je ne le remercierai jamais assez pour son aide inestimable dans la rédaction de mes articles. Je le remercie pour sa disponibilité et son soutien indéfectible.*

*Je remercie chaleureusement Docteur Evarad Nguajoe, de m'avoir tout appris sur les techniques immunohistochimiques. C'est grâce à son aide (fourniture de ses kits personnels) que j'ai pu réaliser les marquages sur les îlots pancréatiques des rats rendus diabétiques par injection à la streptozotocine. Je le remercie également pour ses encouragements et sa sympathie ainsi que son amitié qui m'a été précieuse durant mon séjour à Bruxelles.*

*Je tiens à exprimer ma gratitude à tous les membres du laboratoire d'hormonologie expérimentale :*

- *Emeline Hopkins* pour sa grande serviabilité et sa très appréciable compétence technique, qui m'ont aidé dans l'étude *in vivo* sur les rats streptozotocine. Je la remercie pour sa bonne humeur et les éclats de rire partagés.

- *Dr Louchami Karim*, pour son aide, ses conseils et son soutien moral, sans oublier sa bonne humeur et son écoute.

- *Dr Ying Zhang* pour son enthousiasme et ses encouragements.

- *Dr Bulur Nurdan* qui m'a initié à la technique de marquage d'insuline.

Ma gratitude au *Docteur Marie-Hélène Antoine* pour avoir réalisé l'étude immunohistochimique sur le rein.

Mes vifs remerciements à mon père *Belkacemi Behout* et mon frère *Mehdi*, qui ont été présent durant « mon périple » à *Béni abbès* et qui ont participé vivement à la capture des *Psammomys*. A ce propos, je remercie *Mr Hassani Laid* et *Yaïch Mohamed* pour leur chaleureuse hospitalité et leur disponibilité pour la capture des *Psammomys*. Je renouvelle mes remerciements à mon père qui malgré sa maladie était toujours disponible pour assurer l'approvisionnement en *Atriplex halimus* et la confection des cages à rats.

Je voudrais également remercier le directeur du laboratoire vétérinaire régional, le *Docteur Benmehdi Tarek* de m'avoir initié à l'histologie. Je le remercie d'avoir mis à ma disposition le matériel et les produits nécessaires pour la coloration hématoxyline éosine de mes lames de foie de *Psammomys*. Aussi je remercie *Docteur Adnane* d'avoir mis à ma disposition son laboratoire.

Enfin, un merci spécial à mes étudiants *Ghribi H*, *Bousmaha F*, *Benaouda A*, *Beldjilali S*, *Soltani K*, *Douidi K*, *Assous S*, *Azgi N* et *Bessoltane H* qui m'ont aidé dans l'élevage des *Psammomys*.

Je remercie vivement ma *Mère*, mon frère *Mohamed Anouar* et ma *Grand-mère* ainsi que tous mes amies qui m'ont soutenu moralement durant ces 8 années de dur labeur. Enfin, un coucou tout particulier à mon cher mari *Mahmoud* et mon petit « pitchoune » *Yahia Louay*.

## **SOMMAIRE**

### **Liste des tableaux et figures**

### **Liste des abréviations**

### **Résumé**

### **Summary**

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Rappels bibliographiques</b>	
<b>Chapitre I : Cellules <math>\beta</math> et le diabète</b> .....	5
1 Capacité d'adaptation des cellules $\beta$ .....	5
1.1 Capacité d'adaptation anatomique.....	5
1.2 Capacité d'adaptation fonctionnelle.....	8
2 Dysfonctionnement des cellules $\beta$ et l'hyperglycémie.....	10
2.1 Diabète de type 1.....	10
2.2 Diabète de type 2.....	12
3 L'hyperglycémie et les complications micro et macro vasculaires.....	16
3.1 Microangiopathie.....	16
3.2 Macroangiopathie.....	18
<b>Chapitre II : Le jeûne intermittent: une alternative à la restriction calorique</b> .....	20
1 Effet du jeûne intermittent sur la prévention du diabète.....	21
2 Effet du jeûne intermittent sur la prévention des maladies cardiovasculaires.....	23
3 Effet du jeûne intermittent sur la prévention de maladies rénales.....	24

## **Partie expérimentale**

<b>Matériels et méthodes</b> .....	27
Introduction et objectifs de l'étude.....	27
1 Induction du diabète chez les Psammomys obesus et les rats Albinos albinos.....	28
1.1 Psammomys obesus.....	28
1.1.1 Description du Psammomys obesus.....	29
1.1.2 Capture du Psammomys obesus.....	30
1.1.3 Protocole expérimental du développement du diabète non insulino-dépendant.....	31
1.2 Albinos albinos.....	35
1.2.1 Induction du diabète par injection de la streptozotocine.....	35

1.2.2	Contrôle des Albinos albinos.....	36
2	Protocole de jeûne.....	36
2.1	Psammomys obesus .....	37
2.1.1	Contrôle des Psammomys jeûneurs et non jeûneurs.....	38
2.1.1.1	Mesure de la concentration du glucose plasmatique.....	38
2.1.1.2	IPGTT.....	39
2.1.1.3	Pesée.....	39
2.1.1.4	Sacrifice et prélèvement des organes.....	39
2.2	<i>Albinos albinos</i> .....	40
2.2.1	Le jeûne et la restriction alimentaire.....	40
2.2.2	Pesée.....	40
2.2.3	IPGTT.....	41
2.2.4	Sacrifice et prélèvement es organes.....	41
3	Analyses.....	41
3.1	Dosage biochimiques.....	41
3.1.1	Paramètres plasmatiques.....	41
3.1.1.1	Glucose.....	41
3.1.1.2	HbA1c.....	42
3.1.1.3	Cholestérol et triglycérides.....	42
3.1.1.4	Créatinine et urée .....	42
3.1.2	Paramètres organiques .....	42
3.1.2.1	Triglycérides et phospholipides.....	42
3.2	Dosage de l'insuline par RIA.....	42
3.3	Sécrétion statique d'insuline.....	43
3.3.1	Collecte des îlots de Langerhans.....	43
3.3.2	Protocole de sécrétion statique d'insuline.....	43
3.4	Histologie.....	44
3.4.1	Préparation des lames.....	44
3.4.2	Etude histologique par coloration à l'hématoxyline-éosine.....	44
3.4.3	Etude histologique par coloration à l'acide périodique de Schiff.....	44
3.4.4	Etude immunohistochimique du pancréas.....	45
3.4.3.1	Marquage de l'insuline.....	45
a.	Marquage ABC-DAB. ....	45

b. Marquage immunofluorescent.....	45
3.4.3.2 Marquage du glucagon.....	46
3.4.3.3 Quantification de la mort cellulaire par technique du TUNEL.....	46
3.4.3.4 Analyse morphométrique.....	47
a. La masse des cellules bêta (beta-cell mass).....	47
b. La taille individuelle des cellules $\beta$ .....	47
3.4.5 Etude immunohistochimique du rein : calcul de l'index PCNA.....	47
3.5 Etudes statistiques.....	48
<b>Résultats</b> .....	49
<b>Chapitre I</b>	
<b>Effet du jeûne intermittent sur les <i>Psammomys obesus</i> diabétiques</b> .....	49
1 Etude in vivo.....	49
1.1 L'évolution du poids corporel.....	49
1.2 Consommation alimentaire.....	51
1.3 Glycémie postprandiale.....	52
1.4 Test de tolérance intrapéritonéale au glucose (IPGTT).....	54
2 Etude post-mortem.....	56
2.1 Paramètres pondéraux.....	56
2.1.1 Poids corporel.....	56
2.1.2 Poids frais du foie et du pancréas.....	57
2.2 Paramètres glucidiques.....	58
2.2.1 Glucose plasmatique.....	58
2.2.2 Hémoglobine glyquée.....	59
2.3 Insuline plasmatique. index insulino-génique et insulino-résistance HOMA .....	60
2.4 Paramètres lipidiques.....	61
2.4.1 Cholestérol et triglycérides plasmatiques.....	61
2.4.2 Triglycérides et phospholipides hépatiques.....	63
2.5 Histologie du foie.....	64
2.6 Histologie du pancréas.....	66
2.6.1 Marquage de l'insuline par la technique ABC-DAB.....	66
2.6.2 Marquage immunofluorescent de l'insuline .....	67
2.6.3 Marquage du glucagon par la technique ABC-DAB.....	68

**Chapitre II**

<b>Effet du jeûne intermittent sur les rats wistar rendus diabétiques par injection à la streptozotocine</b>	70
<b>1 Etude in vivo</b> .....	70
<b>1.1 Evolution du poids corporel</b> .....	70
<b>1.2 La consommation alimentaire</b> .....	71
<b>1.3 IPGTT</b> .....	72
<b>2 Etude post mortem</b> .....	76
<b>2.1 Paramètres pondéraux</b> .....	76
<b>2.1.1 Poids corporel</b> .....	76
<b>2.1.2 Poids frais du foie, rein et pancréas</b> .....	76
<b>2.2 Glucose plasmatique</b> .....	77
<b>2.3 Statut insulinique</b> .....	78
<b>2.4 Paramètre lipidiques</b> .....	79
<b>2.4.1 Cholestérol plasmatique</b> .....	79
<b>2.4.2 Triglycérides plasmatique</b> .....	80
<b>2.5 Paramètres rénaux</b> .....	81
<b>2.5.1 Créatinine plasmatique</b> .....	81
<b>2.5.2 Urée plasmatique</b> .....	82
<b>2.6 Les données sur les îlots pancréatiques</b> .....	83
<b>2.6.1 Sécrétion statique</b> .....	83
<b>2.6.2 Etude histologique du pancréas</b> .....	86
<b>2.6.2.1 Marquage immunohistochimique de l'insuline</b> .....	86
<b>2.6.2.2 Masse cellulaire <math>\beta</math></b> .....	88
<b>2.6.2.3 Evaluation de l'apoptose</b> .....	90
<b>2.6.2.4 Immunodétection du glucagon par marquage ABC-DAB</b> .....	91
<b>2.7 Etude histologique du foie</b> .....	93
<b>2.8 Etude histologique et immunohistochimique du rein</b> .....	95
<b>2.8.1 Etude histologique du rein</b> .....	95
<b>2.8.2 Index PCNA</b> .....	96
<b>Discussion</b> .....	98
<b>Conclusion</b> .....	127
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	
<b>Publications</b>	
<b>Curriculum vitae</b>	

## **LISTE DES TABLEAUX**

**Tableau 1.** Composition nutritionnelle de l'*Atriplex halimus* de la côte de Mostaganem et de l'aliment standard (SARL La Production Locale, Bouzéreah, Alger, Algérie).

**Tableau 2.** Composition nutritionnelle de l'aliment standard des rats *Albinos albinos* (France).

**Tableau 3.** Consommation alimentaire chez les *Psammomys obesus*.

**Tableau 4.** Poids corporel chez les *Psammomys* témoins, non diabétiques et diabétiques, non jeûneurs et jeûneurs.

**Tableau 5.** Poids du foie et du pancréas.

**Tableau 6.** L'hémoglobine glyquée.

**Tableau 7.** Concentration plasmatique de l'insuline, l'index insulinogénique et la HOMA chez les *Psammomys* après sacrifice.

**Tableau 8.** Paramètres lipidiques hépatiques chez les *Psammomys* témoins, non diabétiques et diabétiques, non jeûneurs et jeûneurs.

**Tableau 9.** La consommation alimentaire chez les rats témoins et les rats STZ.

**Tableau 10.** Données de l'IPGTT chez les rats témoins.

**Tableau 11.** Données sur l'IPGTT chez les rats STZ.

**Tableau 12.** Poids corporel au sacrifice.

**Tableau 13.** Poids du foie, du rein et du pancréas des rats témoins et STZ.

**Tableau 14.** Statut insulinique chez les rats wistar témoins et ceux injectés à la STZ, non jeûneurs, jeûneurs et soumis à la restriction calorique.

## **LISTE DES FIGURES**

**Figure 1.** Mécanismes régulateurs de la masse cellulaire  $\beta$  (Cerasi et Ktorza, 2007).

**Figure 2.** Mécanisme de la sécrétion insulinique (Magnan et Ktorza, 2005).

**Figure 3.** Modèle expérimental : *Psammomys obesus*.

**Figure 4.** Retrait progressif de l'*Atriplex halimus* après la période d'acclimatation.

**Figure 5.** Protocole du jeûne intermittent.

**Figure 6.** Répartition des *Psammomys obesus* en fonction de leur statut métabolique (témoins, diabétiques ou obèses) et nutritionnel (jeûneurs et non jeûneurs).

**Figure 7.** Evolution du poids corporel chez les *Psammomys obesus* diabétiques et non diabétiques, non jeûneurs (cercle clair) et jeûneurs (cercle noir) durant toute l'expérimentation.

**Figure 8.** Evolution du poids corporel chez les *Psammomys obesus* témoins non jeûneurs (cercle clair) et jeûneurs (cercle noir) durant les 30 derniers jours d'expérimentation (n=4).

**Figure 9.** Evolution de la glycémie postprandiale des *Psammomys* témoins jeûneurs (n=4).

**Figure 10.** Evolution de la glycémie postprandiale chez les *Psammomys* diabétiques (cercle clair) (n=6) et non diabétiques (cercle noir) (n=6).

**Figure 11.** Evaluation de la tolérance au glucose par test d'IPGTT avant la transition et au 29<sup>ème</sup> jour de jeûne chez les *Psammomys obesus* non diabétiques (ligne discontinue) et diabétiques (ligne continue) non jeûneurs (A) et jeûneurs (B).

**Figure 12.** La surface sous la courbe (AUC) durant le test de tolérance au glucose (IPGTT) réalisé chez des *Psammomys* non jeûneurs (ligne continue) ou jeûneurs (ligne discontinue) non diabétiques ou diabétiques. Les résultats correspondent au test effectué avant la période de transition du régime alimentaire (BS), au 10<sup>ème</sup> (F1), 20<sup>ème</sup> (F2) et 29<sup>ème</sup> jour (F3) de la période de jeûne (ou non jeûne).

**Figure 13.** Représentation graphique de la glycémie plasmatique moyenne chez *Psammomys* témoins (T), non diabétiques (ND) et diabétiques (D), jeûneurs (J) et non jeûneurs (NJ).

**Figure 14.** Représentation graphique de la cholestérolémie moyenne chez *Psammomys* témoins (T), non diabétiques (ND) et diabétiques (D), jeûneurs (J) et non jeûneurs (NJ).

**Figure 15.** Représentation graphique de la triglycéridémie moyenne chez *Psammomys* témoins (T), non diabétiques (ND) et diabétiques (D), jeûneurs (J) et non jeûneurs (NJ).

## ***LISTE DES FIGURES***

---

**Figure 16.** Coupes histologiques du foie de *Psammomys obesus* témoins (A), non diabétiques (B) et diabétiques (C), non jeûneurs (1) et jeûneurs (2). (Coloration hématoxyline-éosine, grossissement×400).

**Figure 17.** Immunodétection par la technique ABC-DAB de l'insuline dans les îlots pancréatiques des *Psammomys obesus* témoins (A), non diabétiques (B) et diabétiques (C), non jeûneurs (1) et jeûneurs (2) (grossissement x40).

**Figure 18.** Mise en évidence par immunofluorescence de l'insuline dans les îlots pancréatiques des *Psammomys obesus* témoins (A), non diabétiques (B) et diabétiques (C), non jeûneurs (1) et jeûneurs (2) (grossissement x40).

**Figure 19.** Immunodétection par la technique ABC-DAB du glucagon au niveau des îlots pancréatiques des *Psammomys obesus* témoins (A), non diabétiques (B) et diabétiques (C), non jeûneurs (1) et jeûneurs (2) (grossissement x40).

**Figure 20.** Evolution du poids corporel chez les rats wistar témoins et STZ.

**Figure 21.** Profil glycémique durant le test IPGTT réalisé au 10<sup>ème</sup> (à gauche), 20<sup>ème</sup> (milieu) et au 29<sup>ème</sup> (à droite) jour de la période finale de l'expérimentation chez les rats témoins non jeûneurs (en haut), jeûneurs (milieu) et CR (en bas) ( $M \pm SEM$  ; n=15-16).

**Figure 22.** Profil glycémique durant le test IPGTT réalisé sur des rats STZ non jeûneurs (en haut), jeûneurs (milieu) et CR (en bas) ( $M \pm SEM$  ; n=15-16).

**Figure 23.** Représentation graphique de l'évolution de la glycémie plasmatique moyenne chez les rats wistar témoins et STZ non jeûneurs (NJ), jeûneurs (J) et CR.

**Figure 24.** Représentation graphique de la cholestérolémie chez les rats wistar témoins (T) et diabétiques (STZ), jeûneurs, non jeûneurs et ceux soumis à la restriction calorique.

**Figure 25.** Représentation graphique de la triglycéridémie chez les rats wistar témoins (T) et diabétiques (STZ), jeûneurs, non jeûneurs et ceux soumis à la restriction calorique.

**Figure 26.** Représentation graphique de la créatinémie chez les rats wistar témoins (T) et diabétiques (STZ), jeûneurs, non jeûneurs et ceux soumis à la restriction calorique.

**Figure 27.** Représentation graphique de l'urémie chez les rats wistar témoins (T) et diabétiques (STZ), jeûneurs, non jeûneurs et ceux soumis à la restriction calorique.

## ***LISTE DES FIGURES***

---

**Figure 28.** Sécrétion insulinique par les îlots isolés à partir de pancréas de rats témoins non jeûneurs (○), jeûneurs (●), et rats CR (△), incubés à des concentrations graduelles de D-glucose. Les résultats sont exprimés par rapport aux valeurs moyennes enregistrées aux trois concentrations d'hexose pour chaque groupe de rats.

**Figure 29.** Immunodétection par la technique ABC-DAB de l'insuline dans les îlots pancréatiques de rats témoins (1) et rats STZ (2), non jeûneurs (A), jeûneurs (B) et CR (C). (Grossissement x40).

**Figure 30.** Immunodétection de l'insuline par immunofluorescence dans les îlots pancréatiques de rats témoins (1) et rats STZ (2), non jeûneurs (A), jeûneurs (B) et CR (C). (Grossissement x40).

**Figure 31.** Masse cellulaire  $\beta$  chez les rats témoins et STZ, non jeûneurs, jeûneurs et CR.

**Figure 32.** Pourcentage d'apoptose évalué par le TUNEL au niveau des pancréas de rats témoins et STZ, non jeûneurs, jeûneurs et CR.

**Figure 33.** Immunodétection par la technique ABC-DAB du glucagon dans les îlots pancréatiques de rats témoins (1) et rats STZ (2), non jeûneurs (A), jeûneurs (B) et CR (C). (Grossissement x40).

**Figure 34 :** Coupes histologiques de foie de rats témoins (1) et STZ (2), non jeûneurs (A), jeûneurs (B) et CR (C). Coloration PAS (grossissement x 20).

**Figure 34 bis.** Coupes histologique de foie de rat STZ non jeûneurs, colorée à l'hématoxyline-éosine. On remarque la présence de nécrose (flèche rouge) et d'infiltration (flèche noire). Coloration hématoxyline-éosine. (Grossissement X40).

**Figure 35.** Coupes rénales de rats témoins (1) et rats STZ (2), non jeûneurs (A), jeûneurs (B) et CR (C) colorées à l'acide périodique de schiff. (Grossissement x40).

**Figure 36.** L'index PCNA chez les rats témoins et STZ, non jeûneurs, jeûneurs et CR.

**Figure 37.** L'expression immunohistochimique du PCNA (proliferative cellular nuclear antigen) dans le cortex rénal des rats témoins et STZ non jeûneurs, jeûneurs et CR (Grossissement X40). Les cellules positives au PCNA présentent des noyaux brun noirâtre.

## LISTE DES ABREVIATIONS

Ac: Anticorp

ADF: alternate day fasting

Ag: Antigène

AUC: area under curve

CM: Collect medium

CR : Restriction calorique

DT1: Diabète de type 1

DT2 : Diabète de type 2

HOMA : homeostatic mode assessment

IA: Islet antigen

IFN: Interféron

IL: Interleukine

IPGTT: test de tolérance intra péritonéale au glucose

J: jeûneurs

NJ: Non jeûneurs

PCNA: proliferating cell nuclear antigen

PDX1: pancreatic and duodenal homeobox gene 1

PKA: Protéine kinase A

PKB: Protéine kinase B

STZ: Streptozotocine

T°: Température

TNF: Tumor necrosis factor

AGL: Acides gras libres

IRS: Insulin receptor substrate

dl: degrés de liberté

### RÉSUMÉ

Le jeûne intermittent est considéré comme une alternative à la restriction calorique classiquement utilisée pour la prévention de complications liées au diabète de type 1 et 2. Ce jeûne intermittent est dans la majorité des cas sous forme de cycles répétitifs d'alternance entre 24 h de jeûne et 24 h de réalimentation ad libitum. Pour notre part, nous nous intéressons à étudier l'effet du jeûne intermittent mimant celui du Ramadan. Il s'agit dans cette étude d'un jeûne intermittent répété pendant 30 jours avec un cycle jeûne/réalimentation de 15 h/9 h. Notre but est d'explorer l'effet de ce jeûne sur l'évolution de certains paramètres biochimiques et organiques qui ont été altérés durant le diabète de type 1 et 2. Pour réaliser nos objectifs, le diabète a été induit chez deux espèces distinctes. Chez les *Psammomys*, le diabète de type 2 a été provoqué par induction nutritionnelle où leur régime naturel, l'*Atriplex halimus*, a été remplacé par un aliment synthétique hypercalorique. Le diabète de type 1 a été induit par injection de rats wistar à la streptozotocine (STZ) (60 mg/Kg) par voies intrapéritonéale. En plus du jeûne intermittent, une restriction alimentaire de 20% et de 40% a été respectivement imposée à un groupe de rats wistar témoins et de rats STZ. Notre objectif est de comparer l'effet du jeûne à celui d'une restriction alimentaire dans le but de voir si l'effet bénéfique observée durant le jeûne imposé aux rats diabétiques de type 1 est dû à la restriction calorique (CR) en soi ou à la limitation de la fréquence des prises alimentaires. Chez les deux espèces, les rats ont été répartis en fonction de leur statut métabolique : témoins, diabétiques ou non diabétiques pour les *Psammomys obesus*, et témoins et diabétiques pour les rats wistar. Chaque groupe métabolique a été réparti en sous-groupe : jeûneurs (J) et non jeûneurs (NJ). Les animaux jeûneurs sont soumis à une privation alimentaire quotidienne d'une durée de 15 h et ce pendant 30 jours.

La glycémie postprandiale reste stable chez les rats témoins. Chez les *Psammomys* diabétiques, la glycémie postprandiale diminue sous l'effet du jeûne intermittent, alors qu'elle reste pratiquement stable chez les non diabétiques. L'amélioration de la tolérance au glucose chez les *Psammomys* diabétiques jeûneurs est accompagnée par une amélioration de l'insulinorésistance. Les paramètres lipidiques sont également améliorés par ce jeûne avec une diminution du taux de triglycérides plasmatique et hépatiques accompagnée sur le plan histologique par une diminution du volume et du nombre de gouttelettes lipidiques.

Chez les rats STZ, la glycémie retrouvée chez les rats J et CR est significativement plus faible par rapport à celle des rats STZ non jeûneurs. Les valeurs de l'index insulino-génique ont tendance à être relativement plus élevées chez les rats diabétiques J et CR par rapport aux rats STZ non jeûneurs. Ni le jeûne intermittent ni la restriction calorique ne semble affecter la sécrétion d'insuline ou le contenu insulinaire. Les îlots de pancréas prélevés à partir de rats STZ jeûneurs et soumis à la CR

## RÉSUMÉ

---

semblent retrouver une architecture relativement plus homogène comparée à celle des rats STZ non jeûneurs. D'ailleurs, la masse cellulaire  $\beta$  augmente relativement chez les rats STZ J et CR. Le marquage au TUNEL démontre un fort taux d'apoptose au niveau des îlots de pancréas prélevés à partir de rats STZ NJ. Cette Apoptose est de 46,5% et de 30% moins élevée respectivement chez les rats STZ jeûneurs et CR par rapport au taux calculé chez les rats STZ non jeûneurs. L'analyse histologique des coupes de rein de rats STZ non jeûneurs, démontre la présence de cellules Armanni-Ebstein principalement dans les tubules proximaux. Une forme de dégénérescence est observée à proximité de ces cellules. Ces modifications semblent partiellement être moins accentuées au niveau des coupes rénales de rats soumis à la restriction alimentaire mais surtout chez ceux soumis au jeûne intermittent. D'ailleurs, le taux de prolifération cellulaire est plus bas chez les rats STZ jeûneurs et CR comparés au taux de prolifération chez les rats STZ non jeûneurs.

Enfin, Cette étude démontre qu'un jeûne intermittent de 15 heures observé durant 30 jours pourrait relativement contribuer à améliorer l'homéostasie chez des rats atteints de diabète de type 1 et 2. En effet, il a été constaté que l'hyperglycémie, qui joue un rôle dans la genèse de complications liées au diabète, est diminuée sous l'effet du jeûne aussi bien chez les rats diabétiques de type 1 que 2. Néanmoins, les rats atteints du diabète de type 2 semblent être plus sensibles à l'effet du jeûne sur l'homéostasie glucidique. Ceci démontre que l'effet bénéfique du jeûne sur le diabète et surtout sur les acteurs veillant sur l'homéostasie glucidique reste très relatif à la masse cellulaire  $\beta$  résiduelle. Dans le cas du diabète de type 1, cette amélioration semble être plus «timide», en raison de la destruction accentuée des îlots. Cependant, l'hyperglycémie reste moins élevée chez les rats STZ jeûneurs et CR ce qui pourrait avoir une origine autre que la sécrétion de l'insuline par les îlots  $\beta$ . Les acteurs contribuant à cette diminution de l'hyperglycémie chez les diabétiques de type 1 reste à élucider.

**Mots clés :** diabètes type 1, diabètes type 2, jeûne intermittent, restriction calorique, *Psammomys obesus*, *Albinos albinos*, streptozotocine, insulino-résistance, îlots pancréatiques, stéatose hépatique, complication rénale.

### SUMMARY

Calories intake excess induces metabolic disturbances leading to the outcome of chronic diseases. Caloric restriction (CR) and intermittent fasting (IF) are two diet manipulations used to reverse the negative effect of calories overabundance. Several studies have proven effectiveness of these two paradigms to prevent development of many diseases such as diabetes. The intermittent fasting paradigm known as alternate day fasting (ADF) consists in total food deprivation for a full day that alternates with a “feast day” on which food is consumed ad libitum. The fast and feast periods are typically 24 h each, but they may vary. Our aim is to assess the effect of intermittent fasting mimic Ramadan fasting upon biochemical and organic parameters related to carbohydrate and lipid metabolism and which could be altered by diabetes conditions. This fasting consists of a daily intermittent fasting for 15 hours followed by ad libitum period, over 30 days. To fulfill our aim, we use animal models representing each one diabetic syndrome. We study the effect of intermittent fasting in *Psammomys obesus* and *Albinos albinos* rat developing respectively diabetes type 2 and 1. We induced diabetes in *Psammomys* by switching them from vegetable diet to hypercaloric one. Diabetes type 1 was induced in wistar rats by intraperitoneal injection of 65 mg/Kg. Each group of rats was divided in control and diabetic rats. After what, they were either submitted to intermittent fasting or continue to have free access to food over the 30 last days of experiment. Those undergoing fasting were deprived from food during 15 hours over a period of 30 days. Third STZ sub group were exposed to a restricted food supply comparable to that ingested by the intermittently fasting animals. Such a caloric restriction represented a 20% decrease in food intake in the control animals and a 40% decrease of food intake in the STZ rats.

In *Psammomys obesus*, the postprandial glycemia was comparable in control and non-diabetic sand rats, and little affected by intermittent fasting in these animals. In diabetic rats, however, the postprandial glycemia increased over the last 30-day period in non-fasting animals, whilst it decreased in the intermittently fasting animals. An essentially comparable situation was documented during the IPGTT performed in non-diabetic and diabetic rats before the switch in food intake and at days 10, 20 and 29 of the last 30-day period. In this case, intermittent fasting prevented in both non-diabetic and diabetic animals, the progressive deterioration of glucose tolerance otherwise recorded in non-fasting sand rats. Plasma insulin decrease under fasting, in another hand insulin stores are somewhat replenished in pancreatic islets from fasting diabetic rats. Insulin resistance is improved by intermittent fasting through the decrease of HOMA. This decrease contributes to improve plasma triglyceride concentration and liver triglyceride content which thereby alter steatosis in non-diabetic and diabetic rats.

In diabetic wistar rats, hyperglycemia persists even after fasting and CR. However, it remains less increased compared to that recorded in non-fasting diabetic wistar rats. This relative improvement

## ***SUMMARY***

---

is accompanied by a weak architectural restoration of islets which are destroyed by streptozotocin. However, Insulin secretion was improved neither by intermittent fasting nor by calorie restriction. Apoptosis seems decreased in Islets from IF and CR diabetic rats. This decrease averaged 46.5% and 30% respectively in fasting and calorie restricted diabetic rats comparing with relative values of 100% in non-fasting diabetic rats. Proximal tubular epithelial cells showed obvious changes with PAS-positive grains at the periphery of cytoplasm (Armanni-Ebstein cells). This change was especially prominent in the straight portion of proximal tubules. These changes seem to be less accentuated in diabetic fasting and calorie restricted rats.

Finally, the present study reveals that an intermittent daily fast has some beneficial effect upon biochemical and organic parameters which were altered by diabetes. Type 2 diabetic rats seems respond more to this fasting than the type 1 diabetic rats. This is probably due to the high degree of alteration in type 1 diabetes. It is important to have a residual beta cells mass which may respond positively to regimen like intermittent fasting. Even slight improvements of glucid and lipid profile contribute at least to delay complication related to diabetes conditions.

**Key words:** diabetes type 1, diabetes type 2, intermittent fasting, calorie restriction, *Psammomys obesus*, *Albinos albinos*, streptozotocine, insulinoreistance, pancreatic islets, hepatic sterosis, kidney injury.

### **INTRODUCTION**

Le diabète est une maladie caractérisée par une hyperglycémie chronique consécutive à des altérations immunologiques ou métaboliques d'origine génétiques et/ou environnementales.

Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie d'origine multifactorielle liée à l'effet de plusieurs gènes et de facteurs environnementaux. En effet, il s'agit d'une maladie ayant un comportement de prédisposition qui fait que certains individus sont plus sensibles à développer le DT1. Toutefois, les facteurs environnementaux tels que les virus, les toxines et certains facteurs diététiques, jouent un rôle dans le déclenchement de cette maladie à caractère immunitaire.

Le diabète de type 2 est une maladie polygénique caractérisée par un dérèglement du métabolisme glucidique et lipidique. C'est le mode de vie actuel, caractérisé par une alimentation riche et une augmentation de la sédentarité, qui est responsable de la genèse de cette maladie. Cependant, il est à préciser que la prédisposition génétique joue un rôle primordial dans l'apparition du diabète non insulino-dépendant. En effet, sans prédisposition génétique, une alimentation hypercalorique ne peut déclencher à elle seule le diabète, elle générerait plutôt une obésité considérée également comme une autre maladie métabolique et dont la prévalence ne cesse d'augmenter de par le monde.

Des études épidémiologiques récentes dévoilent une tendance à une augmentation globale, « planétaire », de l'incidence de cette maladie. En effet, Le nombre de diabétiques a atteint en 2010, 285 millions de personnes. Ce nombre augmentera de 54% en 2030 (Shaw et al, 2010). Il en est de même pour l'Algérie dont le nombre de patients diabétiques passera de 1.632000 en 2010 à 2.850.000 en 2030 (Shaw et al, 2010).

L'étiologie ainsi que la physiopathologie du diabète de types 1 et 2 sont parfaitement différentes, néanmoins quels que soient les mécanismes déclenchant ces deux maladies, ils aboutissent à la destruction progressive des cellules  $\beta$ . Les cellules  $\beta$  deviennent progressivement incapables de répondre aux changements métaboliques. Il en résulte l'apparition d'une hyperglycémie et donc des

## ***INTRODUCTION***

---

perturbations aussi bien de l'homéostasie glucidique que lipidique qui résultent en l'apparition de complications liées aux dérèglements de l'homéostasie.

La gravité d'un diabète est liée à la sévérité des complications chroniques qui peuvent lui être associées après quelques années d'évolution. Ce sont essentiellement la neuropathie, la rétinopathie, la néphropathie et la macro angiopathie. Ces complications sont influencées non seulement par la durée du diabète mais également par le niveau moyen de glycémie chronique (Nathan, 2002). En effet, l'hyperglycémie chronique joue un rôle essentiel dans leur genèse, avec des conséquences toutefois différentes.

Les traitements préconisés pour chaque type de diabète doivent être accompagnés de mesures hygiéno-diététiques. Ces mesures consistent en des régimes restrictifs qui assisteraient les traitements à mieux rétablir l'homéostasie glucidique et lipidique.

A cet effet, plusieurs auteurs se sont intéressés à étudier l'effet de la restriction alimentaire sur la prévention et le retardement du diabète ou des complications qui lui sont liées. Deux paradigmes de la restriction alimentaire ont été largement étudiés chez les rats, les souris et même chez l'homme pour évaluer leur effet sur l'espérance de vie. Le premier paradigme concerne la restriction calorique (CR), définie comme étant la réduction de la consommation calorique au-dessous de la consommation usuelle et ceci sans malnutrition. Généralement, la consommation alimentaire est limitée à 60–85% des besoins énergétiques quotidiens. Le second paradigme concerne le jeûne intermittent ou ADF (alternate day fasting) qui consiste en une privation alimentaire pendant un jour entier (24 heures) alternée avec un jour (24 heures) où la nourriture est consommée ad libitum.

Tous les auteurs ayant étudié l'effet du jeûne intermittent ADF sur la prévention de certaines maladies telles que le diabète et les pathologies qui lui sont liées, ont démontré son effet bénéfique sur des paramètres biochimiques et organiques qui joueraient un rôle négatif sur la physiopathologie de nombreuses maladies chroniques. Il n'y a aucun doute concernant l'efficacité de ce genre de jeûne, cependant la question qui se pose concerne la faisabilité des 24 heures de jeûne chez l'homme. Le sentiment de faim pourrait décourager les sujets à adopter ce genre de diète sur une longue période. La

## ***INTRODUCTION***

---

réduction de la durée de jeûne ou alors la limitation des fréquences d'alimentation à un repas par jour pourrait être plus acceptable par les sujets qui pourraient ainsi mieux profiter des bienfaits du jeûne intermittent sans frustration.

Le « jeûne du Ramadan », consistant en une privation alimentaire quotidienne se prolongeant sur 30 jours, présente un modèle de jeûne intermittent assez intéressant du fait que la période d'intermittence entre le jeûne et la réalimentation s'étale sur 24 heures au lieu des 48 heures préconisées dans le modèle ADF.

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail qui consiste à étudier l'effet du jeûne intermittent, mimant le modèle Ramadan, sur certains paramètres biochimiques et organiques qui ont été altérés par le diabète de type 1 ou 2. Ce jeûne intermittent consiste en une privation alimentaire quotidienne de 15 heures, suivie d'une période de réalimentation ad libitum de 9 heures et ce durant 30 jours.

A travers la restriction alimentaire imposée par ce jeûne, nous envisageons à améliorer le contrôle glycémique et le métabolisme lipidique à travers l'amélioration de la sécrétion de l'insuline ainsi que l'augmentation de la sensibilité à cette hormone.

Par la diminution de la prise alimentaire due à la restriction alimentaire observée durant 15 heures, la demande de l'organisme en insuline pourrait diminuer du fait de la diminution des apports alimentaires, ce qui contribuerait probablement à l'amélioration de la sécrétion insulinaire résultant d'une restauration des îlots pancréatiques qui voient leur nombre et leur morphologie altérés par le diabète.

L'amélioration d'une part de la production de l'insuline par le pancréas et d'autre part de l'insulinosensibilité, pourraient également avoir un impact bénéfique non seulement sur le contrôle glycémique mais également sur le métabolisme lipidique dont les anomalies contribuent à l'apparition de risques cardiovasculaires.

## ***INTRODUCTION***

---

Pour vérifier notre hypothèse sur l'effet probable du jeûne intermittent sur le métabolisme au cours du diabète, nous avons utilisé un modèle animal pour chaque type de diabète. Le diabète de type 1 a été induit chez le rat wistar (*Albinos albinos*) par injection de la streptozotocine par voie intrapéritonéale. A cet effet, il a été rapporté que la streptozotocine induit un diabète chez les rongeurs (rats ou souris) assimilé au diabète de type 1 chez l'homme (Hayashi et al, 2006 ; Lenzen, 2008). Concernant le diabète de type 2, le modèle animal semblant le plus approprié pour représenter ce diabète est le rat de sable : *Psammomys obesus*. Ce rongeur saharien compte parmi les rares espèces offrant l'avantage de développer un diabète de type 2 nutritionnellement induit, rappelant celui du diabète de type 2 humain (Kaldron et al, 1986).

L'utilisation de modèles animaux nous permettra de cerner l'effet de ce jeûne sur le plan plasmatique, mais surtout sur le plan tissulaire et ce par l'étude immunohistochimique du pancréas et l'étude histologique du foie et du rein.



# **RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

---

## **CHAPITRE I**

### **CELLULES $\beta$ ET LE DIABÈTE**

La masse cellulaire  $\beta$ , terme qui recouvre à la fois le nombre et le volume des cellules  $\beta$  (Cerasi et Ktorza, 2007) et qui n'est entre autre que la proportion des cellules sécrétrices d'insuline par rapport au reste du pancréas, est un élément clé dans l'équilibre glycémique. La proportion des cellules  $\beta$  est sujette à des variations toute au long de la vie, et ce depuis l'embryogénèse jusqu'à l'âge adulte (Montanya et al, 2000). Ces variations sont le résultat d'une capacité remarquable d'adaptation de ces cellules aux besoins de l'organisme en insuline, aussi bien dans des conditions physiologiques normales que dans des situations pathologiques.

#### **1 Capacité d'adaptation des cellules $\beta$**

##### **1.1 Capacité d'adaptation anatomique**

La capacité d'adaptation ou autrement dit la plasticité anatomique des cellules  $\beta$ , reflétée par les variations du nombre et du volume de celles-ci, est régie par 4 processus (figure 1): la réplication des cellules différenciées préexistantes, la différenciation de cellules précurseurs en cellules  $\beta$  (néogenèse), l'hypertrophie des cellules  $\beta$  et la mort cellulaire programmée ou apoptose (Bouwens et Rooman, 2005).

##### **1.1.1 Réplication**

Longtemps considérés comme étant statiques, les îlots pancréatiques, majoritairement composés de cellules  $\beta$ , sont actuellement considérés comme étant dynamiques, ce qui permet d'une part leur développement tout au long de la vie (Montanya et al, 2000), et d'autre part le maintien de la capacité de ce microorgane à répondre aux stimuli externes (Salpeter et Dor, 2008). Dès la première semaine de vie, les cellules  $\beta$  s'auto-répliquent assurant ainsi leur expansion, ensuite leur taux de réplication diminue progressivement durant la vie postnatale (Bouwens et Rooman, 2005). Le taux de cellules  $\beta$  en phase S du cycle cellulaire est inférieur à 0,25% à l'âge de 3 mois (Montanya et al,

2000). Les cellules préexistantes se répliquent sous l'effet de plusieurs facteurs tels que le glucose, le GPL-1 (glucagon-like peptide-1) qui stimule la réplication et diminue l'apoptose, ainsi que des facteurs de croissance dont le IGF-I et II (insulin-like growth factors), le PDGF (platelet-derived growth factor), EGF (epidermal growth factor) et d'autres ((Bouwens et Rومان, 2005).

### **1.1.2 Néogénèse**

La néogénèse des îlots pancréatiques se réfère spécialement à l'augmentation de la masse cellulaire  $\beta$  via la différenciation des cellules précurseurs pancréatiques adultes, localisées dans l'épithélium ductal ou le tissu acinaire, en tissu fonctionnel et physiologiquement régulé (Pittenger et al, 2009). La néogénèse à partir des cellules progénitrices induit une forte expansion des cellules  $\beta$ , alors que l'autoréplication de ces cellules induit une faible expansion (Bouwens et Rومان, 2005). La régulation moléculaire de la néogénèse n'a pas encore été élucidée.

### **1.1.3 Hypertrophie**

La masse cellulaire  $\beta$  ne dépend pas uniquement de la formation (réplication et néogénèse) et de la mort des cellules  $\beta$ , mais également de la taille individuelle de ces dernières, autrement dit de leur hypertrophie ou atrophie (Montanya et al, 2000). L'hypertrophie joue un rôle important dans l'expansion de la masse  $\beta$  (Cerasi et Ktorza, 2007) et le maintien de cette masse cellulaire  $\beta$  notamment durant l'âge adulte. En effet, il a été constaté que chez le rat, durant les premiers mois de la vie, aussi bien l'hyperplasie que l'hypertrophie des cellules  $\beta$  contribue à l'augmentation rapide de la masse cellulaire bêta, alors que chez le rat âgé, cette augmentation repose uniquement sur l'hypertrophie (Montanya et al, 2000). Enfin l'hypertrophie, tout comme la réplication, est stimulée par le glucose. En effet, il a été rapporté qu'une infusion au glucose durant 96 h causait l'augmentation de la masse cellulaire  $\beta$  à partir de la stimulation de la réplication mais également de l'hypertrophie (Bonner-Weir et al, 1989).

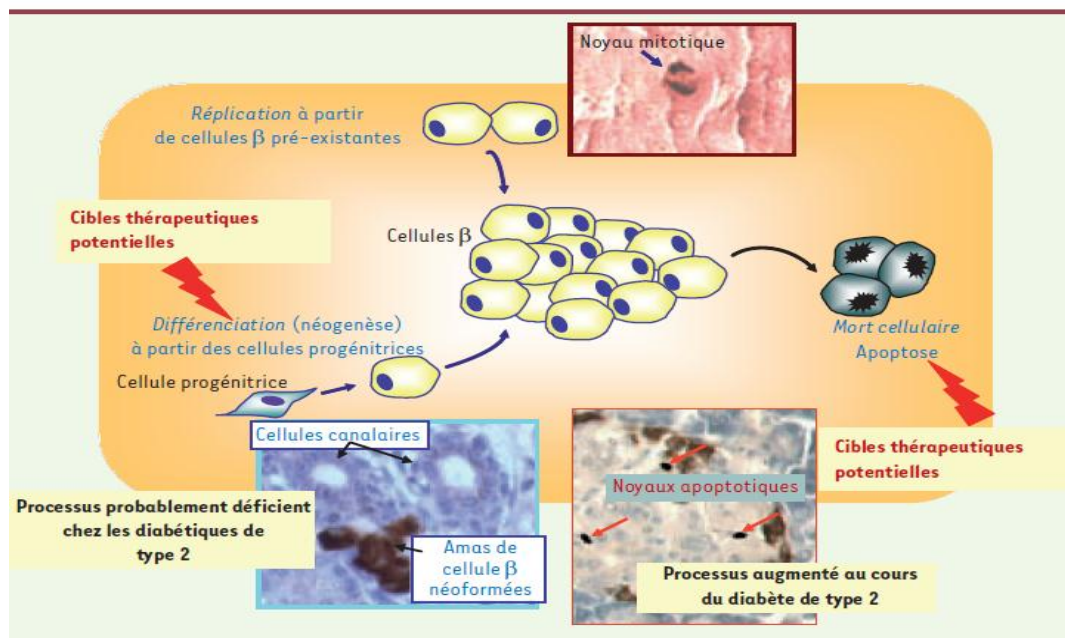
### **1.1.4 Mort cellulaire (apoptose)**

Outre l'apoptose des cellules  $\beta$  qui contribue au développement du diabète de type 1 et 2 (Mathis et al, 2001), il existe une apoptose basale de ces cellules qui joue un rôle dans le remodelage

## RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

et le développement du pancréas endocrine normal (Johnson et Luciani, 2010). Déjà à la naissance, il existe une apoptose des cellules bêta, qui est suivie par des proliférations menant à l'expansion de la masse cellulaire  $\beta$ . Ainsi, durant toutes les étapes de la vie, la réplication et la mort de ces cellules sont étroitement contrôlées par des facteurs intrinsèques et extrinsèques qui ajustent la masse cellulaire bêta en fonction des demandes métaboliques (Johnson et Luciani, 2010). Si cet équilibre qui existe entre la réplication et l'apoptose est rompu en faveur de l'apoptose, il en résulte l'apparition du diabète.

Dans le diabète de type 1, une apoptose excessive est capable d'initier une réponse immunitaire chez les individus susceptibles. Il a été suggéré que l'apoptose durant la période périnatale promeut la présentation des auto-antigènes des cellules  $\beta$  ce qui provoque une réponse auto-immune contre celles-ci (Mathis et al, 2001). Les acteurs responsables de la destruction des cellules bêta au courant du diabète de type 1 sont l'IL-1 $\beta$  et l'INF- $\gamma$ . Concernant le diabète de type 2, il a été suggéré que l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  ainsi que l'IL-6 sont impliqués dans l'apoptose des cellules  $\beta$  (Rhodes, 2008).



**Figure 1.** Mécanismes régulateurs de la masse cellulaire  $\beta$  (Cerasi et Ktorza, 2007).

### **1.2 Capacité d'adaptation fonctionnelle**

La cellule  $\beta$  démontre une grande plasticité fonctionnelle, aussi bien à des stimuli aigus que chroniques. Ces stimuli peuvent être rencontrés lors de diverses situations telles que l'obésité (Ferrannini et al, 2004), la grossesse (Bouwens et Rooman, 2005), l'effort athlétique (Cerasi et Ktorza, 2007) ou alors une infusion de glucose (Bonner-Weir et al, 1989).

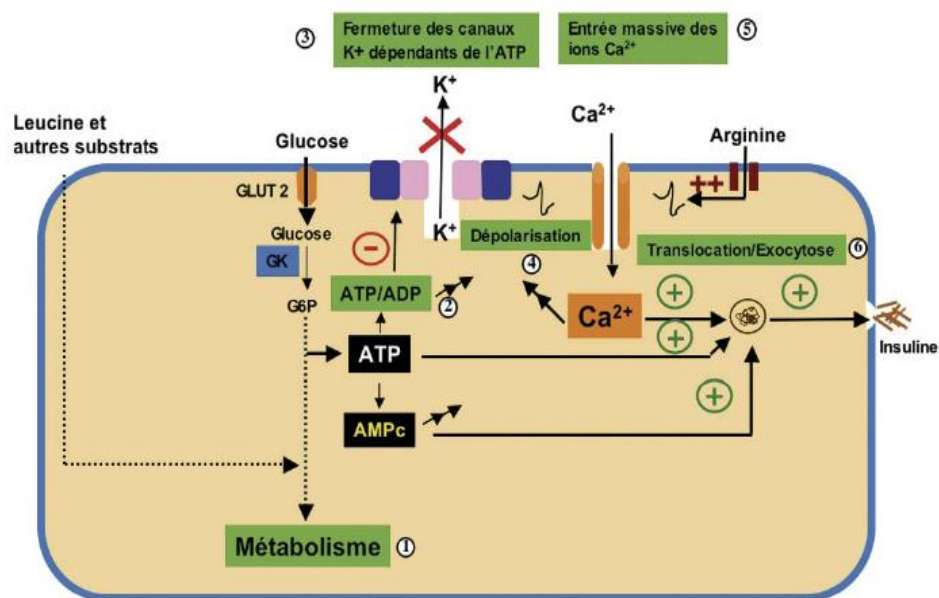
L'adaptation à long terme de la cellule  $\beta$  est aussi largement documentée. Ainsi, l'athlète professionnel, dont la sensibilité à l'insuline est très élevée, peut maintenir une glycémie normale en sécrétant 2 à 3 fois moins d'insuline que l'individu moyen (Cerasi et Ktorza, 2007). L'adaptation fonctionnelle de la cellule  $\beta$  à une suralimentation est cruciale car elle conditionne le maintien de l'homéostasie glucidique. En effet, en réponse à l'augmentation des demandes métaboliques, la cellule  $\beta$  « se doit » de maintenir une glycémie normale et par conséquent ajuster sa sécrétion d'insuline pour faire face à ces changements métaboliques.

#### **1.2.1 Sécrétion de l'insuline par la cellule $\beta$**

La cellule  $\beta$  adapte sa sécrétion d'insuline en réponse à différents stimuli qu'ils soient métaboliques, hormonaux ou nerveux. Le stimulus principal déclenchant la sécrétion insulinaire reste l'augmentation du glucose dans le sang. La particularité majeure de la cellule  $\beta$  consiste dans ses facultés à analyser exactement la concentration du glucose sanguin et à traduire ceci dans une réponse adaptée (figure 2). Pour se faire, le glucose doit pénétrer à l'intérieur de la cellule  $\beta$  pour déclencher des réactions en chaîne aboutissant à l'exocytose de l'insuline. Le glucose est transporté par la cellule à l'aide de transporteur : GLUT2 chez les rongeurs et le GLUT 1 chez l'humain (Magnan et Ktorza, 2005). Ce transporteur, comme les enzymes clés de la glycolyse, possède un  $K_m$  correspondant à des glycémies supraphysiologiques ce qui permet une adaptation rapide de sa vitesse selon la concentration physiologique du substrat, le glucose (Rigalleau et al, 2007). Le glucose est ensuite phosphorylé en glucose-6-phosphate par la glucokinase. Une fois phosphorylé, il est utilisé principalement par la voie de la glycolyse et de la respiration oxydative. Le métabolisme du glucose dans la cellule  $\beta$  est à l'origine d'une production accrue de protons, d'équivalents réduits (NADH,

## RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

NADPH, glutathion réduit) et surtout d'intermédiaires phosphorylés à haute énergie (ATP) (Magnan et Ktorza, 2005). L'augmentation de l'ATP et la diminution du rapport ADP/ATP conduit à l'inactivation des canaux  $K^+$ /ATP entraînant une dépolarisation membranaire et l'ouverture de canaux  $Ca^{2+}$  voltage-dépendants, aboutissant finalement à l'augmentation massive de la concentration cytosolique de  $Ca^{2+}$ . L'augmentation du calcium intracellulaire, de concert avec d'autres seconds messagers (AMPc), stimule la libération d'insuline (Ferré, 2005).



**Figure 2.** Mécanisme de la sécrétion insulinaire (GK : glucokinase ; GLUT 2 : *glucose transporter 2* (Magnan et Ktorza, 2005).

### 1.2.2 Mécanisme d'action de l'insuline

Le principal rôle de l'insuline est de diminuer le taux de glucose sanguin, quand celui-ci est en excès, en assurant la captation du glucose par les tissus périphériques. Cette captation est assurée par des transporteurs de glucose : les GLUT4, qui assure son transport dans les tissus périphériques sensibles à l'insuline : muscle et tissu adipeux (Rigalleau et al, 2007). L'externalisation du GLUT 4 à la surface des cellules de ces tissus est un des principaux effets induits par l'activation de la voie de signalisation de l'insuline (Rigalleau et al, 2007). La signalisation de l'insuline inclut : la liaison de l'hormone à la sous unité  $\alpha$  et la stimulation de la phosphorylation de la tyrosine de la sous unité  $\beta$  du

récepteur d'insuline. L'autophosphorylation de la sous unité  $\beta$  induira l'activation de leur kinase intrinsèque envers IRS-1/2 (Kahn et White, 1988). Les IRS activés interagissent avec la sous-unité régulatrice p85 de la phosphatidylinositol (PI) 3Kinase, entraînant sa translocation à proximité de la membrane cellulaire où se trouvent les phosphoinositides, substrats de sa sous-unité catalytique p110. Cette dernière les phosphoryle, générant du phosphatidylinositol triphosphate « PIP3 » qui active d'autres protéines kinases : PKB, PKC atypiques. Ces dernières vont mettre en jeu des voies métaboliques majeures : pénétration intracellulaire du glucose avec la translocation membranaire de ses transporteurs GLUT4, synthèse de glycogène et lipogenèse (Rigalleau et al, 2007).

### **2. Dysfonctionnement des cellules $\beta$ et l'hyperglycémie**

Des facteurs génétiques ainsi qu'environnementaux peuvent œuvrer ensemble et induire des troubles dans le bon fonctionnement des cellules  $\beta$  qui ne peuvent plus s'adapter aux changements métaboliques. Ces cellules perdent leur plasticité tant sur le plan anatomique que fonctionnelle. Il en résulte de ce dysfonctionnement une perturbation de l'homéostasie glucidique mais également lipidique. Ceci est le cas du diabète de type 1 et 2 où le dysfonctionnement de l'adaptation des cellules  $\beta$  joue un rôle déterminant dans l'apparition de ces maladies.

#### **2.1 Diabète de type 1**

Le diabète de type 1 est défini comme étant une condition dans laquelle une destruction progressive des cellules bêta aboutit à une déficience absolue en insuline (Tisch et McDevitt, 1996). Dans la plupart des cas, cette destruction est d'origine immunitaire (Giudicelli, 2001 ; Elhadj Ali et Dayan, 2009). Les mécanismes moléculaires initiaux qui conduisent à la réaction auto-immune ne sont toujours pas entièrement identifiés. Cependant, ce qui est bien établi c'est que ce sont principalement les lymphocytes T qui induisent cette maladie. Aussi bien les lymphocytes CD4+ auxiliaires que les CD8+ cytotoxiques sont impliqués dans la réponse à certains antigènes synthétisés par les cellules pancréatiques elles-mêmes. Il s'agit de peptides dérivés de l'insuline, l'acide glutamique décarboxylase (GAD) et la tyrosine phosphatase IA-2 et IA2- $\beta$  (Lernmark, 2001). Ces antigènes de la cellule  $\beta$  sont présentés aux cellules T par les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) dont les macrophages et les cellules dendritiques (Mathis et al, 2001). Il apparaît hypothétiquement que les

## ***RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES***

---

antigènes de la cellule  $\beta$  sécrétés par les cellules apoptotiques seraient un signal d'activation efficace pour les APCs en particulier les cellules dendritiques. Cette activation locale des APCs est suivie par leur migration dans les nodules lymphatiques pancréatiques dans le but de présenter l'Ag aux cellules T immatures spécifiques aux cellules  $\beta$  (Thivolet, 2002).

D'autre part, il a été démontré que les cellules  $\beta$  montrent une susceptibilité aux actions combinées de cytokines inflammatoires telles que les IL-1 $\beta$  et IFN $\gamma$ , sécrétées par les cellules mononucléaires dans les acinies des îlots. Ces cytokines diminuent l'expression de certains gènes qui affaiblissent les fonctions spécialisées des cellules  $\beta$  et réduisent la masse cellulaire  $\beta$  (Cardozo et al, 2001). Plus surprenant encore, les cellules  $\beta$  exposées aux cytokines pourraient également augmenter l'expression des gènes codant pour des chémokines et des molécules d'adhésion responsables de l'activation et de l'attraction des cellules T et ainsi de l'accélération de leur influx vers les îlots (Thivolet, 2002). Il est intéressant de préciser que ni l'IL-1 $\beta$  ni l'IFN $\gamma$  ne peuvent agir seul sur l'induction de l'apoptose des cellules  $\beta$  humaines, cependant c'est la combinaison de ces deux cytokines qui induit directement la mort de ces cellules (Eizirik et Darville, 2001). En effet, l'IL-1 $\beta$  seul ne peut induire l'expression de la iNOS (forme inductible de l'oxyde nitrique synthase) (Eizirik et al, 1996). Cette enzyme est responsable de la production de l'oxyde nitrique (NO) décrit comme ayant un rôle crucial dans la suppression de la fonction des îlots, induite par les cytokines. De plus ce radical est considéré comme la voie finale commune dans la mort des cellules  $\beta$  (Eizirik et al, 2002).

D'autres protéines sont impliquées dans le phénomène de destruction des cellules  $\beta$  lors du DT1. Il s'agit des récepteurs Fas des cellules  $\beta$  dont l'expression est augmentée par l'effet indirect des cytokines citées. Cette surexpression de ces récepteurs au niveau de la membrane des cellules  $\beta$  augmenterait la susceptibilité de ces cellules à l'apoptose facilitée par le ligand Fas (FasL) exprimé à la surface des macrophages et des lymphocytes T invasives (Amrani et al, 2000). L'importance des récepteurs Fas dans la destruction des cellules  $\beta$  est prouvée par une étude *in vivo* montrant que des souris NOD déficientes en Fas ne développent pas de diabète spontanément et sont résistantes aux L<sub>T</sub> diabétogéniques (Itoh et al, 1997). D'un autre côté, Herrera et ses collaborateurs (2000) ont démontré

que le TNF (tumor necrosis factor) membranaire apporté par les cellules CD8<sup>+</sup> activées jouerait un rôle dans le diabète auto-immun en absence de Fas ou de perforine.

Du point de vue fonctionnel, les cytokines induisent le dysfonctionnement de la cellule  $\beta$  qui précède la mort cellulaire de quelques jours (Eizirik et Pavlovic, 1997). En effet, ils affectent la production d'insuline (Eizirik et al, 1996), l'expression du PDX1 (pancreatic and duodenal homeobox gene 1) (Ling et al, 2000), GLUT2 (Ling et al, 2000), glucokinase (Ma et al, 1997).

Après plusieurs années d'évolution, lorsque la masse des cellules  $\beta$  devient insuffisante pour assurer la normoglycémie, les signes cliniques de la maladie apparaissent. L'hyperglycémie qui en résulte a des conséquences qui à long terme deviennent très fâcheuses pour les patients atteints de cette maladie. Il s'agit de complications microvasculaires et macrovasculaires qui seront relativement développées ultérieurement.

### **2.2 Diabète de type 2**

L'équipement en cellules  $\beta$  fonctionnelles est altéré chez le sujet atteint du DT2. Cette altération évolue au cours du temps et est liée à la détérioration de l'environnement métabolique de la cellule  $\beta$  résultant de l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie (gluco-lipotoxicité).

Le diabète de type 2 est la résultante d'un dysfonctionnement de la cellule  $\beta$  lié à la diminution de l'efficacité biologique de l'insuline vis-à-vis des tissus cibles, autrement dit une augmentation de l'insulinorésistance tissulaire. Face à une telle insulinorésistance, la cellule  $\beta$  perd sa capacité d'adaptation anatomique et fonctionnelle à l'élévation du taux de glucose sanguin.

#### **2.2.1 L'insulinorésistance**

La résistance à l'insuline joue un rôle considérable dans le développement du diabète de type 2, elle précède de 10 à 20 ans le début de cette maladie (Polonsky et al, 1996 ; Cline et al, 1999). Il s'agit à la fois d'un défaut génétiquement déterminé et favorisé par l'obésité (Gerich, 2000; Buysschaert, 2001) ou indépendamment de celle-ci (Gerich, 2000) et causé aussi par d'autres facteurs

## ***RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES***

---

tels que, une alimentation riche en graisse, un manque d'exercice, tabac, grossesse et certains médicaments communément utilisés (Kahn, 2001).

La résistance à l'insuline se traduit par une moindre capacité de l'insuline à exercer son action au niveau du foie et des tissus périphériques insulino-dépendants (muscles squelettiques et tissus adipeux). Il en résulte une inefficacité de l'insuline à normaliser la glycémie.

Le tissu adipeux, plus particulièrement le tissu adipeux viscéral, joue un grand rôle dans l'altération de la sensibilité à l'insuline (Rigalleau et al, 2007). Ce tissu, dans le cas du diabète de type 2, voit d'une part sa sécrétion d'adipocytokines augmentée (Rigalleau et al, 2007), sauf pour la sécrétion de l'adiponectine qui est réduite (Brichard, 2003). Les adipocytokines, dont fait partie TNF- $\alpha$  et qui sont sécrétés aussi bien par les adipocytes (Hotamisligil et al, 1994) que par les cellules musculaires (Saghizadeh et al, 1996), inhibent la voie de signalisation de l'insuline (Fumeron, 2005 ; Rigalleau et al, 2007). Quant à l'adiponectine, elle stimule l'utilisation musculaire du glucose par la voie de l'adénosine monophosphate kinase (AMPK) (Fumeron, 2005); ainsi la diminution de sa sécrétion affaiblit par ailleurs l'utilisation musculaire de glucose (Rigalleau et al, 2007). Le tissu adipeux contribue à l'insulinorésistance également via la sécrétion accrue d'acides gras (Rigalleau et al, 2007), qui sont libérés dans la veine porte résultant en une insulinorésistance, une augmentation de la formation de triglycérides hépatiques et des LDL (Zimmet et Thomas, 2003) et enfin une augmentation de la néoglucogenèse (Rigalleau et al, 2007). Les acides gras proviennent également de dépôts locaux intramusculaires et intrahépatiques. Dans le muscle, leur augmentation conduirait à l'accumulation de certains de leurs métabolites, tels que l'acyl-coA et le diacylglycérol. Ce dernier active une sérine/thréonine kinase qui phosphoryle le substrat majeur du récepteur de l'insuline (IRS) sur des résidus sérine-thréonine, et inhibe ainsi sa capacité de recrutement et d'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 kinase) (Imai et al, 1997 ; Shepherd et al, 1999). La voie de transduction du signal insulino-ique est donc diminuée, ce qui conduit à une réduction du transport de glucose (Girard, 2003). Ceci est dû à un défaut dans les voies de translocation du GLUT4, principal transporteur de glucose dans le tissu musculaire et adipeux, depuis le compartiment intracellulaire jusqu'à la membrane plasmique (Shepherd et al, 1999). Le même type de mécanisme existe dans le

foie, et qui conduit à une inhibition de la glycolyse; la résistance à l'insuline entraîne en effet une inactivation (phosphorylation) des enzymes clés (phosphofructo-2 kinase et pyruvate kinase) de la glycolyse, avec pour corollaire une activation de la néoglucogenèse (Girard, 2003). Mise à part un défaut dans la phosphorylation des IRS, ces derniers sont sujets à une dégradation accrue par le protéasome et ce sous l'influence de l'IL-6 (Rigalleau et al, 2007).

Enfin, l'insulinorésistance est une pathologie précoce qui précède l'altération de l'homéostasie glucidique par un maintien du taux normal de glucose grâce à une hypersécrétion qui mène à l'épuisement des cellules bêta et donc à la tolérance altérée au glucose puis au diabète.

### **2.2.2 Atteinte de la masse fonctionnelle des cellules $\beta$**

La sécrétion affaiblie de l'insuline peut être considérée comme universellement présente chez tous les malades atteints d'un diabète de type 2 (Gerich, 2000). Elle est due à un dysfonctionnement des cellules bêta qui se produit bien avant le développement de l'hyperglycémie et commence quelques années avant le diagnostic du diabète (Kahn, 2001).

D'une part, il y a une perte de la phase précoce de sécrétion (Polonsky et al, 1996), et dans la forme sévère un retard de la deuxième phase de sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation au glucose (Buysschaert, 2001 ; Kahn, 2001) et aux sécrétagogues autres que celui-ci. Un défaut de la pulsation de l'insuline et de la conversion de la proinsuline en insuline (kahn, 2001) s'ajoutent à ces altérations (Buysschaert, 2001).

D'autre part, la sensibilité à l'insuline a été reconnue comme un facteur important, déterminant la magnitude de la réponse insulínique par stimulation des cellules bêta. La nature de cette relation est telle que la sensibilité à l'insuline et le fonctionnement des cellules bêta sont inversement et proportionnellement reliés de telle sorte que le produit de ces deux paramètres reste constant. Au fait, l'insulinorésistance induit une augmentation de sécrétion d'acides gras par le tissu adipeux, une forte exposition du pancréas aux acides gras augmente la sécrétion basale d'insuline et en parallèle inhibe l'induction de cette sécrétion par le glucose (Poitout et Robertson, 2002). En s'accumulant dans la cellule  $\beta$ , des acyl-CoA empêcherait la fermeture du canal  $K^+$  dépendant de l'ATP et contribuerait à

## ***RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES***

---

une perte de sensibilité de la cellule bêta au glucose (Girard, 2003 ; Fumeron, 2005). De plus, les acides gras inhibent l'expression du gène d'insuline en présence de concentration élevée de glucose via une régulation négative du facteur de transcription PDX-1 (Poitout et Robertson, 2002). En plus de leur effet délétère sur le bon fonctionnement de la cellule  $\beta$ , les acides gras en excès induisent la mort cellulaire des cellules  $\beta$ . En effet, lorsque les îlots de Langerhans sont exposés de manière chronique à des concentrations élevées d'acides gras, des triglycérides s'accumulent dans les cellules  $\beta$  et produisent une lipotoxicité qui conduit à la destruction des cellules par apoptose (Girard, 2003).

En plus de l'excès des acides gras et leur effet délétère sur les îlots insulaires, l'excès de glucose dans le sang exerce également un effet néfaste sur ces îlots. En effet, l'hyperglycémie, marqueur de ce désordre métabolique, induit une augmentation de la production des espèces réactives d'oxygène (ROS) qui provoque l'oxydation de différentes molécules telles que les lipides, protéines et les acides nucléiques (Santos et al, 2009). Or, il se trouve que le pancréas soit vulnérable au stress oxydatif, probablement due à un niveau d'expression assez faible d'enzymes antioxydants (Kajimoto & Kaneto 2004).

Finalement, la lipotoxicité associée à la glucotoxicité (gluco-lipotoxicité) induisent des altérations morphologiques et fonctionnelles des cellules  $\beta$  (Cerasi et Ktorza, 2007).

Ces mécanismes impliqués dans l'échec progressif des cellules bêta ne viennent que s'ajouter à un défaut génétiquement programmé au sein de ces cellules (kahn, 2001). En effet, il a été constaté qu'une exposition in vitro d'îlots isolés de *Psammomys obesus* prédisposés au diabète, à des concentrations élevée de glucose induisait une apoptose des cellules  $\beta$  qui est proportionnelle à la concentration du milieu en glucose chez ces rats, alors que chez les rats wistar le taux d'apoptose reste inchangé (Donath et al, 1999).

Enfin l'hyperglycémie résultante de l'altération de la sensibilité à l'insuline ainsi que la sécrétion de celle-ci ne fait qu'aggraver encore l'insulinorésistance et donc l'épuisement des cellules  $\beta$ . En effet, il a été rapporté que la concentration augmentée en glucose induit une glycation de l'insuline ce qui pourrait gêner sa liaison à son récepteur (Rigalleau et al, 2007).

### **3. L'hyperglycémie et les complications micro et macro vasculaires**

La gravité d'un diabète est liée à la sévérité des complications chroniques qui peuvent lui être associées après quelques années d'évolution. Ce sont essentiellement la neuropathie, la rétinopathie, la néphropathie et la macroangiopathie. Ces complications sont influencées non seulement par la durée du diabète mais également par le niveau moyen de glycémie chronique (Nathan, 2002). En effet, l'hyperglycémie chronique joue un rôle essentiel dans leur genèse, avec des conséquences différentes, puisque son incidence sur les maladies macro vasculaires est moins élevée par rapport aux maladies micro vasculaires; ce qui expliquerait la prévalence de ces dernières chez les populations avec un contrôle glycémique insatisfaisant. Cependant, les complications micro vasculaires ne se produisent qu'à des concentrations les plus extrêmes de glycémie (Stratton et al, 2000). Par ailleurs, l'hypertension artérielle, la dyslipidémie contribuent aussi à la genèse des lésions de micro et macro angiopathie (Buysschaert, 2001).

#### **3.1 Micro angiopathie**

##### **3.1.1 Neuropathie**

La neuropathie est retrouvée chez la majorité des malades après 10-20 ans de maladie; bien qu'elle puisse être présente au moment du diagnostic, si le diabète a été longtemps méconnu (Buysschaert, 2001). Elle touche surtout les diabétiques âgés chez qui la maladie a duré et a été mal contrôlée (Slama, 1994).

Cette complication est caractérisée morphologiquement par des lésions axonales des petites et larges fibres nerveuses. Il est observé, en outre, la présence d'une démyélinisation segmentaire ainsi que des plages de régénération (Buysschaert, 2001). La forme la plus commune est une polyneuropathie progressive diffuse affectant principalement le pied (Donnelly et al, 2000) avec des engourdissements au niveau des pieds et une hypoesthésie puis une anesthésie au toucher, à la chaleur et au froid (Passa, 1999).

### **3.1.2 Rétinopathie**

La rétinopathie diabétique est une micro angiopathie avec atteinte privilégiée des vaisseaux capillaires rétiniens. C'est la complication oculaire la plus grave du diabète. Elle reste, dans les pays industrialisés, une des premières causes de cécité.

La rétinopathie n'est qu'exceptionnellement observée au cours des premières années d'un diabète. Ce n'est, en effet, habituellement qu'après 15 années (Donnelly et al, 2000) voire même moins (5-10 années) d'évolution (Buysschaert, 2001), qu'apparaissent ses premiers stigmates chez presque la totalité des patients atteints du diabète de type 1 et chez les deux tiers chez ceux atteints du type 2 (Donnelly et al, 2000).

La rétinopathie est la conséquence d'une hyperglycémie chronique. Chez les diabétiques insulino-dépendants, elle est due à une néovascularisation (Donnelly et al, 2000), alors que chez les diabétiques non insulino-dépendants, elle s'explique par une fragilisation capillaire, ainsi que par une augmentation du débit sanguin. Ces anomalies provoquent une hyperperméabilité vasculaire ; en parallèle, surviennent des micros occlusions capillaires qui se compliquent d'hypoxie et sont favorisées par des perturbations hémorhéologiques (Buysschaert, 2001).

### **3.1.3 Néphropathie**

De nombreux travaux physiologiques expérimentaux et cliniques effectués au cours de ces dernières années ont clairement démontrés que l'atteinte rénale au cours du diabète sucré précédait de longue date l'apparition d'une protéinurie décelable par bandelette réactive (Jacobs, 1994).

Dans le diabète de type 1, l'atteinte rénale se caractérise sur le plan morphologique par des lésions au niveau des glomérules, des artérioles, dans les interstitiels et enfin dans les tubules. La glomérulopathie est considérée comme le changement structural le plus important, et est caractérisée par l'épaississement de la membrane basale glomérulaire ainsi qu'une expansion mésangiale. D'autres anomalies structurales incluent l'élargissement glomérulaire, l'épaississement de la membrane basale tubulaire, une atrophie tubulaire, une expansion interstitielle et enfin une hyalinose artériolaire

afférente et efférente. Enfin, l'épaississement de la capsule de Bowman est fréquemment observé (Vestra et Fioretto, 2003).

Chez les diabétiques de type 2, les lésions sont retrouvées au niveau tubulo-interstitiel et vasculaire plutôt qu'au niveau glomérulaire comme était le cas du diabète de type 1 (Vestra et Fioretto, 2003).

Ces altérations structurales vont se refléter sur le plan physiologique par une micro albuminurie sans protéinurie au début. C'est par la suite qu'apparaît une protéinurie qui devient franche après 10 ans d'évolution du diabète (Jacobs, 1994). C'est l'augmentation du diamètre des pores membranaires qui contribue à transformer la micro albuminurie en macro protéinurie (Buysschaert, 2001).

### **3.2 Macro angiopathie**

Le diabète est bien identifié comme facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires aussi bien chez les femmes que chez les hommes. Globalement, les diabétiques présentent deux (Buysschaert, 2001), quatre (Henry, 2001) et même cinq fois (Nathan, 2002) plus de risque d'atteinte cardiovasculaire par rapport aux sujets non atteints. Par ailleurs, 75 à 80% des décès liés aux diabètes sont attribués aux complications macro vasculaires principalement les maladies cardiovasculaires, cérébrovasculaires et maladies vasculaires périphériques (Henry, 2001).

La relation entre les concentrations de glucose et les événements macrovasculaires est moins grande comparée à celle existante entre l'hyperglycémie et les complications microvasculaires (Donnelly et al, 2000). Ce qui augmente le risque d'incidence de complications cardiovasculaire sont la dyslipidémie, l'hypertension artérielle et le tabac (Donnelly et al, 2000 ; Stratton et al, 2000). En ce qui concerne l'effet de l'hyperglycémie en lui-même, il apparaît que l'exposition à long terme aux niveaux élevés de glycémie, peut contribuer au dysfonctionnement des cellules endothéliales qui jouent un rôle central dans le développement d'athérosclérose (Henry, 2001). D'autre part, l'hyperglycémie génère la production de produits avancés de glycation (AGE) qui peuvent causer des dysfonctionnements significatifs de l'endothélium macrovasculaire dans le sens où ils peuvent générer

## ***RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES***

---

l'athérogène des parois vasculaires, l'hypertension ou des évènements prothrombotiques (Eid et al, 2003). Finalement, en raison du transport ainsi de l'oxydation inadéquats du glucose observés durant le diabète, la production énergétique dans le cœur repose entièrement sur la  $\beta$  oxydation des AGL, un processus qui a des effets délétères sur la fonction du muscle cardiaque (Sambandam et al, 2000).

## **CHAPITRE II**

### **LE JEÛNE INTERMITTENT : UNE ALTERNATIVE 0 LA RESTRICTION CALORIQUE**

Plusieurs études rapportent que le facteur principal à l'origine d'un bon nombre de maladies est la suralimentation (Masoro, 2000 ; Wan et Mattson, 2003). En effet, l'excès de la consommation calorique, caractérisant la société moderne, induit la production des radicaux libres qui causent des effets endommageant sur les lipides, les protéines/enzymes, les glucides et l'ADN, induisant ainsi des dommages au niveau de la membrane, des modifications de protéines et enfin une mort cellulaire induite par la fragmentation de l'ADN et la peroxydation de lipides. Ces dommages liés au stress oxydatif sont impliqués dans la physiopathologie de certaines maladies telles que le diabète, les maladies cardiaques (athérosclérose) et la néphropathie. En plus de son effet sur le stress oxydatif, la suralimentation cause des désordres métaboliques, spécialement glucidiques et lipidiques, impliqués dans les maladies suscitées.

Cependant, la restriction alimentaire par la limitation de la prise énergétique réduit le taux des dommages oxydatifs de la cellule et ce par la diminution de la production des radicaux libres (Mattson et Wan, 2005), par la prévention de maladies chroniques (Heilbronn et al, 2005) ou alors par le retardement du début des pathologies liées à l'âge (Weindruch et al, 2001).

Deux paradigmes de la restriction alimentaire ont été largement étudiés chez les rats, les souris et même chez l'homme pour évaluer leur effet sur l'espérance de vie. Le premier paradigme concerne la restriction calorique (CR) qui est définie comme étant la réduction de la consommation calorique au-dessous de la consommation usuelle et ceci sans malnutrition. Généralement, la consommation alimentaire est limitée à 60–85% des besoins énergétiques quotidiens. Le second paradigme concerne le jeûne intermittent ou ADF (alternate day fasting) qui consiste en une privation alimentaire pendant un jour entier alternée par un jour où la nourriture est consommée ad libitum. L'alternance entre jeûne et alimentation dans le modèle ADF consiste généralement en 24 heures de jeûne suivi de 24 heures

d'alimentation ad libitum, cependant la durée de chacune des périodes, jeûne et réalimentation, peut varier.

Plusieurs auteurs ont prouvé les bienfaits du jeûne intermittent sur la santé et le recommandent donc comme alternative à une restriction calorique journalière (Varady et al, 2009) et ce afin de prévenir de nombreux déséquilibres métaboliques induisant des désordres moléculaires et cellulaires.

### **1. Effet du jeûne intermittent sur la prévention du diabète**

Nombreuses sont les études ayant testé l'effet du jeûne intermittent sur les paramètres liés au développement du diabète.

Il a été constaté une amélioration de la sensibilité à l'insuline chez des rongeurs et des singes soumis au jeûne intermittent (Goodrick et al, 1990). Cette augmentation de l'insulinosensibilité a résulté en une stimulation de la mobilisation du glucose. L'amélioration de l'insulinosensibilité observée durant le jeûne intermittent peut être expliquée par l'augmentation de l'oxydation des acides gras dans le foie et le muscle (Krizova et al, 1996). Il a également été proposé que les acides gras circulant soient essentiels pour une sécrétion insulinique efficace à partir d'îlots pancréatiques d'animaux ayant jeûnés durant 18 ou 24 heures (Stein et al. 1996). La capacité de l'ADF à diminuer la taille des cellules adipeuses viscérales peut aussi être bénéfique pour l'insulinosensibilité (Varady et al, 2007) dans le sens où la diminution du gras causée par la restriction calorique induit une réduction de l'insulinorésistance hépatique et périphérique (Brazilai and Gabriely, 2001). Ceci contribue à la diminution du risque de diabète vu que le gras viscéral pourrait jouer un rôle essentiel dans le développement du diabète de type 2 à travers l'augmentation de l'insulinorésistance (Sironi et al, 2004 ; Rigalleau et al, 2007).

Anson et ses collaborateurs (2003), en comparant les effets de la restriction calorique à ceux du jeûne ADF, ont trouvé que le jeûne intermittent avait des effets bénéfiques qui se rapprochent et même excède ceux d'une restriction calorique à 40%. Ces effets bénéfiques incluent la réduction du niveau de glucose et celui de l'insuline. Cet effet bénéfique du jeûne est indépendant de la

consommation calorique globale. En effet, même sans la réduction de la quantité d'aliment consommée, le jeûne intermittent améliore la régulation du glucose (Wan and al, 2003). C'est la réduction de la fréquence des prises alimentaires qui est la cause de telles améliorations (Anson and al, 2003). Ainsi, toutes ces adaptations positives au jeûne sont supposées diminuer le risque de survenue du diabète. D'ailleurs, Pederson et ses collègues (1999) ont trouvé que 77% des rats BB contrôles nourris ad libitum développent un diabète alors que seulement 52% des rats BB soumis au jeûne ADF deviennent diabétiques.

Le jeûne intermittent représenterait une bonne perspective pour réduire l'incidence du diabète chez l'homme, étant donné que Halberg et al (2005) ont constaté que ce jeûne augmentait l'action de l'insuline sur la captation du glucose au niveau du corps entier.

L'augmentation plasmatique de la concentration d'adiponectine observée après chaque période de jeûne pourrait expliquer l'amélioration de l'insulinosensibilité. En effet, l'adiponectine est corrélée positivement à la sensibilité à l'insuline chez l'homme (Murakami et al, 2003) et c'est dans ce sens que son augmentation pourrait exercer un effet insulino-sensibilisant. Le même auteur conclue que les cycles jeûne-réalimentation sont importants en tant qu'initiateurs du gène « thrifty » induisant l'amélioration de la fonction métabolique.

En cas de diabète, l'hyperglycémie, marqueur de ce désordre métabolique, induit une augmentation de la production des espèces réactives d'oxygène (ROS) qui provoquent l'oxydation de différentes molécules telles que les lipides, protéines et les acides nucléiques (Santos and al, 2009). Cette production de ROS facilitée par l'hyperglycémie est considérée comme étant la cause de différentes conditions de morbidité associées au diabète, telles que les maladies cardiovasculaire (Wright et al, 2006), la néphropathie (Tikoo and al, 2007; Wagener et al, 2009) et pleins d'autres maladies. Tikoo et ses collaborateurs (2007) rapportent que le jeûne intermittent diminue le stress oxydatif en raison de son effet sur la diminution de la peroxydation lipidiques et sur l'augmentation du taux de superoxyde dismutase.

Selon Anson et al (2003), la période d'alternance entre anabolisme et catabolisme pourrait jouer un rôle dans l'activation de l'augmentation de la résistance cellulaire au stress et de la réparation des biomolécules et cellules endommagées. D'un autre côté, dans cette même étude, le jeûne intermittent est perçu comme ayant un effet neuroprotecteur plus efficace que celui d'une alimentation journalière limitée. Ceci démontre que l'efficacité du jeûne sur la résistance cellulaire au stress est due au jeûne lui-même plutôt qu'à la réduction de la prise calorique. Il semble que les changements s'effectuant sur les facteurs neuroendocriniens, aussi bien que les changements se produisant sur les constituants plasmatiques, induits par le jeûne intermittent conduisent à l'augmentation de la protection contre le stress (Allard et al, 2008).

### **2. Effet du jeûne intermittent sur la prévention des maladies cardiovasculaires**

De nombreuses études ont démontré l'effet cardioprotecteur du jeûne intermittent et ce à travers l'étude de la réponse de biomarqueurs des problèmes cardiovasculaires à la privation alimentaire intermittente.

La pression artérielle, qui représente un risque majeur pour les malaises cardiovasculaires (Padwal et al, 2001), est significativement diminuée par le jeûne intermittent aussi bien chez les rats normaux (Wan et al, 2003; Ahmet et al, 2005; Mager et al, 2006) que diabétiques (Tikoo et al, 2007), et même chez les personnes adultes atteintes d'obésité (Varady et al, 2009). Cette diminution pourrait être attribuée à la stimulation de la sensibilité à l'insuline par le jeûne intermittent, sachant bien que la résistance à l'insuline joue un rôle dans l'initiation de l'hypertension (shehata, 2008). Ainsi, la réduction de la pression sanguine contribuerait à la prévention des problèmes cardiovasculaires. Wittnich et Wallen (1995) ont trouvé que chez des rats mâles spontanément hypertensifs atteints d'une hypertrophie myocardiale, une privation de nourriture pendant 24 heures induisait une augmentation du glycogène dans le myocarde. Ceci les a conduit à suggérer le développement de diètes basées sur la privation alimentaire suivie par une réalimentation comme moyen de protection des cœurs hypertrophiés durant le stress métabolique.

Durant le jeûne intermittent, une diminution de la fréquence cardiaque a été observée (Ahmet et al, 2005; Mager et al, 2006). Ceci implique une augmentation de la variabilité de la fréquence cardiaque (Ahmet et al, 2005) qui est associée à l'amélioration de la fonction cardiovasculaire (Mattson and Wan, 2005). Chez le rat, cette variabilité élevée de la fréquence cardiaque est liée à la réduction de l'activité physique durant la période de jeûne et de réalimentation, spécialement pendant la nuit (Wan et al, 2003).

L'autre facteur de risque connu pour sa contribution dans l'apparition des maladies cardiovasculaires est l'altération de la concentration des lipides circulants ; en d'autres termes, l'élévation de la concentration plasmatique du cholestérol, des triglycérides et du LDL-cholestérol. Ces biomarqueurs du désordre du métabolisme lipidiques sont améliorés par la privation intermittente de nourriture. Plusieurs travaux rapportent une diminution de la concentration de triglycérides, de LDL-cholestérol (Halberg et al 2005; Heilbronn et al, 2005; Mattson and Wan, 2005), et une augmentation de la concentration des HDL-cholestérol (Halberg et al 2005; Heilbronn et al, 2005; Tikoo et al, 2007). Varady et al (2009) ont constaté les mêmes changements chez des personnes adultes obèses soumises au jeûne ADF pendant 8 semaines. Ils ont noté chez ces personnes que la concentration du cholestérol total, du LDL-c et des triglycérides diminuait de 21%, 25% et de 32% respectivement. Ces changements positifs sur les paramètres lipidiques font du jeûne intermittent un bon moyen pour prévenir voir même supprimer l'athérosclérose.

Finalement, le rôle cardioprotecteur du jeûne intermittent pourrait être expliqué par le fait que celui-ci provoque une répétition d'un stress moyen qui induit l'expression de gènes qui stimulent l'aptitude des cellules à faire face à un stress plus sévère (Mattson et al, 2002).

### **3. Effet du jeûne intermittent sur la prévention de maladies rénales**

Les maladies rénales représentent un autre problème de santé qui pourrait être supprimé ou retardé au moyen d'une privation intermittente de nourriture. Dans son étude, Tikoo et ses collaborateurs (2007) ont évalué l'effet du jeûne intermittent sur des paramètres physiologiques et biochimiques associés à la néphropathie diabétique. Ils ont trouvé que le jeûne intermittent diminuait

significativement le taux d'urée et de créatinine plasmatique chez des rats rendus diabétiques par injection à la streptozotocine depuis 8 semaines. A côté de cela, l'incidence et l'intensité d'une hypertrophie et d'une vacuolisation glomérulaire, observées au niveau de reins de rats diabétiques nourris ad libitum, sont largement diminuées au niveau de reins prélevés à partir de rats diabétiques ayant été soumis à un jeûne intermittent. Les mêmes auteurs ont essayé de découvrir le mécanisme engendrant cet effet néphroprotecteur du jeûne intermittent. En se basant sur les résultats obtenus, ils ont suggéré qu'il existe une relation inverse entre l'expression de Sir2 et celle de p53 en faveur de la prévention des problèmes rénaux. En effet, la sous expression de Sir2 est un médiateur de la stimulation de l'expression de p53. Par conséquent, sous des conditions de diabète, l'augmentation de l'expression de p53 est associée à l'apoptose rénale. L'atténuation de l'expression de p53 ; facilitée par l'augmentation de l'expression de Sir2 chez les rats diabétiques soumis au jeûne intermittent, les prévient de l'apparition de la néphropathie diabétique. Caspases-3 et la protéine kinase p38 comptent parmi les acteurs proapoptotiques impliqués dans le début de la néphropathie diabétiques et qui sont influencés par le jeûne intermittent dans le sens où ils préviennent contre l'apoptose au niveau du rein. Le clivage de caspases-3, une protéine comptant parmi la famille de caspases jouant un rôle central dans la néphropathie diabétique via l'induction/exécution de l'apoptose (Wagener et al, 2009), est réduit par le jeûne intermittent (Tikoo et al, 2007). L'activation de p38, un médiateur de la mort cellulaire par apoptose se produisant sous les conditions de diabète, est réduite par le jeûne intermittent.

Toutes les études citées dans ce chapitre présentent des preuves de l'effet bénéfique du jeûne intermittent sur des paramètres biochimiques et organiques qui joueraient un rôle négatif sur la physiopathologie de nombreuses maladies chroniques. La majorité de ces études se sont penchées sur le jeûne intermittent ADF sous forme de cycles d'alternance entre période de privation alimentaire et de réalimentation dont la durée est de 24 heures pour chacun. Il n'y a aucun doute concernant l'efficacité de ce genre de jeûne, cependant la question qui se pose concerne la faisabilité des 24 h de jeûne chez l'humain. Le sentiment de famine pourrait décourager les sujets à adopter ce genre de diète pour une longue période. La réduction de la durée du jeûne ou alors la limitation des fréquences

## ***RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES***

---

d'alimentation à un repas par jour pourrait être plus acceptable par les sujets qui pourraient ainsi mieux profiter des bienfaits du jeûne intermittent sans frustration.

# MATERIELS ET MÉTHODES

---

## **MATERIELS ET METHODES**

### **Introduction et objectifs de nos recherches**

Notre travail consiste à étudier l'effet du jeûne intermittent sur certains paramètres biochimiques et organiques ayant été altérés durant le diabète de type 1 ou 2. La portée de nos recherches est de voir si un jeûne intermittent mimant le modèle ramadan est susceptible d'améliorer les altérations biochimiques et organiques observées durant le diabète et ainsi prévenir l'apparition de complications qui lui sont liées. La réalisation de notre objectif a nécessité l'utilisation de deux modèles animaux représentant chacun un type de diabète. Les *Psammomys obesus* qui sont rendus diabétiques par induction nutritionnelle et les rat wistar (*Albinos albinos*) rendus diabétiques par injection à la streptozotocine. Ainsi, notre étude a été scindée en deux chapitres. Le premier est consacré à l'étude réalisée sur les *Psammomys obesus* dont une a été réalisée en Algérie (élevage, paramètres plasmatiques, étude histologique du foie) et l'autre partie (paramètres organiques, études immunohistochimiques) a été réalisé en Belgique. Le deuxième chapitre concerne une étude comparative entre l'effet du jeûne intermittent et celui d'une restriction calorique, sur le diabète de type 1 induit chez le rat wistar. La totalité de cette partie a été réalisée au sein du laboratoire d'Endocrinologie Expérimentale (Belgique) et ce dans le cadre d'une bourse ministérielle (PNE). Certains paramètres n'ont pu être réalisés que chez le rat wistar et ce en raison d'une part de la disponibilité au niveau du Laboratoire d'Endocrinologie Expérimentale, de matériels adéquats utilisés pour des études exigeant des échantillons frais, et d'autre part pour la durée du stage (11 mois) qui a relativement permis de réaliser plus de paramètres.

Chacun des chapitres comporte une étude *in vivo* où l'on suit l'évolution de certains paramètres (poids, glycémie et test de tolérance au glucose (IPGTT)) et une étude post-mortem où nous avons évalué, après sacrifice des rats *Psammomys* ou rats wistar, certains paramètres biochimiques et organiques. Cette évaluation a été appuyée par des études histologiques et immunohistochimiques.

- ❖ L'étude de paramètres biochimiques englobe :
  1. Le dosage de certains paramètres plasmatiques (glucose, cholestérol, triglycérides, urée et créatinine) et organiques (triglycérides et phospholipides hépatiques) a été effectué par des méthodes enzymatiques-colorimétriques en utilisant des kits de dosage.
  2. Concernant le dosage de HbA1c chez les *Psammomys*, il a été effectué à l'aide du DiaSTAT Hemoglobin A<sub>1c</sub> Program en utilisant le Bio-Rad DiaSTAT Analyzer (Bio-Rad laboratories, CA, USA).
  3. Le dosage de l'insuline a été réalisé par la méthode radioimmunologique RIA.
- ❖ L'étude histologique du foie et du rein a été réalisée dans le but de mettre en évidence histologiquement les anomalies décelées lors de dosage biochimiques. Ces organes ont été colorés à l'hématoxyline-éosine et/ou à l'acide périodique de Schiff.
- ❖ L'étude immunohistochimique du pancréas a été entreprise afin de mettre en évidence l'insuline et le glucagon au niveau du pancréas. L'immunomarquage à l'insuline a permis d'établir une analyse morphométrique des cellules bêta.
- ❖ L'étude immunohistochimique du rein a permis d'apprécier le taux de prolifération des cellules rénales.

### **1. Induction du diabète chez les *Psammomys obesus* et les rats Albinos albinos**

#### **1.1 *Psammomys obesus***

*Psammomys obesus*, ou autrement appelé rats de sable (figure 3), est un modèle animal qui compte parmi les rares espèces offrant l'avantage de développer un diabète de type 2 nutritionnellement induit. Lorsque le *Psammomys obesus*, en captivité, est nourri au régime hypercalorique, il développe un syndrome métabolique rappelant celui du diabète de type 2 humain (Kaldron et al, 1986). Selon Neshier et al (2001), l'un des aspects attractifs chez le *Psammomys obesus* est que son phénotype diabétique se révèle durant le processus d'adaptation lors de la transition du régime hypocalorique, retrouvé dans son habitat naturel, au régime synthétique hypercalorique. Ceci rappelle la genèse du diabète de type 2 chez l'être humain qui est dû entre autre à son passage au mode

de vie occidental se caractérisant par une sédentarité et une alimentation riche en calories. De ce fait, afin de mieux comprendre l'étiologie ainsi que la physiopathologie du diabète de type 2 chez l'homme, plusieurs chercheurs ont opté pour l'utilisation de cet animal comme modèle expérimental (Nesher et al, 1999 ; Ikeda et al, 2001 ; Leibowitz et al, 2002).



**Figure 3.** Modèle expérimental : *Psammomys obesus*.

### **1.1.1 Description du *Psammomys obesus***

Le *Psammomys obesus* est un rongeur saharien de la famille des Muridés, sous famille des Gerbillidés, super ordre des glires, sous ordre des Myomorphes. D'après Petter (1961), une seule sous espèce vit dans les contrées sahariennes algériennes, il s'agit de la sous espèce Cretzschmar. C'est un rongeur au pelage fauve-roux dont la longueur totale tête-corps varie entre 130 et 160 mm. Le poids corporel chez l'adulte varie de 80-120 g dans les zones où la végétation est peu abondante (Igli, marhoum et B'chir dans la wilaya de Béchar, sud-ouest algérien), il est supérieur à 125 g dans les zones à végétation abondante (Abadla, wilaya de Béchar) (Gernigon, 1992).

Les rats de sable vivent dans les lits d'oueds dans les dépressions sableuses ou argileuses où poussent les Chénopodiacées en abondance. Leur répartition est liée au réseau hydrographique (Petter, 1961 ; 1975). C'est sous les arbrisseaux de Chénopodiacées, plantes halophytes très riches en eau et en

sels minéraux, que les rats de sables creusent leurs terriers sur plusieurs mètres de surface pouvant atteindre 6 m de périmètre et 1.2 m de profondeur. Ces terriers sont composés de plusieurs étages de galeries communiquant entre elles par des galeries secondaires avec 4 ou 6 orifices d'accès. Par cette manière de creuser son terrier, le *Psammomys* peut d'une part fuir ses prédateurs et d'autre part créer un microclimat d'aération où la température est constante (25°C) et le degré d'hygrométrie élevé (60 à 70%) (Petter, 1961).

Les *Psammomys* sont phytophages, ils se nourrissent exclusivement des tiges et des feuilles de plantes salées de la famille des Chénopodiacées qui se trouvent juste au-dessus de leur terrier. Ils exploitent le buisson jusqu'à épuisement, l'abandonnent et y reviennent lorsque celui-ci se sera développé à nouveau. Les rats de sables peuvent consommer 4 espèces de Chénopodiacées qu'ils trouvent dans leur biotope, ce sont : *Traganum nudatum*, *Salsola faetida*, *Sueda mollis* et *Atriplex halimus*. Ces 4 espèces coexistent sur le même biotope (observation personnelle).

L'animal sort de son terrier dès le lever du soleil pour couper des tiges et des feuilles fraîches de Chénopodiacées appartenant au buisson sous lequel il vit ou alors d'un autre buisson. En été, les sorties sont limitées aux heures les plus fraîches de la journée (aube et crépuscule), tandis qu'en hiver les sorties sont plus tardives aux heures les plus chaudes de la journée.

### **1.1.2 Capture des *Psammomys***

#### **1.1.2.1 Période de capture**

En raison du fait que la période de reproduction s'étale de septembre à mai avec de nombreuses naissances en novembre et en mars (Gernigon, 1992), et pour des raisons climatiques, nous avons choisi la période de printemps (climat tempéré), précisément le mois d'avril pour effectuer la chasse des *Psammomys obesus*. Ceci nous a permis d'augmenter nos chances d'obtenir un grand nombre d'animaux assez jeunes, ce qui sera idéal pour la suite du protocole (voir ultérieurement). En effet, selon Shafrir et al (2006), plus l'intervalle entre le sevrage du *Psammomys* et son transfert du régime hypocalorique au régime hypercalorique est rapproché, plus sa sensibilité de développer un

diabète de type 2 augmente. Il est à noter que le sevrage chez cette espèce se fait à un mois d'âge (Daly et Daly, 1973).

### **1.1.2.2 Lieu de capture**

C'est dans le Sahara algérien, dans la wilaya de Béchar, plus précisément dans la région de Abadla (Latitude:31°1'0"N Longitude : 2°43'59"W) que nous avons, avec l'aide de chasseurs de Béni Abbess (Wilaya de Béchar), effectué la chasse des animaux. Ce lieu est choisi par les chasseurs en raison de l'abondance de la végétation et par conséquent un plus fort taux de population de *Psammomys*.

### **1.1.2.3 Mode de capture**

En raison du fait que le rat de sable sort de son terrier dès le lever du soleil, la chasse se pratique au lever du jour (à 5h du matin) de telle sorte que le piège est placé avant la première sortie de l'animal. Après avoir vérifié que le terrier est bien habité (présence de traces fraîches, de pattes et de queue, typiques au *Psammomys*), le chasseur pose le piège garni de feuilles fraîches de chénopodiacées (en général *Traganum nudatum*) à l'entrée principale du terrier et ferme tous les orifices secondaires afin d'éviter que le *Psammomys* n'utilise d'autres sorties pour cueillir les tiges et les feuilles. La chasse se déroule toute la journée de l'aube jusqu'au crépuscule.

## **1.1.3 Protocole expérimental du développement du diabète non insulino-dépendant**

### **1.1.3.1 Conditionnement des *Psammomys obesus***

Notre expérimentation a porté sur 52 *Psammomys obesus*, tout sexe confondu (34 femelles et 18 mâles). Les difficultés rencontrées au cours de la chasse des animaux ainsi que le taux élevé de mortalité lié au transport et au stress dû à la captivité, ne nous permettent pas de procéder au choix du sexe ; de plus, tous les travaux de recherche effectués sur *Psammomys obesus* utilisent les deux sexes sans pour autant citer de différences du syndrome métabolique diabétique entre le mâle et la femelle.

Après la capture, les *Psammomys* sont transportés jusqu'à Mostaganem (nord-ouest de l'Algérie, Latitude: 35°51'43"N, longitude: 0°7'39"E). Au niveau du laboratoire (24±2°C), ils sont

## **MATERIELS ET MÉTHODES**

---

répartis dans des cages et nourris ad libitum, durant les 3 premiers jours de captivité, avec un mélange de chénopodiacées d'origine désertique (*Traganum nudatum* d'Abadla) et côtière (*Atriplex halimus* de Mostaganem). Par la suite, et durant le reste de la période d'acclimatation qui dure 15 jours, les *Psammomys* sont nourris exclusivement de feuilles d'*Atriplex* côtier; la quantité fournie à chaque *Psammomys* correspond à 100% de son poids, tout en sachant qu'en 24 h, les femelles *Psammomys* consomment 67 à 88% de leur poids et que les mâles en consomment 32 à 61% (d'après les observations de Petter (1961)). La composition nutritionnelle de l'*Atriplex halimus* est représentée dans le tableau 1 :

**Tableau 1.** Composition nutritionnelle de l'*Atriplex halimus* de la côte de Mostaganem et de l'aliment standard (SARL La Production Locale, Bouzéreah, Alger, Algérie).

<b>Matière</b>	<b>Pourcentage %</b>	
	<i>Atriplex halimus</i>	<b>Aliment standard</b>
Humidité	81,35	10,31
Matière sèche	18,65	89,69
Glucides	1,35	46
Matière grasse	1,37	3,3
Protéines	6,06	19,16
Matière minérale	4,00	5,2
Valeur énergétique kcal	0,42	2,90

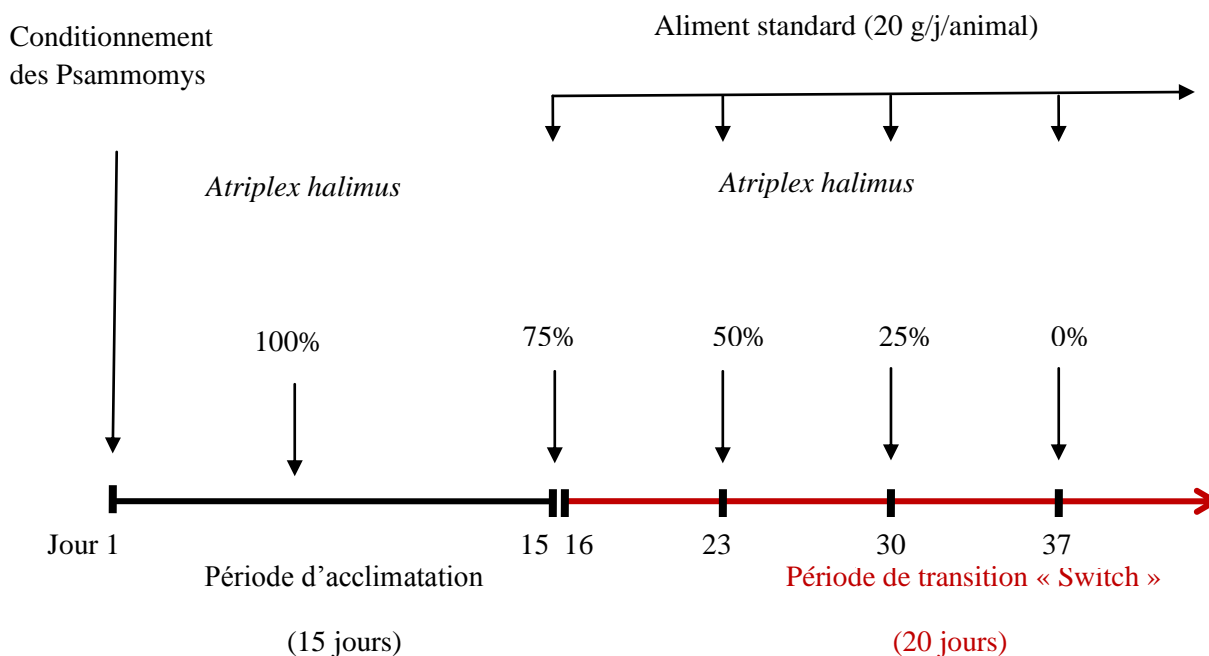
A la fin de cette période, et avant de procéder à l'introduction de l'aliment standard, dont la composition figure sur le tableau 1, la glycémie postprandiale ainsi que le poids corporel de chaque animal ont été relevés.

Le poids des animaux a été utilisé comme critère de sélection des *Psammomys* destinés à recevoir l'aliment standard pour induire un diabète et/ou une obésité. Pour cela, nous avons choisi les *Psammomys* ayant le poids le moins élevé comme étant les plus jeunes et ce afin d'augmenter leur « chances » de développer un diabète. A ce propos, Shafrir et al (2000) rapportent que la probabilité de provoquer un diabète de type 2 chez les *Psammomys obesus* diminue avec l'âge, de plus les travaux portant sur l'étude du diabète chez cette espèce utilisent des animaux âgés entre 2 et 3.5 mois vu que les animaux les plus jeunes y sont plus susceptibles (Leibowitz et al, 2001 ; Kaiser et al, 2005 ; Üçkaya et al, 2005). D'autre part et d'après des observations personnelles, il a été constaté que le taux de mortalité était plus élevé chez les *Psammomys* âgés ayant développé un diabète par rapport à ceux développant ce syndrome étant plus jeunes. Ainsi, étant donné que les *Psammomys* à 2 mois d'âge dépassent rarement les 90 g (Koceir, 2003) et que l'âge des animaux est relatif à leur poids, la plupart des *Psammomys* sélectionnés comme étant relativement les plus appropriés à développer un DNID par induction nutritionnelle avaient un poids inférieur à 110 g (76% des *Psammomys* recevant l'aliment standard avaient un poids inférieur à 110 g).

Enfin, à la fin de la période d'acclimatation, les *Psammomys obesus* sont scindés en deux groupes, celui des témoins (T) nourris exclusivement au régime végétal et celui des animaux destinés à recevoir l'aliment synthétique.

### **1.1.3.2 Période de transition ou de « Switch ».**

Durant cette période, le retrait de l'Atriplex se fait progressivement. En effet, dès le 16<sup>ème</sup> jour, chaque *Psammomys* qui était soumis exclusivement au régime végétal durant les 15 jours d'acclimatation, reçoit désormais une ration alimentaire mixte composée d'une quantité constante de l'aliment synthétique (20 g/animal/jour) et une quantité d'Atriplex correspondant à 75% du poids du *Psammomys*, ce qui équivaut à un retrait de 25% par rapport à la quantité fournie durant les 15 jours d'acclimatation et qui correspondait à 100% de son poids. Par la suite, la quantité d'atriplex décroît de 25% tous les 7 jours pour enfin être retirée complètement (0%) de la ration alimentaire au 21<sup>ème</sup> jour de la période de transition correspondant au 37<sup>ème</sup> jour (voir figure 4).



**Figure 4.** Retrait progressif de l'*Atriplex halimus* après la période d'acclimatation.

On précise que de l'eau salée à 0,9% est fournie uniquement aux animaux recevant le régime standard. D'après Schmidt-Nielson (1965), ce sel est nécessaire aux *Psammomys* pour ajuster leur balance hydrique en particulier pour la réabsorption tubulaire de l'eau métabolique contre l'élimination du sodium.

Les *Psammomys* appartenant au groupe témoins (T) continuent à être nourris exclusivement au régime végétal (*Atriplex*), on précise également que contrairement au groupe précédent, ces derniers ne reçoivent pas d'eau vu que celle-ci existe déjà dans l'*Atriplex* (81.35%) (Tableau 1). Ainsi, à partir du 37<sup>ème</sup> jour, autrement dit à la fin de la période de « switch », tous les *Psammomys obesus* exceptés ceux continuant à se nourrir au régime végétal, reçoivent exclusivement de l'aliment standard et de l'eau salée jusqu'à la fin de l'expérimentation.

### 1.1.3.3 Contrôle des *Psammomys*.

Dans le but de distinguer les *Psammomys* ayant développé une hyperglycémie et donc un diabète de type 2 de ceux restant normoglycémiques, la concentration du glucose sanguin des rats de sable se nourrissant exclusivement d'aliment standard est mesurée avec un glucomètre (Glucotrend 2,

Roche Diagnostics, Meylan, France). La concentration est déterminée à partir d'une fine quantité de sang prélevée à partir de la veine saphène. Les Psammomys dont la concentration de glucose sanguin postprandial est inférieure à 1.40 g/l (7.8 mmol/l) sont considérés comme non diabétiques (groupe ND), ceux ayant une concentration sanguine en glucose supérieure à 1.49 g/l (8.3 mmol/l) sont retenus comme diabétiques (groupe D) (Leibowitz et al, 2001; Kaiser et al 2005 ; Üçkaya et al, 2005).

### ***1.2 Albinos albinos***

#### **1.2.1 Induction du diabète par injection de streptozotocine.**

Cette partie a porté sur 50 femelles wistar (Charles River, Bruxelles, Belgique) âgées entre 8 et 10 semaines. Afin d'induire un diabète assimilé au diabète de type 1, le jour de l'injection (Ji), ces rats ont été mis à jeun pendant 6 heures puis ont été injectés par voie intrapéritonéale avec de la streptozotocine (Sigma-Aldrich, Bruxelles, Belgique) fraîchement dissoute dans du tampon citrate 50 mM, pH 4.5, et ce à raison de 65 mg/kg. Les rats témoins ont été injectés avec du tampon citrate (Sigma-Aldrich, Belgique).

Afin d'éviter toute hypoglycémie que pourrait provoquer l'injection de streptozotocine, l'eau des rats injectés à la streptozotocine a été remplacée par une solution de saccharose à 10% durant toute une nuit (Wu et Huang, 2008).

La composition nutritionnelle de l'aliment présenté aux rats Wistar est rapporté dans le tableau 2 :

**Tableau 2.** Composition nutritionnelle de l'aliment standard des rats *Albinos albinos* (Villemoisson-Sur-Orge, France).

<b>Matière</b>	<b>Pourcentage %</b>
Humidité	12
Matière sèche	88
Glucides	52
Matière grasse	5
Protéines	21
Matière minérale	5
Valeur énergétique kcal	3,37

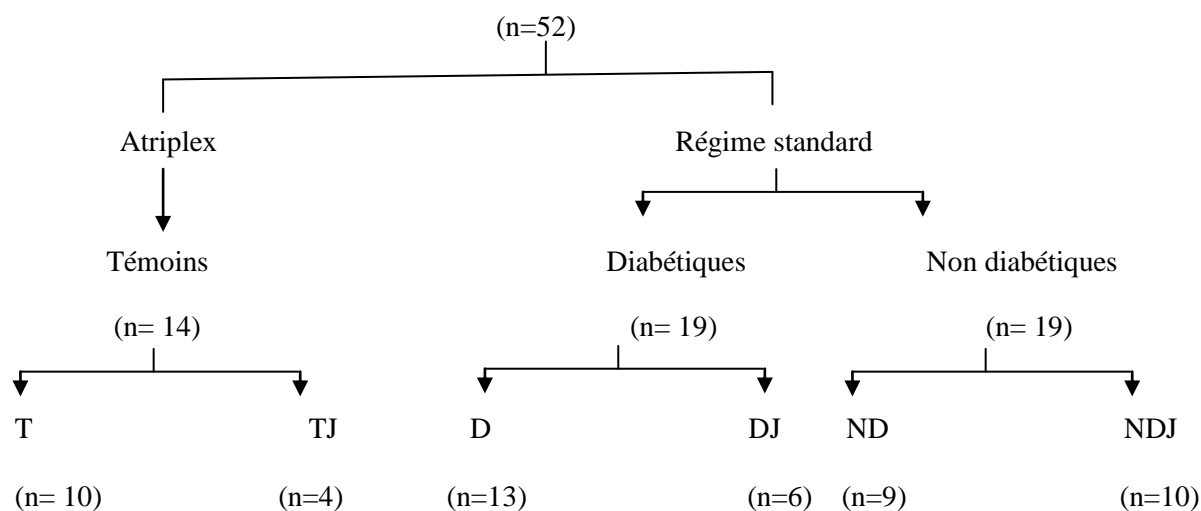
### 1.2.2 Contrôle des *Albinos albinos*

En vue de confirmer l'induction du diabète, la glycémie des rats injectés, mis à jeun, a été mesurée avec un glucomètre (accucheck, Roche, France) 5 jours après l'injection à la streptozotocine. La concentration de glucose sanguin à jeun a été déterminée sur du sang prélevé à partir de la veine caudale. Seuls les rats ayant une glycémie supérieure à 300 mg/ml (16.7 mM ; n=33) ont été retenus pour cette expérimentation.

## 2. Protocole de jeûne.

Plusieurs auteurs se sont intéressés à étudier l'effet d'une restriction calorique sur le métabolisme des diabétiques de type 2. Cette restriction concerne soit une diminution relative de la prise alimentaire, en particulier des régimes restrictifs en hydrates de carbone (Kelley et al, 1993, Christiansen et al, 2008, Kirk et al, 2008) ou lipides (Weigle et al, 1997), ou alors une privation totale de nourriture autrement dit des jeûnes courts (Oishi et al, 2007) ou prolongés (Weigle et al, 1997).



*Psammomys obesus*

**Figure 6.** Répartition des *Psammomys obesus* en fonction de leur statut métabolique (témoins, diabétiques ou obèses) et nutritionnel (jeûneurs et non jeûneurs).

Pour les animaux jeûneurs et durant un mois, chaque jour l'aliment et l'eau sont retirés à 17 h pour être remis le lendemain à 8 h du matin (15 h de jeûne). La sciure servant de litière a également été retirée durant les heures de jeûne afin d'éviter toute phytophagie vu que le *Psammomys* peut la consommer et tirer profit de sa cellulose (Koceir, 2003).

Contrairement au groupe précédent, les animaux non jeûneurs continuent durant ce mois à se nourrir et à recevoir de l'eau (pour le groupe D et ND).

### 2.1.1 Contrôle des *Psammomys* jeûneurs et non jeûneurs.

#### 2.1.1.1 Mesure de la concentration du glucose sanguin

Une semaine après le début du jeûne (S1) (7<sup>ème</sup> jour de jeûne), tous les *Psammomys* jeûneurs, tous groupes confondus, sont contrôlés en état postprandial deux heures après leur avoir remis l'eau et la nourriture à 8 h.

Le sang est prélevé à partir de la veine saphène et la concentration de glucose sanguin est mesurée avec un glucomètre. Ce contrôle est répété à la fin de la 2<sup>ème</sup> (S2), 3<sup>ème</sup> (S3) et 4<sup>ème</sup> semaine du jeûne (S4) correspondant respectivement au 14<sup>ème</sup>, 21<sup>ème</sup> et 30<sup>ème</sup> jour de jeûne.

### **2.1.1.2 Test de la tolérance intrapéritonéale au glucose (IPGTT).**

Un test de tolérance au glucose intrapéritonéale (Horio et al, 2005 ; Lam et al, 2005) a été effectué sur les Psammomys diabétiques et obèses jeûneurs et non jeûneurs. Ce test est réalisé sur des animaux non anesthésiés, au 10<sup>ème</sup> (F1), 20<sup>ème</sup> (F2) et 29<sup>ème</sup> (F3) jour du jeûne.

Afin de comparer la tolérance au glucose entre diabétiques et obèses jeûneurs et non jeûneurs, ces derniers ont également été mis à jeun la veille de chaque IPGTT.

Avant de remettre la nourriture aux Psammomys, la concentration basale (à jeun) du glucose sanguin (t=0 min) est mesurée à l'aide de glucomètre sur du sang prélevé à partir de la veine saphène. Après cette mesure, une solution de 20% de glucose dans de l'eau distillée (2 g /kg de poids) est injectée en intrapéritonéale. La concentration du glucose sanguin est par la suite mesurée à la 30<sup>ème</sup> et la 120<sup>ème</sup> minute après l'injection. La nourriture et l'eau ne sont remises qu'après la mesure du glucose contenu dans le sang.

### **2.1.1.3 Pesée**

Le poids de chaque Psammomys a été évalué hebdomadairement d'une part pour suivre l'évolution de leur poids au cours du développement du diabète de type 2 et d'autre part pour étudier l'influence du jeûne intermittent sur ce paramètre.

### **2.1.1.4 Sacrifice et prélèvement de tissus**

Les animaux sont anesthésiés avec de la kétamine chlorhydrate (Imalgène<sup>R</sup> 1000, France) en injection intrapéritonéale à raison de 1 ml/ Kg de poids. Après décapitation, le sang est prélevé à partir de la veine jugulaire dans des tubes héparinés ou EDTA (pour la mesure du taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c)). Les analyses biochimiques sont réalisées sur du plasma séparé après centrifugation à 5000 tours/min pendant 10 min. Le reste du plasma est congelé à -20°C en vue d'effectuer d'autres analyses.

Le foie et le pancréas ont été prélevés et pesés. Les pancréas et une partie de chaque foie ont été fixés dans une solution de Bouin pour des études histologiques et immunohistochimiques (voir ultérieurement), le reste du foie a été congelés à -20°C pour des analyses biochimiques.

### ***2.2 Albinos albinos***

#### **2.2.1 Le jeûne et la restriction alimentaire.**

Afin de comparer l'effet du jeûne intermittent mimant le jeûne du Ramadan à celui d'une restriction calorique, l'expérimentation sur les rats wistar témoins et STZ a été conduite sur deux périodes successives. Vingt jours après l'injection des rats soit à la streptozotocine ou au tampon citrate, ces derniers ont été chacun scindés en trois groupes, le groupe de rats non jeûneurs (NJ) continuant à recevoir de l'aliment tout au long de la période expérimentale durant 30 jours, le groupe des rats jeûneurs (J) subissant le même protocole de jeûne auquel ont été soumis les *Psammomys* et ce durant 30 jours (voir figure 5) et enfin le groupe de rats soumis à une restriction calorique de 20% et 40% respectivement pour les rats témoins et les rats STZ. L'expérimentation sur les rats subissant une restriction calorique n'a commencé qu'après avoir fini celle du jeûne. En effet, la quantité d'aliment consommé durant le période de jeûne nous a permis de déterminer le pourcentage de restriction auquel seront soumis les rats témoins et STZ appartenant au 3<sup>ème</sup> groupe (CR).

#### **2.2.2 Pesée.**

Afin d'estimer la quantité d'aliment ingéré durant la période de jeûne, et qui servira par la suite pour restreindre les rats subissant une restriction calorique au même taux de consommation, la nourriture restante a été pesée quotidiennement. Concernant le poids corporel des rats, celui-ci a été enregistré deux fois par semaine.

### **2.2.3 Test de la tolérance intrapéritonéale au glucose (IPGTT).**

Un test de tolérance au glucose intrapéritonéale a été effectué sur les rats témoins et streptozotocine non jeûneurs, jeûneurs et ceux subissant une restriction calorique. Ce test a été réalisé selon la procédure décrite plus haut. Les 2 seules différences consistent en le prélèvement du sang à partir de la veine caudale et à la mesure de la glycémie à la 60<sup>ème</sup> minute.

### **2.2.4 Sacrifice et prélèvement des organes.**

A la fin de l'expérimentation, les rats ont été sacrifiés après être anesthésiés à la kétamine/xylocaïne (2v/1v) en injection intrapéritonéale à raison de 1 ml/ Kg de poids.

Le sang est prélevé à partir du cœur et mis dans des tubes héparinés. Le plasma est séparé après centrifugation à 3000 tours/min pendant 20 min et est conservé à -80°C.

Les pancréas ont été soit digérés pour une sécrétion statique d'insuline ou alors prélevés, pesés puis fixés dans du formol à 10% pour des études immunohistochimiques.

Le foie et le rein ont été pesés puis fixés dans du formol 10%.

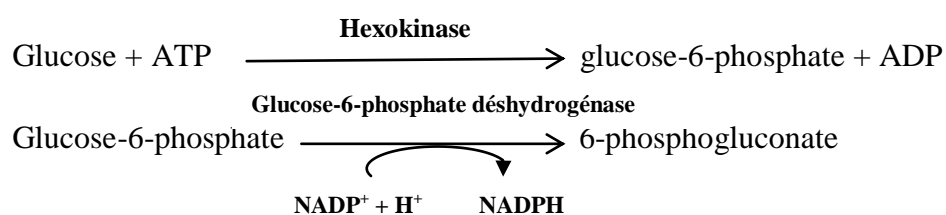
## **3. Analyses**

### **3.1 Dosage biochimiques**

#### **3.1.1 Paramètres plasmatiques**

##### **3.1.1.1 Glucose**

Le glucose est dosé en microméthode par une méthode enzymatique à l'aide d'un spectrophotomètre (lecture à 340 nm). Le principe de ce dosage est basé sur les réactions décrites ci-dessous :



Ce dosage est réalisé en suivant le protocole établi par Bergmeyer et Berndt (1974).

### **3.1.1.2 HbA1c**

L'hémoglobine glyquée est mesurée à l'aide du Bio-Rad DiaSTAT<sub>TM</sub> Hemoglobin A1c Program qui est utilisé sur le Bio-Rad DiaSTAT Analyzer (Bio-RAD, France). Le DiaSTAT fait appel à la chromatographie par échange cationique à basse pression conjointement à un gradient d'éluion pour séparer les sous-types et variantes d'hémoglobine humaine du sang total hémolysé (Ersser et al, 1986). Les fractions d'hémoglobine séparées sont surveillées par absorption lumineuse à 415 nm.

### **3.1.1.3 Cholestérol et triglycérides**

Le dosage du cholestérol et des triglycérides a été fait à l'aide de kit ELITech (France).

### **3.1.1.4 Créatinine et urée**

La créatinine et l'urée ont été mesurées en utilisant l'analyseur automatique COBAS C111 (ROCHE Diagnostics, Indianapolis, IN 46256). Les réactifs sont fournis avec l'automat.

## **3.1.2 Paramètres organiques**

### **3.1.2.1 Triglycérides et phospholipides**

Les triglycérides hépatiques (Roche Diagnostic GmbH, Allemagne) et les phospholipides (Biomerieux, France) ont été mesurés dans des extraits de foie, en utilisant les kits enzymatiques cités.

## **3.2 Dosage de l'insuline par RIA**

La concentration de l'insuline plasmatique et la quantité d'insuline sécrétée par les îlots ainsi que le contenu de ces derniers en insuline ont été mesurés par Radioimmunoassy (Leclercq-Meyer et al, 1985). L'insuline-I<sup>125</sup> (Perkin Elmer Life Science, Boston, USA) et l'insuline standard de rat (Novo Nordisk) sont utilisées.

Durant l'incubation, l'insuline-I<sup>125</sup> et l'insuline non marquée des échantillons standards et des tests se lient compétitivement à une quantité définie d'anticorps anti-insuline (préparé par le Dr Leclercq-Meyer, ULB). Le complexe Ac-Ag est ensuite séparé de l'insuline I<sup>125</sup> libre par une précipitation au charbon-dextran. La radioactivité du culot résultant est comptée dans un compteur gamma. Après

avoir fait une courbe standard du pourcentage de liaison radioactif, le contenu en insuline dans les échantillons peut être calculé.

### **3.3 Sécrétion statique d'insuline**

#### **3.3.1 Collecte des îlots de Langerhans**

En vue de collecter des îlots de Langerhans, une digestion du pancréas est effectuée en utilisant une solution de collagénase. A cet effet, 5.8 mg et 5 mg de collagénase (Roche, France) sont dissoutes chacune dans 15 ml de Hanks pour servir à la digestion de pancréas de rats témoins et de rats STZ, respectivement. La composition de la solution de Hanks est donnée en annexe 1.

Après euthanasie des rats, leur abdomen est ouvert et leur intestins et foie sont dégagés très délicatement. Le canal ductal du pancréas est repéré et une très fine incision y est pratiquée. Une solution de collagénase (10 ml) y est perfusée. Le pancréas est alors récupéré et mis dans le flacon contenant le reste de la solution de collagénase. Celui-ci est incubé dans un bain marie à 37°C. Après 15 min d'incubation, environ 15 ml de Hanks sont ajoutés dans le flacon et ce dernier est agité manuellement pendant 1 minute. L'agitation devient plus rigoureuse afin d'obtenir une suspension à l'aspect relativement homogène. Le contenu du tube est ensuite filtré sur une étamine dans un cristalliseur. De l'Hanks est ajouté dans ce cristalliseur et le tout est homogénéisé. Après 2 min de sédimentation, le surnageant est délicatement aspiré. De l'Hanks y est remis et l'opération est répétée en laissant sédimenter 1.30 min puis une minute. Enfin, de l'Hanks y est ajouté et une pêche des îlots à l'aide d'une pipette pasteur albuminisée y est pratiquée sous microscope binoculaire.

#### **3.3.2 Protocole de sécrétion statique d'insuline**

Les îlots pêchés sont distribués dans 30 cupules à raison de 4 îlots/cupule. Trois milieux d'incubation, se différenciant uniquement par leur concentration en D-Glucose anhydre (2.8 mM, 8.3 mM et 16.7 mM) (voir annexe 1), sont distribués chacun dans un lot de 10 cupules à raison de 0,5 ml/cupule. Les cupules sont incubées, gazées pendant 5 min avec un mélange O<sub>2</sub> (95%)-CO<sub>2</sub> (5%) et sont incubées 90 min à 37°C. Au bout de ces 90 min d'incubation, le surnageant est prélevé et est stocké à -20°C pour un dosage ultérieur d'insuline. Enfin, 0,5 ml de CM (annexe 1) sont ajoutés aux 4 îlots

restant dans la cupule et y sont sonifiés deux fois pendant 10 secondes puis sont stockés également à -20°C pour un dosage ultérieur du contenu des îlots en insuline.

### **3.4 Histologie**

#### **3.4.1 Préparation des lames**

Après fixation des organes, ces derniers sont déshydratés par un passage successif dans deux bains d'alcools 70° puis 96°. Ensuite ils sont clarifiés dans un bain d'alcool- chloroforme (50%-50%), puis dans un autre contenant du chloroforme à 100%. Les cassettes portant les organes sont imprégnées dans de la paraffine (56°C) toute une nuit. Les organes sont mis en bloc et sont coupés par un microtome.

#### **3.4.2 Etude histologique par coloration à l'hématoxyline-éosine**

Après avoir déparaffiné et réhydraté les sections de foie et de rein, celles-ci sont placées dans une solution d'hématoxyline pendant 30 min. Après un bref lavage à l'eau courante, une différenciation dans un bain acide-alcool à 1% est effectuée. Les lames sont ensuite rincées avec de l'eau de robinet puis contre colorées à l'éosine pendant 10 minutes. Il s'ensuit une déshydratation par des passages dans des bains croissant d'alcool et enfin deux bains de xylène. Le Montage des lames-lamelles se fait avec une colle spéciale ; le baume de Canada. Enfin ces lames sont placées dans une étuve réglée à 56°C pendant une nuit.

#### **3.4.3 Etude histologique par coloration à l'acide périodique de Schiff (PAS)**

Après avoir déparaffiné et réhydraté les sections de foie et de rein, celles-ci sont placées dans une solution d'acide périodique 1% (Sigma Aldrich, Belgique). Au bout de 10 min, les lames sont rincées dans de l'eau courante durant 5 min puis dans de l'eau distillée durant quelques secondes. Les lames sont ensuite trempées dans du réactif de schiff (Sigma Aldrich, Belgique) pendant 15 min puis rincer à l'eau courante puis à l'eau distillée pour être trempées après dans de l'hématoxyline de Mayer (2 min) (Sigma Aldrich, Belgique). Ces lames sont enfin rincées puis déshydratées en vue du montage lame-lamelle.

### **3.4.4 Etude immunohistochimique du pancréas**

#### **3.4.4.1 Marquage de l'insuline**

##### **a. Marquage ABC-DAB**

L'immunodétection de l'insuline a été réalisée par la technique standard ABC-DAB (Hsu et al, 1981) et ce en utilisant le kit Avidine-biotine (Vector Laboratories, USA). Après réhydratation des sections déparaffinées par des passages dans des bains à concentrations décroissantes en alcool (100°-90°-70°), celles-ci sont incubées dans le PBS 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 20 minutes. Il s'ensuit un blocage des sites non spécifiques avec le sérum normal de chèvre (Normal Goat Serum) (Vector Labs, USA) suivi par un blocage à l'avidine-biotine. L'anticorps primaire anti-insuline à la dilution 1 :500 (Sancta Cruz, Biotechnology, USA) est mis en contact avec les sections pendant 1 nuit à 4°C. Le lendemain, les sections sont lavées dans du PBS puis mises en contact avec l'anticorps secondaire biotinylé de chèvre anti-lapin (goat anti-rabbit biotinylated) dilué au 1/300 (Vector Laboratories, USA). Après 30 min d'incubation à température ambiante, ces sections sont lavées puis traitées avec le complexe ABC (avidine biotine complex) (Vector Labs) pendant 30 minutes à T° ambiante. Les sites de liaisons sont ensuite révélés par l'utilisation du DAB (3, 3'-diaminobenzidine) (Vector Labs, USA). Les lames sont ensuite contre colorées à l'hématoxyline de Harris puis lavées à l'eau courante. Enfin, elles subissent une déshydratation dans des bains à concentrations croissantes d'alcool puis dans du xylène. La lecture des lames se fait à l'aide d'un microscope photonique (Leica microsystèmes, Suisse) et les images sont enregistrées avec une caméra intégrée (Carl Zeiss).

##### **b. Marquage immunofluorescent**

Les sections pancréatiques déparaffinées et réhydratées, sont bloquées avec 1/20 de sérum normal de chèvre (Vector Laboratories, USA) à T° ambiante. Une heure après, ces sections sont lavées au PBS puis mises en contact avec un anticorps monoclonal de souris anti-insuline à la concentration 1/3000 (Sigma-Aldrich, Belgique). Après une nuit d'incubation à 4°C, les lames sont lavées puis traitées avec un anticorps secondaire, Rhodamine Red X-conjugué à l'IgG de chèvre anti-souris (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA) dilué au 1/100 dans du PBS/sérum normal de chèvre. L'incubation se fait à température ambiante pendant 30 minutes. Les lames sont ensuite montées et

l'ADN est contre coloré avec du DAPI (Prolong® Gold antifade, molecular Probes). La lecture se fait avec le microscope à fluorescence Axioplan et les photos sont enregistrées avec l'Axiocam (Carl Zeiss, Allemagne).

### **3.4.4.2 Marquage au glucagon**

L'immuno détection du glucagon est également réalisée par la technique ABC-DAB (Hsu et al, 1981) décrites précédemment. Dans ce cas, l'anticorps primaire utilisé à la dilution 1 :400 est l'anti-Glucagon (Dako, Allemagne).

### **3.4.4.3 Quantification de la mort cellulaire par technique du TUNEL**

L'apoptose est détectée par la méthode TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick-End Labeling). Son principe repose sur la détection par le TUNEL du 3'OH libre du brin rompu résultant de la fragmentation de l'ADN. Le protocole utilisé pour détecter cette fragmentation de l'ADN est celui décrit par le fournisseur du *In Situ Cell Death Detection kit, POD* (Roche Diagnostics, Allemagne). Les étapes de réhydratation et du blocage des sites non spécifiques par le sérum normal de chèvre, sont les mêmes que celles décrites pour la technique ABC-DAB. Les lames sont ensuite traitées soit à la DNase I 1 mg/ml (WVR, Belgique) pour les contrôles positifs (2 lames), soit au Label Solution pour les lames contrôles négatifs (2 lames) ou alors avec une solution TUNEL MIXTURE pour toutes les lames à étudier. Après une heure d'incubation à 37°C, les lames sont rincées dans du PBS puis incubées avec du Converter-POD pendant 30 min à 37°C. Du DAB-Nickel est déposé sur chaque section de tissu. Cinq minutes après, les lames sont rincées dans du PBS puis mises au contact de l'anticorps primaire anti-insuline (Sigma-Aldrich, Belgique) à la dilution 1/3000. Après une nuit d'incubation à 4°C, les lames sont rincées au PBS puis mises au contact d'un anticorps secondaire (Rhodamine Red X-conjugué à l'IgG de chèvre anti-souris) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA) à la dilution 1/200 pendant 30 min à température ambiante. Enfin, l'étape de montage est réalisée après rinçage des lames au PBS.

Des photos d'îlots ont été enregistrées avec l'Axiocam (Carl Zeiss, Allemagne) intégrée au microscope à fluorescence Axioplan. Les noyaux positifs (apoptotiques) et les noyaux non

apoptotiques sont comptés pour chaque îlot. L'index apoptotique représente le rapport entre le nombre de noyau positifs et le nombre total de noyaux de l'îlot.

### **3.4.4.4 Analyse morphométrique**

#### **a. La masse des cellules bêta ( $\beta$ cell mass)**

La masse cellulaire bêta est quantifiée par la méthode morphométrique de comptage de point (Biarnés et al, 2002) à partir de sections pancréatiques immunomarquées à l'insuline par la technique ABC-DAB décrite précédemment.

Les sections sont analysées en « live » avec le microscope Leica Microsystems en utilisant un fin film transparent comportant des points et fixé sur un écran d'ordinateur pour le comptage des points. Le volume relatif des cellules  $\beta$  représente le ratio entre le nombre de points positifs pour l'insuline sur le total du tissu pancréatique (exocrine et endocrine non-bêta). La masse cellulaire  $\beta$  pour chaque section représente le produit du volume relatif et du poids du pancréas correspondant à la section.

#### **b. La taille individuelle des cellules $\beta$**

En utilisant des images calibres, une mesure de la taille individuelle des cellules  $\beta$  ( $\beta$ -cell size) a pu être effectuée. Le logiciel Image J (NIH) permet cette quantification; la taille d'un îlot de la cellule  $\beta$  marquée à l'insuline d'une section pancréatique est divisée par le nombre de noyaux identifiés dans cette zone insuline positive.

### **3.4.5 Etude immunohistochimique du rein: Calcul de l'index PCNA (proliferating cell nuclear antigen)**

Des sections rénales (4  $\mu$ m) ont été déparaffinées avec du xylène, puis incubées durant 5 min dans de l'isopropanol puis 30 min dans du méthanol contenant 3% d' $H_2O_2$ . Les lames ont été ensuite rincées dans du PBS puis incubées pendant 1 h dans du sérum normal de chèvre à 5% (Abcam ab7481; Cambridge, UK). Les lames ont été ensuite incubées avec un anticorps primaire polyclonal de lapin anti PCNA (Abcam ab2426; Cambridge, UK) pendant une nuit à 4°C. Les lames témoins ont été

## ***MATERIELS ET MÉTHODES***

---

incubées uniquement dans du sérum normal de chèvre. L'utilisation du kit de détection avidin-biotin (Vector, PK 6101, Peterborough, UK) a permis de détecter les cellules PCNA<sup>+</sup>. La révélation des noyaux positifs a été réalisée en utilisant le 3,3'-diaminobenzidine comme chromogène. Les noyaux positifs ont été comptés sur une totalité de 20 champs en utilisant un microscope optique (agrandissement x400). L'index PCNA représente le rapport entre le nombre de cellules positives au PCNA et le nombre total de cellules.

### **3.5 Etudes statistiques**

Les résultats sont exprimés comme la valeur de la moyenne plus ou moins l'erreur standard sur la moyenne (S.E.M) avec le nombre de mesures individuelles (n) ou le degré de liberté (df). Les significations statistiques des différences entre les valeurs moyennes sont évaluées par l'utilisation du test Student.

# RÉSULTATS

---

## RÉSULTATS

### . Chapitre I

#### Effet du jeûne intermittent sur des paramètres biochimiques et organiques chez les

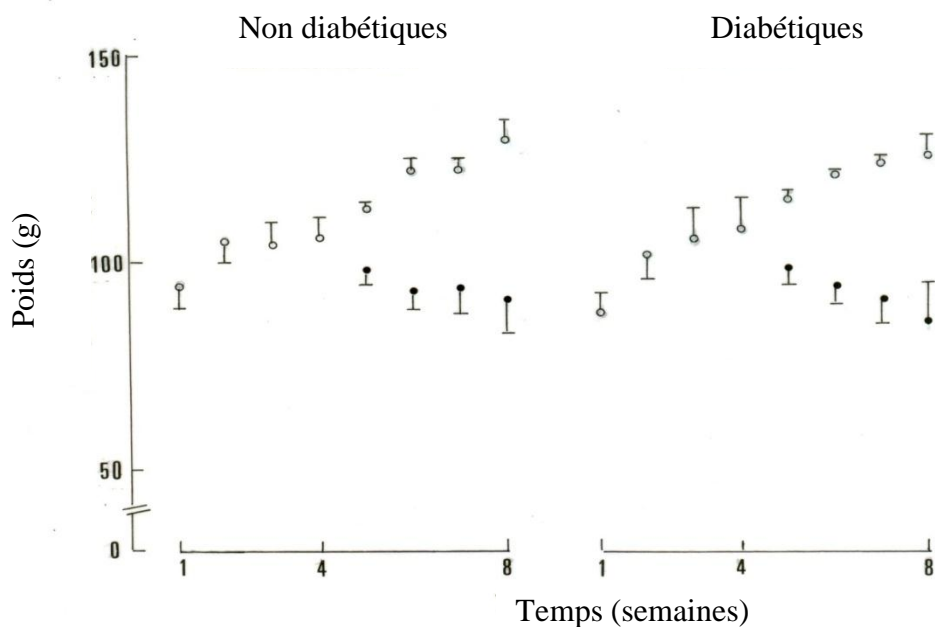
#### **Psammomys obesus**

##### **1 Etude in vivo**

##### **1.1 Evolution du poids corporel**

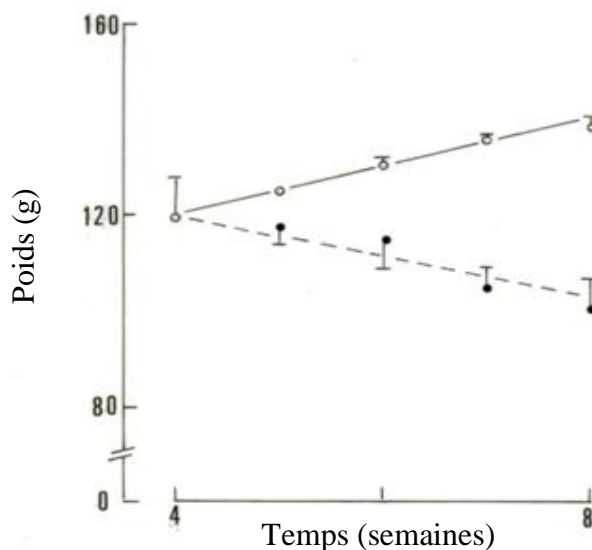
Durant les 3 semaines de la période de transition, l'évolution du poids corporel ne diffère pas significativement ( $dl = 34$ ;  $p > 0,1$ ) entre les *Psammomys* diabétiques et non diabétiques (figure 7). L'ensemble des *Psammomys*, diabétiques et non diabétiques ont enregistré un gain de poids de  $15,5 \pm 2,6$  g ( $n = 38$ ), soit une augmentation d'environ 18% ( $p < 0,001$ ) par rapport au poids enregistré au début de la période de transition. A la fin de cette période, le poids des *Psammomys* diabétiques ( $107,4 \pm 7,9$  g;  $n = 19$ ) avoisine ( $p > 0,8$ ) celui des non diabétiques ( $105,5 \pm 5,3$  g;  $n = 19$ ). Les valeurs enregistrées chez ces deux groupes sont faibles ( $p > 0,05$ ) comparées à celles enregistrées chez les *Psammomys* témoins ( $120,0 \pm 8,6$  g;  $n = 8$ ). A la fin des 30 derniers jours de l'expérimentation, les rats diabétiques non jeûneurs enregistrent un gain de poids de  $19,2 \pm 3,5$  g ( $n = 13$ ;  $p < 0,001$ ); ce qui représente  $21,7 \pm 3,7$  % ( $n = 13$ ) du poids enregistré au début de cette période. Chez les *Psammomys* diabétiques jeûneurs, la situation est relativement différente ( $p < 0,001$ ). En effet, leur poids diminue de  $15,0 \pm 7,2$  % ( $p < 0,01$ ), soit une perte de  $24,2 \pm 11,4$  g ( $n = 6$ ;  $p < 0,09$ ).

Concernant les rats non diabétiques, à la fin de la période des 30 jours, les rats non jeûneurs enregistrent un gain de poids de  $23,9 \pm 4,5$  g ( $n = 9$ ;  $p < 0,001$ ), représentant une augmentation de  $22,3 \pm 3,4$  % ( $n = 9$ ). Les rats non diabétiques jeûneurs perdent  $15,0 \pm 7,9$  g ( $n = 10$ ;  $p < 0,1$ ), ce qui équivaut à une perte de poids de  $11,6 \pm 7,1$  % ( $p > 0,1$ ). L'évolution du poids corporel chez les *Psammomys* diabétiques et non diabétiques est illustrée dans la figure 7.



**Figure 7.** Evolution du poids corporel chez les *Psammomys obesus* diabétiques et non diabétiques, non jeûneurs (○), et jeûneurs (●) durant toute l'expérimentation.

Le poids corporel des rats témoins durant les 4 dernières semaines de l'expérimentation (figure 8) évolue différemment entre ceux continuant à se nourrir ad libitum et ceux soumis au jeûne intermittent. En effet, le poids des rats témoins non jeûneurs augmente de  $18,8 \pm 2,4$  g ( $n = 4$ ;  $p < 0,005$ ), soit un gain de  $17,2 \pm 1,6$  %, alors que celui des rats témoins jeûneurs diminue de  $20,0 \pm 7,4$  g ( $n = 4$ ) représentant une perte de poids estimée à  $15,3 \pm 4,6$  % ( $p < 0,05$ ).



**Figure 8.** Evolution du poids corporel chez les *Psammomys obesus* témoins non jeûneurs (○) et jeûneurs (●) durant les 30 derniers jours d'expérimentation ( $n=4$ ).

### 1.2 Consommation alimentaire

Les valeurs moyennes de la consommation alimentaire, obtenues à partir de la mesure quotidienne durant la période de « non jeûne » et du jeûne intermittent, sont représentées dans le tableau 3.

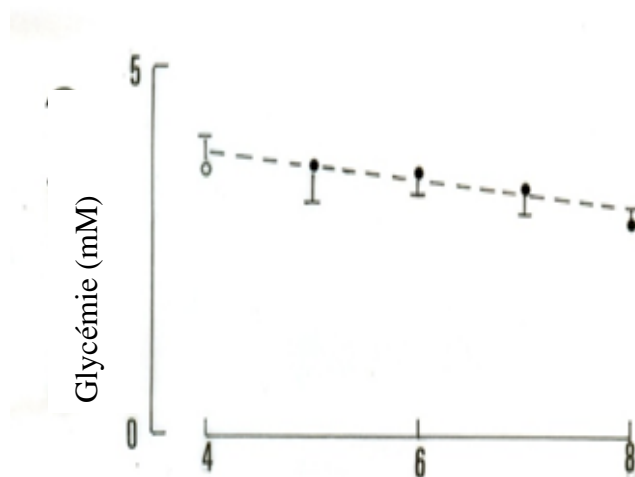
Chez les *Psammomys* témoins non jeûneurs, la consommation alimentaire durant les 4 dernières semaines de l'expérimentation atteint en moyenne  $82,3 \pm 9,5$  g/jour/rat, correspondant à une consommation calorique de  $34,6 \pm 4,0$  kcal/jour/rat. Durant ces 4 semaines, les rats non diabétiques et diabétiques non jeûneurs consomment respectivement en moyenne  $16,6 \pm 0,6$  et  $16,3 \pm 0,6$  g/ jour/rat, soit  $47,7 \pm 1,7$  kcal/ jour/rat. Ainsi, en terme de calories, la consommation apparaît élevée ( $p < 0,02$ ) chez les *Psammomys* nourris à l'aliment synthétique par rapport à ceux nourris à l'Atriplex. Durant la période de jeûne, les *Psammomys* témoins consomment durant la phase de réalimentation (9 h), moins de la moitié de la quantité consommée par les *Psammomys* témoins non jeûneurs ( $p < 0,004$ ), soit  $33,5 \pm 6,3$  g/jour/rat. Il en est de même pour les *Psammomys* non diabétiques ou diabétiques jeûneurs. En effet, la consommation alimentaire des deux groupes confondus ( $n=12$ ) est de  $16,4 \pm 0,4$  g/jour/rat alors que la consommation de ceux soumis au jeûne ( $n=12$ ) est de  $10,0 \pm 0,5$  ( $p < 0,001$ ).

**Tableau 3.** Consommation alimentaire chez les *Psammomys obesus*.

<i>Psammomys obesus</i>		Consommation alimentaire (g / jour)			
		5 <sup>ème</sup> semaine	6 <sup>ème</sup> semaine	7 <sup>ème</sup> semaine	8 <sup>ème</sup> semaine
Témoins	Non jeûneurs	$87,3 \pm 9,5$	$80,4 \pm 9,2$	$79,5 \pm 8,0$	$81,9 \pm 11,3$
	Jeûneurs	$34,6 \pm 6,7$	$33,8 \pm 7,9$	$32,7 \pm 5,2$	$33,0 \pm 5,2$
Non diabétiques	Non jeûneurs	$15,9 \pm 0,7$	$16,6 \pm 0,6$	$16,9 \pm 0,5$	$16,8 \pm 0,6$
	Jeûneurs	$11,7 \pm 0,5$	$10,0 \pm 0,6$	$9,8 \pm 0,5$	$9,4 \pm 0,7$
Diabétiques	Non jeûneurs	$15,8 \pm 0,5$	$16,3 \pm 0,5$	$16,6 \pm 0,6$	$16,6 \pm 0,7$
	Jeûneurs	$10,3 \pm 1,3$	$9,5 \pm 0,8$	$9,7 \pm 0,5$	$9,4 \pm 0,7$

### 1.3 Glycémie postprandiale

Chez les jeûneurs, la glycémie postprandiale a été mesurée 2 heures après l'arrêt du jeûne, autrement dit à 10 h du matin. Chez les *Psammomys* témoins et avant la période de jeûne, la glycémie postprandiale atteignait  $3,63 \pm 0,45$  mM ( $n = 4$ ). Cette glycémie diminue de  $0,74 \pm 0,30$  mM ( $n = 4$ ;  $p < 0,01$ ) durant la période de jeûne mais reste pratiquement stable (figure 9) tout au long de cette période.



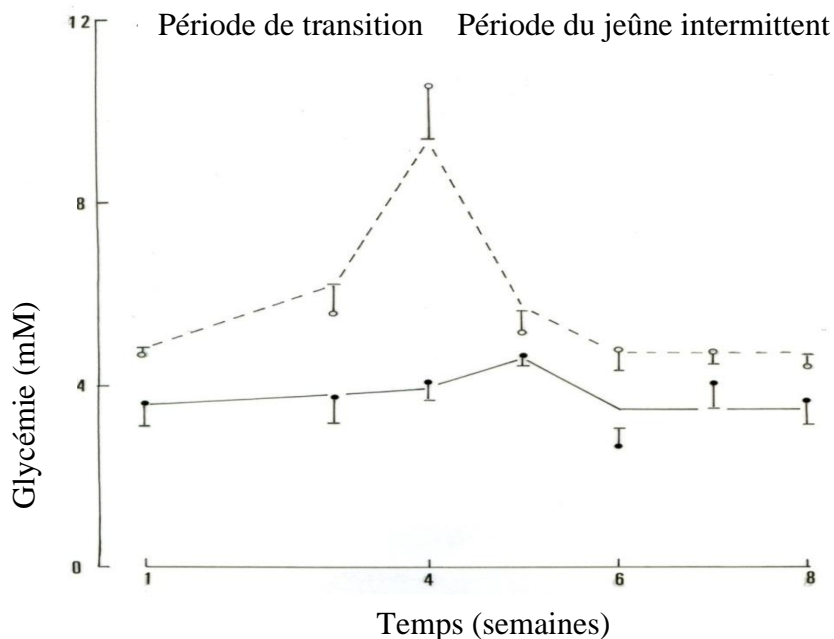
**Figure 9.** Evolution de la glycémie postprandiale des *Psammomys* témoins jeûneurs ( $n=4$ ).

La situation est différente chez les *Psammomys* non diabétiques et diabétiques jeûneurs. Juste avant la période de transition, la glycémie postprandiale est déjà relativement basse ( $p < 0,1$ ) chez les non diabétiques ( $3,61 \pm 0,49$  mM;  $n = 6$ ) par rapport aux diabétiques ( $4,68 \pm 0,15$  mM;  $n = 6$ ). Cette différence devient plus accentuée ( $p < 0,06$ ) deux semaines après la période de transition, avec une valeur moyenne de  $3,75 \pm 0,58$  mM ( $n = 6$ ) chez les *Psammomys* non diabétiques et  $5,59 \pm 0,60$  mM ( $n = 6$ ) chez les diabétiques (Figure 10). Elle devient hautement significative ( $p < 0,001$ ) 3 semaines après la transition à l'aliment synthétique où l'on constate que toutes les glycémies des rats diabétiques excèdent 8,3 mM ( $10,63 \pm 1,22$  mM;  $n = 6$ ), alors qu'elle n'atteint que  $4,06 \pm 0,41$  mM ( $n = 6$ ) chez les non diabétiques. L'augmentation de la glycémie chez les *Psammomys* diabétiques est estimée à  $5,95 \pm 1,26$  mM ( $n = 6$ ) alors qu'elle n'est que de  $0,45 \pm 0,56$  mM ( $n = 6$ ) chez les non diabétiques ( $p < 0,005$ ).

## RÉSULTATS

La situation durant les 3 semaines de transition est comparable chez les *Psammomys obesus* qui ne seront pas soumis au jeûne, et chez qui la glycémie postprandiale atteint en moyenne avant et à la fin de la période de transition respectivement,  $3,51 \pm 0,26$  et  $4,96 \pm 0,39$  mM chez les *Psammomys* non diabétiques ( $n = 9$ ) et  $3,97 \pm 0,19$  mM et  $11,70 \pm 0,92$  mM chez les diabétiques ( $n = 13$ ). En effet, le cumul de toutes les données permet de constater que la glycémie postprandiale est significativement plus élevée ( $p < 0,03$ ) chez les rats diabétiques ( $4,19 \pm 0,16$  mM;  $n = 19$ ) par rapport aux non diabétiques ( $3,55 \pm 0,24$  mM;  $n = 15$ ) avant même le changement du régime alimentaire.

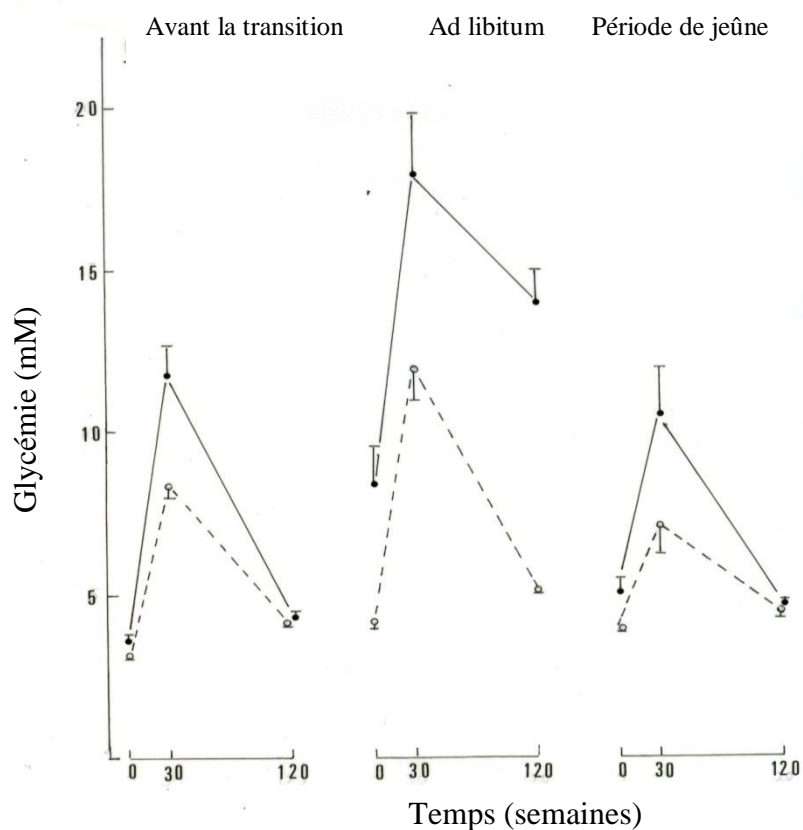
Durant la période du jeûne intermittent, la glycémie postprandiale ne baisse pas de manière significative chez les rats non diabétiques, avec en moyenne une diminution hebdomadaire de  $0,09 \pm 0,39$  mM ( $n = 24$ ;  $p > 0,8$ ). Chez les rats diabétiques jeûneurs, une telle diminution hebdomadaire atteint  $1,53 \pm 0,58$  mM ( $n = 24$ ;  $p < 0,02$ ). Comme le montre la figure 10, cette diminution de la glycémie postprandiale chez les rats diabétiques est plus prononcée durant la 1<sup>ère</sup> semaine de jeûne où elle atteint en moyenne  $5,45 \pm 1,11$  mM ( $n = 6$ ). A la fin des 2 dernières semaines de jeûne, la glycémie postprandiale est significativement plus élevée ( $p < 0,005$ ) chez les rats diabétiques ( $4,67 \pm 0,21$  mM;  $n = 18$ ) par rapport aux non diabétiques.



**Figure 10.** Evolution de la glycémie postprandiale chez les *Psammomys* diabétiques (cercle clair) ( $n=6$ ) et non diabétiques (cercle noir) ( $n=6$ ).

### 1.4 Test de tolérance intrapéritonéale au glucose (IPGTT)

Comme attendu, avant la période de transition totale, l'IPGTT génère des résultats confirmant ceux observés pour la glycémie postprandiale. Déjà pendant la période de transition, l'IPGTT diffère entre les rats désignés plus tard comme diabétiques ou non diabétiques (figure 11). En effet, malgré le fait qu'au temps 0 et qu'à la 120<sup>ème</sup> min les valeurs moyennes de la glycémie chez les diabétiques sont légèrement, mais non significativement, plus élevées par rapport à celles enregistrées chez les non diabétiques, le pic de glycémie à la 30<sup>ème</sup> min est significativement plus élevé ( $p < 0,003$ ) chez les Psammomys diabétiques ( $11,80 \pm 0,89$  mM;  $n = 12$ ) que les non diabétiques ( $8,38 \pm 0,39$  mM;  $n = 12$ ).



**Figure 11.** Evaluation de la tolérance au glucose par test d'IPGTT avant la transition et au 29<sup>ème</sup> jour de jeûne chez les Psammomys obesus non diabétiques (ligne discontinue) et diabétiques (ligne continue) non jeûneurs (A) et jeûneurs (B).

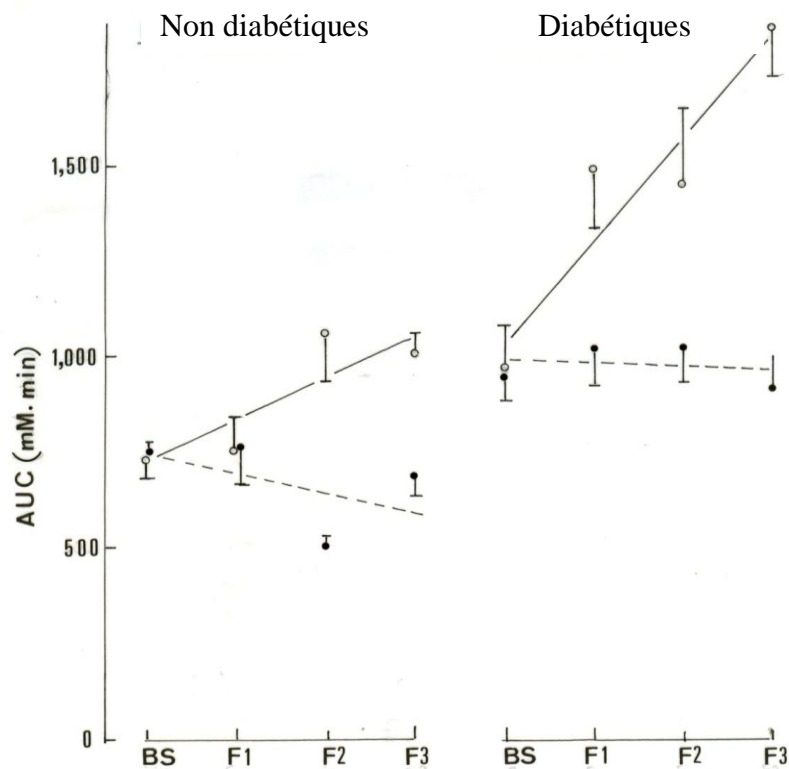
Durant la période des 30 jours d'expérimentation, la situation est également différente entre les Psammomys diabétiques et non diabétiques. Chez les rats non diabétiques non jeûneurs, une

## RÉSULTATS

---

détérioration progressive de la tolérance au glucose est observée ( $n = 6$ ). La surface sous la courbe (AUC) passe de ( $p < 0,005$ ) de  $732,9 \pm 42,5$  mM.min avant la période de transition à  $1008,5 \pm 59,3$  mM.min ( $n = 6$ ) à la fin des 30 derniers jours de l'expérimentation (figure 12). De plus, il y a une corrélation positive élevée ( $r = + 0,5172$ ;  $n = 24$ ;  $p < 0,01$ ) entre les valeurs individuelles pour cette surface et le jour où a été réalisé l'IPGTT c'est-à-dire avant la transition, au 10<sup>ème</sup>, 20<sup>ème</sup> et enfin au 29<sup>ème</sup> jour de l'expérimentation. Une telle détérioration n'a pas eu lieu chez les rats non diabétiques soumis au jeûne intermittent, chez qui l'AUC n'est pas plus élevée à la fin de la période de jeûne ( $689,3 \pm 54,1$  mM.min;  $n = 6$ ) qu'avant la période de transition ( $745,1 \pm 39,6$  mM.min;  $n = 6$ ). Après le 20<sup>ème</sup> et 29<sup>ème</sup> jour de jeûne, l'AUC durant le test IPGTT représente  $57,6 \pm 4,4$  % ( $n = 12$ ;  $p < 0,001$ ) de la moyenne retrouvée au même jour du test chez les rats non diabétiques non jeûneurs ( $100,0 \pm 6,5$  %;  $n = 12$ ).

Chez les *Psammomys* non jeûneurs, la détérioration de la tolérance au glucose est plus rapide chez les rats diabétiques que non diabétiques. L'AUC durant le test IPGTT, réalisé avant la période de transition, est déjà plus élevée ( $p < 0,005$ ) chez les *Psammomys* diabétiques ( $954,8 \pm 60,6$  mM.min;  $n = 12$ ) que chez les non diabétiques ( $739,0 \pm 27,8$  mM.min;  $n = 12$ ). D'autre part, chez les rats diabétiques non jeûneurs, l'AUC passe de  $967,2 \pm 113,4$  mM.min ( $n = 6$ ) avant la transition à  $1494,3 \pm 155,2$  mM.min ( $p < 0,025$ ;  $n = 6$ ) au 10<sup>ème</sup> jour de la période des 30 derniers jours, alors qu'aucun changement significatif ( $p > 0,8$ ) n'a été enregistré chez les rats non diabétiques non jeûneurs ( $732,9 \pm 42,5$  mM.min Vs  $757,2 \pm 96,2$  mM.min;  $n = 6$  pour les deux cas) durant les mêmes périodes. Enfin, chez les non diabétiques, une augmentation tardive ( $p < 0,03$ ) ( $1036,6 \pm 68,5$  mM.min;  $n = 12$ ) a été enregistrée au 20<sup>ème</sup> et 29<sup>ème</sup> jour après le début de la période des 30 jours; ceci n'est pas le cas pour les rats diabétiques jeûneurs chez qui les valeurs moyennes atteintes au 10<sup>ème</sup> jour ( $1494,3 \pm 155,2$  mM.min;  $n = 6$ ) ne diffèrent pas significativement ( $p > 0,4$ ) de celles enregistrées au 20<sup>ème</sup> et 29<sup>ème</sup> jour ( $1664,0 \pm 128,9$  mM.min;  $n = 12$ ). Chez les rats non diabétiques jeûneurs, l'AUC ne diffère pas significativement entre celle de la période avant la transition et l'AUC retrouvée durant les 3 tests d'IPGTT (F1, F2 et F3) (figure 12). Cette surface (AUC) est diminuée chez les rats diabétiques jeûneurs par rapport aux non jeûneurs, que ce soit à la 1<sup>ère</sup> ( $p < 0,03$ ) ou dernière IPGTT ( $p < 0,001$ ) effectuée durant cette période.



**Figure 12.** La surface sous la courbe (AUC) durant le test de tolérance au glucose (IPGTT) réalisé chez des *Psammomys* non jeûneurs (ligne continue) ou jeûneurs (ligne discontinue) non diabétiques ou diabétiques. Les résultats correspondent au test effectué avant la période de transition du régime alimentaire (BS), au 10<sup>ème</sup> (F1), 20<sup>ème</sup> (F2) et 29<sup>ème</sup> jour (F3) de la période de jeûne (ou non jeûne).

## 2 Etude post-mortem

### 2.1 Paramètres pondéraux

#### 2.1.1 Poids corporel

Que ce soit chez les animaux jeûneurs ou non jeûneurs, le poids corporel à la fin de l'expérimentation ne diffère pas significativement entre les *Psammomys* témoins, diabétiques ou non diabétiques avec une moyenne globale de  $121,2 \pm 4,3$  g ( $n=32$ ) pour les non jeûneurs et  $102,8 \pm 5,2$  g ( $n=20$ ) pour les jeûneurs ( $p < 0,02$ ) (Tableau 4).

**Tableau 4.** Poids corporel chez les Psammomys témoins, non diabétiques et diabétiques, jeûneurs et non jeûneurs.

<b>Psammomys obesus</b>		<b>Poids corporel (g)</b>
Témoins	Non jeûneurs	127,5 ± 4,2
	Jeûneurs	111,3 ± 14,3
Non diabétiques	Non jeûneurs	126,7 ± 10,5
	Jeûneurs	93,0 ± 4,8
Diabétiques	Non jeûneurs	112,7 ± 6,8
	Jeûneurs	113,3 ± 11,5

### 2.1.2 Poids frais du foie et du pancréas

Chez le groupe non jeûneurs, le poids du foie est en moyenne plus élevé chez les diabétiques ( $4,70 \pm 0,25$  g;  $n = 13$ ;  $p < 0,06$ ) et les non diabétiques ( $5,03 \pm 0,25$  g;  $n = 9$ ;  $p < 0,005$ ) par rapport aux rats témoins ( $4,03 \pm 0,18$  g;  $n = 10$ ) (tableau 5). De manière similaire, le poids du foie relatif au poids corporel est significativement plus élevé ( $p < 0,02$ ) chez les rats diabétiques ( $4,22 \pm 0,17$  %;  $n = 13$ ) et non diabétiques ( $4,15 \pm 0,32$  %;  $n = 9$ ) que chez les témoins ( $3,19 \pm 0,16$  %;  $n = 10$ ).

Concernant le poids du pancréas chez les non jeûneurs, celui-ci est plus faible ( $p < 0,05$ ) chez les rats diabétiques et non diabétiques ( $227 \pm 24$  mg;  $n = 22$ ) par rapport aux rats témoins ( $316 \pm 37$  mg,  $n = 10$ ). Cette différence est marquée ( $p < 0,02$ ) si l'on compare seulement les rats diabétiques aux témoins. Chez les jeûneurs, tous groupe confondus, les valeurs moyennes atteignent  $80,5 \pm 6,7$  % ( $n = 20$ ;  $p < 0,08$ ) de la valeur moyenne retrouvée chez les rats non jeûneurs, témoins, diabétiques et non diabétiques, c'est-à-dire  $100,0 \pm 7,3$  % ( $n = 32$ ).

**Tableau 5.** Poids du foie et du pancréas.

<b>Psammomys obesus</b>		<b>Poids du foie</b>		<b>Poids du pancréas</b>	
		<b>(g)</b>	<b>(%)</b>	<b>(mg)</b>	<b>(‰)</b>
Témoins	NJ (n=10)	4,03 ± 0,18	3,19 ± 0,16	316 ± 37	2,49 ± 0,29
	J (n=4)	5,03 ± 0,17	4,83 ± 0,82	271 ± 47	2,74 ± 0,86
Non diabétiques	NJ (n=9)	5,03 ± 0,25	4,15 ± 0,32	260 ± 50	2,02 ± 0,28
	J (n=10)	4,65 ± 0,28	5,07 ± 0,30	172 ± 23	1,74 ± 0,28
Diabétiques	NJ (n=13)	4,70 ± 0,25	4,22 ± 0,17	206 ± 20	1,80 ± 0,12
	J (n=6)	4,77 ± 0,51	4,22 ± 0,18	207 ± 21	1,85 ± 0,12

% représente le ratio poids du foie/ poids corporel

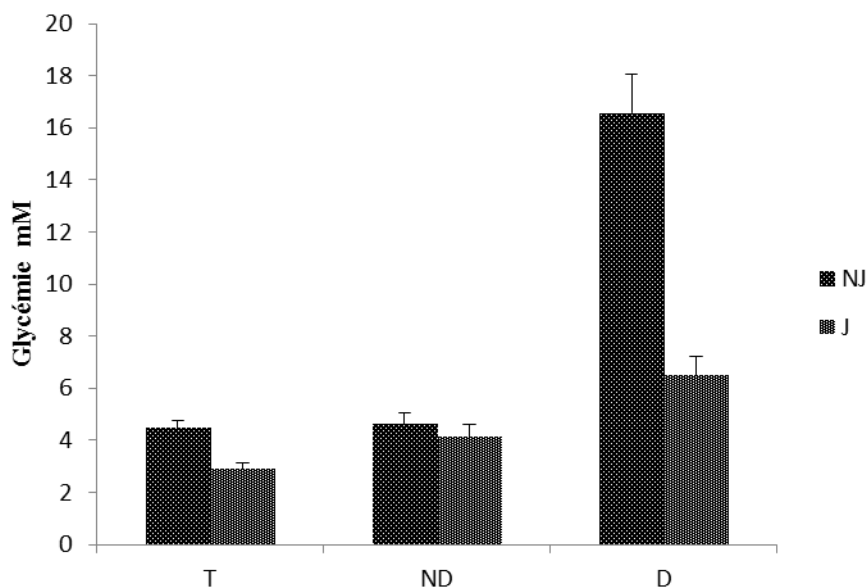
‰ représente le ratio poids du pancréas/ poids corporel

## 2.2 Paramètres glucidiques

### 2.2.1 Glucose plasmatique

Au sacrifice, la concentration du glucose plasmatique chez les *Psammomys* non jeûneurs témoins et non diabétiques atteint des valeurs comparables correspondant respectivement à  $4,46 \pm 0,28$  mM et  $4,61 \pm 0,45$  mM (figure 13), tandis que cette concentration atteint un niveau largement plus élevé ( $p < 0,001$ ) chez les rats ayant développés un diabète de type 2 ( $16,56 \pm 1,52$  mM).

Chez les rats jeûneurs, les niveaux de glycémie tendent à décroître chez tous les groupes avec une nette diminution chez les diabétiques ( $6,49 \pm 0,74$  mM,  $p < 0,001$ ) dont la glycémie reste toutefois plus élevée comparée à celle des deux autres groupes. A cet effet, les rats témoins voient leur glycémie chuter de 35 % par rapport à celle des non jeûneurs ( $p < 0,01$ ), tandis que celle des non diabétiques reste comparable ( $4,12 \pm 0,48$  mM) à ceux continuant à se nourrir pendant cette expérimentation ( $p > 0,05$ ).



**Figure 13.** Représentation graphique de la glycémie plasmatique moyenne chez *Psammomys* témoins (T), non diabétiques (ND) et diabétiques (D), jeûneurs (J) et non jeûneurs (NJ).

### 2.2.2 Hémoglobine glyquée

Les résultats obtenus pour l'Hb1Ac sont en concordance avec ceux retrouvée pour la glycémie. En effet, on constate que l'HbA1c est plus élevée chez les *Psammomys* diabétiques non jeûneurs en comparaison avec les rats témoins ( $p < 0,001$ ) et les non diabétiques ( $p < 0,005$ ) (tableau 6).

Le jeûne intermittent exerce un effet positif sur l'Hb1Ac chez les *Psammomys* diabétiques jeûneurs dont la valeur moyenne est plus basse comparée à celle enregistrée chez les non jeûneurs du même groupe, ceci ci dit cette différence est statistiquement non significative ( $p < 0,08$ ).

**Tableau 6.** L'hémoglobine glyquée.

<b>Psammomys obesus</b>		<b>HbA1c (%)</b>
Témoins	Non jeûneurs	1,98 ± 0,16
	Jeûneurs	3,92 ± 0,23
Non diabétiques	Non jeûneurs	2,73 ± 0,33
	Jeûneurs	3,21 ± 0,31
Diabétiques	Non jeûneurs	4,78 ± 0,46
	Jeûneurs	3,47 ± 0,14

### 2.3 Insuline plasmatique, index insulino-génique et insulino-résistance (HOMA)

Les rats diabétiques, en comparaison aux rats non diabétiques et témoins enregistrent en moyenne une insulino-génie plus élevée (Tableau 7) et ce quel que soit leur statut nutritionnel. En effet, les valeurs d'insulino-génie mesurées chez les *Psammomys* non jeûneurs témoins et non diabétiques représentent, respectivement, seulement  $17,1 \pm 3,7$  % ( $n = 8$  ;  $p < 0,005$ ) et  $34,8 \pm 3,3$  % ( $n = 11$  ;  $p < 0,005$ ) par rapport aux valeurs absolues enregistrées chez les *Psammomys* diabétiques sous les mêmes conditions nutritionnelles ( $100,0 \pm 17,4$  % ;  $n = 13$ ).

La concentration plasmatique d'insuline semble diminuer sous l'effet du jeûne. En effet, les valeurs moyennes d'insulino-génie chez les rats jeûneurs, tous groupes confondus, représentent  $71,3 \pm 8,6$  % ( $n = 16$  ;  $p < 0,005$ ) des valeurs moyennes retrouvées chez les non jeûneurs ( $100,0 \pm 15,1$  % ;  $n = 16$ ).

**Tableau 7.** Concentration plasmatique de l'insuline, l'index insulino-génique et la HOMA chez les *Psammomys* après sacrifice.

<i>Psammomys obesus</i>		<b>Insuline plasmatique</b> ( $\mu\text{g/l}$ )	<b>Index insulino-génique</b> ( $\mu\text{g/mol}$ )	<b>Résistance à l'insuline HOMA</b> ( $\text{mM}\cdot\mu\text{g/l}$ )
<b>Témoins</b>	Non jeûneurs	$1,55 \pm 0,60$	$409 \pm 162$	$5,9 \pm 0,3$
	Jeûneurs	$1,08 \pm 0,41$	$385 \pm 151$	$3,1 \pm 1,1$
<b>Non diabétiques</b>	Non jeûneurs	$2,95 \pm 0,37$	$653 \pm 110$	$13,4 \pm 1,1$
	Jeûneurs	$2,25 \pm 0,29$	$536 \pm 65$	$10,6 \pm 2,4$
<b>Diabétiques</b>	Non jeûneurs	$9,35 \pm 2,34$	$599 \pm 135$	$156 \pm 45,6$
	Jeûneurs	$6,14 \pm 1,51$	$1130 \pm 360$	$35,1 \pm 6,4$

Concernant l'index insulino-génique (Tableau 7), qui est le rapport entre la concentration plasmatique en insuline et celle en glucose, seul celui des *Psammomys* diabétiques tend à augmenter chez le groupe jeûneur par rapport aux non jeûneurs, alors qu'il diminue légèrement chez les *Psammomys* jeûneurs témoins et non diabétiques. Cependant, ces changements sont statistiquement non significatifs.

L'insulinorésistance, estimée par la HOMA qui est le produit de l'insulinémie ( $\mu\text{g/l}$ ) et de la glycémie (mM) semble s'améliorer d'une façon considérable par le jeûne chez les diabétiques (tableau 7). En effet, la HOMA de ces derniers est 77,5% plus basse comparée à celle des diabétiques non jeûneurs ( $156 \pm 46,6 \text{ mM}\cdot\mu\text{g/l}$ ). Concernant les deux autres groupes, aussi bien les témoins que les non diabétiques, leur HOMA ne diminue que très légèrement sous l'effet du jeûne.

## **2.4 Paramètres lipidiques**

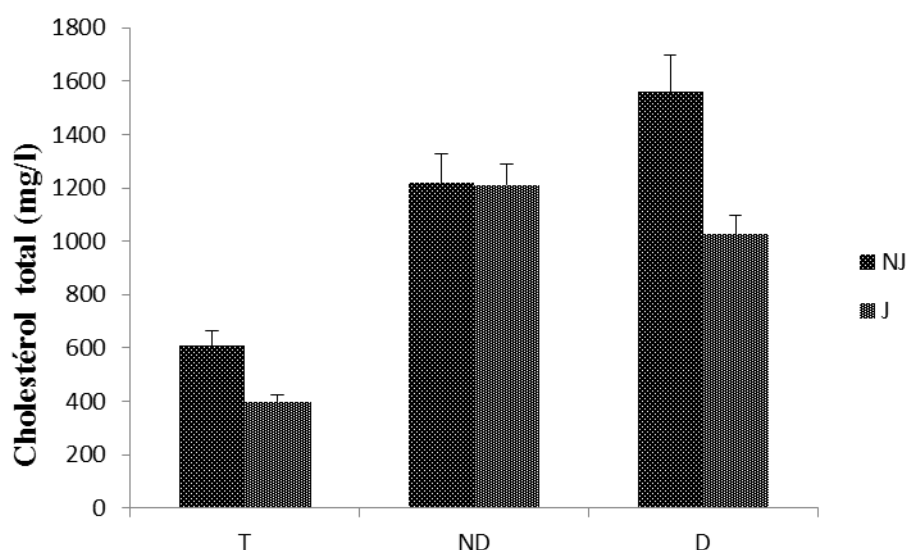
### **2.4.1 Cholestérol et triglycérides plasmatiques**

Que ce soit chez les rats jeûneurs ou non jeûneurs, la concentration du cholestérol plasmatique est significativement plus élevée chez les rats soumis au régime synthétique par rapport aux rats

## RÉSULTATS

témoins continuant à se nourrir à l'*Atriplex halimus* (figure 14). Aucune différence significative n'est observée entre les rats diabétiques et non diabétiques, qu'ils soient jeûneurs ( $p > 0,1$ ) ou non jeûneurs ( $p > 0,1$ ).

Si l'on compare l'effet du jeûne sur la cholestérolémie, on constate que celle-ci tend à diminuer significativement aussi bien chez les animaux diabétiques ( $p < 0,025$ ) que témoins ( $p < 0,05$ ). En effet, les valeurs moyennes atteignent  $607 \pm 57$  et  $1558 \pm 138$  mg/l respectivement chez les *Psammomys* non jeûneurs témoins et diabétiques, alors qu'elles atteignent chez les jeûneurs du même groupe respectivement  $398 \pm 28$  et  $1025 \pm 72$  mg/l. Cependant, ce jeûne ne semble avoir aucun effet sur la concentration plasmatique en cholestérol chez les rats non diabétiques ( $1217 \pm 111$  et  $1211 \pm 78$  mg/l respectivement chez les non jeûneurs et les jeûneurs).

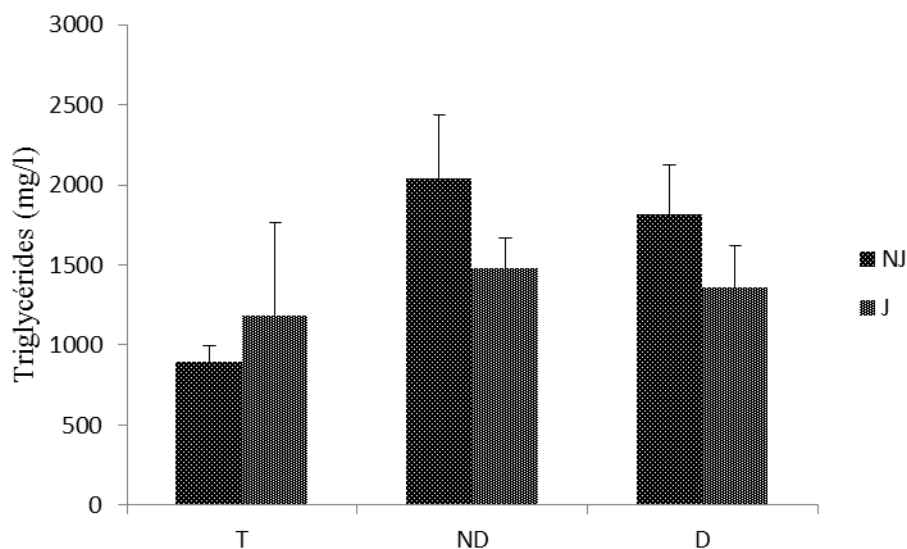


**Figure 14.** Représentation graphique de la cholestérolémie moyenne chez *Psammomys* témoins (T), non diabétiques (ND) et diabétiques (D), jeûneurs (J) et non jeûneurs (NJ).

Concernant la concentration plasmatique en triglycérides (figure 15), elle est significativement plus élevée ( $p < 0,02$ ) chez les rats non jeûneurs diabétiques ( $1815 \pm 307$  mg/l ;  $n=13$ ) et non diabétiques ( $2041 \pm 397$  mg/l ;  $n=9$ ) par rapport aux témoins ( $893 \pm 99$  ;  $n=10$ ). L'analyse statistique ne révèle aucune différence entre les taux de triglycérides enregistrés chez les rats diabétiques et non diabétiques et ce qu'ils soient jeûneurs ( $p > 0,6$ ) ou non jeûneurs ( $> 0,7$ ). En moyenne, la triglycéridémie

## RÉSULTATS

est de  $1362 \pm 254$  mg/l (n=6) et  $1478 \pm 193$  mg/l (n=10) respectivement chez les *Psammomys* diabétiques et non diabétiques jeûneurs, représentant  $73,7 \pm 7,6\%$  (n=16 ;  $p < 0,07$ ) par rapport aux rats jeûneurs, diabétiques et non diabétiques confondus ( $100 \pm 10,2\%$  ; n=22). Cette diminution de la triglycémie, quoi que statistiquement non significative, n'est pas observée chez les rats témoins qui enregistrent respectivement  $893 \pm 99$  mg/l et  $1185 \pm 575$  mg/l chez les non jeûneurs et les jeûneurs.



**Figure 15.** Représentation graphique de la triglycémie moyenne chez *Psammomys* témoins (T), non diabétiques (ND) et diabétiques (D), jeûneurs (F) et non jeûneurs (NF).

### 2.4.2 Triglycérides et phospholipides hépatiques

Que ce soit chez les rats non jeûneurs ou ceux jeûnant par intermittence, le contenu en triglycérides hépatiques (tableau 8) est plus élevé chez les rats non diabétiques et diabétiques par rapport aux rats témoins (tableau 5). Si l'on prend en considération à la fois les jeûneurs et les non jeûneurs, ce taux élevé de triglycérides hépatiques chez les rats nourris au régime synthétique représente  $321,6 \pm 92,2\%$  (n=16) du taux enregistré chez tous les témoins ( $100 \pm 8,9\%$  ; n=8).

Si l'on regroupe les données concernant le taux de triglycérides hépatiques chez tous les groupes jeûneurs (témoins, diabétiques et non diabétiques) et qu'on les compare à ceux des non jeûneurs, tous groupes confondus, on constate que ce taux représente  $49,3 \pm 5\%$  (n=12;  $p < 0,02$ ) du taux retrouvé chez les non jeûneurs ( $100 \pm 19,5\%$ ; n=12).

## RÉSULTATS

Enfin, aucune différence significative n'a été remarquée entre les *Psammomys* diabétiques et non diabétiques qu'ils soient jeûneurs ou pas.

En ce qui concerne le taux de phospholipides hépatiques, la seule différence significative observée est leur valeur diminuée chez les *Psammomys* jeûneurs comparé aux non jeûneurs ( $p < 0,05$ ).

**Tableau 8.** Paramètres lipidiques hépatiques chez les *Psammomys* témoins, non diabétiques et diabétiques, jeûneurs et non jeûneurs (n=4 pour les 6 groupes).

<i>Psammomys obesus</i>		Triglycérides hépatiques ( $\mu\text{mol/g}$ )	Phospholipides hépatiques ( $\mu\text{mol/g}$ )
<b>Témoins</b>	Non jeûneurs	3,52 $\pm$ 0,56	20,29 $\pm$ 0,94
	Jeûneurs	2,24 $\pm$ 0,24	13,15 $\pm$ 2,70
<b>Non diabétiques</b>	Non jeûneurs	12,41 $\pm$ 2,86	21,67 $\pm$ 1,63
	Jeûneurs	5,16 $\pm$ 0,74	19,07 $\pm$ 0,94
<b>Diabétiques</b>	Non jeûneurs	14,85 $\pm$ 8,92	20,90 $\pm$ 1,61
	Jeûneurs	6,29 $\pm$ 1,39	20,42 $\pm$ 0,47

### 2.5 Histologie du foie

La coloration du foie à l'hématoxyline-éosine confirme les résultats obtenus sur l'augmentation du taux de triglycérides hépatiques chez les rats de sable diabétiques et non diabétiques non jeûneurs. En effet, il a été observé que les foies de ces groupes de *Psammomys* (figure 16) contiennent un nombre assez important de gouttelettes lipidiques, il s'agit de la stéatose hépatique non alcoolique. Avec un grossissement plus élevé nous avons constaté une présence de gouttelettes lipidiques à l'intérieur des hépatocytes. Ces gouttelettes tendent à refouler le noyau vers la périphérie des cellules hépatiques qui sont également entourées de petites gouttelettes lipidiques. Enfin, aucun signe de fibrose n'a été détecté.

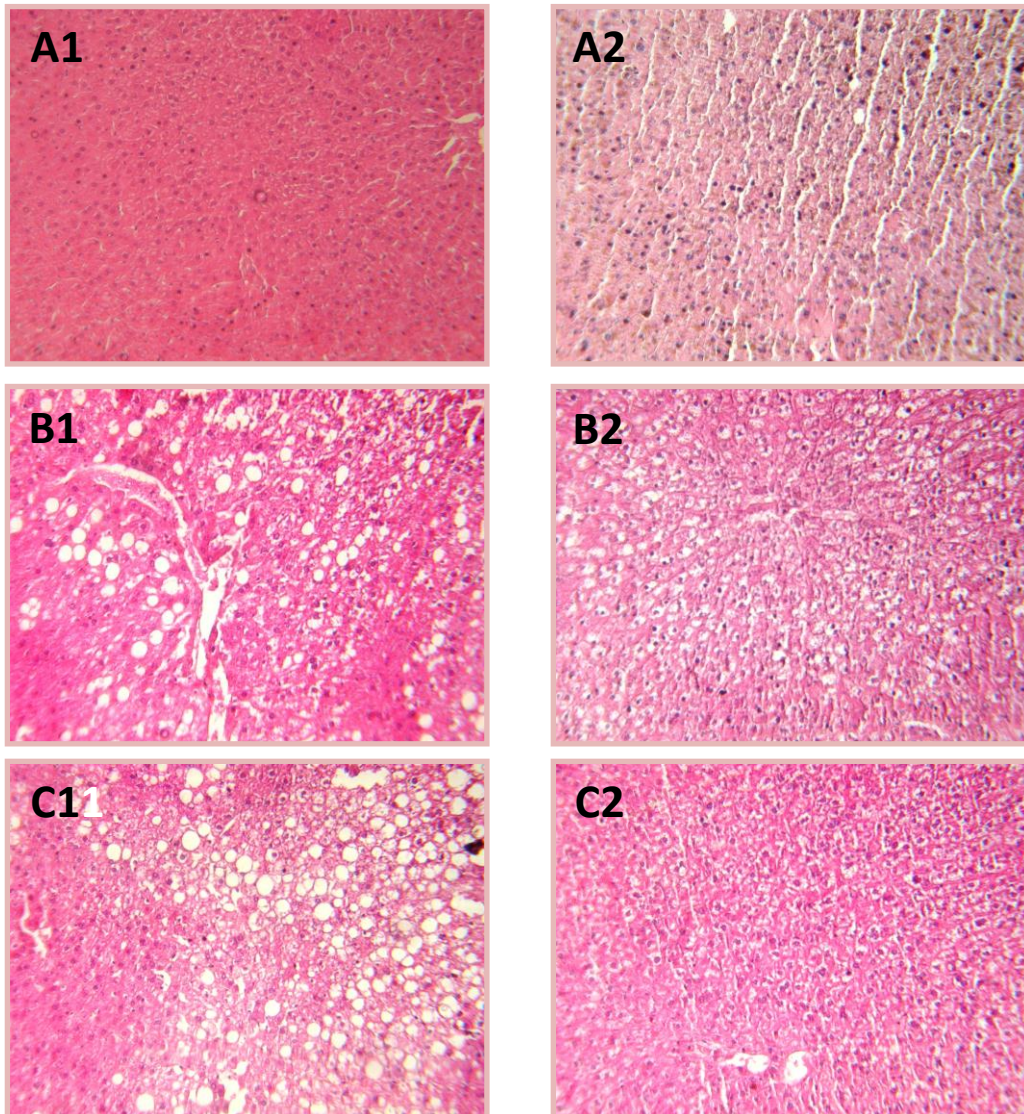
Concernant le foie des *Psammomys* jeûneurs diabétiques et non diabétiques, les observations histologiques s'accordent avec les résultats concernant le dosage de triglycérides hépatiques. En effet,

## RÉSULTATS

---

la diminution de ces derniers chez ces deux groupes jeûneurs se traduit sur le plan histologique par la diminution du volume des gouttelettes lipidiques.

En ce qui concerne le foie des *Psammomys* témoins, celui-ci ne présente aucun signe particulier lors de l'examen hépatohistologique et ce aussi bien chez les jeûneurs que les non jeûneurs.



**Figure 16.** Coupes histologiques du foie de *Psammomys* obesus témoins (A), non diabétiques (B) et diabétiques (C), non jeûneurs (1) et jeûneurs (2). (Coloration hématoxyline-éosine, grossissement×20).

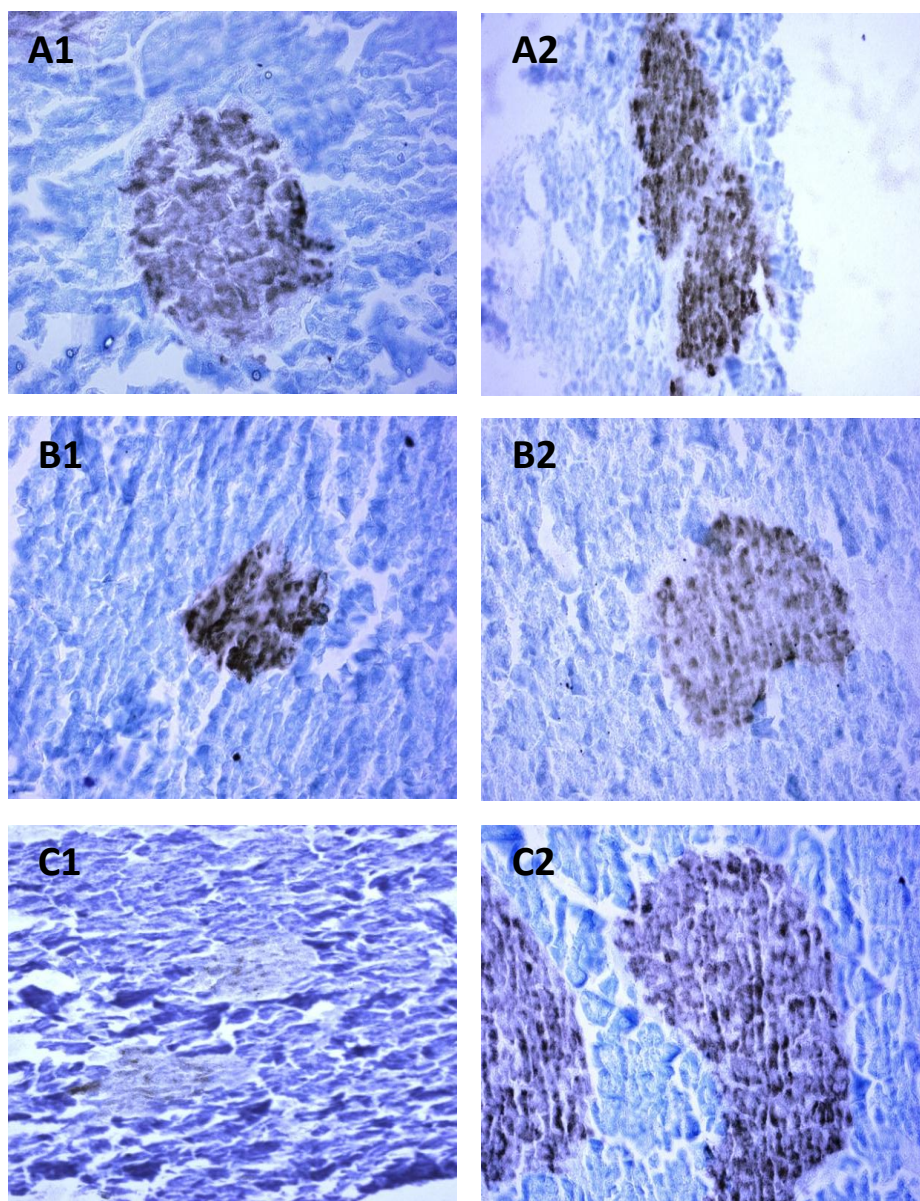
### **2.6 Histologie du pancréas**

#### **2.6.1 Marquage de l'insuline par la technique ABC-DAB**

D'après l'observation de l'immunomarquage de l'insuline (figure 17) par la technique ABC-DAB, il apparaît que les réserves insuliniques dans les îlots pancréatiques des Psammomys diabétiques non jeûneurs sont extrêmement épuisées. Leur taille est également diminuée par rapport à celle des rats témoins et des rats non diabétiques qui, contrairement aux précédents, ont des îlots intacts mais également chargés de réserves insuliniques. En effet, la coloration brune est plus intense chez ces derniers alors qu'elle apparaît pratiquement absente chez les rats diabétiques non jeûneurs.

Le jeûne intermittent semble rétablir relativement les réserves pancréatiques en insuline chez les rats diabétiques. On constate nettement une restauration des réserves insuliniques reflétée par un nombre élevé de cellules fortement colorées au brun. D'autre part, les îlots sont largement plus volumineux comparés à ceux observés chez les non jeûneurs ayant le même statut métabolique.

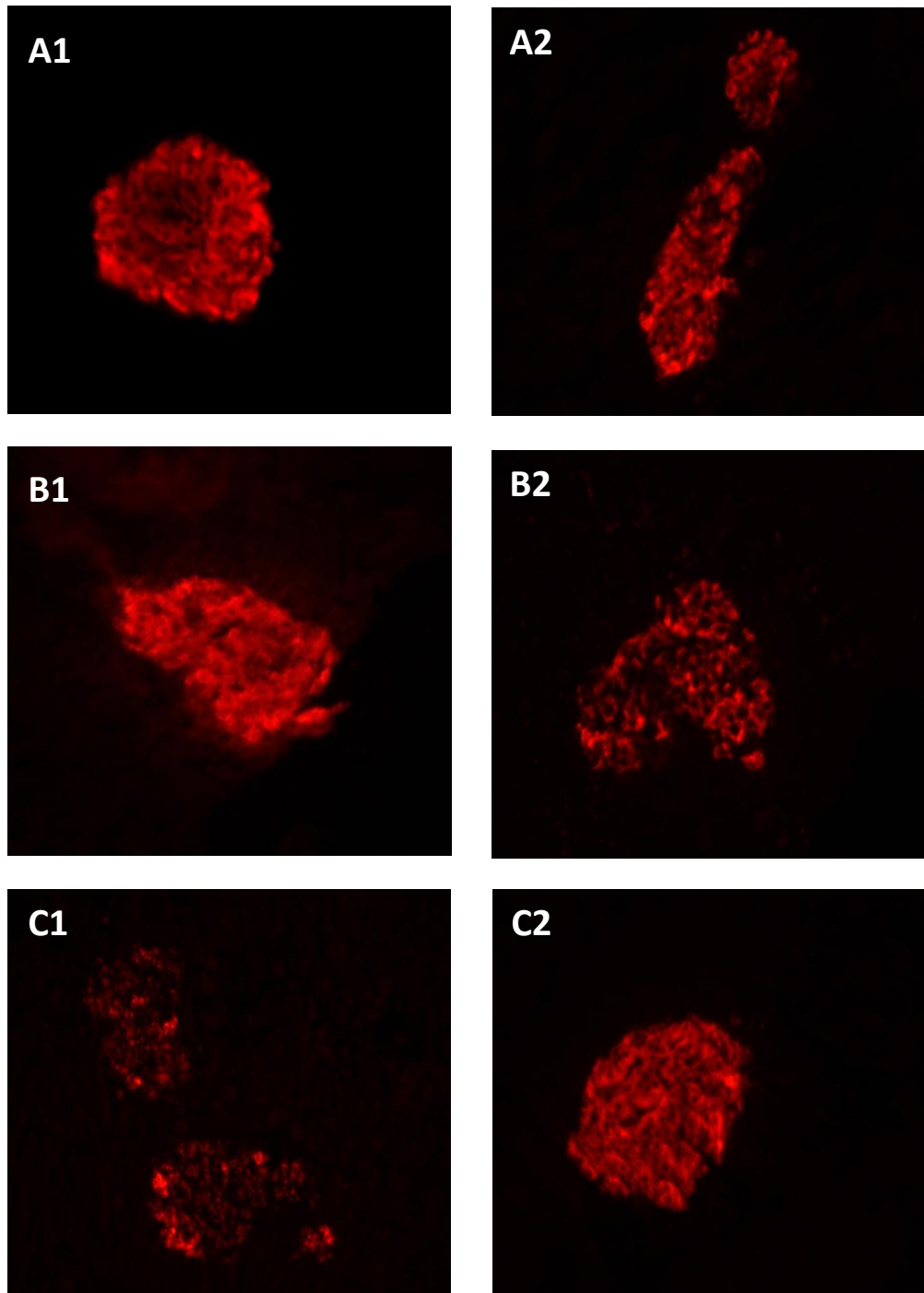
Enfin, chez les deux autres groupes, aucune différence n'est observée concernant les réserves insuliniques entre les jeûneurs et les non jeûneurs.



**Figure 17.** Immunodétection par la technique ABC-DAB de l'insuline dans les îlots pancréatiques des *Psammomys obesus* témoins (A), non diabétiques (B) et diabétiques (C), non jeûneurs (1) et jeûneurs (2) (contre coloration à l'hématoxyline de Harris, grossissement x40).

### **2.6.2 Marquage immunofluorescent de l'insuline**

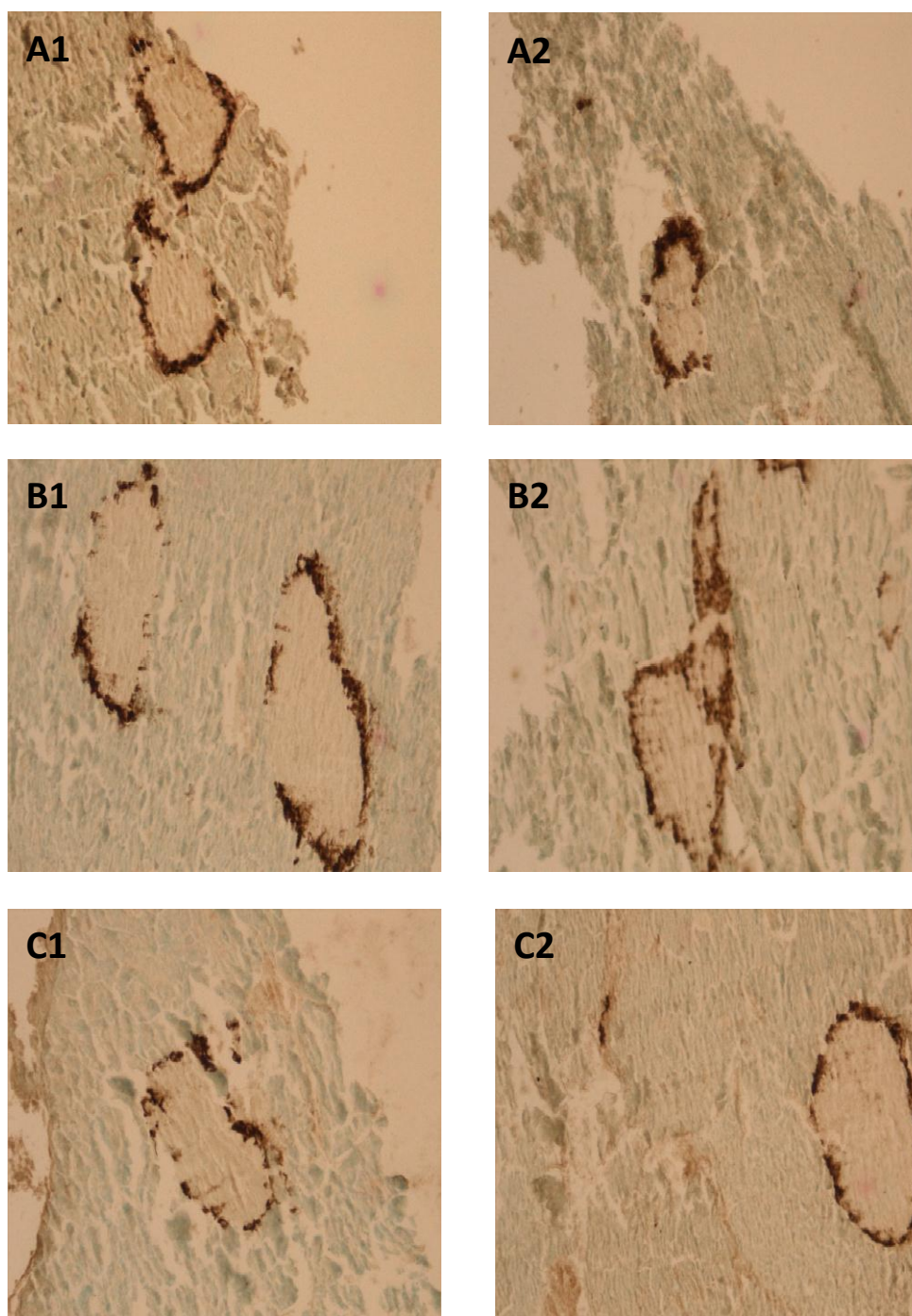
Le marquage immunofluorescent (figure 18) ne fait que confirmer les observations décrites précédemment, notamment en ce qui concerne les îlots des rats diabétiques qui voient leurs réserves en insuline se restituer suite à la privation calorique observée durant le jeûne intermittent.



**Figure 18.** Mise en évidence par immunofluorescence de l'insuline dans les îlots pancréatiques des *Psammomys obesus* témoins (A), non diabétiques (B) et diabétiques (C), non jeûneurs (1) et jeûneurs (2) (grossissement x40).

### **2.6.3 Marquage du glucagon par la technique ABC-DAB**

Le marquage du glucagon ne présente aucune différence entre les *Psammomys* témoins, diabétiques ou non diabétiques, qu'ils soient jeûneurs ou non jeûneurs.



**Figure 19.** Immunodétection par la technique ABC-DAB du glucagon au niveau des îlots pancréatiques des *Psammomys obesus* témoins (A), non diabétiques (B) et diabétiques (C), non jeûneurs (1) et jeûneurs (2) (grossissement x40).

## Chapitre II

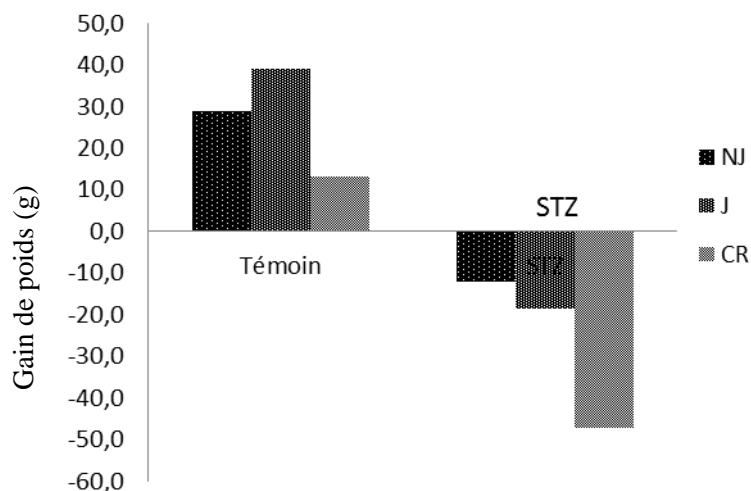
### **Effet du jeûne intermittent sur des rats wistar rendus diabétiques par injection à la streptozotocine**

Dans cette partie, l'effet du jeûne intermittent a été comparé à celui d'une restriction calorique dont le taux a été déduit à partir de la quantité d'aliment consommée par les jeûneurs (voir matériels et méthodes). Le but est de voir si l'effet engendré par le jeûne intermittent est dû à la restriction calorique observée durant ce jeûne ou alors au paradigme en lui-même.

#### **1 Etude in vivo**

##### **1.1 Evolution du poids corporel**

Durant les 3 semaines suivant l'injection des rats à la streptozotocine ou au tampon citrate (Ji-J0), l'évolution du poids diffère significativement entre les rats témoins et les rats STZ ( $p < 0,001$ ) (figure 21). En effet, on constate un gain moyen de poids atteignant  $+ 18,3 \pm 3,9$  g ( $n=16$ ) chez les témoins, alors que chez les rats STZ le poids tend à diminuer induisant une perte de poids de  $- 3,2 \pm 4,3$  g ( $n=17$ ). Le poids corporel continue à augmenter chez les rats témoins durant les 30 derniers jours de l'expérimentation (J0-Js). Le gain de poids entre les rats témoins NJ ( $28,6 \pm 2,9$  g) et J ( $39 \pm 4,5$  g) ne diffère pas significativement, alors qu'il est statistiquement différent entre ces deux groupes et celui des rats témoins CR ( $p < 0,05$ ) qui enregistrent un gain de poids de  $13,1 \pm 1,5$  g. Concernant les rats STZ, la perte de poids est plus accentuée chez les rats soumis à la restriction calorique par rapport aux rats jeûneurs avec une perte de poids estimée respectivement à  $- 47,5 \pm 5,7$  g et  $- 18,8 \pm 2,7$  g. Quant aux rats STZ non jeûneurs, ils enregistrent une perte globale de  $- 12,4 \pm 2,9$  g.



**Figure 21.** Comparaison entre l'évolution du poids corporel chez les rats jeûneurs et ceux soumis à la restriction calorique.

### 1.2 La consommation alimentaire

Comme indiqué dans le tableau 9, la prise alimentaire durant les 6 jours de la période témoin (du 15<sup>ème</sup> au 20<sup>ème</sup> jour après l'injection de la STZ ou du tampon citrate), est deux fois plus élevée ( $p < 0,001$ ) chez les rats STZ que chez les rats témoins. Cette différence de consommation persiste quand on compare les rats témoins et STZ non jeûneurs durant les 30 derniers jours de l'expérimentation. Même chez les rats jeûneurs et CR, la consommation alimentaire est également presque deux fois plus élevée ( $p < 0,001$ ) chez les rats STZ comparés aux rats témoins.

Les valeurs individuelles considérées dans le tableau 9 représentent la moyenne de 6-26 mesures effectuées sur chaque rat. Durant les 6 derniers jours de la période témoin, le coefficient de variation (SD/moyenne) pour les 6 mesures successives faites sur chaque rat atteint  $7,9 \pm 0,4\%$  ( $n=6$ ) et  $7,2 \pm 0,8\%$  ( $n=17$ ) respectivement chez les rats témoins et STZ. D'une façon similaire, durant les 30 derniers jours, le coefficient de variation pour les 26 mesures effectuées durant cette période atteint respectivement  $9,9 \pm 0,8\%$  ( $n=5$ ) et  $9,1 \pm 1,1\%$  ( $n=5$ ) chez les rats témoins et STZ non jeûneurs et  $15,5 \pm 0,3\%$  ( $n=5$ ) et  $16,5 \pm 0,3\%$  ( $n=6$ ) chez les rats témoins et STZ jeûneurs ( $p < 0,001$ ).

**Tableau 9.** La consommation alimentaire (g) chez les rats témoins et les rats STZ.

<b>Rats</b>		<b>Période témoin (6 derniers jours)<sup>a</sup></b>	<b>Période expérimentale (30 jours)<sup>b</sup></b>
<b>Témoins</b>	Non jeûneurs	18,7 ± 0,1 (6)	20,1 ± 0,3 (5)
	Jeûneurs		15,3 ± 0,5 (5)
	Restriction calorique		15,0 ± 0,1 (6)
<b>Streptozotocine</b>	Non jeûneurs	44,5 ± 1,8 (5)	46,0 ± 0,7 (5)
	Jeûneurs	42,9 ± 0,9 (6)	25,8 ± 0,6 (5)
	Restriction calorique	44,2 ± 1,6 (6)	26,5 ± 1,0 (6)

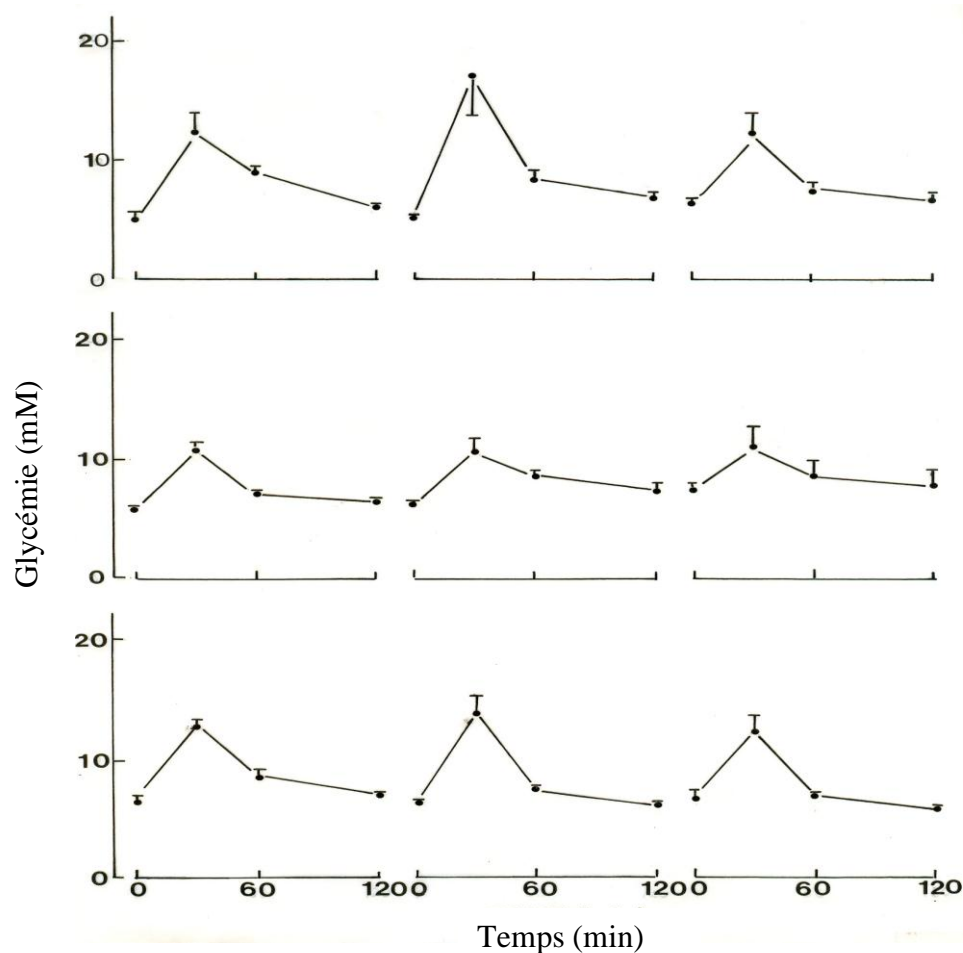
<sup>a</sup>Chaque valeur individuelle représente la moyenne de 6 déterminations<sup>b</sup>Chaque valeur individuelle représente la moyenne de 26 déterminations

### 1.3 IPGTT

Le profil de la glycémie durant le test IPGTT effectué chez les rats témoins est illustré dans la figure 21. A la 30<sup>ème</sup> min, les pics de glycémie les moins élevés sont retrouvés chez les rats témoins jeûneurs ; cependant, aucune différence significative ( $p > 0,34$ ) n'a été notée entre les rats témoins non jeûneurs, jeûneurs et chez ceux soumis à la restriction calorique. Cependant, l'AUC incrémentale tend à être moins élevée chez les rats témoins jeûneurs et CR par rapport aux rats témoins nourris ad libitum (tableau 10). Ainsi, les valeurs enregistrées chez les rats témoins jeûneurs et CR atteignent respectivement  $59,1 \pm 15,3\%$  ( $n = 16$ ) et  $65,3 \pm 9,5\%$  ( $n = 17$ ) de la valeur moyenne enregistrée le même jour chez les rats témoins ad libitum ( $100,0 \pm 15,1\%$ ;  $n = 15$ ). Une telle différence devient statistiquement significative ( $p < 0,04$ ) seulement si l'on compare la totalité des valeurs moyennes enregistrées chez les rats jeûneurs et CR ( $62,3 \pm 9,5\%$ ;  $n = 33$ ) à celles trouvées chez les rats nourris ad libitum.

**Tableau 10.** Données de l'IPGTT chez les rats témoins.

<b>Rats</b>	<b>jour</b>	<b>Temps zero (mM)</b>	<b>AUC total (mM.min)</b>	<b>AUC Incrementale (mM.min)</b>	<b>n</b>
<b>Non jeûneurs</b>	10	5,12 ± 0,59	1027 ± 73	412 ± 120	5
	20	5,21 ± 0,27	1177 ± 121	552 ± 104	5
	29	6,44 ± 0,38	998 ± 104	225 ± 77	5
<b>Jeûneurs</b>	10	5,79 ± 0,36	927 ± 28	233 ± 49	6
	20	6,16 ± 0,42	1014 ± 49	275 ± 28	5
	29	7,50 ± 0,49	1061 ± 97	161 ± 113	5
<b>Restriction calorique</b>	10	6,54 ± 0,32	1081 ± 34	295 ± 52	5
	20	6,21 ± 0,30	1044 ± 30	299 ± 42	6
	29	6,64 ± 0,74	959 ± 56	160 ± 75	6



**Figure 21.** Profil glycémique durant le test IPGTT réalisé au 10<sup>ème</sup> (à gauche), 20<sup>ème</sup> (milieu) et au 29<sup>ème</sup> (à droite) jour de la période finale de l'expérimentation chez les rats témoins non jeûneurs (en haut), jeûneurs (milieu) et CR (en bas) ( $M \pm SEM$  ;  $n=15-16$ ).

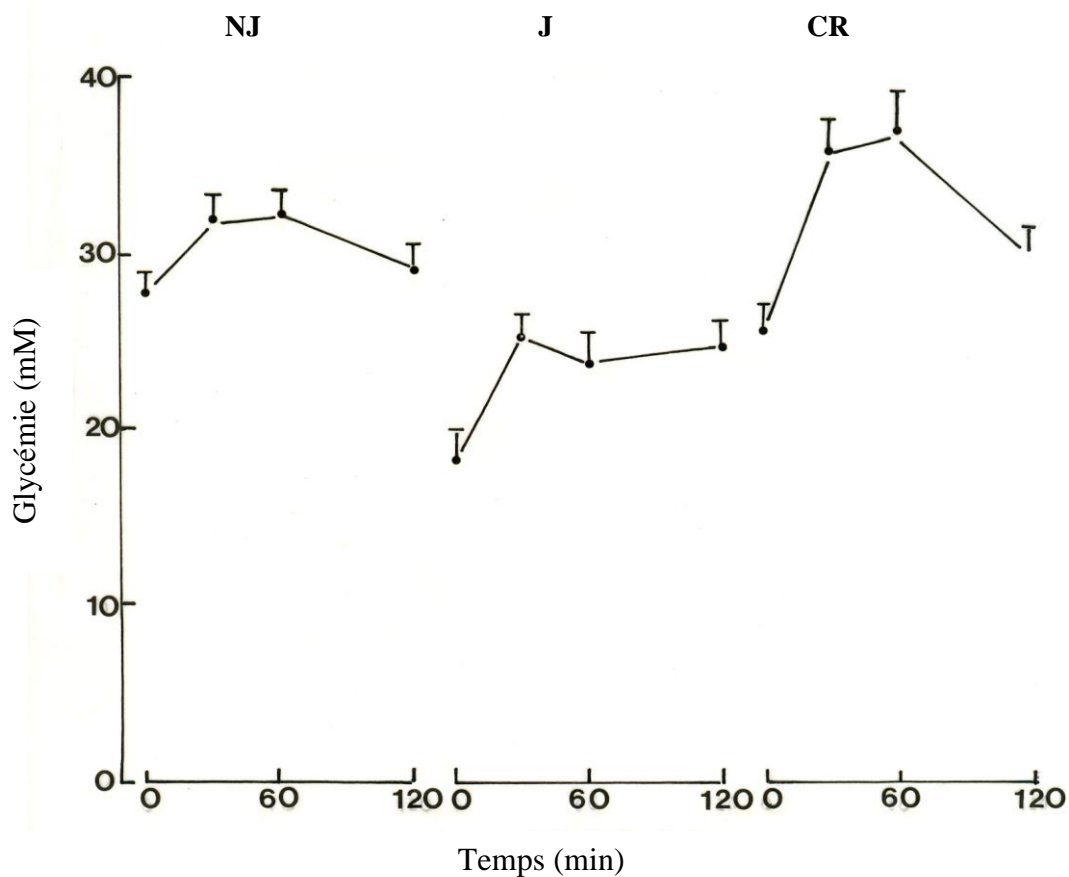
Chez les rats STZ, les résultats de l'IPGTT sont très comparables entre les rats non jeûneurs examinés 20 jours après l'injection de streptozotocine ou durant le 10<sup>ème</sup>, 20<sup>ème</sup> et 29<sup>ème</sup> jour de la période d'expérimentation ; ainsi, les résultats de ces IPGTT ont été regroupés (pooled). De la même manière, les résultats du test d'IPGTT conduits au 10<sup>ème</sup>, 20<sup>ème</sup> et 29<sup>ème</sup> jour de la période expérimentale (30 derniers jours) ont été réunis que ce soit pour les rats STZ jeûneurs ou CR (figure 22). La glycémie au temps 0 est moins élevée ( $p < 0,007$ ) chez les rats J comparée à celle des rats STZ NJ ou CR. Aucune différence significative ( $p > 0,24$ ) n'a été observée entre ces deux derniers groupes de rats STZ (tableau 11). D'une façon similaire, l'AUC totale est plus faible chez les rats STZ

## RÉSULTATS

jeûneurs comparée aux rats STZ non jeûneurs ou soumis à la restriction ( $p < 0,001$ ). Chez ces deux derniers groupes l'AUC totale est statistiquement comparables ( $p > 0,21$ ).

**Tableau 11.** Données sur l'IPGTT chez les rats STZ.

Rats	Temps zero (mM)	AUC Total (mM.min)	AUC Incrementale (mM.min)	n
Non jeûneurs	$27,84 \pm 1,17$	$3681 \pm 155$	$279 \pm 153$	20
Jeûneurs	$17,97 \pm 1,85$	$2825 \pm 174$	$668 \pm 149$	15
Restriction calorique	$25,38 \pm 1,70$	$3988 \pm 194$	$943 \pm 205$	17



**Figure 22.** Profil glycémique durant le test IPGTT réalisé sur des rats STZ non jeûneurs (à gauche), jeûneurs (au milieu) et CR (à droite) ( $M \pm SEM$  ;  $n=15-16$ ).

**2 Etude post mortem****2.1 Paramètres pondéraux****2.1.1 Poids corporel**

Le poids des rats STZ est plus faible que celui enregistré chez les rats témoins ( $p < 0,05$ ) quel que soit leur statut nutritionnel (NJ, J ou CR) (tableau 12). En effet, les rats témoins enregistrent un poids de  $242 \pm 7,3$  g ( $n=16$ ) alors que les rats STZ enregistrent  $199 \pm 3,7$  g.

**Tableau 12.** Poids corporel au sacrifice.

	Rats	Poids (g)
<b>Témoins</b>	Non jeûneurs	$253,6 \pm 8,25$
	Jeûneurs	$228,8 \pm 3,06$
	Restriction calorique	$245,3 \pm 9,55$
<b>STZ</b>	Non jeûneurs	$192,4 \pm 3,01$
	Jeûneurs	$200,5 \pm 6,16$
	Restriction calorique	$205,2 \pm 18,8$

**2.1.2 Poids frais du foie, du rein et du pancréas**

Le poids du foie des rats STZ, qu'il soit exprimé en valeur absolue (g) ou par rapport au poids corporel (%) (tableau 13), est plus élevé ( $p < 0,001$ ) par rapport à celui des rats témoins. En terme de poids absolu (g), ce sont les rats (témoins et STZ) jeûneurs qui enregistrent le poids le plus faible comparés aux rats non jeûneurs et CR ( $p < 0,005$ ).

En ce qui concerne le poids moyen des deux reins des rats STZ et témoins, les mêmes différences de poids constatées pour le foie ont été enregistrées pour le poids absolu des reins et leur poids relatif au poids corporel.

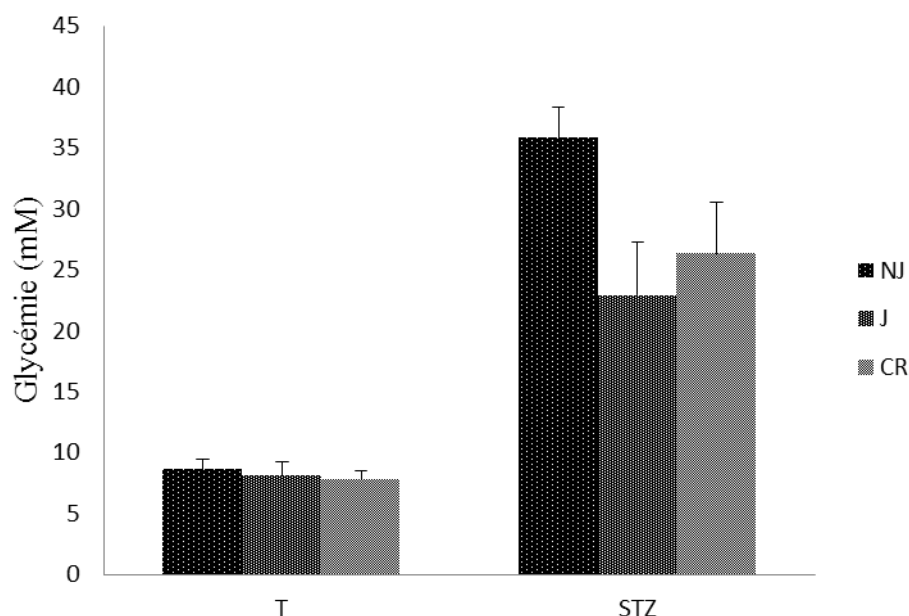
Aucune différence significative n'a été décernée entre le poids moyen des pancréas frais ( $p > 0,66$ ) des rats témoins et les rats STZ, qu'il soit considéré en terme de poids absolue ou relatif au poids corporel (tableau 13).

**Tableau 13.** Poids du foie, du rein et du pancréas des rats témoins et STZ.

Rats		Foie		Rein		Pancréas	
		(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)
Témoins	NJ	7,60 ± 0,08	3,01 ± 0,1	0,97 ± 0,06	0,38 ± 0,02	0,68 ± 0,11	0,27 ± 0,04
	J	7,22 ± 0,56	3,16 ± 0,25	0,90 ± 0,03	0,39 ± 0,01	0,58 ± 0,05	0,26 ± 0,03
	CR	7,42 ± 0,28	3,04 ± 0,1	0,88 ± 0,03	0,36 ± 0,01	0,83 ± 0,09	0,33 ± 0,03
STZ	NJ	10,11 ± 0,28	5,26 ± 0,17	1,39 ± 0,14	0,72 ± 0,08	0,85 ± 0,01	0,44 ± 0,02
	J	9,23 ± 0,32	4,62 ± 0,16	1,16 ± 0,03	0,58 ± 0,02	0,73 ± 0,01	0,37 ± 0,02
	CR	9,49 ± 0,49	4,67 ± 0,16	1,18 ± 0,06	0,58 ± 0,03	0,87 ± 0,04	0,44 ± 0,02

## 2.2 Glucose plasmatique

La concentration du D-glucose plasmatique est environ 3-4 fois plus élevée chez les rats STZ comparés aux rats témoins (figure 23). Les glycémies chez les rats témoins sont comparables entre les non jeûneurs, jeûneurs et CR ( $p > 0,49$ ). Cette glycémie atteint en moyenne chez tous les groupes témoins une valeur globale égale à  $8,78 \pm 0,23$  mM ( $n=16$ ). Par contre, chez les rats STZ, la valeur moyenne de la glycémie retrouvée chez les rats jeûneurs ( $22,91 \pm 4,30$  mM ;  $n=6$ ) et CR ( $26,35 \pm 4,20$  mM ;  $n=6$ ) est significativement plus faible ( $p < 0,04$ ) par rapport à celle des rats STZ non jeûneurs ( $35,80 \pm 2,47$  mM ;  $n=5$ ).



**Figure 23.** Représentation graphique de la glycémie plasmatique moyenne chez les rats wistar témoins et STZ non jeûneurs (NJ), jeûneurs (J) et CR.

### 2.3 Statut insulinique

La concentration de l'insuline plasmatique est approximativement deux fois plus faible chez les rats STZ par rapport à celle des rats témoins (tableau 14). Aucune différence significative n'a été enregistré entre l'insulinémie des rats témoins non jeûneurs, jeûneurs ou CR ( $p > 0,26$ ). Ceci est également le cas chez les rats STZ ( $p > 0,15$ ).

L'index insulino-génique est largement plus élevé ( $p < 0,001$ ) chez les rats témoins ( $10,60 \pm 1,84$  mU/mmol;  $n = 15$ ) que chez les rats STZ ( $0,90 \pm 0,21$  mU/mmol;  $n = 17$ ) (tableau 14). Aucune différence significative n'a été retrouvée que ce soit au sein du groupe témoins ou du groupe STZ entre les rats non jeûneurs, jeûneurs ou CR. Cependant, les valeurs moyennes de l'index insulino-génique ont tendance ( $p < 0,09$ ) à être relativement plus élevées chez les rats diabétiques J et CR ( $1,17 \pm 0,34$  mU/mmol;  $n = 12$ ) par rapport aux rats STZ non jeûneurs ( $0,48 \pm 0,08$  mU/mmol;  $n = 5$ ).

## RÉSULTATS

**Tableau 14.** Statut insulinique chez les rats témoins et injectés à la streptozotocine, non jeûneurs, jeûneurs et soumis à la restriction calorique.

Rats		insuline ( $\mu\text{U/ml}$ )	Index Insulinogénique ( $\text{mU/mmol}$ )	HOMA ( $\text{mM}\cdot\mu\text{U/ml}$ )
Témoins	Non jeûneurs	$38 \pm 6$	$8,63 \pm 2,08$	$336 \pm 73$
	Jeûneurs	$32 \pm 2$	$9,44 \pm 3,42$	$264 \pm 45$
	Restriction calorique	$45 \pm 2$	$14,61 \pm 4,51$	$336 \pm 68$
STZ	Non jeûneurs	$16 \pm 2$	$0,48 \pm 0,08$	$548 \pm 57$
	Jeûneurs	$22 \pm 5$	$1,17 \pm 0,51$	$419 \pm 45$
	Restriction calorique	$25 \pm 5$	$1,16 \pm 0,52$	$518 \pm 51$

L'index HOMA reflétant l'insulinorésistance ne diffère pas entre les 3 groupes de rats témoins, avec une valeur moyenne globale atteignant  $312 \pm 35 \text{ mM}\cdot\mu\text{U/ml}$  ( $n = 15$ ) (tableau 14). Ceci est également le cas chez les rats STZ chez qui la valeur moyenne globale atteint  $518 \pm 51 \text{ mM}\cdot\mu\text{U/ml}$  ( $n = 17$ ) et qui est significativement plus élevée ( $p < 0,004$ ) que celle enregistrée chez les rats témoins.

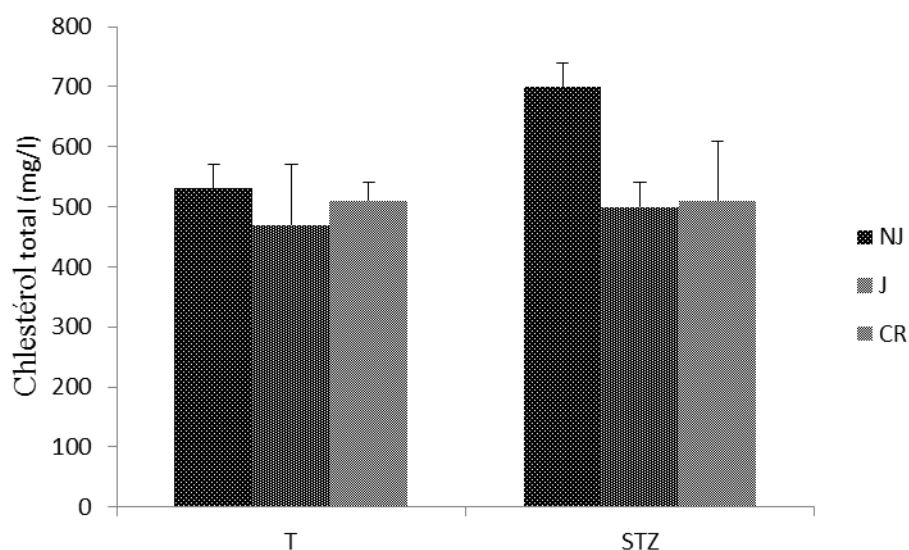
### 2.4 Paramètres lipidiques

#### 2.4.1 Cholestérol plasmatique

Le taux de cholestérol plasmatique chez les rats wistar témoins ( $n = 12$ ) atteint en moyenne  $530 \pm 36,6 \text{ mg/l}$ . La cholestérolémie est assez comparable ( $p > 0,05$ ) entre les trois groupes de rats témoins (figure 24). En effet, les rats témoins non jeûneurs, jeûneurs et ceux soumis à la restriction calorique enregistrent respectivement  $530 \pm 40 \text{ mg/l}$ ,  $470 \pm 40 \text{ mg/l}$  et  $510 \pm 30 \text{ mg/l}$ .

Contrairement aux rats témoins, on note une différence assez significative ( $p < 0,025$ ) entre la cholestérolémie du groupe de rats STZ non jeûneurs ( $700 \pm 100 \text{ mg/l}$ , ( $n = 5$ )) et celle des rats STZ jeûneurs et CR. En effet, ces deux derniers groupes enregistrent respectivement  $500 \pm 40$  ( $n = 5$ ) et

510 ± 100 mg/l (n = 5), des taux similaires ( $p > 0,05$ ) à ceux retrouvés chez les rats témoins tous groupes confondus.

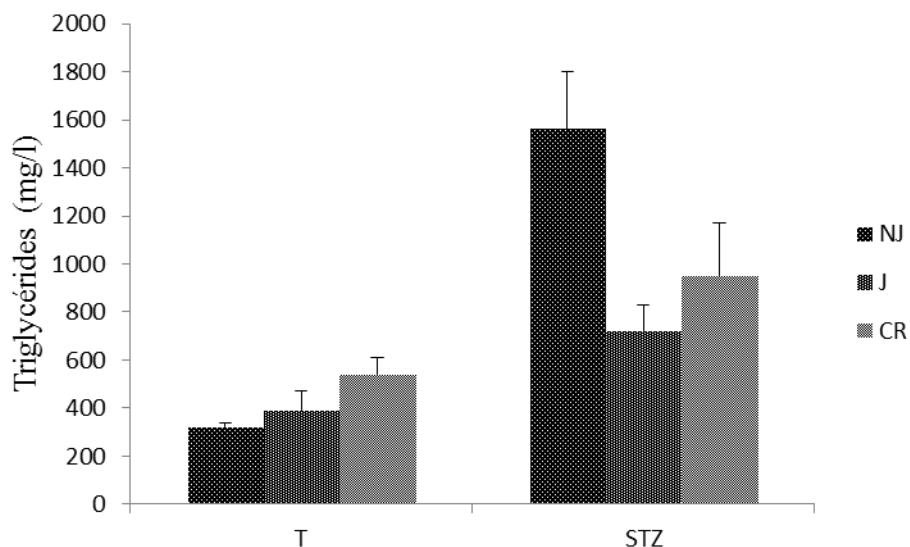


**Figure 24.** Représentation graphique de la cholestérolémie chez les rats wistar témoins (T) et diabétiques (STZ), jeûneurs, non jeûneurs et ceux soumis à la restriction calorique.

### 2.4.2 Triglycérides plasmatiques

Le taux de triglycérides plasmatiques ne diffère pas significativement ( $p > 0,05$ ) entre les rats témoins non jeûneurs ( $320 \pm 0,02$  mg/l) et les témoins jeûneurs ( $390 \pm 0,08$  mg/l). Les rats témoins soumis à la restriction calorique enregistrent une triglycéridémie largement supérieure à celle des rats témoins NJ ( $p < 0,005$ ) ; elle atteint  $540 \pm 0,07$  mg/l (figure 25).

Chez les rats diabétiques (STZ), le taux de triglycérides le plus élevé est enregistré chez les rats STZ non jeûneurs qui affichent une triglycéridémie égale à  $1560 \pm 240$  mg/l. Le jeûne intermittent ainsi que la restriction calorique semblent diminuer le taux de triglycérides chez les rats STZ. En effet, la triglycéridémie est plus faible chez les rats diabétiques jeûneurs ( $720 \pm 110$  mg/l) et CR ( $950 \pm 220$  mg/l) par rapport aux rats diabétiques non jeûneurs ( $p < 0,002$ ).

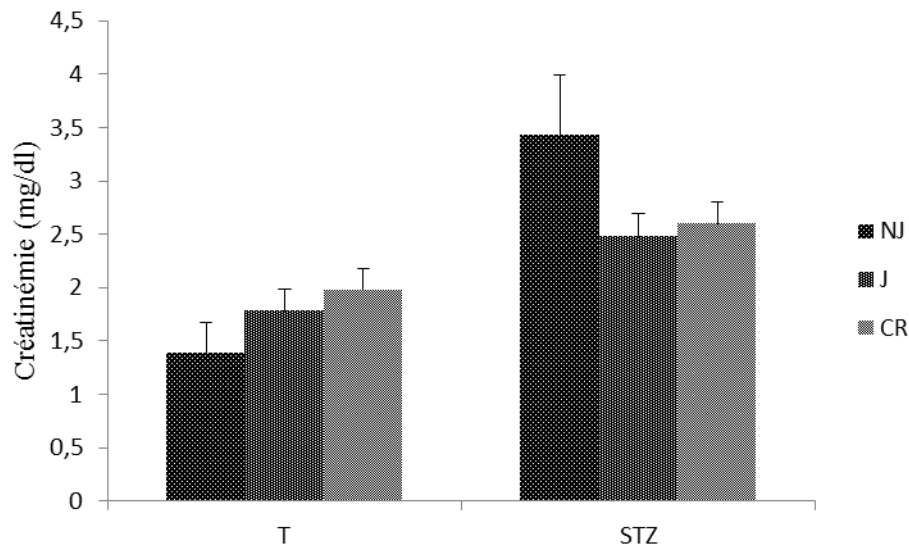


**Figure 25.** Représentation graphique de la triglycéridémie chez les rats wistar témoins (T) et diabétiques (STZ), jeûneurs, non jeûneurs et ceux soumis à la restriction calorique.

### 2.5 Paramètres rénaux

#### 2.5.1 Créatinine plasmatique

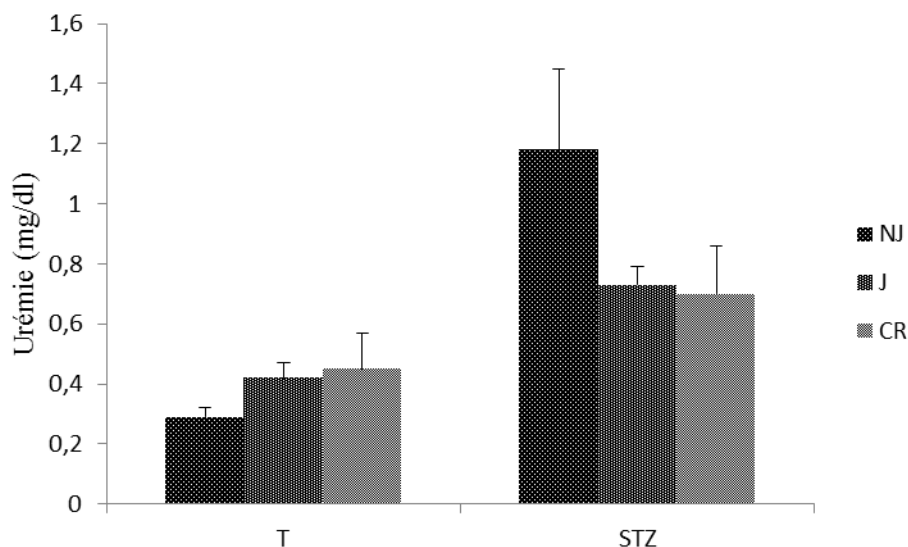
La concentration de la créatinine plasmatique est comparable entre les 3 groupes de rats témoins ( $p > 0,19$ ), avec une moyenne atteignant  $1,71 \pm 0,16$  mg/dl ( $n = 12$ ) (figure 26). Cette créatinémie est environ 2 fois plus élevée ( $p < 0,003$ ) chez les rats STZ non jeûneurs ( $3,43 \pm 0,63$  mg/dl;  $n = 4$ ) par rapport à celle enregistrée chez les témoins. Le taux de créatinine plasmatique semble diminuer sous l'effet du jeûne et de la restriction calorique ( $p < 0,05$ ) chez les rats STZ, elle atteint respectivement  $2,48 \pm 0,26$  et  $2,60 \pm 0,24$  mg/dl.



**Figure 26.** Représentation graphique de la créatinémie chez les rats wistar témoins (T) et diabétiques (STZ), jeûneurs, non jeûneurs et ceux soumis à la restriction calorique.

### 2.5.2 Urée plasmatique

La comparaison des taux d'urée plasmatique entre les rats témoins non jeûneurs, jeûneurs et ceux soumis à la restriction calorique (figure 27) indique que cette dernière ne diffère pas significativement entre les 3 groupes ( $p > 0,1$ ). La valeur moyenne des 3 groupes atteint  $38,8 \pm 5,4$  mg/dl ( $n = 12$ ). Par rapport aux rats témoins, l'urémie est environ 3 fois plus élevée ( $p < 0,001$ ) chez les rats STZ non jeûneurs ( $118,3 \pm 30,3$  mg/dl;  $n = 4$ ) dont le taux est également plus élevé comparé à celui des rats STZ jeûneurs et celui des rats STZ soumis à la restriction calorique ( $p < 0,02$ ).

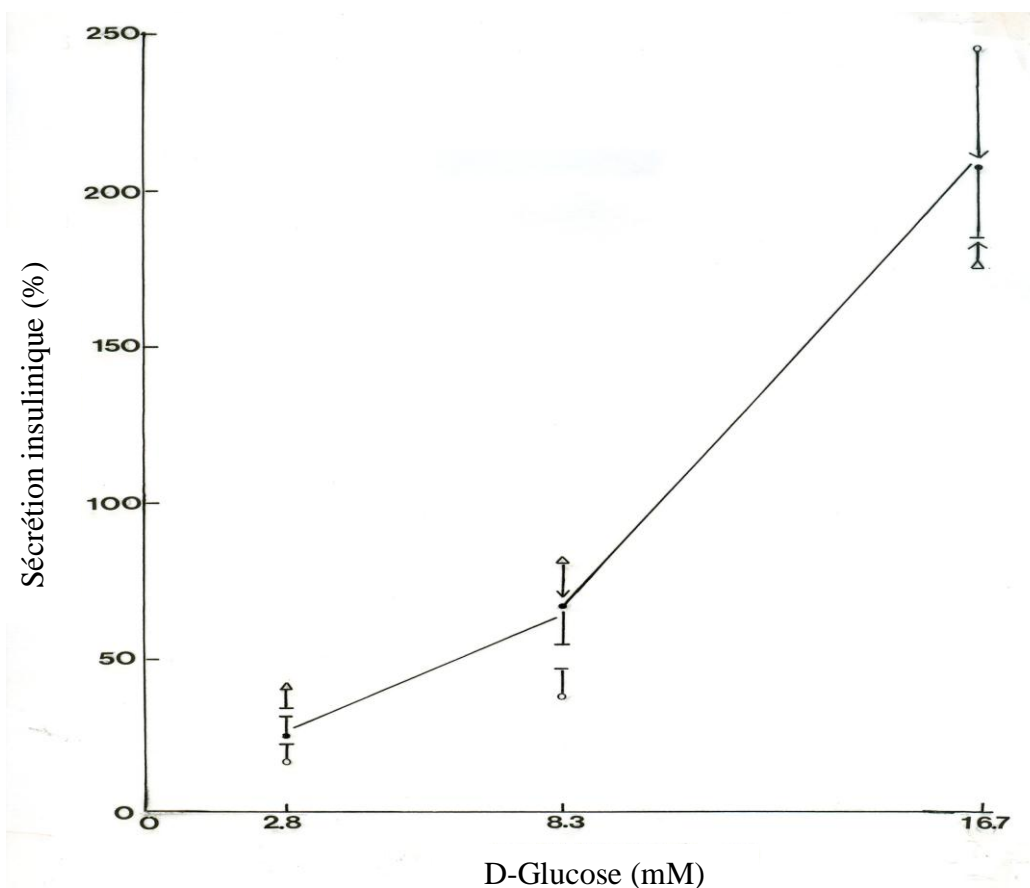


**Figure 27.** Représentation graphique de l'urémie chez les rats wistar témoins (T) et diabétiques (STZ), jeûneurs, non jeûneurs et ceux soumis à la restriction calorique.

### 2.6 Données sur les îlots pancréatiques

#### 2.6.1 Sécrétion statique

La sécrétion d'insuline par les îlots des rats témoins, incubés pendant 90 min dans un milieu à 8,3 mM de D-glucose, atteint  $87,3 \pm 12,7 \mu\text{U}/\text{îlot}$  ( $n = 40$ ). Comme il est illustré dans la figure 28, la relation entre la concentration du D-glucose et la réponse de l'îlot à celle-ci indique que la sécrétion d'insuline en réponse à des concentrations croissantes d'hexose est comparable entre les rats témoins NJ, J et CR. Cependant, on constate que les valeurs moyennes d'insuline sécrétées par des îlots préparés à partir de rats J et CR et incubés à 2,8 mM et 8,3 mM, tendent à être plus élevées chez ces derniers par rapport aux rats non jeûneurs.



**Figure 28.** Sécrétion insulinaire par les îlots isolés à partir de pancréas de rats témoins non jeûneurs (○), jeûneurs (●), et rats CR (Δ), incubés à des concentrations graduelles de D-glucose. Les résultats sont exprimés par rapport aux valeurs moyennes enregistrées aux trois concentrations d'hexose pour chaque groupe de rats.

Quel que soit la concentration de D-glucose dans laquelle ont été incubés les îlots préparés à partir des rats témoins, leur contenu final en insuline ne diffère pas significativement entre l'incubation à 2,8, 8,3 ou 16,7 mM. En regroupant toutes les données disponibles concernant le contenu en insuline des îlots obtenus à partir de tous les rats témoins, tous groupes confondus (NJ, J et CR), on constate que les valeurs moyennes globales pour chaque incubation atteignent  $96,0 \pm 5,5\%$  ( $n = 39$ ),  $98,8 \pm 3,8\%$  ( $n = 40$ ) et  $105,0 \pm 3,3\%$  ( $n = 40$ ) dans les îlots exposés respectivement aux trois concentrations du D-glucose, à savoir 2,8, 8,3 et 16,7 mM. Ces résultats ne présentent aucune différence significative. De la même manière, aucune différence significative n'a été observée entre les valeurs moyennes du contenu en insuline des îlots préparés à partir de rats témoins NJ ( $347,2 \pm 18,0 \mu\text{U}/\text{îlot}$ ;  $n = 30$ ) ceux des rats témoins J ( $303,0 \pm 14,0 \mu\text{U}/\text{îlot}$ ;  $n = 30$ ) ou CR ( $385,1 \pm 16,4 \mu\text{U}/\text{îlot}$ ;  $n = 29$ ).

## RÉSULTATS

---

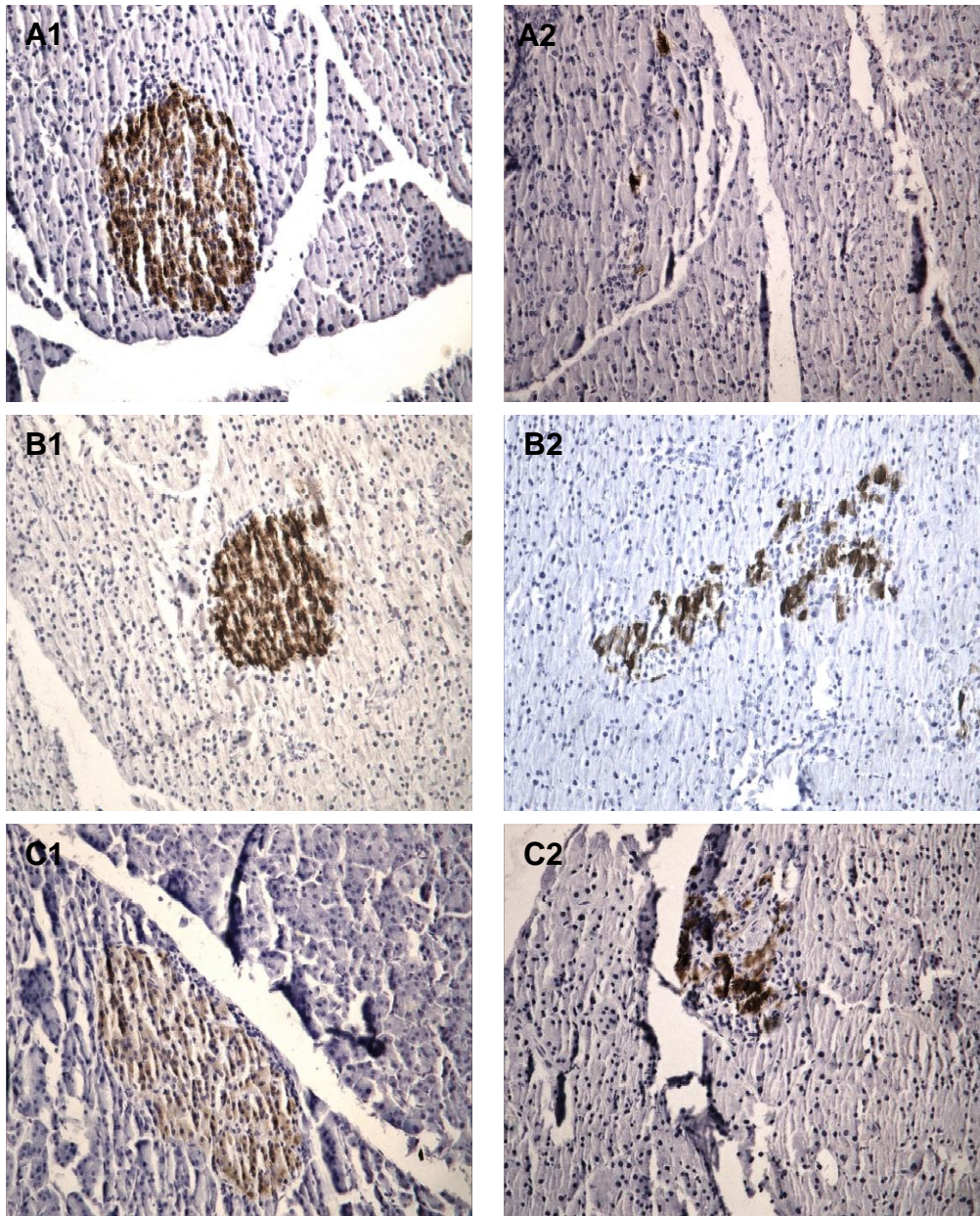
La sécrétion d'insuline ( $\mu\text{U}/\text{îlot}$  en 90 min) par les îlots préparés à partir de rats STZ, atteint à la concentration en D-glucose à 2,8, 8,3 et 16,7 mM, respectivement,  $2,08 \pm 0,91$  ( $n = 28$ ),  $4,01 \pm 1,01$  ( $n = 36$ ) et  $7,18 \pm 1,70$  ( $n = 36$ ). Cette sécrétion est significativement plus élevée ( $p < 0,02$ ) à la concentration 16,7 mM qu'à la concentration 2,8 mM. Si l'on se réfère aux valeurs moyennes de la sécrétion d'insuline et celles du contenu insulinaire des îlots dans chaque expérience, on constate que la sécrétion d'insuline représente  $32,7 \pm 11,7\%$  ( $n = 4$ ),  $43,0 \pm 19,4\%$  ( $n = 5$ ) et  $62,6 \pm 32,1\%$  ( $n = 5$ ) du contenu final en insuline dans les îlots après une incubation à 2,8; 8,3 et 16,7 mM D-glucose, respectivement. Le contenu en insuline des îlots préparés à partir de rats STZ diminue progressivement en fonction de la concentration de D-glucose dans laquelle les îlots sont incubés. En effet, le contenu en insuline de ces îlots atteint en moyenne  $165,5 \pm 27,8\%$  ( $n = 28$ ) après une incubation à 2,8 mM,  $105,1 \pm 20,1\%$  ( $n = 35$ ) et  $94,8 \pm 17,4\%$  ( $n = 35$ ) après une exposition aux concentrations 8,3 et 16,7 mM, respectivement. La différence est statistiquement significative ( $p < 0,03$ ) quand on compare le contenu des îlots incubés à la concentration 2,8 mM et à la concentration 16,7 mM. Enfin, ces observations sont valables aussi bien pour les rats STZ non jeûneurs, jeûneurs que CR.

La sécrétion d'insuline tout comme le contenu de celle-ci dans les îlots sont tous deux très faibles chez les rats STZ comparés aux témoins. Par exemple, après les 90 min d'incubation à la concentration 8,3 mM de D-glucose, la moyenne de la sécrétion d'insuline par les îlots des rats STZ n'excède pas  $4,0 \pm 1,0 \mu\text{U}/\text{islet}$  ( $n = 36$ ), alors que la valeur moyenne de cette sécrétion, sous les mêmes conditions atteint  $87,3 \pm 12,7 \mu\text{U}/\text{islet}$  ( $n = 40$ ) chez les rats témoins.

Le même constat est fait concernant le volume relatif occupé par les îlots dans les sections de pancréas. En effet, celui-ci n'excède pas  $0,20 \pm 0,05\%$  ( $n = 9$ ) chez les rats STZ alors qu'il atteint  $1,06 \pm 0,07\%$  ( $n = 9$ ) chez les rats témoins ( $p < 0,001$ ). Aucune différence significative n'est observée entre les valeurs enregistrées chez les rats diabétiques J et CR et celles enregistrées chez les rats STZ non jeûneurs ( $p > 0,23$ ). Ceci est également le cas des rats témoins.

**2.6.2 Etude histologique du pancréas**

**2.6.2.1 Marquage immunohistochimique de l'insuline**



**Figure 29.** Immunodétection par la technique ABC-DAB de l'insuline dans les îlots pancréatiques de rats témoins (1) et rats STZ (2), non jeûneurs (A), jeûneurs (B) et CR (C). (Grossissement x40).

La détection immunohistologique de l'insuline par la technique ABC-DAB (figure 29) indique que l'intensité de la coloration brune, reflétant la présence de cellules positives à l'insuline, est comparable entre les rats témoins non jeûneurs, jeûneurs et ceux soumis à la restriction calorique à

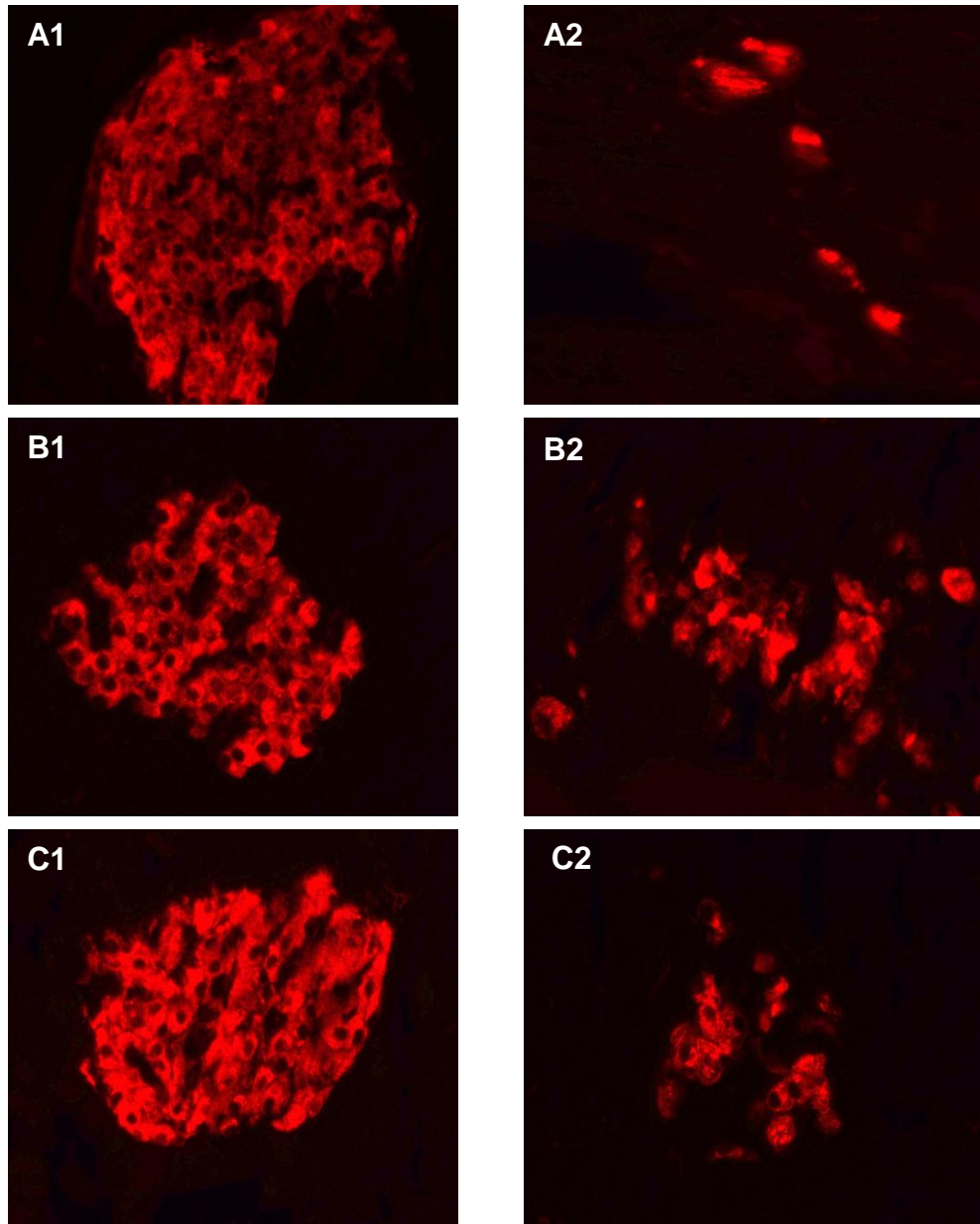
## ***RÉSULTATS***

---

20%. Ceci a également été constaté sur les îlots marqués à l'insuline par immunofluorescence (figure 30).

Chez les rats STZ non jeûneurs, les îlots pancréatiques perdent complètement leur intégrité. En effet, on constate que leur morphologie est très atteinte (figure 29). L'atteinte de l'intégrité des cellules bêta se reflète sur le plan fonctionnelle par l'absence quasiment totale de l'insuline au niveau des îlots pancréatiques marqués à l'insuline par immunofluorescence (figure 30). En effet, il y a perte totale d'immunoréactivité de l'insuline. Aucune infiltration de cellules immunitaires n'a été observée aux alentours des îlots de rats STZ non jeûneurs.

La coloration brune qui est pratiquement absente chez les rats STZ non jeûneurs, est relativement plus intense chez les rats STZ soumis au jeûne intermittent ou à la restriction calorique à 40%, ceci dit la présence de cellules positives à l'insuline restent nettement plus faible en comparaison avec celles des îlots appartenant aux 3 groupes de rats témoins. Au marquage immunofluorescent (figure 30), l'insuline apparaît légèrement plus présente au niveau des cellules bêta des rats STZ jeûneurs ou CR comparés aux rats STZ non jeûneurs.



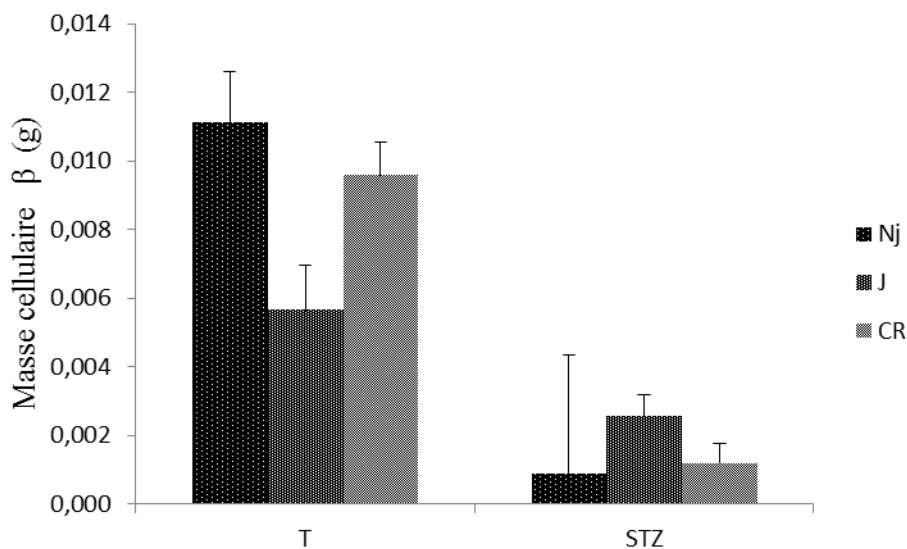
**Figure 30.** Immunodétection de l'insuline par immunofluorescence dans les îlots pancréatiques de rats témoins (1) et rats STZ (2), non jeûneurs (A), jeûneurs (B) et CR (C). (Grossissement x40).

#### **2.6.2.2 Masse cellulaire $\beta$**

Le comptage de la masse cellulaire  $\beta$  révèle une différence entre les rats jeûneurs et les deux autres groupes de rats témoins. En effet, il est observé une diminution de cette masse chez les jeûneurs qui atteint en moyenne  $0,0111 \pm 0,0035$  mg, Cette masse cellulaire chez ce dernier groupe représente

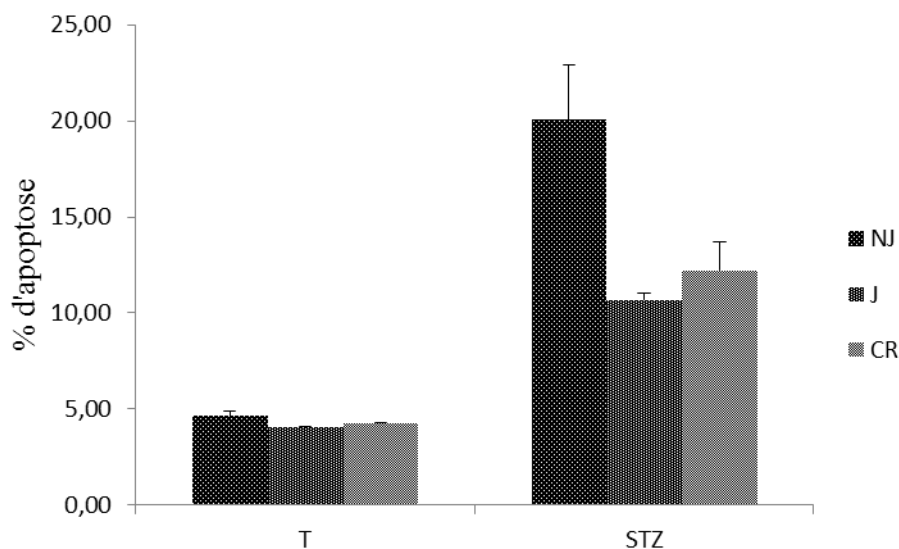
## RÉSULTATS

50,9% de la masse cellulaire calculée chez les témoins non jeûneurs. La masse cellulaire  $\beta$  chez les rats CR est comparable à celle de témoins non jeûneurs, elle atteint  $0,0096 \pm 0,0010$  mg, soit une valeur moyenne représentant 86,13% de celle calculée chez les rats témoins non jeûneurs (figure 31).



**Figure 31.** Masse cellulaire  $\beta$  chez les rats témoins (T) et STZ, non jeûneurs, jeûneurs et CR.

Concernant les rats diabétiques, la masse cellulaire  $\beta$  est considérablement diminuée chez les rats STZ non jeûneurs, elle atteint en moyenne seulement  $0,0009 \pm 0,0035$  mg. Elle représente 8,05% de la masse cellulaire retrouvée chez les rats témoins non jeûneurs. Cette masse cellulaire bêta augmente relativement sous l'effet du jeûne intermittent ( $0,0026 \pm 0,0006$  mg) et de la restriction calorique ( $0,0012 \pm 0,0006$  mg) atteignant respectivement 285,15 et 133,65% de la valeur moyenne retrouvée chez les Rats STZ non jeûneurs. Cependant, comme il a déjà été constaté par le marquage immunohistochimique ABC-DAB, cette masse cellulaire chez les deux groupes de STZ J et CR reste très inférieure à celle des rats témoins NJ. En effet, comparée à ces derniers elle ne représente respectivement que 22,95 et 10,75%.

**2.6.2.3 Evaluation de l'apoptose**

**Figure 32.** Pourcentage d'apoptose évalué par le TUNEL au niveau des pancréas de rats témoins et STZ, non jeûneurs, jeûneurs et CR.

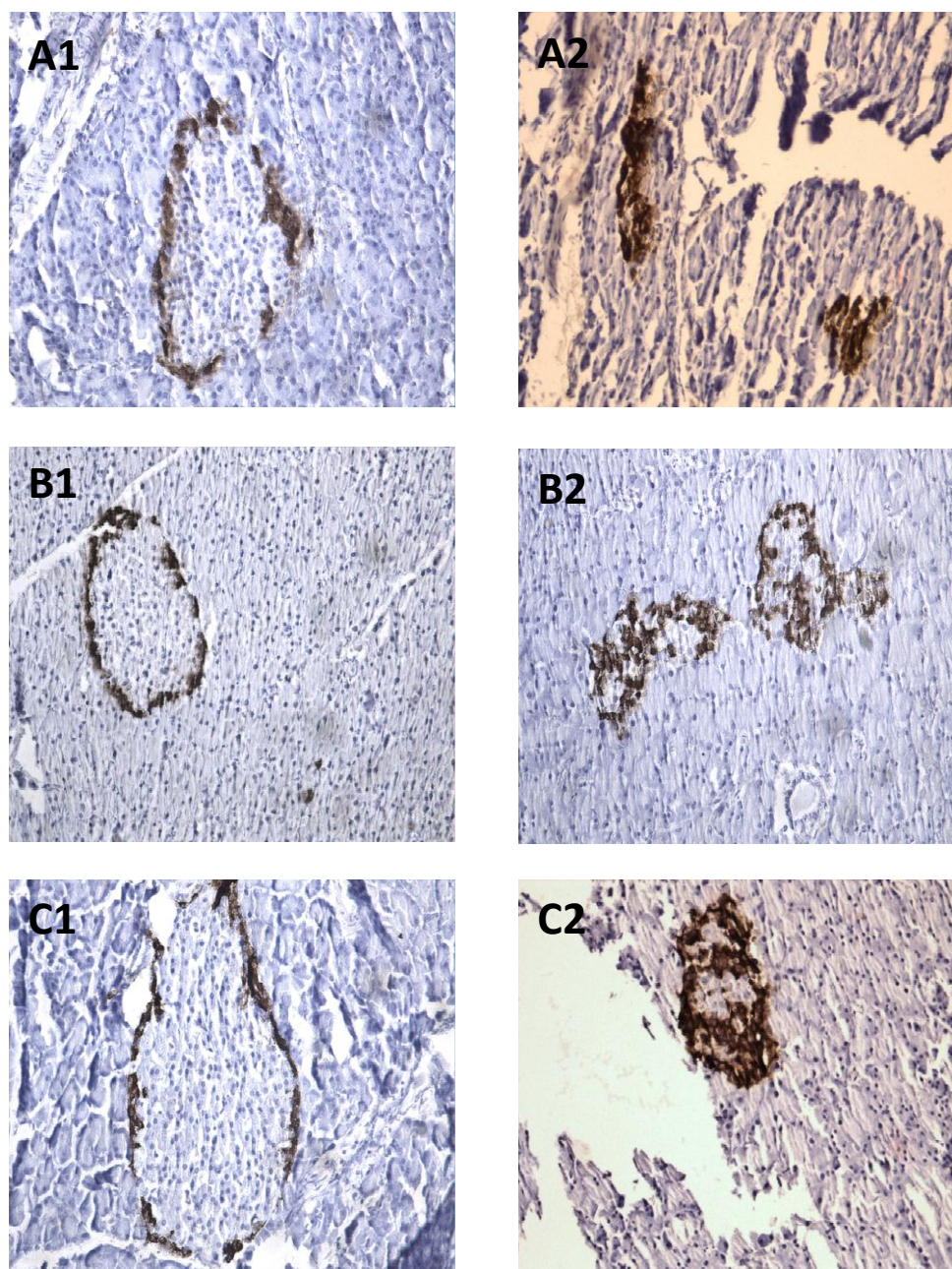
Le taux d'apoptose est largement plus élevé ( $p < 0,001$ ) chez les rats STZ que chez les rats témoins tous groupes confondus (figure 32). Chez le groupe des non jeûneurs, les rats témoins affichent un taux d'apoptose égale à  $4,67 \pm 0,21$  % ( $n=5$ ) alors que chez les rats STZ le taux d'apoptose atteint  $20,03 \pm 2,9$  % ( $n=5$ ), soit 4,3 fois plus élevé par rapport aux rats témoins.

Chez les rats témoins, ni le jeûne intermittent ni la restriction calorique n'exercent un effet sur l'apoptose dont les taux qui atteignent respectivement  $4,02 \pm 0,10$  % ( $n=5$ ) et  $4,26 \pm 0,07$  % ( $n=5$ ), sont comparables ( $p > 0,05$ ) à ceux des non jeûneurs. Cependant, ces deux paradigmes semblent diminuer le taux d'apoptose chez les rats STZ jeûneurs ( $10,68 \pm 0,38$  %,  $n=5$ ) et CR ( $12,22 \pm 1,46$  %,  $n=5$ ). Le pourcentage d'apoptose chez ces deux groupes de rats représente respectivement 53,23 et 61 % du taux enregistré chez les rats STZ non jeûneurs (100%,  $p < 0,05$ ). Néanmoins, le pourcentage d'apoptose chez les rats STZ J et CR reste plus élevé que celui retrouvé chez les rats témoins, il représente respectivement 248 et 283,7 % du taux retrouvé chez les rats témoins (100%,  $n=15$ ).

### **2.6.2.4 Immunodétection du glucagon par marquage ABC-DAB**

Concernant l'immunomarquage au glucagon (figure 33), celui-ci révèle que chez les 3 groupes de rats témoins, les cellules alpha se localisent à la périphérie de l'îlot, ce qui est typique pour ces cellules. Ceci ne semble pas être le cas au niveau des îlots des rats STZ dont le nombre de cellules alpha augmente au détriment de la diminution de la masse cellulaire bêta. Les cellules  $\alpha$  ont tendance à "envahir" la partie centrale de l'îlot au lieu de se localiser à la périphérie de celui-ci.

Il semble d'après les observations microscopiques de plusieurs sections et îlots pancréatiques, que le jeûne a un effet relativement positif sur la répartition des cellules  $\alpha$  au niveau des îlots des rats diabétiques STZ. En effet, on constate que ces cellules envahissent moins le centre de l'îlot chez les rats STZ jeûneurs mais également chez les rats soumis à la restriction calorique par rapport aux rats STZ non jeûneurs. Leur nombre semble être moins élevé par rapport à celui retrouvé chez les rats STZ non jeûneurs.



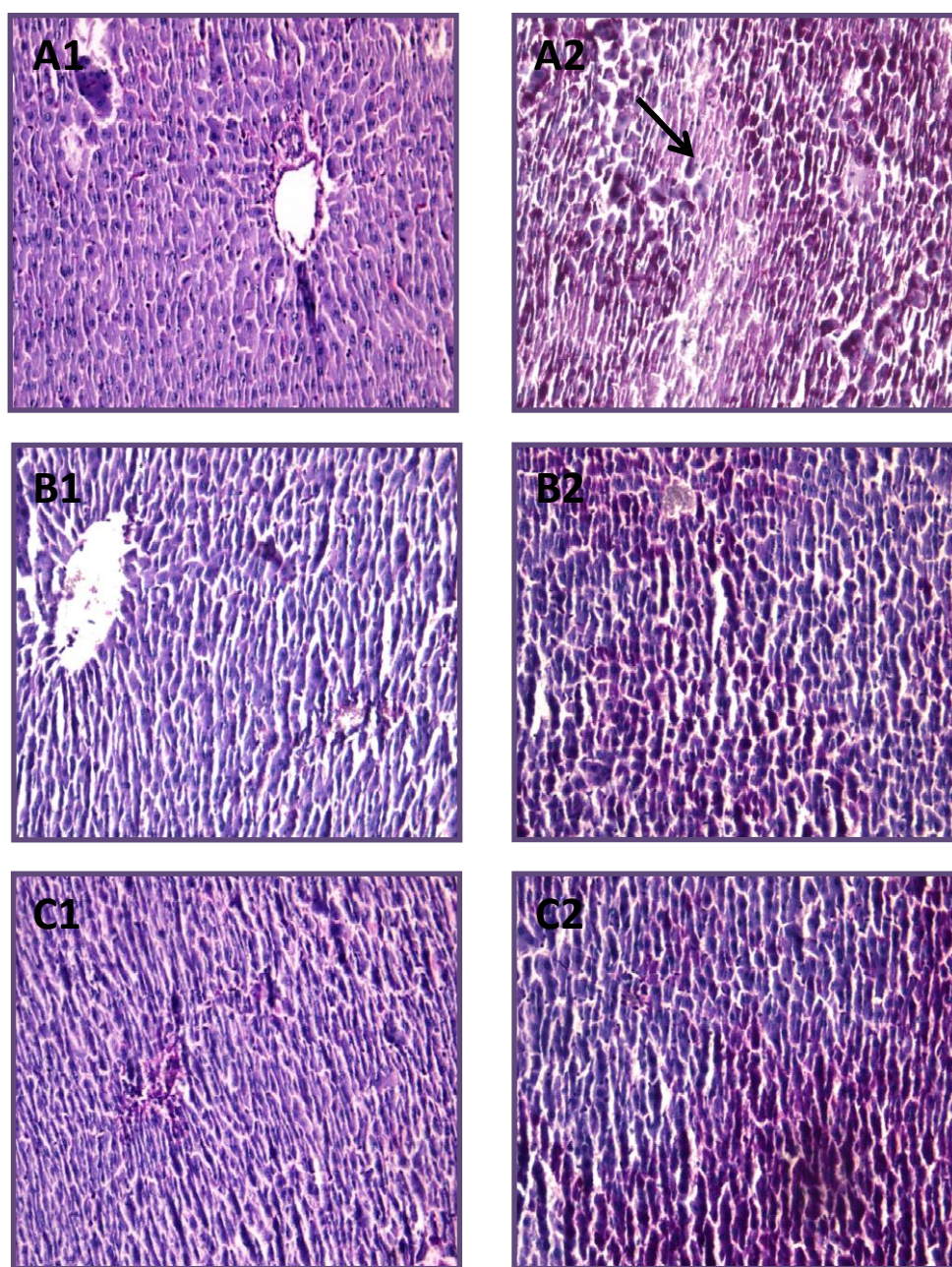
**Figure 33.** Immunodétection par la technique ABC-DAB du glucagon au niveau des îlots pancréatiques de rats témoins (1) et rats STZ (2), non jeûneurs (A), jeûneurs (B) et CR (C). (Grossissement x40).

### **2.7 Etude histologique du foie**

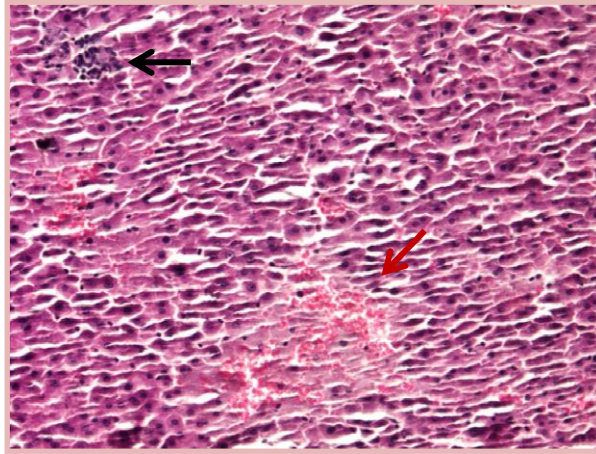
D'après la figure 34, on constate la présence de plage de nécrose au niveau de la coupe hépatique du rat STZ non jeûneurs (flèche A2) et une congestion de celui-ci. Cette observation a été constatée sur toutes les coupes issues des rats diabétiques non jeûneurs. Il y a lieu de préciser la présence de quelques zones d'infiltrations au niveau de ces coupes hépatiques du même groupe de rats (figure 34 bis).

Contrairement aux rats STZ non jeûneurs, les plages de nécrose n'apparaissent pas ou alors très faiblement au niveau des coupes de foie des rats STZ jeûneurs (B2) et CR (C2).

D'autre part, on constate que les hépatocytes au niveau des coupes hépatiques de rat STZ sont positifs à la coloration PAS, avec une coloration plus intense chez les non jeûneurs. Ceci reflète l'accumulation du glycogène. La coloration semble relativement se clarifier au niveau des coupes hépatiques des rats streptozotocine J et CR indiquant une moindre accumulation du glycogène au niveau des foies de ces rats.



**Figure 34** : Coupes histologiques de foie de rats témoins (1) et STZ (2), non jeûneurs (A), jeûneurs (B) et CR (C). Coloration PAS (grossissement x 20).



**Figure 34 bis.** Coupes histologique de foie de rat STZ non jeûneurs, colorée à l'hématoxyline-éosine. On remarque la présence de nécrose (flèche rouge) et d'infiltration (flèche noire). Coloration hématoxyline-éosine. (Grossissement X40).

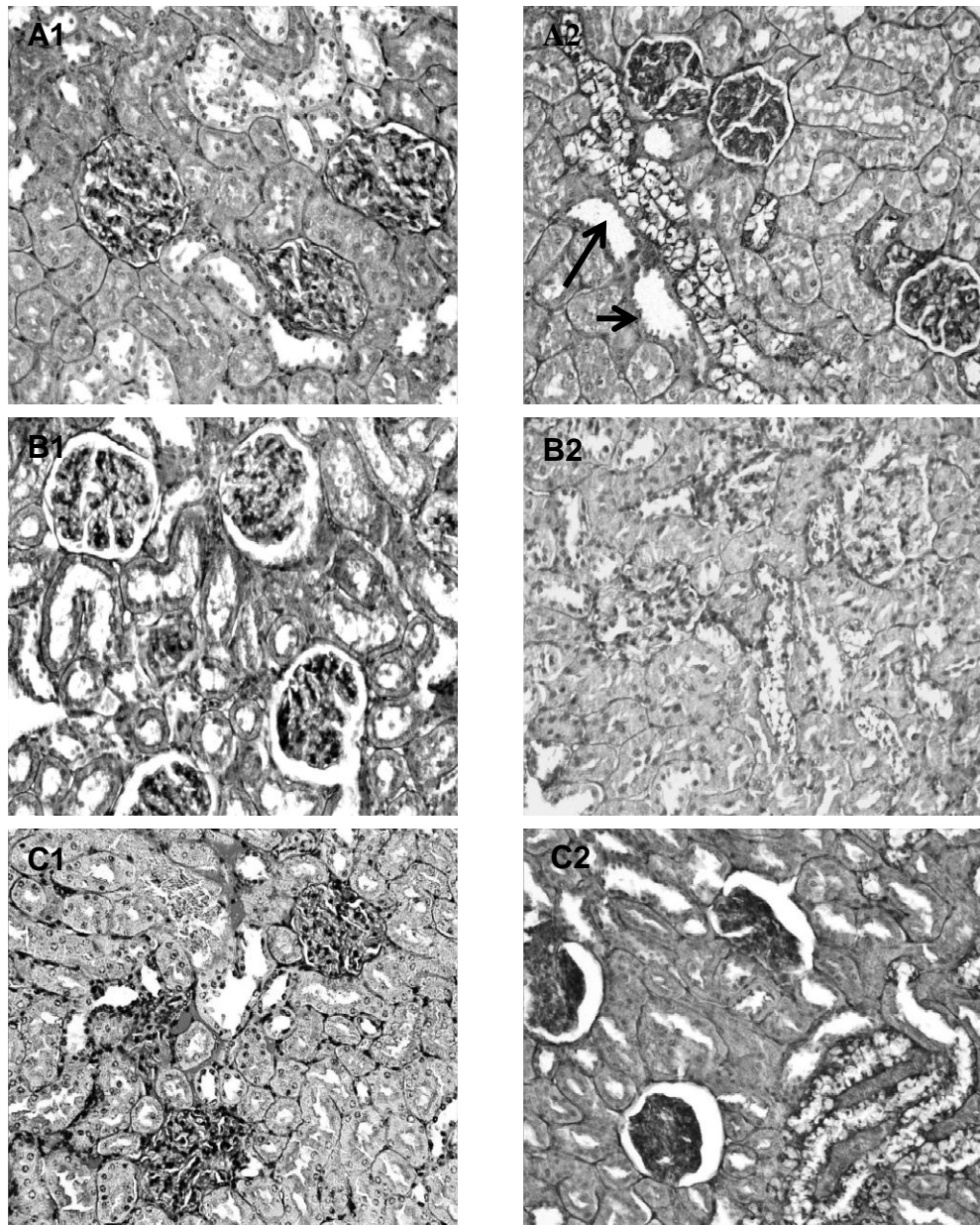
### 2.8 Etude histologique et immunohistochimique du rein

#### 2.8.1 Etude histologique du rein

Au microscope optique, l'analyse histologique des coupes rénales de rats STZ non jeûneurs démontre la présence de cellules Armani-Ebstein principalement dans les tubules proximaux, avec à la périphérie de leur cytoplasme des grains positive à l'acide périodique de schiff. A proximité de ces cellules Armani-Ebstein, on constate la présence de tubules dilatés et atrophiés (flèche A2) (figure 35).

Ces changements histologiques semblent relativement être moins accentués au niveau des coupes rénales de rats soumis à la restriction alimentaire mais surtout de ceux soumis au jeûne intermittent.

L'analyse des coupes rénales de rats témoins ne révèle aucun effet du jeûne ou de la restriction calorique sur l'histologie du rein.



**Figure 35.** Coupes rénales de rats témoins (1) et rats STZ (2), non jeûneurs (A), jeûneurs (B) et CR (C) colorées à l'acide périodique de schiff. (Grossissement x40).

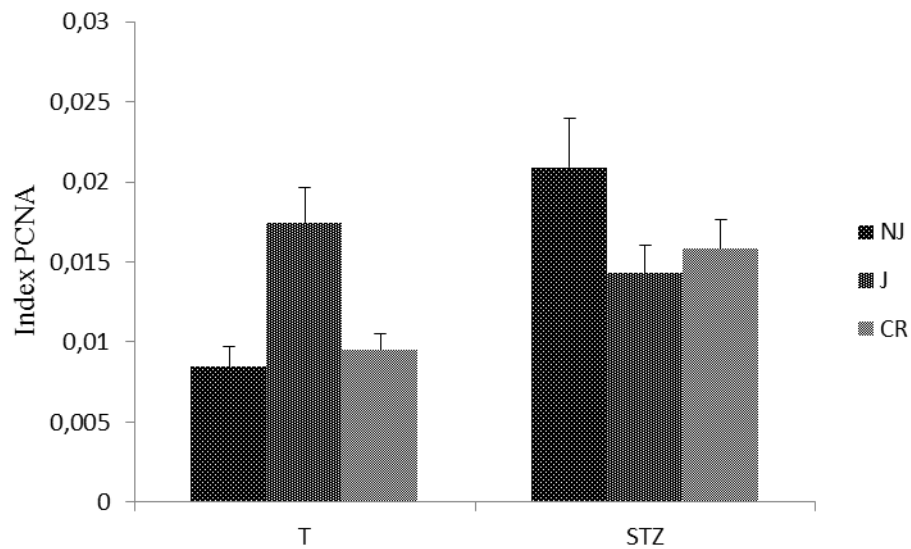
### 2.8.2 L'index PCNA

En moyenne, l'index PCNA est significativement plus élevé chez les rats STZ que chez les rats témoins ( $p < 0,001$ ).

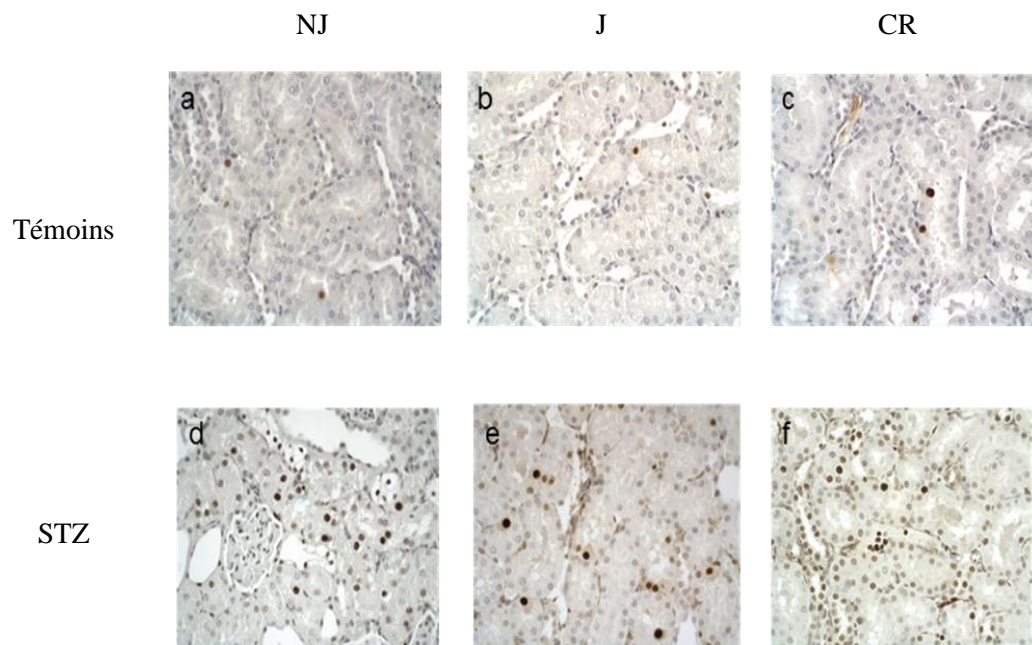
Le jeûne intermittent ainsi que la restriction calorique semble exercer un effet non négligeable sur l'index PCNA chez les rats STZ ( $p < 0,04$ ). En effet, cet index est plus bas chez ces deux groupes

## RÉSULTATS

(STZJ :  $142,9 \pm 17,5 \cdot 10^{-4}$  et STZJ :  $157,9 \pm 18,1 \cdot 10^{-4}$ ) par rapport à celui calculé chez les rats STZ non jeûneurs ( $209,3 \pm 30,5 \cdot 10^{-4}$ ).



**Figure 36.** L'index PCNA chez les rats témoins et STZ, non jeûneurs, jeûneurs et CR.



**Figure 37.** L'expression immunohistochimique du PCNA (proliferative cellular nuclear antigen) dans le cortex rénal des rats témoins et STZ non jeûneurs, jeûneurs et CR (Grossissement X40). Les cellules positives au PCNA présentent des noyaux brun noirâtre.

**DISCUSSION**

---

**CONCLUSION & PERSPECTIVES**

## **DISCUSSION**

### **1. *Psammomys obesus***

#### **1.1 Induction du diabète de type 2**

Le rat de sable *Psammomys obesus* est un modèle animal comptant parmi les rares espèces offrant l'avantage de développer un diabète de type 2 nutritionnellement induit. Lorsque le *Psammomys obesus*, en captivité, est nourri au régime hypercalorique, il développe un syndrome métabolique rappelant celui du diabète de type 2 humain (Kaldron et al, 1986). Selon Nesher et al (2001), l'un des aspects attractifs chez le *Psammomys obesus* est que son phénotype diabétique se révèle durant le processus d'adaptation lors de la transition du régime hypocalorique, retrouvé dans son habitat naturel, au régime synthétique hypercalorique. Ceci rappelle la genèse du diabète de type 2 chez l'être humain qui est dû entre autre à son passage au mode de vie occidental se caractérisant par une sédentarité et une alimentation riche en calories. De ce fait, afin de mieux comprendre l'étiologie ainsi que la physiopathologie du diabète de type 2 chez l'humain, plusieurs chercheurs ont opté pour l'utilisation de cet animal comme modèle expérimental (Nesher et al, 1999 ; Ikeda et al, 2001 ; Leibowitz et al, 2002).

L'un des objectifs de cette thèse consistant à étudier la réponse métabolique de rats atteints de diabète de type 2 à une privation alimentaire imposée sous forme de jeûne intermittent mimant le jeûne du Ramadan, nous a conduit à utiliser le *Psammomys obesus*, une espèce désertique tant convoitée pour des recherches sur le diabète de type 2.

Le changement de régime alimentaire, autrement dit l'introduction d'un régime synthétique largement plus calorique par rapport au régime naturel des *Psammomys obesus* basé sur la consommation de plantes halophytes, à générer des changements métaboliques tant sur le plan biochimique qu'organique.

### **1.1.1 Poids corporel et consommation alimentaire**

Chez les *Psammomys* non jeûneurs, la consommation du régime végétal (*Atriplex halimus*) par les *Psammomys* témoins est plus importante que la quantité d'aliment standard consommée par les *Psammomys* diabétiques et non diabétiques. La valeur énergétique du régime végétal étant faible, les *Psammomys* témoins la compensent par une quantité d'aliment ingéré plus importante que celle des *Psammomys* diabétiques et non diabétiques. Si l'on se réfère à la consommation alimentaire uniquement en grammes d'aliment ingéré, on constatera que les *Psammomys* soumis au régime synthétique consomment moins que les témoins. Cependant, si l'on prend en considération la valeur calorique de chaque aliment (végétal ou synthétique) et donc la quantité d'aliment ingéré exprimée en Kcal/jour au lieu de g/jour, on constatera que la prise calorique chez les *Psammomys* soumis au régime synthétique dépasse celle des *Psammomys* témoins. La teneur de l'aliment synthétique représente 690% de la valeur énergétique du régime naturel végétal. Ceci démontre bien l'intérêt de prendre en considération un aliment non pas sur le plan quantitatif (ration ingérée) mais sur le plan qualitatif. En effet, c'est la nature des nutriments qui composent un aliment qui déterminera son influence sur l'homéostasie. Dans ce contexte, c'est la qualité de l'aliment synthétique, de nature hypercalorique, qui a causé les désordres métaboliques observés aussi bien chez les *Psammomys* diabétiques que non diabétiques. Ceci nous amène à dire que bien que le gain de poids chez ces derniers soit relativement comparable à celui des témoins, l'évolution des paramètres biochimiques chez ces trois groupes est complètement différente. En effet, la lipidémie diffère nettement entre le groupe de *Psammomys* continuant à se nourrir au régime naturel et le groupe soumis au régime synthétique. De plus, même au sein de ce groupe, l'homéostasie glucidique a permis de distinguer entre les diabétiques et non diabétiques.

Les deux aliments diffèrent principalement en leur teneur en glucides. Cette teneur représente au niveau de l'*Atriplex* seulement 2,93% de celle retrouvée au niveau de l'aliment standard. D'autre part, la qualité des composés glucidiques de l'*Atriplex* contribue au maintien d'une normoglycémie chez les *Psammomys* témoins. En effet, l'*Atriplex halimus* est une chénopodiacée dont les hydrates de carbone sont composés de lignine, d'hémicellulose et de cellulose. L'hydrolyse de ces fibres alimentaires par la

flore intestinale prend du temps (Degen et al, 2000), ce qui ralentit l'absorption du glucose et donc une augmentation d'une glycémie post prandiale.

### **1.1.2 L'homéostasie glucidique**

La glycémie des *Psammomys* soumis au régime riche en calories, a permis de distinguer deux sous-groupes : les gerbilles du premier sous-groupe qui ont une glycémie supérieure à 1,49 g/l (8,3 mmol/l) et donc considérées comme hyperglycémiques, tandis que les gerbilles du deuxième sous-groupe présentent une glycémie inférieure à 1,40 g/l (7,8 mmol/l) et sont considérées comme étant normoglycémiques (Leibowitz et al, 2001, Kaiser et al 2005 ; Üçkaya et al, 2005). Ainsi, bien que ces deux sous-groupes soient soumis au même régime synthétique hypercalorique, ils présentent des glycémies totalement différentes. Par conséquent, une alimentation riche en calories et une sédentarité (captivité des rats) ne sont pas des facteurs suffisants pour provoquer un diabète non insulino-dépendant. La prédisposition génétique joue un rôle très important dans l'apparition de cette hyperglycémie et donc du diabète. A ce propos, certains auteurs (Kaiser et al, 2005 ; Shafrir et al, 2006) rapportent que seulement 40% des *Psammomys* soumis au régime synthétique sont rendus diabétiques. Au fait, c'est la prédisposition génétique qui détermine la réponse des *Psammomys* obèses au régime synthétique hypercalorique. En effet, il existe deux lignées de *Psammomys* obèses ; la première est résistante au diabète (DR) tandis que la deuxième y est prédisposée (DP) (Kalman et al, 1996 ; Kaiser et al, 2005). Les *Psammomys* résistants au diabète, soumis au régime synthétique, compensent la surcharge calorique par une augmentation modérée de la sécrétion d'insuline, une quantité suffisante pour maintenir une normoglycémie. Cependant, chez l'autre lignée de *Psammomys*, cette même quantité d'insuline, et même une concentration plus élevée, sont incapables de prévenir une hyperglycémie.

Dans cette étude, la différence entre les deux lignées est perçue avant même que ces deux dernières soient soumises au régime hypercalorique. En effet, avant l'introduction du nouveau régime, autrement dit quand les gerbilles de sable sont encore sous régime végétal, la glycémie post prandiale est déjà élevée ( $p < 0,03$ ) chez les *Psammomys* identifiés par la suite comme diabétiques ( $4,19 \pm 0,16$  mM;  $n = 19$ ) par rapport à celle des *Psammomys* ne développant jamais de diabète ( $3,55 \pm 0,24$  mM;  $n$

## ***DISCUSSION***

---

= 19). D'autre part, la AUC durant le test de tolérance intraperitonéal au glucose (IPGTT) est déjà plus élevée ( $p < 0,005$ ) chez les gerbilles de sable prédisposées au diabète ( $954,8 \pm 60,6$  mM.min;  $n = 12$ ) comparée à l'AUC chez celles qui y sont résistantes ( $739,0 \pm 27,8$  mM.min;  $n = 12$ ). Ces différences s'accroissent davantage après le sevrage du régime végétal hypocalorique.

La différence entre ces deux lignées se situe principalement au niveau du fonctionnement des îlots (Nesher, 2001). Plusieurs maillons impliqués dans la synthèse, le stockage et la sécrétion d'insuline semblent déterminer la cause de l'évolution de l'hyperglycémie chez la lignée prédisposée au diabète qui est relative à la fonction perturbée des îlots de cette lignée. Cette lignée est incapable, en réponse au régime hypercalorique, d'augmenter le taux d'oxydation du glucose. Le faible taux de glucose oxydé qui en résulte indique que le fonctionnement de la mitochondrie est inadéquat chez cette lignée (Nesher et al, 1999). L'incapacité de cette organelle à oxyder le glucose entraîne une production insuffisante d'ATP qui est considéré comme un métabolite important dans de multiples étapes impliquées dans la production d'insuline, son stockage et sa sécrétion. La déficience en ATP pourrait ainsi expliquer l'affaiblissement du contenu pancréatique en insuline et les troubles de la dynamique de la sécrétion d'insuline (Nesher et al, 1999).

L'homéostasie détériorée du glucose est d'une part expliquée par l'affaiblissement de la réponse insulinaire au glucose due à la perte des réserves pancréatiques en insuline qui a lieu déjà durant la phase d'intolérance au glucose qui précède le diabète franc (Kaiser et al, 2005). D'autre part, l'hyperglycémie chez les rats diabétiques est liée à la diminution de l'expression de certaines iso-enzymes des protéines kinases C (PKC). Une étude immunohistochimique a révélé qu'il y a une expression réduite de PKC $_{\alpha}$  et de PKC $_{\lambda}$  au niveau des cellules  $\beta$  des *Psammomys obesus* prédisposés au diabète comparée à celle retrouvée chez ceux qui y sont résistants (Nesher et al, 2001). La PKC $_{\alpha}$  est impliquée dans la réponse insulinaire au glucose au niveau des îlots (Nesher et al, 2001). Ainsi, la diminution de son expression chez les rats DP altère la réponse insulinaire au stimulus de glucose et donc par conséquent induit l'augmentation plasmatique de celui-ci. D'autres iso-enzymes de PKC, développées ultérieurement, sont par contre impliquées dans l'insulinorésistance.

Enfin, l'insulinorésistance décelée chez les Psammomys diabétiques contribue à l'hyperglycémie chez ces rats. En effet, en raison de la diminution de l'insulinosensibilité, l'insuline ne peut plus exercer efficacement son effet suppresseur sur l'expression de la glucose 6 phosphatase et la PEPCK. Il en résulte une augmentation du catabolisme du glycogène et du taux de néoglucogenèse aboutissant à une augmentation de la sécrétion hépatique de glucose (den Boer, 2006). Cet excès de glucose ne peut être rééquilibré par l'insuline.

### **1.1.3 Statut insulinique**

Les résultats (voir tableau 7) indiquent que l'insulinémie la plus élevée est enregistrée chez les Psammomys diabétiques. A cet effet, plusieurs études ont rapporté l'augmentation de l'insulinémie chez les gerbilles de sable développant un diabète (Nesher et al, 1999 ; Kaiser et al, 2005). Cette élévation est associée à l'augmentation de la phosphorylation du glucose au niveau de la cellule  $\beta$ . Ceci est dû à une activité augmentée de la glucokinase couplée à l'activité également élevée de l'hexokinase et ce en réponse au régime hypercalorique qui probablement serait responsables de l'augmentation de la sécrétion d'insuline chez les Psammomys diabétiques (Nesher et al, 1999). L'augmentation de la capacité de phosphorylation sensibilise les cellules  $\beta$  à un moindre niveau de glucose ce qui contribue à une sécrétion excessive d'insuline, qui couplée à une production d'insuline inappropriée (Leibowitz et al, 2001) induite par le régime, promeut l'épuisement des réserves pancréatiques en insuline et la réduction du nombre des cellules  $\beta$ .

L'insulinorésistance est extrêmement élevée chez les Psammomys diabétiques. En effet, la valeur de la HOMA chez les rats diabétiques (tableau 7) dépasse largement celle des deux autres groupes. Selon Ziv et al (1996), ces Psammomys même durant le stade où ils étaient normoglycémiques exhibaient une insulinorésistance. Ceci a été démontré par l'incapacité de ces derniers à avoir une hypoglycémie et à restreindre la production hépatique en glucose après une administration d'insuline exogène. L'un des éléments associé à l'insulinorésistance est l'augmentation de l'expression de la PKC $\epsilon$  (Hillel et al, 2005) aussi bien au niveau du foie qu'au niveau du muscle (Ikeda et al, 2005). Même sous régime hypocalorique, la PKC $\epsilon$  est surexprimée chez les Psammomys prédisposés au diabète. Seulement, la surexpression seule ne conduit pas forcément au diabète, c'est l'introduction du régime hypercalorique ainsi que la présence de facteurs liés au milieu diabétique tels

que l'hyperlipidémie, l'hyperglycémie et/ou l'hyperinsulinémie qui contribuent à l'activation de PKC $\epsilon$ . Cette surexpression pourrait expliquer la susceptibilité génétique de la lignée DP au développement de l'insulinorésistance, qui en concordance avec les influences environnementales pourrait aboutir au développement du diabète (Ikeda et al, 2001).

Cette expression augmentée de PKC $\epsilon$  va induire des désordres au niveau des voies de signalisation de l'insuline. Tout d'abord, cette surexpression va entraver la liaison de l'insuline à son récepteur (IR). En effet, il existe une corrélation inverse significative entre l'expression de la PKC $\epsilon$  et la liaison de l'insuline à l'IR (Ikeda et al, 2001). Ceci est dû au dysfonctionnement de l'IR lié à l'augmentation de la quantité des résidus tyrosine phosphorylés au niveau de la sous unité  $\beta$  (Kanety et al, 1994). En effet, il existe un défaut de phosphorylation de ces récepteurs, dû à une activation défectueuse de la tyrosine kinase par l'insuline (Kanety et al, 1994). Mise à part son effet sur le dysfonctionnement de l'IR, la PKC $\epsilon$  va également diminuer le nombre de ces récepteurs (Ikeda et al, 2001). Il est intéressant de noter que les P obèses ont déjà un petit nombre d'IRs comparés aux rats Albinos (Kanety et al, 1994, Meyerovitch et al, 2002) ; ainsi, même un changement mineur de leur nombre va influencer la signalisation d'insuline (Kanety et al, 1994). Mise à part la diminution de la densité des IRs, aussi bien au niveau du muscle que du foie (Kanety et al, 1994), il s'avère également que la surexpression de PKC $\epsilon$  inhibe la PKB et diminue le taux de GLUT 4 (Shafir et al, 1999; Ikeda et al, 2001). L'inhibition de la PKB pourrait être impliquée dans la diminution de la masse cellulaire  $\beta$  vu que cette kinase fournit une protection aux cellules  $\beta$  contre l'apoptose par la phosphorylation et l'inhibition de protéines pro apoptotiques (Jetton, 2005). Finalement, une étude *in vitro* démontre que la PKC $\epsilon$  jouerait un rôle important dans la médiation de l'effet inhibiteur du TNF- $\alpha$  sur la voie de signalisation de l'insuline (Kellerer et al, 1997).

### **1.1.4 Changements morphologiques du pancréas**

#### **1.1.4.1 Cellules $\beta$ et insuline**

D'après nos observations, les cellules  $\beta$  perdent une bonne partie de leurs réserves insuliniques au niveau des îlots pancréatiques des Psammomys diabétiques. Les mêmes observations ont été déjà faites par plusieurs auteurs (Gadot et al, 1994 ; Gadot et al, 1995 ; Leibowitz et al, 2001). Ce qui

## ***DISCUSSION***

---

pourrait expliquer la diminution du contenu en insuline est l'altération de la biosynthèse de proinsuline et/ou sa conversion en insuline due à la demande élevée en insuline (Gadot et al, 1995) résultante de l'augmentation de l'apport calorique. La conversion défectueuse de la proinsuline en insuline, observée durant le syndrome diabétique chez ces rats, est accompagnée par la diminution du contenu des îlots pancréatiques en PC1, PC2 et en carboxypeptidase H, enzymes responsables de la conversion de la proinsuline en insuline. Cette diminution n'est pas due à la diminution de leur biosynthèse mais plutôt à la sécrétion exagérée des granules sécrétoires chargés de ces enzymes et qui est en relation avec la demande élevée d'insuline (Alarcon et al, 1995). Il en résulte une augmentation du ratio proinsuline/insuline (Leibowitz et al, 2001). Ce même auteur rapporte que la diminution des réserves insuliniques est due à un déséquilibre entre la demande en insuline et la biosynthèse de celle-ci due à une sous-expression du gène d'insuline. Il semble que le gène d'insuline devient insensible à l'effet stimulateur du glucose, ceci est causé par l'absence du facteur de transcription de ce gène ; insulin promotor factor 1 (IPF1)/pancreatic duodenal homeobox 1 (PDX-1) chez *P. obesus* (Leibowitz et al, 2001; Leibowitz et al, 2002). Il est intéressant de préciser que malgré l'absence de ce facteur de transcription, les *Psammomys* arrivent à rester normoglycémiques quand ils sont sous régime hypocalorique et que leurs îlots pancréatiques contiennent une quantité normale d'insuline. Ainsi d'autres facteurs de transcription dans la cellule bêta sont suffisants à soutenir une expression basale du gène d'insuline sous les conditions hypocaloriques (Leibowitz et al, 2001 ; Vedtofte et al, 2007). Cependant, il est utile de préciser que le PDX1 pourrait exister chez le *Psammomys obesus*, mais qu'il serait suffisamment muté pour échapper à la détection immunologique (Vedtofte et al, 2007).

L'autre effet marquant du diabète sur le pancréas se situe au niveau de la morphologie des îlots qui semblent détériorés. En effet, on constate que la taille des îlots est largement plus réduite comparée à celle des deux autres groupes (voir figure 17). Selon Kaiser et al (2005), avant même que les *Psammomys* deviennent diabétiques, autrement dit quand ils sont au stade d'intolérance au glucose dit : « impaired fasting glucose », le volume et la masse cellulaires  $\beta$  sont déjà réduits. C'est la glucotoxicité qui affecte négativement la masse cellulaire bêta en promouvant la mort des cellules  $\beta$  qui n'est pas compensée par une augmentation du taux de production de ces cellules (Leibowitz et al, 2001). La diminution de la protéine kinase B, sus-citée en haut, contribue à l'apoptose de ces cellules

(Jetton, 2005). Quoique le dosage des acides gras libres plasmatiques n'ait pas pu être effectué chez nos *Psammomys*, on suppose que ce taux est élevé chez les rats diabétiques et non diabétiques non jeûneurs. D'ailleurs plusieurs auteurs (Girard, 2003 ; Cerasi et Ktorza, 2007) rapportent que leur taux est augmenté chez les *P. obesus* soumis au régime hypercalorique et que c'est cette augmentation qui induit un effet lipotoxique sur le pancréas. Chez l'être humain, une exposition chronique à des taux élevés d'acides gras libres conduit à une surcharge des cellules pancréatiques en lipides, une mauvaise régulation de la sécrétion d'insuline et une mort de ces cellules par apoptose (Leonardi et al, 2003). On suppose que les conséquences de la lipotoxicité des AGL sont les mêmes chez *Psammomys*.

### **1.1.4.2 Cellules $\alpha$ et glucagon**

On ne constate aucune différence concernant l'intensité de coloration des cellules  $\alpha$  entre les îlots pancréatiques des différents groupes de *Psammomys*. Contrairement aux rats STZ (voir ultérieurement), ni le nombre ni la localisation des cellules  $\alpha$  n'ont changé au cours du diabète de type 2 chez le *Psammomys*. Ceci est probablement dû au fait que contrairement aux rats STZ qui voient leurs îlots pratiquement tous détruits en un laps de temps assez court suite à l'injection de streptozotocine, chez les *Psammomys* diabétiques cette destruction de la masse cellulaire  $\beta$  semble être un phénomène plus progressif et plus lent. Ceci pourrait expliquer le caractère non invasif des cellules  $\alpha$  au cours du diabète de type 2 et qui reste donc relatif à la durée de celui-ci. D'autre part, l'hyperglycémie est plus accentuée chez les rats STZ ( $35,80 \pm 2,47$  mM) par rapport aux *Psammomys* diabétiques ( $16,56 \pm 1,52$  mM), ce qui explique davantage que chez ces derniers, les cellules  $\alpha$  ne se comportent pas de la même manière que chez les rats STZ (voir ultérieurement).

### **1.1.5 Paramètres lipidiques**

Dans cette étude, à l'instar d'autres études (Ikeda et al, 2001 ; Walder et al, 2002 ; zoltowska et al, 2004), les *P. obesus* non jeûneurs diabétiques et non diabétiques exhibent une altération du métabolisme lipidique qui se remarque aussi bien sur le plan plasmatique qu'organique.

La grande différence du taux de triglycérides déterminé entre les *Psammomys* témoins et les diabétiques se traduit par la présence d'une hypertriglycéridémie chez ces derniers. Ce résultat concorde avec les travaux de Walder et al (2002), ainsi que ceux de Ikeda et al (2001), qui ont trouvé

## ***DISCUSSION***

---

que le taux de triglycérides plasmatiques augmente chez les *Psammomys* diabétiques après 3 semaines, jusqu'à la fin de l'induction du diabète non insulino-dépendant par le régime synthétique. Les résultats concernant la triglycéridémie concordent avec ceux concernant le poids corporel. En effet, la triglycéridémie est proportionnelle au poids, d'ailleurs le taux de triglycérides le plus élevé est retrouvé chez les *Psammomys* non diabétiques qui enregistrent le poids le plus important. De plus, nous avons décelé une forte masse de tissu adipeux viscéral lors du sacrifice des *Psammomys* diabétiques et non diabétiques non jeûneurs, et qui pourrait contribuer à l'augmentation de la triglycéridémie qui sera conséquente à l'augmentation de l'insulinorésistance. Au fait, il existe une relation linéaire entre le ratio tissu adipeux viscéral/tissu adipeux total et le score graisseux du foie. Un niveau élevé de gras dans le foie supprime les effets inhibiteurs de l'insuline sur la lipolyse et la néoglucogénèse, résultant en une sécrétion exagérée d'AGL hépatiques et de glucose (Zimmet et Thomas, 2003). D'ailleurs, le taux de triglycérides hépatiques est assez élevé au niveau des foies des *Psammomys* soumis au régime synthétique et il concorde avec les résultats retrouvés au niveau plasmatique. L'augmentation du niveau des triglycérides dans le foie est le résultat non seulement de la distribution des acides gras libres vers cet organe et par conséquent l'augmentation de la lipogénèse, mais également du degré d'évacuation des AGL soit par oxydation mitochondriale ou leur sécrétion sous forme de VLDL (Toledo et al, 2006). En résumé, c'est le déséquilibre entre la synthèse et la sécrétion des triglycérides qui est à l'origine de l'accumulation de ces derniers dans le foie.

L'augmentation de la charge lipidique dans le foie est également décelable sur le plan histologique (voir figure 16) où l'on remarque que les hépatocytes des rats non jeûneurs diabétiques et non diabétiques, en comparaison avec les rats témoins, sont plus volumineux en raison de la présence de grosses gouttelettes lipidiques dans leur cytoplasme. Il s'agit d'une infiltration macrovasculaire. Cette dernière est associée, comme c'est souvent le cas, à une infiltration microvasculaire caractérisée par la présence de petites gouttelettes lipidiques en périphérie du noyau hépatocytaire (Anty et al, 2007). Cette surcharge graisseuse du foie chez les rats diabétiques et non diabétiques non jeûneurs, est due au régime hypercalorique auquel sont soumis les *Psammomys* obèses. Ce régime, et comme il a été cité dans les paragraphes précédents, a induit plusieurs désordres métaboliques liés principalement à l'insulinorésistance. L'ingestion de ce régime riche en glucides induit une surcharge de glucose dans le

sang qui est prise en charge par le foie. L'excès de glucose est stocké dans le foie sous forme de glycogène. Cependant, la capacité de stockage du foie est limitée, ainsi le glucose en excès sera catabolisé en pyruvate et lactate de telle sorte qu'il sera utilisé pour produire des acides gras par la lipogenèse de novo (den Boer, 2006). D'autre part, l'insulinorésistance contribue de manière significative à l'accumulation de gras dans le foie. En effet, il existe une relation inverse entre le contenu hépatique en triglycérides et la sensibilité du foie à l'insuline (den Boer, 2006). L'existence de cette relation est appuyée par l'expression élevée du TNF- $\alpha$  dans le foie dans le cas de NAFLD (non alcoholic fatty liver disease) (Jiang et Torok, 2008). Parmi les effets de l'insulinorésistance, l'incapacité de l'insuline à inhiber la HSL (hormon sensitive lipase) dont l'activité au sein du tissu adipeux est régulée par cette hormone. Il en résulte de la levée d'inhibition sur la HSL, une sécrétion accrue d'acides gras dans la circulation. Ainsi, le foie en qualité de tampon prend en charge cet excès d'acides gras qui va par conséquent s'accumuler dans cet organe (den Boer, 2006).

Concernant la cholestérolémie, celle-ci est plus élevée chez les *Psammomys* soumis au régime synthétique avec des valeurs plus élevées chez les rats diabétiques que non diabétiques. La faible absorption du cholestérol pourrait expliquer son taux très élevé chez les *Psammomys* diabétiques. En effet, Gylling et Miettinen (1997) rapportent que l'hypercholestérolémie au cours du diabète de type 2 est expliquée par une moindre capacité à absorber le cholestérol. L'hypertriglycéridémie vient appuyer l'augmentation du cholestérol dans le cas du DT2 (Briones et al, 1986).

### **1.2 Effet du jeûne intermittent sur les paramètres biochimiques et organiques**

L'excès de la prise calorique favorise le développement de maladies métaboliques telles que le diabète de type 2 et l'obésité. Inversement à la surcharge calorique, une restriction alimentaire peut prévenir l'apparition de ces maladies ou alors, dans le cas où celles-ci se sont déjà installées, diminuer les risques de complications qui leur sont liés. Plusieurs modes de restriction calorique ont été proposés. En effet, celle-ci peut se produire soit en diminuant le contenu d'un régime alimentaire en glucides (Kelley et al. 1993, Christiansen et al. 2000, Kirk et al. 2008) ou en lipides (Weigle et al. 1997), ou alors par une privation alimentaire sous forme de jeûne court (Anson et al. 2003, Oishi et al, 2007) ou prolongé (Weigle et al. 1997).

Plusieurs études ont prouvé l'efficacité du jeûne intermittent sur les désordres métaboliques liés au diabète et à l'obésité. Le jeûne intermittent expérimenté dans ces études consiste en une alternance entre 24 heures de jeûne suivi de 24 heures de réalimentation (Anson et al. 2003). Cependant, la durée de la période de jeûne (24 heures) ne pourrait-elle pas présenter une contrainte pour celui qui pratique ce mode de restriction calorique ?

Dans la présente étude nous explorons un autre mode de jeûne intermittent qui consiste en une privation alimentaire quotidienne de 15 heures étalée sur une durée de 30 jours. Notre objectif principal est d'étudier la réponse métabolique des rats atteints du diabète à ce jeûne inspiré de celui observé durant le Ramadan, et ce à travers l'évaluation de certains paramètres biochimiques et organiques.

### **1.2.1 Poids corporel**

Le suivi de l'évolution du poids corporel démontre une diminution de celui-ci aussi bien chez les *Psammomys* jeûneurs témoins, diabétiques et non diabétiques. Cette diminution du poids coïncide avec la diminution de la masse adipeuse viscérale observée le jour du sacrifice chez les jeûneurs diabétiques et non diabétiques. La perte de cette masse adipeuse est le résultat de la réduction de la prise calorique qui, selon Gazdag et al (2000), résulte d'un déséquilibre énergétique induisant la perte de la masse graisseuse corporelle. La réduction du poids corporel, spécialement celui de la masse adipeuse est fortement associée à l'amélioration de la tolérance au glucose (Weidruch et al, 1999) et à l'action de l'insuline sur ses tissus cibles (Kelly et al, 1993, Gazdag et al, 2000). Dans la présente étude, cette amélioration de la tolérance au glucose est reflétée, d'une part par une réduction de l'AUC chez les groupes jeûneurs comparés aux non jeûneurs, et d'autre part par des glycémies postprandiales qui atteignent des valeurs comparables à celles enregistrées avant la transition au régime synthétique, autrement dit avant le développement du diabète. Il est probable que cette perte de poids contribue à l'amélioration de la tolérance au glucose à travers la correction de l'insulinorésistance (DeFronzo, 1988 ; Guldstrand et al, 2003 ; Shafir et al, 2006) (voir ultérieurement).

Cependant, il y a lieu de préciser que le jeûne intermittent ne résulte pas toujours en une perte de poids. Ceci a été le cas dans l'étude de Anson et al (2003) qui ont soumis des souris à un jeûne intermittent (ADF) et qui ont remarqué que durant le jour de réalimentation, les souris ayant jeûné consommaient une quantité d'aliment comparable à celle que consommaient en deux jours les souris qui n'étaient pas soumises au jeûne. Cette surconsommation en 24 heures de réalimentation pourrait être liée à la sensation de faim. A ce propos, Heilbronn et al (2005) rapportent qu'un tel protocole de jeûne intermittent (ADF) est difficile à suivre sur un long terme chez l'être humain, ceci en raison du sentiment de faim décourageant. Les résultats de la présente étude démontrent que la prise alimentaire reste diminuée chez les *Psammomys* jeûneurs par rapport aux non jeûneurs, suggérant que la frustration que pourraient ressentir les rats de sable durant la période de jeûne n'est pas aussi forte au point d'induire un excès de prise alimentaire compensatoire pendant la période de réalimentation.

### **1.2.2 Paramètres glucidiques, insuliniques et pancréatiques**

Le retour à la normoglycémie chez les rats diabétiques jeûneurs est accompagné par une réduction du taux d'insuline plasmatique. Neshier et al (1999) ont constaté qu'un jeûne de 18 heures seulement induit un rétablissement de la normoglycémie chez les *Psammomys* prédisposés au diabète et qui ont été alimentés pendant 1-2 semaines avec un régime hypercalorique.

Selon Kaiser et al (2005), le diabète est réversible par un régime hypocalorique. Cette réversibilité est accompagnée par un rétablissement des réserves pancréatiques en insuline et est dépendante du temps. Autrement dit, la durée du diabète et donc le degré d'atteinte du pancréas endocrine détermineront la réponse positive ou non du pancréas diabétique face à une réduction de l'apport calorique. En effet, un stade trop avancé du diabète, où l'architecture des îlots est complètement détruite, est un stade de « non retour » où le *Psammomys* ne peut recouvrir son homéostasie (Shafir et al, 1999c; Kaiser et al, 2005) et ce malgré un traitement diététique ou pharmacologique. D'ailleurs, ceci a été aperçu chez les rats rendus diabétiques par injection à la streptozotocine (voir ultérieurement).

Il est vrai que le taux d'insuline n'a pas été mesuré au niveau des îlots pancréatiques des *Psammomys* obèses; cependant, le retour à la normoglycémie chez ceux soumis au jeûne nous mène à penser qu'il

## ***DISCUSSION***

---

Il y a eu rétablissement de 40-50% des réserves insuliniques dans le pancréas de ces derniers. Cette conclusion est tirée des observations de Kaiser et al (2005) qui rapportent que le diabète ne peut être reversé que si les réserves insuliniques atteignent les taux cités et si la morphologie des îlots est restituée.

La restauration des réserves insuliniques pourrait être expliquée, dans le cas du jeûne intermittent, par la diminution de la stimulation de la sécrétion d'insuline due à la réduction de l'apport calorique durant la privation alimentaire observée durant le jeûne. D'autre part, la diminution de l'insulinorésistance observée chez les diabétiques jeûneurs et qui est reflétée par la diminution de la HOMA, pourrait également contribuer à cette restauration. Il se peut également que la privation alimentaire observée durant le jeûne exerce un effet bénéfique sur la réduction de la production hépatique du glucose caractéristique du diabète de type 2.

Enfin, la restauration du contenu insulinique des îlots pourrait être attribuée à la stimulation de l'oxydation des acides gras contenus dans les îlots pancréatiques. En effet, le jeûne augmente l'expression du PPAR $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ) qui à son tour est impliqué dans l'augmentation de l'oxydation des acides gras des îlots. Cette stimulation cause la diminution de la sécrétion d'insuline, probablement par la réduction de lipides qui induisent l'expression de molécules impliquées dans l'exocytose (Gremlich et al, 2005).

### **1.2.3 Paramètres lipidiques**

Aussi bien chez les *Psammomys* diabétiques que non diabétiques jeûneurs, la triglycémie est diminuée par rapport à celle des non jeûneurs du même groupe. Il en est de même pour le contenu hépatique en triglycérides. D'ailleurs, il existe une corrélation positive significative entre ces deux paramètres ( $r = + 0,6536$ ;  $n = 22$ ;  $p < 0,001$ ).

Chez les rats jeûneurs, le contenu hépatique en triglycérides est également plus élevé ( $p < 0,001$ ) chez les *Psammomys* diabétiques et non diabétiques ( $5,48 \pm 0,63 \mu\text{mol/g}$ ;  $n = 8$ ) par rapport aux *Psammomys* témoins ( $2,20 \pm 0,25 \mu\text{mol/g}$ ;  $n = 4$ ). Dans tous les cas, le jeûne intermittent diminue le taux de triglycérides hépatiques, les valeurs enregistrées chez les *P. obesus* jeûneurs représentent en

## ***DISCUSSION***

---

moyenne seulement la moitié de celles retrouvées chez les non jeûneurs témoins, diabétiques et non diabétiques

Parallèlement à ces observations, l'analyse des coupes histologiques du foie révèle également une diminution du nombre et de la taille des gouttelettes lipidiques chez les diabétiques et non diabétiques jeûneurs par rapport aux non jeûneurs du même groupe. Il semble que le jeûne intermittent corrige relativement la stéatose hépatique provoquée par le régime synthétique hypercalorique en diminuant l'accumulation des triglycérides dans le foie. Vu que cette accumulation est fortement associée à l'insulinorésistance hépatique (Yki-Jarvinen, 2005) et vu qu'il existe une relation inverse entre le contenu du foie en triglycérides et l'insulinosensibilité hépatique (den Boer et al, 2004), la diminution du taux de triglycérides hépatiques décelée aussi bien sur le plan biochimique qu'histologique chez les jeûneurs pourrait améliorer l'insulinosensibilité hépatique et par là diminuer l'insulinorésistance du foie observée dans la présente étude. Par conséquent, le foie des non jeûneurs qui était en raison de l'insulinorésistance devenu moins sensible à l'effet suppresseur de l'insuline sur la production de glucose et de VLDL (Bacon et al, 1994) contribuant à l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie, retrouve relativement sous l'effet du jeûne intermittent sa sensibilité à l'action de l'insuline. Il en résulte une amélioration concomitante des désordres glucidiques et lipidiques.

L'absence de gouttelettes lipidiques chez les *Psammomys* témoins jeûneurs, et la diminution du nombre de celles-ci au niveau des foies de rats non diabétiques et diabétiques jeûneurs, indiquent que ce jeûne n'induit pas une stéatose hépatique comme c'est le cas de jeûne prolongé.

Concernant la cholestérolémie, celle-ci est diminuée sous l'effet du jeûne intermittent chez les *Psammomys* diabétiques. L'amélioration du contrôle glucidique pourrait contribuer à la diminution de la synthèse du cholestérol. En effet, selon Scoppola et al (2001), il y a une corrélation positive entre la concentration de l'hémoglobine glyquée et l'excrétion urinaire du mévalonate, un indicateur de la synthèse du cholestérol. Ils suggèrent que la synthèse du cholestérol est stimulée quand il y a un mauvais contrôle glycémique. D'un autre côté, l'insulinosensibilité améliorée sous l'effet du jeûne conduit probablement à la stimulation de l'absorption du cholestérol. A ce propos, Simonen et al

(2000) supposent que l'absorption augmentée du cholestérol est due à l'amélioration de la résistance à l'insuline et qui a comme conséquence une diminution de la synthèse du cholestérol. Enfin la diminution de la cholestérolémie pourrait être expliquée par l'inhibition de la HMG-CoA réductase. Linn (1967) rapporte qu'un jeûne de 24 heures réduirait le taux de cette enzyme ce qui implique une diminution de la biosynthèse de cholestérol. Zimmet et Thomas (2003) rapportent que l'inhibition de cette enzyme induit une réduction du niveau de cholestérol.

## **2. *Albinos albinos***

### **2.1 Induction du diabète de type 1**

La streptozotocine induit un diabète chez les rongeurs (rats ou souris) assimilé au diabète de type 1 chez l'homme (Hayashi et al, 2006 ; Lenzen, 2008). Sa toxicité est liée à son activité d'alkylation de l'ADN. Un groupement méthyl est transféré depuis la streptozotocine à la molécule d'ADN (Lenzen, 2008), il en résulte une cascade d'évènements aboutissant à la fragmentation de l'ADN. Ainsi, la méthylation de l'ADN est responsable de l'apoptose des cellules bêta. D'autre part, en essayant de réparer l'ADN méthylé par la streptozotocine, la cellule  $\beta$  va surexprimer la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP), ce qui résulte en une diminution du  $\text{NAD}^+$  (Nicotinamide adénine dinucléotide) cellulaire induisant ainsi une déplétion considérable des réserves en ATP (Yamamoto et al, 1981 ; Okamoto, 1985) ce qui provoquera la nécrose des cellules  $\beta$  (Lenzen, 2008). En plus de la méthylation de l'ADN, les protéines sont également méthylées et contribuent ainsi au fonctionnement défectueux de la cellule  $\beta$  après exposition à la streptozotocine (Wilson et al, 1988).

Pour que la streptozotocine exerce ses effets suscités sur la cellule  $\beta$ , celle-là doit rentrer à l'intérieur de la cellule  $\beta$ . Ceci est assuré par les transporteurs de glucose GLUT2. Ces transporteurs sont également présents au niveau du foie et du rein, ce qui fait que la streptozotocine endommage également ces deux organes (Rerup, 1970 ; Weiss, 1982).

#### **2.1.1 Consommation alimentaire et poids corporel**

Les rats rendus diabétiques par injection à la streptozotocine consomment une quantité d'aliment largement supérieure à celle consommée par les rats témoins. En effet, cette consommation

est 2,3 fois supérieure à celle des rats wistar témoins non jeûneurs. La déficience en insuline, due à la toxicité de la streptozotocine sur les cellules  $\beta$ , induit une hyperphagie soutenue chez les rats injectés par cette substance (Sindelar et al, 2002). L'effet anoréxigénique de l'insuline ne s'exerce plus vu la diminution considérable du taux de cette hormone chez les rats STZ. De plus, il est fort probable que l'insuline exerce elle même un effet régulateur sur la sécrétion du neuropeptide Y dans le noyau paraventriculaire, et qui in vitro semble être un effet inhibiteur. Ainsi, l'insulinopénie produite par la streptozotocine augmente le taux du peptide NY au niveau de sites hypothalamiques variés associés à l'hyperphagie (Kalra et al, 1999).

D'autre part, la diminution des réserves d'énergie telle que la masse grasse, dont on a remarqué une forte diminution voir même une absence chez certains rats lors du sacrifice, induit une augmentation de la consommation alimentaire. Ceci est considéré comme étant une adaptation face à la réduction des réserves en énergie, qui permet alors la survie (Schwartz et al, 2000). La perte de masse graisseuse est due à la diminution considérable du taux d'insuline plasmatique. L'insuline, hormone lipogénique, étant en très faible quantités induit une perte de la masse graisseuse qui par ailleurs induit une diminution considérable du poids des rats STZ.

Enfin, la valeur calorique de l'aliment donné au rats Wistar dépasse de peu celle de l'aliment qu'ingère les *Psammomys*; cependant, cet aliment n'a pas d'effet diabétogène chez les rats wistar ce qui confirme bien la nécessité d'une prédisposition génétique pour développer un diabète de type 2.

### **2.1.2. Glycémie et statut insulinique**

La glycémie des rats STZ dépasse largement celle enregistrée chez les rats témoins. Parallèlement à l'hyperglycémie, la glycémie enregistrée durant le test IPGTT ainsi que l'AUC totale sont également plus élevées chez les rats STZ que chez les rats témoins. Même l'AUC incrémentale durant l'IPGTT est plus élevée ( $p < 0,006$ ) chez les rats STZ ( $608 \pm 105$  mM.min;  $n = 52$ ) que chez les témoins ( $287 \pm 29$  mM.min;  $n = 48$ ). La concentration d'insuline plasmatique, l'index insulino-génique, la sécrétion d'insuline par les îlots isolés, leur contenu en insuline ainsi que le volume relatif occupé par les îlots au sein des sections pancréatiques sont beaucoup plus faibles chez les rats STZ comparés aux rats témoins. Ceci dit, il est à noter que les îlots isolés des pancréas de rats STZ ne perdent pas totalement leur capacité à sécréter l'insuline en réponse au D-glucose. En effet, on

constate que face à des concentrations croissantes en D-glucose, le contenu en insuline des îlots de rats STZ diminue progressivement. Une telle diminution n'est pas observée au niveau des îlots isolés à partir de pancréas de rats témoins.

Le dérèglement de l'homéostasie glucidique et insulinique est dû à l'effet toxique de la streptozotocine sur la fonction des cellules  $\beta$ . Initialement, la biosynthèse de l'insuline, l'induction de la sécrétion de celle-ci par le glucose et enfin le métabolisme glucidique sont affectés par la streptozotocine (Lenzen, 2008). D'autre part, la réduction du  $\text{NAD}^+$  induite par la STZ pourrait résulter en l'inhibition de la biosynthèse et de la sécrétion de l'insuline (Lenzen, 2008). Ces effets de la streptozotocine sus-cités, en plus des dommages sur l'ADN mitochondriaux qu'elle cause, ont lieu durant les premiers jours d'exposition à la streptozotocine. Ainsi, il est probable que la diminution considérable de l'insulinémie soit attribuée à la perte considérable en cellules  $\beta$  plutôt qu'au dysfonctionnement de celles-ci vu que pendant l'expérience de la sécrétion statique d'insuline on a constaté que les îlots isolés à partir de rats STZ ne perdent pas leur capacité à répondre aux concentrations croissantes en D-glucose.

### **2.1.3 Paramètres lipidiques**

Les taux de cholestérol et de triglycérides plasmatiques sont statistiquement plus élevés chez les rats diabétiques non jeûneurs par rapport aux rats diabétiques jeûneurs et CR. Ceci s'accorde avec d'autres études démontrant une augmentation de la cholestérolémie et de la triglycéridémie chez les rats rendus diabétiques par injection à la streptozotocine (Mendez et al, 2001 ; Komolafe et al, 2009). L'hypercholestérolémie chez les rats STZ est due à l'augmentation de l'absorption intestinale plutôt qu'à sa synthèse hépatique. En effet, Miettinen et al (2004) rapportent dans son article que la streptozotocine induisant le diabète hypertrophie la fonction de la muqueuse intestinale en stimulant l'absorption des graisses et notamment celle du cholestérol.

Concernant les triglycérides, il a été rapporté que durant l'état de déficience en insuline, ce qui est le cas des rats diabétiques STZ, la circulation excessive de triglycérides pourrait être une conséquence d'une production élevée de lipoprotéines ou alors d'une clairance réduite des triglycérides (Sambandaum et al, 2000).

### **2.1.4 Paramètres rénaux**

Kobayashi et Venkatachalam (1992) ont trouvé que la concentration de créatinine est 2-3 fois plus élevée chez les rats diabétiques comparés aux rats témoins. Ceci est également le cas de notre étude où les rats STZ non jeûneurs présentent une créatinémie largement plus élevée par rapport aux rats contrôles. En plus de l'augmentation du niveau de créatinine, on observe également une augmentation de la concentration de l'urée plasmatique chez ces mêmes rats. Ainsi, l'augmentation de ces deux paramètres plasmatiques chez les rats STZ non jeûneurs, ne fait que confirmer les observations histologiques (voir ultérieurement) et qui reflètent ainsi une détérioration non seulement morphologique du rein mais également fonctionnelle.

### **2.1.5 Etude immunohistologique du pancréas**

#### **2.1.5.1 Cellule $\beta$**

L'immunomarquage par la technique ABC-DAB démontre que l'architecture des îlots pancréatiques est totalement détruite chez les rats STZ non jeûneurs. En effet, il ne reste que des « vestiges » de ces îlots chez ces rats diabétiques. Le marquage immunofluorescent de l'insuline est également très faible chez ces rats par rapport à celui des rats témoins, tous groupes confondus.

L'estimation de la masse cellulaire  $\beta$  indique une perte considérable de celle-ci chez ces rats rendus diabétiques depuis 6 semaines. A cet effet, Kakkar et al (1998) ont constaté dans leur étude que déjà 3 semaines après l'injection de la streptozotocine, il y a perte d'environ 50-60% d'immunoréactivité de l'insuline. Ce même auteur rapporte qu'au bout de 6 semaines après l'injection, l'insuline perd totalement son immunoréactivité. Le faible marquage est attribué à la destruction massive des cellules  $\beta$ . En effet, la masse cellulaire  $\beta$  est fortement réduite chez les rats STZ. Cette perte considérable de cellules  $\beta$  est due au fort taux d'apoptose retrouvé au niveau des îlots pancréatiques des rats STZ. D'ailleurs, le taux d'apoptose chez les rats STZ non jeûneurs était 4,3 fois supérieur à celui retrouvé chez les rats témoins. Ce très fort taux d'apoptose au sein des îlots pancréatiques détruit par la streptozotocine est la cause de la perte de l'intégrité architecturale des îlots des rats STZ NJ. Selon Weir et al (2001), il existe un équilibre entre l'apoptose et la réplication des cellules bêta permettant de stabiliser la masse cellulaire bêta. Il apparaît donc que chez les rats STZ,

## ***DISCUSSION***

---

cet équilibre soit rompu en raison du fort taux d'apoptose causée par la streptozotocine. Il en résulte une destruction architecturale de l'îlot et une perte assez impressionnante de la masse cellulaire bêta. Morimoto et al (2005), rapportent que cette apoptose a déjà lieu 6 heures après l'injection de la streptozotocine et avant même que l'hyperglycémie s'installe. L'hyperglycémie ne fait qu'accentuée cette apoptose. En effet, il a été rapporté qu'*in vitro*, une exposition d'îlots pancréatiques humains à une forte concentration en glucose induisait l'expression de FAS spécialement au niveau des cellules  $\beta$  induisant ainsi l'apoptose de ces cellules (Malder et al, 2001). Le pancréas de par sa faible capacité anti oxydative (Kajimoto et Kaneto 2004), est plus susceptible aux radicaux libres générés par la streptozotocine, dont le ROS et le NO (Peschke et al, 2000) et probablement par ceux générés par l'hyperglycémie. Des infiltrations lymphatiques ont été observées lors d'études sur l'induction du diabète par STZ (Ozdemir et al, 2009), ce qui n'est pas le cas dans cette étude. Ceci est fort probablement dû au fait que ces infiltrations aient lieu les premières semaines suivant l'injection de la streptozotocine. En effet, il y a une infiltration de cellules mononucléaires au 3<sup>ème</sup> jour après injection de STZ, et qui augmente jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour ensuite elle diminue (Li et al, 2000). Il est à signaler que l'index d'apoptose aurait pu donc être encore plus élevé si les rats avaient été sacrifiés les premiers jours suivant l'injection de la STZ. En effet, les cellules  $\beta$  ayant subi une fragmentation de leur ADN et mourant par apoptose sont enlevées par les macrophages non spécifiques (Lenzen, 2008).

La mort cellulaire excessive des cellules bêta est à l'origine de l'insulinopénie et donc de l'hyperglycémie observée chez les rats STZ. Toutefois, il est à signaler qu'un faible taux d'insuline plasmatique subsiste chez les rats STZ non jeûneurs. Ce taux est probablement sécrété par les cellules  $\beta$  ayant « survécus » à la streptozotocine. Il a été constaté que la masse cellulaire  $\beta$  est excessivement diminuée chez les rats STZ non jeûneurs comparée aux rats témoins. En effet, le nombre de noyaux des cellules  $\beta$  mis en évidence par le DAPI est très réduit, ce qui indique que le nombre des cellules  $\beta$  est très faible chez les rats STZ. Cependant, l'étude morphométrique des cellules  $\beta$  (voir annexe 2) a révélé que la taille de celles-ci était plus grande comparée à celle des cellules bêta de rats témoins ; il s'agit d'une hypertrophie des cellules  $\beta$ . Miley et al (1997) rapportent qu'une exposition *in vitro* des cellules  $\beta$  à une concentration de 20 mM de glucose induisait une augmentation de 10-15 % de leur volume. L'hypertrophie des cellules bêta a été également observée chez des rats devenus

## ***DISCUSSION***

---

hyperglycémiques après pancréatectomie (Jonas et al, 1999). Il semble que pour contrer l'insulinopénie, les cellules  $\beta$  résiduelles s'hypertrophient. Selon Weir et al (2001), l'hypertrophie des cellules  $\beta$  est un mécanisme compensatoire activé par une demande augmentée en insuline. Cette hypertrophie concerne probablement les cellules bêta qui sont en stage terminal de senescence, autrement dit ne pouvant plus se diviser (Weir et al, 2001).

### **2.1.5.2 Cellules $\alpha$**

Concernant les cellules alpha, nous avons constaté que la distribution de celles-ci au sein de l'îlot pancréatique de rats STZ non jeûneurs est différente de la distribution ordinaire retrouvée au niveau de pancréas de rats sains. La destruction des cellules  $\beta$  contribue au dérèglement de la distribution des cellules  $\alpha$ . En effet, d'après les photos (figure 30), nous constatons que chez les rats STZ non jeûneurs, au lieu que les cellules  $\alpha$  soient localisées à la périphérie comme c'est le cas normal (voir rats témoins), ces dernières ont une localisation centrale. D'autre part, l'immunoréactivité au glucagon (figure 33) démontre que le nombre de ces cellules est augmenté chez les rats diabétiques NJ comparé aux témoins, tous groupes confondus. D'après l'étude de Kakkar et al (1998), les cellules alpha occupent le centre de l'îlot déjà à la 3<sup>ème</sup> semaine suivant l'injection de la STZ. Il est bien établi que sous les conditions du diabète de type 1, l'augmentation de la taille et du nombre des cellules  $\alpha$ , ainsi que leur distribution dans l'îlot sont dérégées en raison de la destruction des cellules  $\beta$ . De plus, en perdant leur bon fonctionnement, les cellules  $\beta$  ne peuvent plus exercer leur influence sur la régulation du glucagon, ce qui induit potentiellement une augmentation de la glucagonémie. Cette hyperglucagonémie contribue au développement de l'hyperglycémie et à la recrudescence du diabète (Kawamori et al, 2010). Enfin, il a été rapporté que l'insuline exerce un effet inhibiteur sur la sécrétion du glucagon et de ce fait l'insulinopénie, observée durant ce diabète, contribue donc à l'expansion des cellules  $\alpha$ . Dans leur article, Liu et Habener (2009) rapportent qu'une hyperplasie des cellules  $\alpha$  a lieu dans des conditions de déficience en insuline qui résultent du dommage de cellules bêta, comme c'est le cas chez les souris ou singes chez qui on a administré de la STZ ou alors chez des souris diabétiques NOD.

### **2.1.6 Etude histologique du foie**

Quelques zones de nécrose ont été observées au niveau des coupes hépatiques des rats STZ non jeûneurs, témoignant d'un début de dégénérescence du foie chez ces rats rendus diabétiques depuis 6 semaines. La présence d'infiltrat indique de futures zones de dégénérescence. Il a été rapporté que la streptozotocine, en plus de son effet sur le pancréas, exerce également un effet toxique sur le foie (Rerup, 1970 ; Weiss, 1982). Ceci laisserait croire que ces changements affectant le foie de ces rats STZ seraient beaucoup plus attribués à cette substance qu'au diabète lui-même. Cependant, l'effet toxique de la STZ est transitoire et semble disparaître 15-30 jours après l'injection (Herrman et al, 1999). Ainsi, on pourrait attribuer ces altérations au stress oxydatif qui résulte entre autre de l'hyperglycémie assez importante et qui contribue donc à cette dégénérescence du foie chez les rats diabétiques non jeûneurs.

La coloration au PAS, permettant de mettre en évidence la présence de mucopolysaccharides qui dans ce cas est le glycogène, est plus importante au niveau des coupes hépatiques des rats STZ NJ par rapport à celles des rats témoins, tous groupes confondus. Cette coloration positive au PAS plus intense reflète l'accumulation de glycogène dans le foie des rats STZ non jeûneurs. Cette accumulation a également été rapportée par Akinola et al (2010). Ces derniers ont constaté que les hépatocytes de rats rendus diabétiques depuis 50 jours suite à une injection de STZ, étaient chargés de glycogène. L'accumulation de glycogène dans le foie, appelée hépatopathie glycogénique, est communément associée au diabète de type 1 avec un contrôle glycémique très faible (Torbenson et al 2006 ; Torbenson, 2010). Les patients atteints du diabète de type 2 peuvent également être affectés par cette hépatopathie glycogénique (Torbenson, 2010). Ceci dit, la prévalence de l'hépatopathie est plus importante dans le cas du diabète de type 1 que 2. En effet, van den Brand et al (2009) rapportent dans leur article que cette prévalence est de 95% et de 2% respectivement pour le diabète de type 1 et 2. Cependant, il est à préciser que tous les patients diabétiques type 1 ne seront pas forcément atteints d'hépatopathie glycogénique (van den Brand et al, 2009). Il apparaît que l'activité de la glycogène synthase et /ou de la glucose-6-phosphatase sont régies par des protéines dont les gènes sont défectueux chez certains patients diabétiques (Ferrer et al, 2003), ce qui contribue donc à l'accumulation du glycogène dans le foie.

En plus de l'accumulation du glycogène au niveau du cytoplasme des hépatocytes, observée par microscope photonique, les observations de l'ultrastructure au microscope électronique démontrent que les noyaux des hépatocytes sont également chargés en glycogène (Torbenso et al, 2006 ; Torbenso, 2010) ; de plus, les mitochondries ont une assez grande taille (Torbenso, 2010). Cette accumulation du glycogène dans les hépatocytes est attribuée à un fort taux de glycogénèse dû à une surexpression de la glycogène synthase (Akinola et al, 2010). Une déficience en insuline pourrait, à long terme, être la cause de la stimulation de l'activité de la glycogène synthase (Ferrannini et al, 1990). D'autre part, la forte concentration en glucose plasmatique cause un flux de glucose, indépendant de l'insuline, vers les hépatocytes où il est phosphorylé et stocké (Van den Brand et al, 2009). L'accumulation du glycogène à l'intérieur des hépatocytes cause une augmentation du poids du foie, autrement dit une hépatomégalie (Noorafshan et al, 2005 ; Van den Brand et al, 2009). D'ailleurs, dans la présente étude on a constaté que le poids des foies des rats STZ, tous groupes confondus, dépasse celui des rats témoins.

Enfin, les coupes histologiques de foie des rats STZ non jeûneurs ne présentent pas de surcharge lipidique sous forme de gouttelettes lipidiques, comme a été le cas pour les *Psammomys* diabétiques. Ceci est probablement dû à la durée du diabète chez ces rats STZ qui était de 6 semaines. En effet, Certaines études rapportent une accumulation de gouttelettes lipidiques à l'intérieur des hépatocytes de rats rendus diabétiques à la STZ depuis 12 semaines (Zafer et al, 2009). Enfin, Jiang et Torok (2008) indiquent que la stéatose hépatique non alcoolique est rare chez les sujets atteints de diabète de type 1.

### **2.1.7 Etude histologique et immunohistochimique du rein**

L'hyperglycémie favorise la néphropathie de différentes manières, en favorisant la formation de produits avancés de glycation (AGE). Les premières incidences de l'hyperglycémie chronique portent rapidement atteinte à l'intégrité structurale et fonctionnelle des cellules du mésangium glomérulaire rénal, qui garantissent ordinairement l'efficacité de la filtration glomérulaire (Geoffrey, 2005). En effet, les cellules mésangiales sont l'objet d'hyperplasie modérée dans les premiers stades précédant la glomérulosclérose. Cet état d'hyperplasie s'estompe rapidement au profit d'un retour à la

quiescence accompagné par une progressive hypertrophie. En effet, selon Young et al (1995), dans le modèle diabétique STZ, la présence d'une hyperplasie des cellules mésangiales a été observée dès les 4-5 premiers jours après l'injection de STZ. D'ailleurs, la figure 37 démontre bien que les cellules positives au PCNA sont principalement retrouvées dans l'espace tubulointersticiel. Ces résultats s'accordent avec ceux de Gross et al (2004) qui indiquent que la prolifération cellulaire est largement plus prononcée au niveau tubulointersticiel qu'au niveau mésangial.

D'autre part, selon Chen et al (2005), l'hypertrophie rénale peut être détectée déjà au premier jour suivant le début du diabète et est régulièrement observé 60 h après l'injection de la STZ. Il a été rapporté également que l'hypertrophie rénale induite par le diabète engendrait une augmentation de la taille des cellules rénales avec une augmentation concomitante du poids du rein. Cette augmentation est probablement due à la diminution de la masse fonctionnelle du rein (Kobayashi et Venkatachalam, 1992).

Enfin, il a été constaté une forte présence de cellules Armani-Ebstein au sein des coupes rénales de rats STZ non jeûneurs. Ce phénotype, qui est une caractéristique morphologique typique au rein diabétique, est spécialement notable au niveau des tubules proximaux. Le glycogène excrété de manière excessive à travers le glomérule est réabsorbé dans le cytoplasme des tubules. Les inclusions de glycogène sont drainées ce qui résulte en un effet éclaircissant à l'intérieur des cellules épithéliales tubulaires (Watanabe and Hotta, 1997) et ainsi l'apparition de ces cellules.

### **2.2 Jeûne intermittent et restriction alimentaire chez *Albinos albinos***

Cette partie est consacrée à l'étude de l'effet du jeûne intermittent sur des paramètres biochimiques et organiques chez le rat wistar. Afin de saisir si l'effet du jeûne observé chez les rat wistar était dû au jeûne lui-même ou alors à la restriction alimentaire observée durant la période de privation alimentaire, une étude comparative entre le jeûne intermittent et la restriction alimentaire a été entreprise. Le taux de cette restriction alimentaire a été déduit à partir de celle observée durant la période de privation alimentaire dans l'expérimentation sur le jeûne intermittent (voir méthodologie).

### **2.2.1 Consommation alimentaire et poids corporel**

La période de jeûne intermittent a été fixée entre 17 h et 8 h, ce qui coïncide avec la phase d'alimentation des rats. En effet, les rats consomment entre 85 et 90% de leur nourriture totale durant la période nocturne (Kalra et al, 1999). Les rats wistar ont une alimentation nocturne qui suit une distribution bimodale (Armstrong et al, 1978), avec un premier pic enregistré après le début de la phase nocturne et un second pic à la fin de cette phase.

Durant le jeûne intermittent, les rats wistar témoins ingèrent une quantité d'aliment 20% inférieure à celle ingérée par les témoins non jeûneurs. A cet effet, Wan et al (2003) rapportent que les rongeurs sujets à un jeûne ADF diminuent leur prise calorique de 10 à 30%.

Chez les rats STZ jeûneurs, la quantité d'aliment diminue de 40% par rapport aux non jeûneurs. Il semble que ce jeûne intermittent n'induit pas une augmentation de l'appétit durant la phase de réalimentation comme c'est le cas du jeûne imposé aux rats dans l'étude de Kalra et al (1991). Ceci n'est pas étonnant vu que ces rats ont été privés de nourriture durant 3 jours, ce qui a induit une augmentation remarquable de la sécrétion du peptide NY (Kalra et al, 1991). Dans la présente étude, il a été constaté que durant les 2 premiers jours de jeûne, les rats STZ jeûneurs consommaient pendant la période de réalimentation une quantité légèrement inférieure ( $19,95 \pm 1,82$  g) à la quantité consommée le reste de l'expérimentation ( $26,24 \pm 0,44$  g). Ceci est également le cas chez les rats témoins jeûneurs ( $11,75 \pm 0,97$  g) par rapport aux non jeûneurs ( $15,61 \pm 0,19$  g). Ainsi, les rats soumis au jeûne intermittent augmentent légèrement leur consommation après les 2 premiers jours de privation alimentaire ; cependant, la quantité d'aliment ingérée reste inférieure à celle consommée par les rats non jeûneurs, qu'ils soient diabétiques ou non. Ceci n'est pas le cas dans l'étude d'Anson et al (2003) citée auparavant. Il apparaît donc que la durée de privation alimentaire intermittente n'est pas suffisante pour induire une sécrétion considérable du peptide NY et donc une augmentation de la consommation alimentaire durant le jeûne.

Contrairement à l'étude de Wan et al (2003), qui rapportent une diminution du poids chez les rats soumis au jeûne ADF, dans cette étude ni le jeûne ni la restriction calorique semblent induire une diminution du poids chez les rats témoins soumis aux 2 régimes suscités. Cependant, chez les rats

diabétiques STZ jeûneurs et ceux soumis à la restriction calorique (40%), l'évolution du poids suit celle de la consommation alimentaire. Il n'en est pas de même pour les rats STZ non soumis aux régimes restrictifs qui malgré l'augmentation de la quantité d'aliment ingéré, ils observent une diminution continue de leur poids corporel. Ceci est dû d'une part à la sévérité du diabète qui induit une diminution du poids en raison de l'absence d'insuline, hormone lipogénique.

### **2.2.2 Glycémie et statut insulinique**

La glycémie chez les rats STZ jeûneurs et les rats STZ CR diminue respectivement d'un facteur de 0,63 et 0,73 par rapport à la glycémie des rats STZ non jeûneurs. La diminution de la glycémie chez les deux groupes J et CR n'est pas attribuée à l'augmentation de l'insulinémie chez ces deux groupes de rats. C'est probablement la diminution de l'apport calorique, qu'il soit sous forme de jeûne intermittent ou de restriction alimentaire, qui est responsable de la diminution de la glycémie. Dans l'étude de McKibbin et al (1992), la restriction calorique parvient à normaliser l'hyperglycémie sans pour autant restaurer l'insulinopénie. D'ailleurs dans cette étude, la concentration d'insuline plasmatique n'augmente pas de façon significative et reste faible chez les rats STZ jeûneurs et CR comparée aux rats témoins. Cependant, il est à préciser que dans l'étude de McKibbin et al (1992), la restriction calorique représentait 40% de la consommation des rats non diabétiques (témoins) et non pas 40% de la consommation des rats diabétiques STZ comme a été le cas dans notre étude. Il est donc normal que la restriction calorique ait pu parvenir à normaliser l'hyperglycémie dans l'étude de McKibbin et al. Il apparaît donc que la diminution de la prise alimentaire observée durant le jeûne intermittent améliore mais ne normalise pas totalement l'hyperglycémie chez les rats diabétiques STZ. L'effet bénéfique du jeûne intermittent se remarque également lors du test IPGTT. En effet, il a été constaté que durant ce test, la glycémie au temps 0 min ainsi que l'AUC total sont diminuées chez les rats STZ soumis au jeûne. De plus et en dépit de l'absence d'une signification statistique, l'insuline plasmatique tend à augmenter chez les rats STZ jeûneurs. D'autre part, leur index insulino-génique est plus élevé et leur index HOMA est plus faible comparés aux rats STZ non jeûneurs. Si l'on prend en considération les moyennes géométriques de la concentration plasmatique en insuline, de l'index insulino-génique ainsi que l'inverse de l'index HOMA, on constate qu'il y a une différence

significative ( $p < 0,025$ ) entre les rats STZ non jeûneurs ( $100,0 \pm 6,9\%$ ;  $n = 15$ ) et jeûneurs ( $164,4 \pm 29,5\%$ ;  $n = 18$ ). La situation est différente pour les rats STZ soumis à une restriction calorique puisque, statistiquement parlant, aucun effet bénéfique de cette restriction n'a été observé chez ces rats particulièrement en ce qui concerne le test IPGTT.

### **2.2.3 Paramètres lipidiques**

Le jeûne intermittent ainsi que la restriction calorique semblent exercer le même effet sur le taux de cholestérol plasmatique aussi bien chez les rats témoins que les rats STZ. Cependant, leur effet est plus marquant chez les rats STZ. Concernant le taux des triglycérides, le jeûne induit une diminution plus significative de ces derniers par rapport à la restriction calorique.

Enfin, Pederson et al (1999) ainsi que Trepanowski et al (2011) rapportent que la diminution sous l'effet du jeûne ou de la restriction calorique, du taux de cholestérol ainsi que celui des triglycérides contribue à la diminution des risques cardiovasculaires.

### **2.2.4 Paramètres rénaux**

La privation alimentaire observée durant le jeûne entraîne un abaissement du taux de créatinine et d'urée plasmatique. Ce jeûne intermittent mimant le mois du Ramadan semble avoir le même effet que celui exercé par le jeûne ADF. D'ailleurs, Tikoo et al (2007) rapportent que le jeûne intermittent ADF diminue significativement la créatinémie et l'urémie chez des rats STZ.

L'effet de la restriction calorique sur ces paramètres rénaux est comparable à celui du jeûne intermittent.

### **2.2.5 Etude immunohistochimique du pancréas**

Il est vrai que la masse cellulaire  $\beta$  n'est pas complètement rétablie par le jeûne au point de recouvrer celle retrouvée chez les témoins; néanmoins, on constate que cette masse cellulaire  $\beta$  est plus élevée chez les rats STZ jeûneurs que chez ceux soumis à la restriction alimentaire. En effet, elle est respectivement 2,9 et 1,3 fois plus élevée chez les rats STZ jeûneurs et CR par rapport aux rats

## ***DISCUSSION***

---

STZ non jeûneurs. Cette augmentation pourrait être attribuée à l'hypertrophie des cellules  $\beta$  mais probablement beaucoup plus à l'augmentation de leur nombre. A cet effet, il a été constaté que la taille des cellules  $\beta$  au niveau du pancréas des rats STZ J était relativement plus élevée par rapport aux rats STZ NJ (voir annexe 2) mais que le nombre de ces cellules dépassait largement celui retrouvé chez les rats STZ NJ. L'augmentation du nombre de cellules  $\beta$  pourrait avoir pour origine la transdifférenciation des cellules  $\alpha$  en cellules  $\beta$ . A cet effet, Liu et Habener (2009) évoquent dans leur article « review » une expérience ayant pour but l'évaluation de la régénération des îlots chez ces souris transgéniques injectées avec de la streptozotocine, et dont les résultats démontrent que la majorité des cellules  $\beta$  nouvellement formées avaient pour origine des cellules ayant sécrétées du glucagon. Il se peut aussi que la diminution de l'hyperglycémie ait induit une régénération des cellules  $\beta$  soit à partir des cellules  $\beta$  résiduelles ou alors des précurseurs de cellules  $\beta$ . Selon Grossman et al (2010), le degré du contrôle glycémique affecte la régénération des cellules  $\beta$ , et que meilleur est le contrôle glycémique chez les souris STZ traitées, plus rapide sera la restauration de la masse cellulaire  $\beta$  et de sa fonction. Il est à préciser que la régénération des cellules  $\beta$  chez la souris STZ est dépendante du temps (Grossman et al, 2010), ce qui laisserait penser que la masse cellulaire qui a relativement augmenté sous l'effet du jeûne prolongé sur 30 jours, et même sous l'effet de la restriction alimentaire, pourrait augmenter davantage si l'on prolonge le jeûne au-delà d'un mois. Cette hypothèse reste à vérifier. Enfin, cette augmentation discrète de la masse cellulaire  $\beta$  est accompagnée sur le plan plasmatique par une très modeste augmentation de la sécrétion insulinaire.

Inversement à la masse cellulaire  $\beta$  qui est plus élevée chez les rats STZ J et CR, le taux d'apoptose au niveau des îlots pancréatiques de ces rats est diminué par rapport à celui retrouvé chez les rats STZ non jeûneurs. Il est probable que la modeste réduction de l'hyperglycémie ait contribué à la diminution du taux d'apoptose chez ces deux groupes. Un contrôle glucidique, même réduit, limite la destruction des cellules  $\beta$  chez les patients atteint du diabète de type 1. Ceci est probablement en relation avec le rôle du glucose dans la régulation de l'expression de Fas dans les membranes des cellules  $\beta$  (Thivolet, 2002).

### **2.2.6 Etude hépatique**

D'après les observations microscopiques, il semble que la nécrose n'est pas présente ou du moins très faible chez les rats STZ soumis au jeûne intermittent ou à la restriction calorique. Il est fort probable que la réduction de l'hyperglycémie, induite par ces deux paradigmes de diète, contribue à la diminution de la nécrose ou alors au ralentissement du développement de lésions au niveau du foie chez les rats diabétiques J ou CR. Vu que ces lésions sont probablement attribuées au stress oxydatif et que celui-ci est étroitement lié à l'hyperglycémie, la diminution de celle-ci aussi bien chez les rats STZ soumis au jeûne intermittent ou à la restriction alimentaire contribue à la diminution des radicaux libres contribuant au développement de lésions inflammatoires au niveau du foie. Selon Tikoo et al (2007), le jeûne intermittent sous forme de 24 h jeûne-24 h réalimentation diminue le stress oxydatif en diminuant la peroxydation lipidique et en augmentant le taux de la superoxyde dismutase.

La relative diminution de l'hyperglycémie se répercute sur le taux de glycogène au niveau des foies de rats STZ J et CR. En effet, sur le plan histologique il existe par endroits des zones plus claires, autrement dit moins réactives au PAS. Ceci reflète la diminution de dépôt de glycogène au niveau des hépatocytes des coupes de foie des rats STZ soumis au jeûne intermittent ou à la restriction calorique 40%. Cette diminution est perceptible également si l'on prend en considération le poids du foie ou le ratio poids du foie/poids corporel. Ces deux derniers paramètres pondéraux sont diminués chez les rats STZ J et CR. Le traitement de l'hépatopathie glycogénique consiste en l'amélioration du contrôle glycémique (van den Brand et al, 2009). En effet, la diminution de l'hyperglycémie sous l'effet du jeûne intermittent diminue relativement l'afflux du glucose vers le foie ce qui résulte en une diminution de la synthèse de glycogène hépatique.

### **2.2.7 Etude histologique du rein**

L'effet positive du jeûne intermittent et de la restriction calorique sur les paramètres biochimiques rénaux (créatinine et urée) chez les rats STZ, se reflète également sur le plan morphologique. En effet, on note que le nombre de cellules Armani-Ebstein au sein des coupes rénales des rats soumis au jeûne et à la restriction calorique, est moindre comparés à celui observés

## ***DISCUSSION***

---

chez les rats STZ non jeûneurs. Il en est de même pour l'index PCNA qui est diminué chez les rats STZ jeûneurs et ceux soumis à la restriction calorique comparés aux rats non jeûneurs.

L'effet bénéfique du jeûne et de la restriction calorique sur le rein est probablement lié à l'amélioration de l'homéostasie glucidique, elle-même liée à l'amélioration de la masse cellulaire beta notamment chez les rats STZJ. A cet effet, une corrélation négative ( $r = -0,8497$ ;  $n = 6$ ;  $p > 0,04$ ) a été observée entre les valeurs moyennes de l'index PCNA et celles de la masse cellulaire beta.

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

---

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES.**

En s'inspirant du jeûne du Ramadan, nous avons tenté d'étudier l'effet du jeûne intermittent sur le métabolisme glucidique et lipidique au cours du diabète de type 1 et 2. Notre objectif était d'explorer l'évolution de paramètres biochimiques et organiques, ayant été altérés par les conditions du diabète de type 1 ou 2, sous l'effet d'une privation alimentaire intermittente sous forme de cycle jeûne/réalimentation de 15 h/9 h répétés pendant 30 jours.

Pour atteindre notre objectif, nous avons opté pour l'utilisation de deux modèles animaux distincts représentant chacun un type de diabète ; le *Psammomys obesus* chez qui un diabète de type 2 a été provoqué par induction nutritionnelle, et le rat wistar (*Albinos albinos*) rendu diabétique de type 1 par injection de streptozotocine.

Chez le *Psammomys obesus*, l'induction du diabète de type 2 démontre l'importance de la prédisposition génétique dans la survenue de cette maladie métabolique. En effet, en absence d'un terrain génétiquement favorable, l'excès calorique ne suffit pas à induire un diabète non insulino-dépendant, mais plutôt à provoquer une obésité. D'autre part, il est important de considérer un aliment non pas sur le plan quantitative mais sur le plan qualitative. Ceci a clairement été démontré pour l'aliment synthétique utilisé et dont la nature hypercalorique a causé des troubles métaboliques et ce malgré une quantité ingérée moindre que l'aliment naturel des *Psammomys*, l'*Atriplex halimus*.

L'excès calorique chez les *Psammomys* a conduit à l'altération de l'homéostasie glucidique qui se traduit sur le plan plasmatique par une nette augmentation de la glycémie, de l'hémoglobine glyquée et de l'insulinémie. Sur le plan organique, l'architecture des îlots pancréatiques est assez atteinte, les cellules bêta perdent une bonne partie de leurs réserves insuliniques.

Cet excès calorique touche également le métabolisme lipidique. Les taux de triglycérides plasmatiques et hépatiques sont fortement élevés chez les *Psammomys* diabétiques mais également chez les *Psammomys* obèses. Sur le plan histologique, ceci se traduit par la présence de gouttelettes lipidiques à l'intérieur des hépatocytes, une des caractéristiques de la NAFLD (non alcoholic fatty liver disease).

## ***CONCLUSION ET PERSPECTIVES***

---

Le diabète de type 1 induit chez les rats wistar par injection de la streptozotocine, semble avoir un effet plus délétère sur la glycémie. En effet, celle-ci est largement supérieure à celle enregistrée chez les Psammomys diabétiques. Les îlots pancréatiques sont fortement atteints chez les rats STZ, leur architecture est totalement détruite avec perte considérable de la masse cellulaire bêta, ce qui induit une forte baisse de l'insulinémie et donc une augmentation considérable de la glycémie.

Les paramètres lipidiques subissent également une altération qui se traduit par l'augmentation de la triglycéridémie et de la cholestérolémie. Cependant, contrairement aux Psammomys diabétiques, chez les rats STZ l'augmentation de la triglycéridémie ne se reflète pas sur le plan hépatique par la présence de gouttelettes lipidiques. Ainsi, le diabète n'induit pas en soi une stéatose hépatique. L'insulinorésistance serait la pierre angulaire dans l'accumulation du gras dans le foie et donc dans la genèse de la NAFLD.

Les reins des rats wistar diabétiques ne sont pas épargnés par l'effet délétère de l'hyperglycémie. En effet, il y a atteinte de l'intégrité structurale du rein. Une augmentation de la créatinémie et de l'urémie témoigne de l'atteinte fonctionnelle de cet organe.

Toutes les altérations observées chez les deux modèles de diabète, sont relativement améliorées sous l'effet du jeûne intermittent. En effet, de par le suivi de l'évolution de certains paramètres biochimiques et organiques chez les rats diabétiques soumis au jeûne intermittent mimant celui du Ramadan, nous avons constaté que le métabolisme de ces derniers y répond favorablement.

Le jeûne intermittent normalise la glycémie chez les Psammomys diabétiques. Une normalisation beaucoup plus attribuée à l'amélioration de la résistance à l'insuline par le jeûne qu'à l'amélioration de la sécrétion insulinique. En effet, la HOMA reflétant l'état d'insulinorésistance diminue sous l'effet de la privation alimentaire intermittente. Cette amélioration de la résistance à l'insuline se reflète positivement sur le profil lipidique tant sur le plan plasmatique qu'hépatique. En effet, il apparaît que les paramètres lipidiques tels que la triglycéridémie et le taux de triglycérides hépatiques, dont les taux étaient très élevés chez les Psammomys non diabétiques et diabétiques nourris ad libitum, sont affectés positivement par le jeûne intermittent. Ces changements positifs du

## ***CONCLUSION ET PERSPECTIVES***

---

profil lipidique induisent une amélioration de la stéatose hépatique et de l'architecture histologique du foie. Ces améliorations sont probablement attribuées à la perte de poids observée durant le jeûne et qui contribue à l'amélioration de l'insulinorésistance.

Chez les rats Wistar atteints du diabète assimilé au diabète de type 1, l'hyperglycémie persiste même après le jeûne et la restriction calorique, ceci dit elle reste moins élevée par rapport à celle retrouvée chez les rats diabétiques non jeûneurs. Cette légère amélioration s'accompagne par une faible augmentation de la masse cellulaire  $\beta$  chez les rats wistar diabétiques soumis au jeûne et à la restriction calorique. Ceci dit la restauration relative des réserves insuliniques par le jeûne n'implique pas forcément une augmentation de la sécrétion d'insuline plasmatique vu que celle-ci reste inchangée si on la compare aux rats diabétiques non jeûneurs. Enfin, l'apoptose au niveau des îlots pancréatiques de rats wistar diabétiques est plus faible chez ceux soumis au jeûne et à la restriction alimentaire.

Ainsi, la réponse métabolique des rats atteints du diabète de type 1 au jeûne semble être moins prononcée comparés à celle des rats atteints du diabète de type 2. Ceci est fort probablement lié au degré d'altération des îlots pancréatiques qui vraisemblablement perdent toute capacité anatomique et fonctionnelle suite à l'induction du diabète de type 1. Ceci démontre la réversibilité du diabète de type 2 par rapport au diabète de type 1. La masse cellulaire  $\beta$  résiduelle, jouerait un rôle important dans la régénération des îlots pancréatiques par le jeûne intermittent. La diminution de la glycémie chez les rats wistar diabétiques est probablement liée à d'autres voies que celles induites par l'insuline vu que la concentration de celle-ci reste inchangée.

Cependant, il est à préciser que chez les rats STZ jeûneurs, la masse cellulaire  $\beta$ , quoique très faiblement rétablie, a pratiquement triplé sous l'effet du jeûne par rapport aux STZ non jeûneurs. Il se pourrait qu'un prolongement de la durée de ce jeûne au-delà de 30 jours produise encore un effet plus remarquable sur la masse cellulaire bêta. L'augmentation discrète de la masse cellulaire  $\beta$  n'est pas accompagnée sur le plan plasmatique par l'augmentation de la sécrétion insulinique. Il semble donc que la masse cellulaire  $\beta$  doit atteindre un certain seuil pour qu'elle puisse rétablir son efficacité face aux demandes métaboliques.

## ***CONCLUSION ET PERSPECTIVES***

---

Enfin, notre hypothèse sur un effet comparable entre la restriction calorique et le jeûne intermittent a été vérifiée. En effet, les paramètres altérés au cours du diabète de type 1 subissent une légère amélioration sous l'effet de la restriction calorique. Cependant, on note à travers toute l'étude un effet relativement supérieur du jeûne intermittent par rapport à l'effet de la restriction calorique, particulièrement sur les îlots pancréatiques.

Finalement, le jeûne intermittent mimant le jeûne du Ramadan, en exerçant son effet relativement bénéfique sur les paramètres biochimiques et organiques, susceptibles d'être altérés sous les conditions du diabète, contribuerait à la prévention ou du moins au retardement de l'apparition de complications liées au diabète.

En perspectives, il serait fort intéressant:

- D'explorer d'autres paramètres biochimiques et hormonaux liés au métabolisme glucidique et lipidique.
- D'étendre nos recherches sur d'autres organes sensibles au changement de l'homéostasie glucidique.
- De pousser nos investigations sur le plan moléculaire pour mieux cerner les mécanismes qui génèrent de telles améliorations notamment sur la régénération des cellules bêta chez les rats STZ.
- En absence d'une restauration de la sécrétion insulinaire, la diminution de l'hyperglycémie chez les rats STZ jeûneurs et CR est liée probablement à d'autres acteurs qui restent à élucider.
- Prolonger la durée du jeûne intermittent au-delà de 30 jours, à condition que la période de privation alimentaire n'excède pas les 24 heures, ce qui pourrait en comparaison au paradigme ADF, être moins contraignants.

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ahmet I, Wan R, Mattson MP, Lakatta EG, Talan M (2005). Cardioprotection by intermittent fasting in rats. *Circulation*; 112:3115–21.
2. Alarcon C, Leahy J, Schuppin G, Rhodes CJ (1995). Increased secretory demand rather than a defect in the proinsulin conversion mechanism causes hyperproinsulinemia in a glucose-infusion model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 95:1032-1039.
3. Allard J.S, Heilbronn L.K, Smith C, Hunt N.D, Ingram D.K, Ravussin E, Pennington CALERIE Team, De Cabo R (2008). In Vitro Cellular Adaptations of Indicators of Longevity in Response to Treatment with Serum Collected from Humans on Calorie Restricted Diets. *PLoS ONE* 3(9): e3211.
4. Amrani A, Verdaguer J, Thiessen S, Bou S, Santamaria P (2000). IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IFN- $\gamma$  mark  $\beta$ -cells for Fas-dependent destruction by diabetogenic CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest* 105:459–468.
5. Anson RM, Guo Z, de Cabo R, Iyun T, Rios M, Hagepanos A, Ingram DK, Lane MA, Mattson MP (2003). Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:6216 –6220.
6. Anty R, Gual P, Huet PM, Le Marchand Brustel Y, Tran A (2007). Les stéatopathies métaboliques: conséquences hépatiques du syndrome métabolique. *Gastroenterol Clin Biol* 31 : 1127-1134.
7. Assal JP, Ekoe JM, Lefevre P, Slama G (1994). Reconnaître, comprendre, traiter le diabète sucré. 2<sup>ème</sup> édition EDISEM Maloine Canada. 424 pages
8. Bergmeyer HU, Berndt E (1974). Glucose determination with glucose oxidase and peroxidase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer HU (ed). Academic Press, New York, pp1205-1215.
9. Biarnes M, Montolio M, Nacher V, Raurell M, Soler J, Montanya E (2002). Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia. *Diabetes* 51(1):66-72.
10. Bonner-Weir S, Deery D, Leahy JL, Wei GC (1989). Compensatory growth of pancreatic  $\beta$ -cells in adults rats after short term glucose infusion. *Diabetes* 38: 49-53.
11. Bouwens L, Rooman I (2005). Regulation of Pancreatic  $\beta$ -cell mass. *Physiol Rev* 85: 1255-1270.
12. Brazilai N, Ganriely I. The role of fat depletion in the biological benefits of caloric restriction. *J. Nutr.* 131: 903S-906S, 2001.
13. Brichard SM (2003). Tissu adipeux: organe endocrinien? *Louvain Med* 122: S301-S304.

14. Briones ER, Steiger DL, Palumbo PJ, O'Fallon WM, Langworthy AL, Zimmerman BR, Kottke BA (1986). Sterol excretion and cholesterol absorption in diabetics and nondiabetics with and without hyperlipidemia. *Am J Clin Nutr* 44: 353-361.
15. Burcelin R, Eddouks M, Maury J, Kande J, Assan R, Girard J (1995). Excessive glucose production, rather than insulin resistance, accounts for hyperglycaemia in recent-onset streptozotocin-diabetes rats. *Diabetologia* 38: 283–290.
16. Buysschaert M (2001). *Diabétologie clinique*. 2<sup>ème</sup> édition De Boeck université , Belgique. 190 pages.
17. Cardozo AK, Kruhoffer M, Leeman R, Orntoft T, Eizirik DL (2001). Identification of novel cytokine induced genes in pancreatic beta cells by high oligonucleotide arrays. *Diabetes* 50: 909-920.
18. Cerasi E, Ktorza A (2007). Plasticité anatomique et fonctionnelle des cellules  $\beta$  du pancréas endocrine et diabète de type 2. *Medecine/sciences* 23 : 885-894.
19. Christiansen MP, Linfoot PA, Neese RA, Hellerstein MK (2000). Effect of Dietary Energy Restriction on Glucose Production and Substrate Utilization in Type 2 Diabetes. *Diabetes* 49:1691–1699.
20. Cline GW, Peterson KF, Krssak M (1999). Failed transport of glucose as causes decreased insulin-stimulated glycogen synthesis of muscle in diabetes of type 2. *N Eg J Med* 341: 240-246.
21. Daly M, Daly S (1973). On the feeding ecology of *Psammomys obesus* (Rodentia, gerbillidae) in the Wadi Saoura, Algeria). *Mammalia* 35:546-561.
22. DeFronzo RA (1988). Lilly lecture 1987. The triumvirate:  $\beta$ -cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes*37:667-687.
23. Degen AA, Kam M, Khokhlova IS, Zeevi Y (2000). "Fiber digestion and energy utilization of fat sand rats (*Psammomys obesus*) consuming the chenopod *Anabasis articulata*". *Physiol Biochem Zool*, 73, 574-80.
24. den Boer M (2006). *Hepatic Steatosis - Metabolic Consequences*. Thesis, University of Leiden, Netherlands. 165 pages.
25. Donath MY, Gross DJ, Cerasi E, Kaiser N (1999). Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes* 48:738 –744.
26. Donnelly R, Emslie-Smith AM, Gardner ID, Morris AD (2000). Vascular complications of diabetes. *BMJ* 302: page 1062.
27. Eid WE, McKay S, Karlsso Fand Garber AJ (2003). Atherosclerosis in type 1 diabetes in Type 1 diabetes: etiology and treatment Sperling M.A. Humana press (595 pages). P473-483.
28. Eizirik DL, Darville MI (2001).  $\beta$ -Cell Apoptosis and Defense Mechanisms:Lessons From Type 1 Diabetes. *Diabetes* 50:S64–S69.

29. Eizirik DL, Flodström M, Karlsten AE, Welsh N (1996). The harmony of the spheres: inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 39:875–890.
30. Eizirik DL, Pavlovic D (1997). Is there a role for nitric oxide in  $\beta$ -cell dysfunction and damage in IDDM? *Diabetes Metab Rev* 13:293–308.
31. Ersser RS, Barlow GB, Drew RG, Hjelm M (1986). Packing materials suitable for rapid, analytical, low-pressure chromatography of hemoglobins on midsize columns. *Biomed Chromatogr* 1: 183-188.
32. Fan JG, Zhong L, Xu ZJ, Tia LY, Ding XD, Li MS, Wang GL (2003). Effects of low-calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity and hyperlipidemia. *World J Gastroenterol* 9:2045-2049.
33. Ferrannini E, Camastra S, Gastaldelli A, Sironi AM, Natali A, Muscelli E, Mingrone G, Mari A (2004). Beta-Cell Function in Obesity: Effects of Weight Loss. *Diabetes* 53:S26-S33.
34. Ferrer JC, Favre C, Gomis RR, et al (2003). Control of glycogen deposition. *FEBS Lett* 546:127-32.
35. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
36. Fumeron F (2005). De l'obésité au diabète de type 2: épidémiologie et physiopathologie. *Choléc-Doc* 88 ; 6 pages.
37. Gerich JE (2000). Insulin resistance is not necessarily an essential component of type 2 diabetes. *J End Clin and Metab* 85: 2113-2115.
38. Gernigon TH (1992). Etudes cytologiques et biochimiques des variations saisonnières de l'appareil génital mâle d'un rongeur saharien, le rat de sable: *Psammomys obesus*. Thèse ISN-USTHB, Alger.
39. Girard J (2003). Rôle des acides gras libres dans la sécrétion et l'action de l'insuline : mécanismes de la lipotoxicité. *Medecine/Sciences* 19 : 827-3.
40. Goodrick CL, Ingram DK, Reynolds MA, Freeman JR, Cider N (1990). Effects of intermittent feeding upon body weight and lifespan in inbred mice: interaction of genotype and age. *Mech Ageing Dev*; 55:69–87.
41. Gremlich S, Nolan C, Roduit R, Burcelin R, Peyot ML, Delghingaro-Augusto V, Desvergne B, Michalik L, Prentki M, Wahli W (2005). Pancreatic Islet Adaptation to Fasting Is Dependent on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  Transcriptional Up-Regulation of Fatty Acid Oxidation. *Endocrinology* 146(1):375–382.
42. Grossman EJ, Lee DD, Tao J, Wilson RA, Park SY, Bell GI, Chong AS (2010). Glycemic control promotes pancreatic beta-cell regeneration in streptozotocin-induced diabetic mice. *PLoS ONE* 5: e8749.

43. Gylling H, Miettinen TA (1997). Cholesterol absorption, synthesis, and LDL metabolism in NIDDM. *Diabetes Care* 20: 90-95.
44. Halberg N, Henriksen M, Soderhamn N, Stallknecht B, Ploug T, Schjerling P, Dela F (2005). Effect of intermittent fasting and refeeding on insulin action in healthy men. *J Appl Physiol*; 99:2128–2136.
45. Hayashi K, Kojima R, Ito M (2006). Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice. *Biol Pharmaceut Bull* 29: 1110-1119.
46. Heilbronn LK, Ravussin E (2003). Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am J Clin Nutr*; 78:361–369.
47. Heilbronn LK, Smith SR, Martin CK, Anton SD, Ravussin E (2005). Alternate-day fasting in nonobese subjects: effects on body weight, body composition, and energy metabolism. *Am J Clin Nutr*; 81:69–73.
48. Henry RR (2001). Cardiovascular complications and diabetes mellitus type 2: Health management. *Clin Diabete* 19: 113-120.
49. Herrera PL, Harlan DM, Vassalli P (2000). A mouse CD8 T cell-mediated acute autoimmune diabetes independent of the perforin and Fas cytotoxic pathway: possible role of membrane TNF. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:279–284.
50. Herrman CE, Sanders RA, Klaunig JE, Schwarz LR, Watkins JB III (1999). Decreased apoptosis as a mechanism for hepatomegaly in streptozotocin-induced diabetic rats. *Toxicol Sci* 50:146-151.
51. Horio F, Teradaira S, Imamura T, Anunciado RVP, Kobayashi M, Namikawa T, Niki I (2005). The HND mouse, a nonobese model of type 2 diabetes mellitus with impaired insulin secretion. *European Journal of Endocrinology* 153 : 971–979.
52. Hotamisligil GS, Spiegelman BM (1994). Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43: 1271-1278.
53. Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580.
54. Ikeda Y, Olsen GS, Ziv E, Hansen LL, Busch AK, Hansen BF, Shafrir E, Mosthaf-Seedorf L (2001). Cellular mechanism of nutritionally induced insulin resistance in Psammomys obesus: Overexpression of protein kinase C $\epsilon$  in skeletal muscle precedes the onset of hyperinsulinemia and hyperglycemia. *Diabetes* 50: 584-592.
55. Imai Y, Neubert P, Sesti G, Accili D, Taylor S (1997). Expression of various form of receptor of insulin substrate 1 identified in patients with the dependent diabetes not insulin mellitus 1. 82: 4201- 4027.

56. Itoh N, Imagawa A, Hanafusa T, Waguri M, Yamamoto K, Iwahashi H, Moriwaki M, Nakajima H, Miyagawa J, Namba M (1997). Requirement of Fas for the development of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 186: 613-618.
57. Jacobs C (1994). Diabète et rein. In *Reconnaitre, comprendre, traiter le diabète sucré*. 2<sup>ème</sup> édition EDISEM Maloine Canada. P 289- 290.
58. Jetton TL, Lausier J, LaRock K, Trotman WE, Larmie B, Habibovic A, Peshavaria M, Leahy JL (2005). Mechanisms of compensatory beta-cell growth in insulin-resistant rats: roles of Akt kinase. *Diabetes* 54:2294–2304.
59. Jiang J, Torok N (2008). Nonalcoholic steatohepatitis and the Metabolic syndrome. *Metabolic syndrome and related disorders* 6: 1-8.
60. Johnson JD, Luciano DS (2010). Mechanism of pancreatic  $\beta$ -cell apoptosis in diabetes and its therapies *in*: Islam MS; *The islets of Langerhans, advances in experimental medicine and biology*. Springer edition. Page 447.
61. Jonas JC, Sharma A, Hasenkamp W, Ilkova H, Patane G, Laybutt R, Bonner-Weir S, Weir GC (1999). Chronic Hyperglycemia Triggers Loss of Pancreatic  $\beta$ -Cell Differentiation in an Animal Model of Diabetes. *The Journal Of Biological Chemistry* 274: 14112–14121.
62. Kahn CR, White MF (1988). The Insulin Receptor and the Molecular Mechanism of Insulin Action. *J Clin. Invest* 82: 1151-1156.
63. Kahn SE (2001). The importance of  $\beta$ -cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J Endo Met* 8: 4047-4058.
64. Kaiser N, Yuli M, Üçkaya G, Oprescu AI, Berthault MF, Kargar C, Donath MY, Cerasi E, Ktorza A (2005). Dynamic changes in  $\beta$ -cell mass and pancreatic insulin during the evolution of nutrition-dependent diabetes in *Psammomys obesus*: Impact of glycemic control. *Diabetes* 54: 138-145.
65. Kajimoto Y and Kaneto H (2004). Role of oxidative stress in pancreatic beta-cell dysfunction. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1011: 168–176.
66. Kakkar R, Mantha SV, Radhi J, Prasad K, Kalra J (1998). Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. *Clinical Science* 94: 623-632.
67. Kalderon B, Gutman A, Levy E, Shafir E, Adler JH (1986). Characterization of stages in development of obesity-diabetes syndrome in sand rat (*Psammomys obesus*). *Diabetes* 35:717-724.
68. Kalra SP, Dube MG, Sahu A, Phelps CP, Kalra PS (1991). Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc Nat Acad Sci USA* 88:10931–10935.

69. Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS (1999). Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine Reviews* 20: 68–100.
70. Kanety H, Moshe S, Shafrir E, Lunenfeld B, Karasik A (1994). Hyperinsulinemia induces a reversible impairment in insulin receptor function leading to diabetes in the sand rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci* 91: 1853–1857.
71. Kawamori D, Welters HJ, Kullkarni RN (2010). Molecular pathways underlying the pathogenesis of pancreatic  $\alpha$ -cell dysfunction in Islam MS; The islets of Langerhans, advances in experimental medicine and biology. Springer edition. 654 pages. 421-445.
72. Kellerer M, Mushack J, Mischak H, Haring HU (1997). Protein kinase C (PKC) epsilon enhances the inhibitory effect of TNF alpha on insulin signaling in HEK293 cells. *FEBS Lett* 418:119 – 122.
73. Kelley DD, Wing R, Buonocore C, Sturis J, Polonsky K, Fitzsimmons M (1993). Relative Effects of Calorie Restriction and Weight Loss in Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 1287-1293.
74. Kirk JK, Graves DE, Craven TE, Lipkin EW, Austin M, Margolis KL (2008). Restricted-carbohydrate diets in patients with type 2 diabetes: A meta-analysis. *J Am Diet Assoc* 108: 91-100.
75. Kirschner MA, Schneider G, Ertel NH, Gorman J (1988). An eight-year experience with a very-low-calorie formula diet for control of major obesity. *Int J Obes* 12:69-80.
76. Koceir EHA (2003). Etude du métabolisme glucidique et lipidique de l'hépatocyte isolé de rat des sables (*Psammomys obesus*) au cours du développement du syndrome diabétique. Influence nutritionnelle, hormonale et pharmacologique. Thèse ISN-USTHB, Alger.
77. Komolafe OA, Adeyemi DO, Adewole SO, Obuotor EM (2009). Streptozotocin-Induced Diabetes Alters The Serum Lipid Profiles Of Adult Wistar Rats. *The Internet Journal of Cardiovascular Research*. Volume 7 Number 1.
78. Koolhaas JM (1999). The laboratory rats. In *UFAW Handbook on the care and management of laboratory animals*. 7<sup>th</sup> edition (Poole T Ed): 313-330.
79. Krizova E, Simek V (1996). Effect of intermittent feeding with high-fat diet on changes of glycogen, protein and fat content in liver and skeletal muscle in the laboratory mouse. *Physiol Res*; 45:379–83.
80. Lam PP, Leung YM, Sheu L, Ellis J, Tsushima RG, Osborne LR, Gaisano HY (2005). Transgenic mouse overexpressing syntaxin-1A as a diabetes model. *Diabetes* 54:2744-2754.
81. Leclercq-Meyer V, Marchand J, Woussen-Colle MC, Giroix M-H and Malaisse WJ (1985). Multiple effects of leucine on glucagon, insulin and somatostatin secretion from the perfused rat pancreas. *Endocrinology* 116: 1168-1174.

82. Leibowitz G, Üçkaya G, Oprescu AI, Cerasi E, Gross DJ, Kaiser N (2002). Glucose-regulated proinsulin gene expression is required for adequate insulin production during chronic glucose exposure. *Endocrinology* 143: 3214-3220.
83. Leibowitz G, Yuli M, Donath MY (2001).  $\beta$ - Cell glucotoxicity in the *Psammomys obesus* model of type 2 diabetes. *Diabetes* 50 (suppl 1):S113-S117.
84. Lenzen S (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51:216–226.
85. Lernmark A (2001). Autoimmune diseases: are markers ready for prediction? *J Clin Invest* 108: 1091-1096.
86. Li Z., Karlsson F.A., Sandler S (2000). Islet loss and  $\alpha$ -cell expansion in type 1 diabetes induced by multiple low dose streptozotocin administration in mice. *J Endocrinol*, 165: 93-99.
87. Ling Z, Van de Casteele M, Eizirik DL, Pipeleers DG (2000). Interleukin-1 $\beta$ -induced alteration in a  $\beta$ -cell phenotype can reduce cellular sensitivity to conditions that cause necrosis but not to cytokine-induced apoptosis. *Diabetes* 49:340–345.
88. Ma Z, Landt M, Bohrer A, Ramanadham S, Kipnis DM, Turk J (1997). Interleukin-1 reduces the glycolytic utilization by pancreatic islets and reduces glucokinase mRNA content and protein synthesis by a nitric-oxide dependent mechanism. *J Biol Chem* 272:17827–17835.
89. Macedo CS, capelletti SM, Salgado Mercadante MC, Padovani CR, Spadella ST (2002). Role of metabolic control on diabetic nephropathy. *Acta cirúrgica brasileira* 17: 370-376.
90. Mager DE, Wan R, Brown M, Cheng A, Wareski P, Abernethy DR, Mattson MP (2006). Caloric restriction and intermittent fasting alter spectral measures of heart rate and blood pressure variability in rats. *FASEB J* 20, 631-637.
91. Magnan C, Ktorza A (2005). Production et sécrétion de l'insuline par la cellule  $\beta$  pancréatique. *EMC-Endocrinologie* 2 :241–264.
92. Malder K, Spinass GA, Lehman R, Sergeev P, Weber M, Fontana A, Kaiser N, Donath MY (2001). Glucose induced beta cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes* 50:1683-1690.
93. Martin B, Mattson MP, Maudsley S (2006). Caloric restriction and intermittent fasting: Two potential diets for successful brain aging. *Ageing Res Rev* 5(3): 332–353.
94. Masoro EJ (2000). Caloric restriction and aging: an update. *Exp. Gerontol.* 35: 299–305.
95. Mathe D (1995). Dyslipidemia and diabetes animal models. *Diabetes Metab*21(2): 106.
96. Mathis D, Vence L, Benoist C (2001). Beta cell death during progression to diabetes. *Nature* 414: 792-798.
97. Mattson MP, Chan SL, Duan W (2002). Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior. *Physiol Rev*; 82:637– 672.

98. Mattson MP, Wan R (2005). Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems. *J Nutr Biochem* 16:129-137.
99. Mckibbin PE, Mccarthy HD, Shaw P, Williams G (1992). Insulin Deficiency Is a Specific Stimulus to Hypothalamic Neuropeptide Y: A Comparison of the Effects of Insulin Replacement and Food Restriction in Streptozocin-Diabetic Rats. *Peptides* 13 :721-727.
100. Mendez JD, Balderas F (2001). Regulation of hyperglycemia and dyslipidemia by exogenous L-arginine in diabetic rats. *Biochimie*83(5):453-8
101. Miley HE, Sheader EA, Brown PD, Best L (1997) Glucose-induced swelling in rat pancreatic beta-cells. *Journal of Physiology* 504: 191–198.
102. Montanya E, Nacher V, Biarnès M, Soler J (2000). Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes* 49: 1341-1346.
103. Morimoto S, Mendoza-Rodríguez CA, Hiriart M, Larrieta ME, Vital P, Cerbón MA (2005). Protective effect of testosterone on early apoptotic damage induced by streptozotocin in rat pancreas. *Journal of Endocrinology* 187:217–224.
104. Murakami H, Ura N, Furuhashi M, Higashiura K, Miura T, Shimamoto K (2003). Role of adiponectin in insulin-resistant hypertension and atherosclerosis. *Hypertens Res* 26: 705–710.
105. Nathan DM (2002). Gestion of glycaemia in diabetes type 2 mellitus. *N Eng J Med* 347: 1342-1349.
106. Neshar R, Gross DJ, Donath MY, Cerasi E, Kaiser N (1999a). Interaction between genetic and dietary factors determines  $\beta$ - cell function in *Psammomys obesus*, an animal model of type 2 diabetes. *Diabetes* 48: 731-737.
107. Neshar R, Warwar N, Khan A, Efendic S, Cerasi E, Kaiser N (2001b). Defective stimulus-secretion coupling in islets of *Psammomys obesus*, an animal model for type 2 diabetes. *Diabetes* 50: 308-314.
108. Oishi K, Ohkura N, Matsuda J, Ishida N (2007). Food deprivation induces adipose plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression without accumulation of plasma PAI-1 in genetically obese and diabetic db/db mice. *Thromb Haemost* 98: 864–870.
109. Okamoto H (1985). The role of poly (ADP-ribose) synthetase in the development of insulin-dependent diabetes and islet B-cell regeneration. *Biomed Biochim Acta* 44:15–20.
110. Ozdemir O, Akalin Pp, Baspinar N , Hatipoglu F (2009). Pathological changes in the acute phase of streptozotocin-induced diabetic rats. *Bull Vet Inst Pulawy* 53, 783-790.
111. Padwal R, Straus SE, Mc Alister FA (2001). Cardiovascular risk factors and theirs effects on the decision to treat hypertension: evidence based review. *BMJ* 322-977.
112. Passa P (1999). Prise en charge du diabète. *La revue du praticien. Med Gen* 13 : 762-763.

113. Pederson CR, Hagemann I, Bock T, Buschard K (1999). Intermittent feeding and fasting reduces diabetes incidence in BB rats. *Autoimmunity* 30 (4): 243-250.
114. Peschke E, Ebel H, Brömme HJ, Peschke D (2000). 'Classical' and 'new' diabetogens – comparison of their effects on isolated rat pancreatic islets in vitro. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57:158–164.
115. Petter F (1961). Répartition géographique et écologique des rongeurs désertiques. *Mammalia* 25, 1-222.
116. Pittenger GL, Taylor-Fishwick D, Vinik AI (2009). The Role of Islet Neogenesis-Associated Protein (INGAP) in Pancreatic Islet Neogenesis. *Current Protein and Peptide Science* 10: 37-45.
117. Poyten V, Robertson RP (2002). Minireview: Secondary  $\beta$ -Cell Failure in Type 2 Diabetes—A Convergence of Glucotoxicity and Lipotoxicity. *Endocrinology* 143:339–342.
118. Polonsky KS, Sturis J, Bell GI (1996). Diabete non insulinodepant mellitus a lack genetically programmed of beta cell to compensate for insulin resistance. *N Eng J Med* 334: 777-783.
119. Rerup CC (1970). Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev* 22:485–518
120. Rhodes CJ (2008). Regulation of beta cell growth and death in: Seino S and Bell G:pancreatic beta cell in health and disease. 215-243.
121. Rigalleau V, Lang J, Gin H (2007). Étiologie et physiopathologie du diabète de type 2. *Endocrinologie-Nutrition* 10-366-D-10: 1-12.
122. Ritchie S, waugh D (1957). The pathology of Armanntni-Ebstein diabetic nephropathy. *The American Journal of Pathology* 33: 1035-1057.
123. Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, Henry RR, Kern Pa (1996). The expression of TNF alpha by human muscle: relationship to insulin resistance. *J Clin Inest* 97: 1111-1116.
124. Saltpeter SJ, Dor Y (2008). Beta cell replication in: pancreatic beta cell in health and disease. 245-264.
125. Santos RX, Cardoso S, Silva S, Correia S, Carvalho C, Cris´Ostomo J, Rodrigues L, Amaral C, Louro T, Matafome P, Santos MS, Proenc P, Duarte AI, Seica A, Moreira PI (2009). Food deprivation promotes oxidative imbalance in rat brain. *Journal of food science* 74 (1):H8-H13.
126. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:667–671.
127. Scoppola A, Montecchi FR, Menzenger G and Lala A (2001). Urinary mevalonate excretion rate in type 2 diabetes: role of metabolic control. *Atherosclerosis* 156: 357-361.
128. Seino S and Bell G (2008). Pancreatic beta cell in health and disease. Springer edition. 474 pages.
129. Seyer-Hansen K: Renal hypertrophy in streptozotocin diabetic rats. *Clin Sci Mol Med Suppl* 1976, 51:551-555.

130. Shafrir E, Ben-Sasson R, Ziv E, Bar-On H (1999c). Insulin resistance, beta cell survival and apoptosis in type 2 diabetes: animal models and human implications. *Diab Rev* 7: 114–123.
131. Shafrir E, Zif 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 journal* 47,3:212-222.
132. Shafrir E, Ziv E, Mosthaf L (1999b). Nutritionally induced insulin resistance and receptor defect leading to beta cell failure in animal models – human implications. *Ann NY Acad Sci* 892: 223–246.
133. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *diabetes research and clinical practice* 87:4 –14.
134. Shehata M.F. Genetic and dietary salt contributors to insulin resistance in Dahl salt-sensitive rats. *Cardiovascular diabetology*, 7:7, 2008.
135. Shepherd PR, Kahn BB (1999). Action of transporter-insulin of glucose implication for the insulin resistance and the diabetes mellitus. *N Eng J Med* 341: 248-257.
136. Shulman GI (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.* 106:171-176.
137. Sindelar DK, Mystkowski P, Marsh DJ, Palmiter RD, Schwartz MW (2002). Attenuation of diabetic hyperphagia in neuropeptide y–deficient mice. *Diabetes* 51:778–783.
138. Sironi AM, Gastaldelli A, Mari A, Ciociaro D, Postano V (2004). Visceral Fat in Hypertension Influence on Insulin Resistance and  $\beta$ -Cell Function. *Hypertension* 44:127-133.
139. Slama G (1994). Neuropathie diabétique. In *Reconnaitre, comprendre, traiter le diabète sucré*. 2<sup>ème</sup> édition EDISEM Maloine Canada. P 319-321.
140. Stein DT, Esser V, Stevenson BE, Lane KE, Whiteside JH, Daniels MB, Chen S, McGarry JD (1996). Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *Journal of Clinical Investigation* 97: 2728–2735.
141. Stratton IM, Adler AI, Neil HA (2000). Association of glycemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes. *BMJ* 321: 405-412.
142. Tang D, Yu T, Khraibi AA (2004). Cardiovascular and renal characteristics, and responses to acute volume expansion of a rat model of diabetic pregnancy. *Life sciences* 74:2909-2918.
143. Thivolet C (2002). Beta cells in type 1 diabetes: Victims or activators of t cell response? *Diabetes Metab* 28 : 267-26.
144. Thomas HE, McKenzie MD, Angestra E, Campbell PD, Kay TW (2009). Beta cell apoptosis in diabetes. *Apoptosis* 14(12):1389-1404.
145. Tikoo K, Tripathi DN, Kabra DG, Sharma V, Gaikwad AB (2007). Intermittent fasting prevents the progression of type I diabetic nephropathy in rats and changes the expression of Sir2 and p53. *FEBS Letters* 581: 1070-1078.

146. Tisch R, McDevitt H (1996). Insulindependent diabetes mellitus. *Cell* 85: 291-297.
147. Toledo FGS, SNIDERMAN AD, KELLEY DE (2006). Influence of Hepatic Steatosis (Fatty Liver) on Severity and Composition of Dyslipidemia in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 29:1845–1850.
148. Torbenson M, Chen Y, Brunt E, Cummings OW, Gottfried M, Jakate S, Liu Y, Yeh MM, Ferrell L (2006). Glycogenic hepatopathy: An underrecognized hepatic complication of diabetes mellitus. *Am J Surg Pathol* 30:508-513.
149. Torbenson M (2010). Glycogenic Hepatopathy. *Pathology Case Reviews* 15: 72-76.
150. Tsai EB, Sherry NA, Palmer JP, Herold KC (2006). The rise and fall of insulin secretion in type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia* 49:261-70.
151. Üçkaya G, Delagrang P, Chavanieu A, Grassy G, Berthault MF, Ktorza A, Cerasi A, Leibowitz G, Kaiser N (2005). Improvement of metabolic state in an animal model of nutrition-dependent type 2 diabetes following treatment with S 23521, a new glucagon-like peptide 1 (GLP-1) analogue. *Journal of Endocrinology* 184: 505-513.
152. Van den Brand M, Elving LD, Drenth JPH, van Krieken JHJM (2009). Glycogenic hepatopathy: a rare cause of elevated serum transaminases in diabetes mellitus. *The Netherlands journal of medicine* 67:394-396.
153. Varady K.A, Bhutani S, Church MC, Klempel MC (2009). Short-term modified alternate-day fasting: a novel dietary strategy for weight loss and cardioprotection in obese adults. *Am J Clin Nutr*; 90:1138–1143.
154. Varady KA, Roohk DJ, Loe YC, McEvoy-Hein BK, Hellerstein MK (2007). Effects of modified alternate-day fasting regimens on adipocyte size, triglyceride metabolism, and plasma adiponectin levels in mice. *J. Lipid Res* 48: 2212–2219.
155. Vedtofte L, Bodvarsdottir TB, Karlsen AE, Heller RS (2007). Developmental Biology of the Psammomys obesus Pancreas: Cloning and Expression of the Neurogenin-3 Gene. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 55(1): 97-104.
156. Vestra MD, Fioretto P (2003). Diabetic nephropathy: renal structural studies in type 1 and type 2 diabetic patients. *International Congress Series* 1253:163– 169.
157. Wagener FADTG, Dekker D, Berden JH, Scharstuhl A, van der Vlag J (2009). The role of reactive oxygen species in apoptosis of the diabetic kidney. *Apoptosis* 14:1451–1458.
158. Wan R, Camandola S, Mattson MP (2003). Intermittent Food Deprivation Improves Cardiovascular and Neuroendocrine Responses to Stress in Rats. *J Nutr* 133: 1921–1929.
159. Watanabe Y, Hotta N (1997). Tubulointerstitial injury in diabetes mellitus (including Armani-Ebstein lesion). *Ryoikibetsu Shokogun Shirizu* 17: 225-228.

160. Weigle DS, Duell PB, Connor WE, Steiner RA, Soules MR, Kuijper JL (1997). Effect of Fasting-Refeeding, and Dietary Fat Restriction on Plasma Leptin Levels. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 561–565.
161. Weindruch R, Keenan KP, Carney JM, Fernandes G, Feuers RJ, Floyd RA, Halter JB, Ramsey JJ, Richardson A, Roth GS, Spindler SR (2001). Caloric Restriction Mimetics: Metabolic Interventions. *Journal of Gerontology: SERIES A* 56A (Special Issue I):20–33.
162. Weiss RB (1982). Streptozocin: a review of its pharmacology, efficacy, and toxicity. *Cancer Treat Rep* 66:427–438.
163. Wilson GL, Hartig PC, Patton NJ, LeDoux SP (1988). Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage. Activation of poly(ADP-ribose) synthetase and cellular distribution. *Diabetes* 37:213–216.
164. Wittnich C and Wallen WJ (1997). Sex differences in response to dietary manipulation in rats with hypertension and myocardial hypertrophy. *Am J Clin Nutr* 66:1428-1435.
165. Wright jr E, Scism-bacon JL, Glass C (2006). Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. *Int J Clin Pract* 60 (3): 308–314.
166. Wu KK, Huang F (2008). Induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol* 40: 1-5.
167. Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H (1981). Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* 294:284–286.
168. Zafar M, Naqvi SNH, Ahmed M, Kaimkhani ZA (2009). Altered Liver Morphology and Enzymes in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Int. J. Morphol* 27:719-725.
169. Zimmet P and Thomas CR (2003). Genotype, obesity and cardiovascular disease – has technical and social advancement outstripped evolution? *Journal of Internal Medicine* 254: 114–125.
170. Ziv E, Kalman R, Hershkop K, Barash V, Shafir E, Bar-On H (1996). Insulin resistance in the NIDDM model *Psammomys obesus* in the normoglycaemic–normoinsulinaemic state. *Diabetologia* 39: 1269–1275.
171. Zoltowska M, Zif E, Delvin E, Lambert M, Seidman E, Levy E (2004). Both insulin resistance and diabetes in *Psammomys obesus* upregulate the hepatic machinery involved in intracellular vldl assembly. *Arterioscle Thromb Vasc Biol* 24:118-123.

# ANNEXES



## ANNEXE 1

### 1. Solutions et milieux

#### Milieu Hanks

Composés	Concentration (mM)
<i>NaCl</i>	137
<i>KCl</i>	5.4
<i>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</i>	1.3
<i>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</i>	0.8
<i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O</i>	0.34
<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	0.44
<i>NaHCO<sub>3</sub></i> (pour mettre à pH)	4.2

#### Composition du collect medium (CM)

Solution I: 30 ml (NaCl 448mM et tampon Hepes 40mM, pH=7.4)

Solution II: 30ml (KCl 20mM NaHCO<sub>3</sub> 96mM, MgCl<sub>2</sub> 4mM)

Solution III: 30 ml (CaCl<sub>2</sub> 4mM)

H<sub>2</sub>O: 30 ml

O<sub>2</sub> (95%)-CO<sub>2</sub> (5%) pendant 5 minutes

Albumin: 600 mg

pH 7.75

→ CM

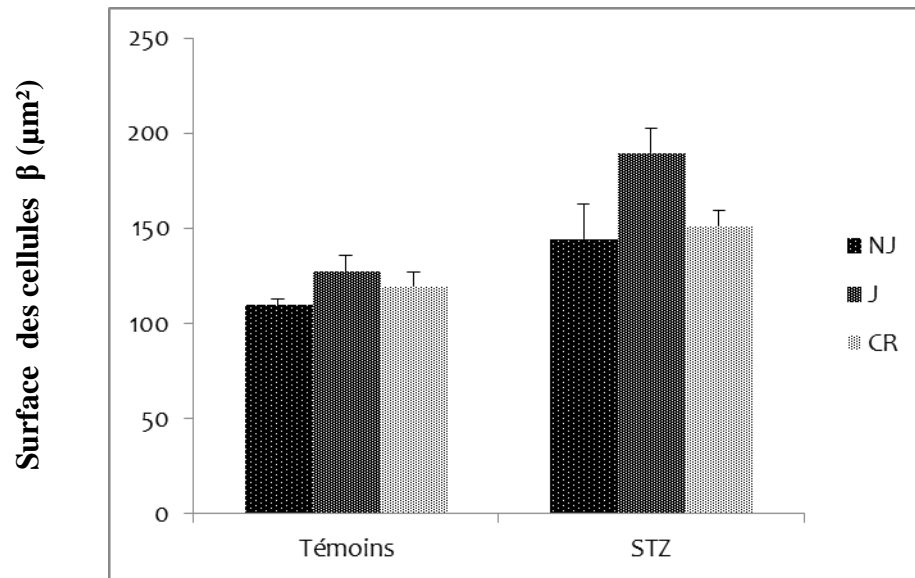
#### Milieux d'incubation (IM) pour la sécrétion statique d'insuline

IM<sub>2,8</sub> : 25 ml CM + 12.6 mg D-Glucose anhydre (2.8mM)

IM<sub>8,3</sub> : 25 ml CM + 37.4 mg D-Glucose anhydre (8.3mM)

IM<sub>16,7</sub> : 25 ml CM + 75.2 mg D-Glucose anhydre (16.7mM)

## ANNEXE 2



**Figure :** Surface individuelle des cellules bêta chez les rats témoins et STZ NJ, J et CR.



# **PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES**

---

## Intermittent fasting modulation of the diabetic syndrome in sand rats I. Background information and experimental design

Louiza Belkacemi<sup>1</sup>, Ghalem Selselet-Attou<sup>1</sup>, Abdullah Sener<sup>2</sup>, Willy J. Malaisse<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Technologie Alimentaire et Nutrition, Université de Mostaganem, Mostaganem, Algeria and

<sup>2</sup>Laboratory of Experimental Hormonology, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

(Received 26 March 2009, accepted 24 April 2009)

### ABSTRACT

The present series of reports deal with the effects of intermittent fasting on the development of diabetes in sand rats exposed to a hypercaloric diet. This first report provides relevant background information on such items as biotope, natural food and capture of the sand rats, as well as a detailed description of the experimental design used to indeed assess the modulation of this diabetic syndrome by intermittent daily fasting for 15 hours.

**KEY WORDS:** Sand rats (*Psammomys obesus*), diabetes, intermittent fasting.

### INTRODUCTION

Since the pilot observations reported in 1967-1968 by Hackel et al. (1), Miki et al. (2) and Malaisse et al. (3), numerous publications have confirmed the occurrence of diabetes in sand rats (*Psammomys obesus*), when exposed to a standard laboratory chow. The present series of reports concerns mainly the possible modulation by intermittent fasting of the metabolic syndrome indeed developing in the sand rats after transition from a purely vegetal diet to a hypercaloric one. More precisely, it was investigated whether an intermittent fasting from 5.00 p.m. to 8.00 a.m. during each 24 hours period may minimize and/or delay the occurrence of such a syndrome.

This first report provides information on such items as the biotope, natural food composition, intake pattern and modality of capture of the sand rats.

### RELEVANT INFORMATION

1. Experimental animal model  
Our study concerns a saharian rodent, the sand rat (*Psammomys obesus*). This animal model offers the uncommon advantage of developing a nutrition-induced diabetes, comparable to type 2 diabetes in human subjects. When held in captivity and exposed to a hypercaloric diet, the sand rat indeed develops a metabolic syndrome, similar to that found in type 2 diabetic subjects (4). An attractive feature of the sand rat consists in the fact that its diabetic phenotype reveals itself during the transition from the hypocaloric diet, found in its natural habitat, to a synthetic hypercaloric diet. This situation is reminiscent of the pathogenesis to type 2 diabetes in human subjects, as may be attributed to their passage to an occidental way of life characterized by sedentariness and caloric rich feeding. Hence, the sand rat is often used as an animal model to further investigate the physiopathology of type 2 diabetes.

2. Animal description  
*Psammomys obesus* is a saharian rodent of the muride family, gerbillide sub-family, glire super-order, myomorphe sub-order (Fig. 1). According to Petter (5),

only one sub-species lives in the algerian saharian regions, namely the Cretzchmar sub-species. The sand rat is a rodent with a fawn reddish-brown fur. Its length ranges between 13 and 16 cm. At the adult age, its body weight ranges between 80 and 120 g in zones with poorly abundant vegetation (Igli, Marhoum and B'Chir in Béchar wilaya), whilst exceeding 125 g in zones with abundant vegetation (Abadia in Bécher wilaya) (6).



Fig 1: *Psammomys obesus*.

3. Biotope  
Sand rats live in Wadi beds, in sandy or clayey dips where Chenopodiaceae plants are abundant. Their repartition is linked to the hydrographic network (5, 7).  
It is below the Chenopodiaceae shrubby trees, halophytic plants rich in water and mineral salts, that the sand rats groove their burrows over several meter area, which may reach 6 m perimeter and 1.2 m depth. These burrows consist of several gallery layers communicating between themselves through secondary galleries with 4 to 6 access openings. This setting allows both to avoid beasts of prey and to ensure an aeration microclimate with constant temperature (25°C) and a high hygrometric degree (60 to 70 %) (5).

4. Natural food

Sand rats are phytophagic animals, their natural food intake consisting exclusively of the stalk and leaves of salted plants belonging to the Chenopodiaceae family. These plants are located just above the animal burrow. Sand rats eat each bush up to exhaustion, then leave it, and only come back when it eventually developed again. Sand rats may consume four species of Chenopodiaceae that they find in their biotope, namely *Traganum nudatum*, *Salsola faetida*, *Sueda mollis* and *Atriplex halimus*. We observed that these four species coexist in the same biotope.

The sand rats come out of their burrow at sunrise to cut the stalk and fresh leaves of Chenopodiaceae belonging to the bush under which they live or another bush. In summer, the sand rats only leave their burrow at the most fresh times of the day, i.e. at dawn and twilight. In winter, however, the coming out occurs later at the most warm hours of the day.

5. Capture of sand rats

Since the reproduction period of sand rats covers the September to May period with numerous births in November and March (6) and for climatic reasons, springtime with temperate climate, more precisely April, was selected to hunt the sand rats. This allowed to capture a great number of relatively young animals, which is optimal for the purpose of our study (see below). Shafir et al. (8) indeed reported that a short period between weaning and transition from the hypocaloric to hypercaloric diet augments the sensibility to develop diabetes. Incidentally, weaning in this species takes place one month after birth (9).

The hunting of the sand rats took place in the Algerian Sahara, in the Béchar wilaya, in the region of Abadla (latitude 31° 10' North, longitude 2°43'59" West). It was conducted with the help of hunters from Beni Abbes (Béchar wilaya), who selected this location because its vegetation abundance and, hence, high sand rat population rate.

Taking into account the fact that sand rats leave their burrow at sunrise, the hunting took place at about 5 a.m., so that the trap could be placed before the first coming out of the animal. Having verified that the burrow is indeed inhabited (presence of fresh trails), the hunters place the trap, furnished with fresh leaves of Chenopodiaceae (usually *Traganum nudatum*), at the entrance of the main burrow and closes the secondary access openings, to impede that the sand rat uses another opening to pick stalks and leaves. The hunting covers the all day from dawn to twilight.

6. Research design

6.1. Conditioning period and acclimatization period

Our investigation involves 52 sand rats, 34 females and 18 males. The restriction imposed by the limitations encountered during the animal hunting and by a high mortality rate linked to the transport and captivity stress did not allow a gender selection. Likewise, in all prior investigations on sand rats, animals of both genders were used without mentioning differences of the metabolic diabetic syndrome between males and females.

After capture, the sand rats are transported to Mostaganem in the north-west of Algeria. In the laboratory (24 ± 2°C), they are distributed in cages and fed ad libitum, during the 3 first days of captivity, with a mixture of Chenopodiaceae of either desertic (*Traganum nudatum* from Abadla) or coastal (*Atriplex halimus* from Mostaganem) origin. Thereafter, during a 15-day acclimatization period, the sand rats are fed solely with coastal *Atriplex*. The amount of food offered each day corresponds to the animal body weight. According to Petter (5), the daily food intake of male and female sand rats represents, respectively, 32-61 and 67-88 % of body weight. The composition of *Atriplex halimus* from Mostaganem coast, expressed as weight percent is as

follows: moisture 81.4%, dry matter 18.6%, carbohydrates 1.4%, fat 1.4%, proteins 6.1%, minerals 4.0%. It provides 0.42 kcal/g. At the end of this 15-day period and before introduction of a standard food, the postprandial glycemia and body weight of each animal are recorded.

The body weight of the animals was used as criterion to select those sand rats later assigned to receive the standard food in the perspective of diabetes induction. The lightest sand rats and, hence, presumably youngest sand rats were selected for such a purpose. Thus, Shafir et al. [8] reported that the probability to develop diabetes in sand rats decreases with age. Most investigations concerning diabetes in sand rats were indeed initiated in young animals, 2 to 3.5 months after birth (10, 11, 12). Moreover, we observed that the death rate is higher in sand rats becoming diabetes at an old age than in sand rats developing diabetes at a younger age.

At the end of this accommodation period, the sand rats were divided in two groups, a group of 14 animals maintained at the vegetal diet and a group of 38 animals designed to receive the hypercaloric diet.

6.2. Transition period

During the 20 days of the transition period, the just mentioned 38 sand rats received a mixed diet containing 20 g per animal and per day of a standard synthetic chow and decreasing amounts of *Atriplex* representing over 3 successive weeks from 75 % to 50 % and then to 25 % of their body weight.

The standard chow (SARL La Production Locale, Bouzéria, Alger, Algeria) contained (weight percent) 10.3 % moisture, 89.7 % dry matter, 46.0 % carbohydrate, 3.3 % lipid, 19.2 % protein and 5.2 % minerals, with a energy value of 2.90 kcal/g.

Thereafter, i.e. from the first day after the transition period up to the last day of the present experiments, no *Atriplex* was anymore present in the diet. Fig. 2 depicts this dietary schedule. It should be underlined that the animals fed the diet containing the synthetic chow were given free access to water containing NaCl (0.9 %, w/v). According to Schmidt-Nielsen (13), this salt is required to adjust the hydric balance of the sand rats.

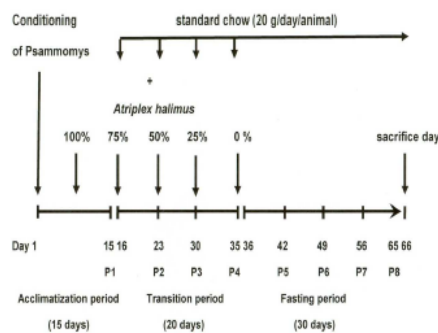


Fig. 2. Flow chart of study design.

P1-P8 represent the recording periods of postprandial glycemia and body weight of *Psammomys obesus*. During the transition period, the quantity of *Atriplex* given to sand rats is reduced each 7 days by 25% i.e they received only 75% (P1), 50% (P2), 25% (P3) and 0% (P4) comparing to the quantity given during the acclimatization period corresponding to 100%. P5, P6, P7 and P8 correspond respectively to the end of 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> week of fasting.

The 14 sand rats of the control group were maintained on the vegetal diet and, hence, were not given access to water, taking into account the moisture content (81.4 %) of Atriplex.

6.3. Distinction between diabetic and non-diabetic sand rats

At about 10 a.m. on day 35 (Fig. 2), i.e. at the end of the transition period, the postprandial glycaemia was measured with a glucometer (Glucotrend 2, Roche Diagnostics, Meylan, France) in a small blood sample obtained from the saphenous vein. Nineteen sand rats considered as non-diabetic, all had a glycaemia below 7.0 mM, whilst 19 animals considered as diabetic had a glycaemia equal to or above 8.3 mM. (10, 11, 12)

6.4. Intermittent fasting

During the last 30 days of the present experiments, 10 control sand rats, 9 non-diabetic sand rats and 13 diabetic sand rats were given free access to their respective diet (and, when so required, salty water). They are referred to as non-fasting animals. The other 4 control rats, 10 non-diabetic sand rats and 6 diabetic sand rats were deprived of food and water for 15 hours in each daily period, i.e. from 5 p.m. to 8 a.m. on the next day. They are referred to as fasting or intermittently fasting animals. Incidentally, the sawdust serving as litter was also removed from the cage during the fasting period to avoid phytophagic intake of cellulose (14).

At the end of the first, second, third and last week of this 30-day period, the postprandial glycaemia was measured in the intermittently fasting animals two hours after reintroduction of food and, if so required, water. An intraperitoneal glucose tolerance test (15, 16) was performed in the diabetic and non-diabetic sand rats on the 10<sup>th</sup>, 20<sup>th</sup> and 29<sup>th</sup> day of the last 30 day-period before sacrifice. In order to allow comparison between non-fasting and intermittently fasting rats, the former rats were also deprived of food and water for 15 hours before the onset of the intraperitoneal glucose tolerance test.

At the end of the present experiments, i.e. one day after the end of the fasting period, all animals were anesthetized with ketamine chlorhydrate (Imalgène® 1000, Merial, Lyon, France) injected intraperitoneally (1 ml/kg body wt.). After decapitation, blood was collected from the jugular vein in heparinized or EDTA-containing tubes. The liver, pancreas and solear muscle were removed and weighed.

DISCUSSION

Several authors have studied the effect of caloric restriction on metabolic variables in type 2 diabetic subjects. Such a restriction involves either a relative decrease of food intake, e.g. by regimens restricted in their carbohydrate (17, 18, 19) or lipid content (20), or otherwise a total short (21) or prolonged (20) starvation.

In the present study, a prolonged but intermittent daily fasting of 15 hours was imposed over a period of 30 days. The selection of this protocol takes into account the two following considerations. First, in their natural habitat, the sand rats go out their burrow at the end of the day to catch Chenopodiaceae plants that they consume during the night. Second we observed, that, in the laboratory, when the sand rats are given access from 5 p.m. to 8 a.m. to about the same amount of food as that otherwise offered from 8 a.m. to 5 p.m., they consume virtually all of it during the night. Our protocol is also comparable to the daily fasting period during the Ramadan.

In conclusion, the present report provides both the relevant background information and the detailed description of the experimental design relative to our investigations on the modulation by intermittent fasting of the diabetic syndrome developing in sand rats exposed to a hypercaloric diet.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to M. Yaich and L. Hassani, the sand rats hunters for their help.

REFERENCES

- Hackel DB, Mikat E, Lebovitz HE, Schmidt-Nielsen K, Horton ES, Kinney TD. The sand rat (*Psammomys obesus*) as an experimental animal in studies of diabetes mellitus. *Diabetologia* 3:130-134, 1967.
- Miky E, Like AA, Steinke J, Soeldner JS. Diabetic syndrome in sand rats. *Diabetologia* 3:135-139, 1967.
- Malaisse WJ, Like AA, Malaisse-Lagae F, Gleason RE, Soeldner JS. Insulin secretion in vitro by the pancreas of the sand rat (*Psammomys obesus*). *Diabetes* 17, 752-759, 1968.
- Kalderon B, Gutman A, Levy E, Shafir E, Adler JH. Characterization of stages in development of obesity-diabetes syndrome in sand rat (*Psammomys obesus*). *Diabetes* 35, 717-724, 1986.
- Petter F. Répartition géographique et écologique des rongeurs désertiques. *Mammalia* 25, 1-222.6, 1961.
- Gernigon TH. Etudes cytologiques et biochimiques des variations saisonnières de l'appareil genital mâle d'un rongeur saharien, le rat de sable: *Psammomys obesus*. Thèse ISN-USTHB, Alger, 1992.
- Petter F. Subfamily gerbillinae in Meester J, Setzer HM, eds. *The Mammals of Africa*. An identification manuel. Smiths Inst Washington, part 6.3: 1-4, 1975.
- Shafir E, Zif E, Kalman R. Nutritionally induced diabetes in desert rodents as models of type 2 diabetes: *Acomys cahirinus* (spiny mice) and *Psammomys obesus* (desert gerbil). *ILAR Journal* 47, 3:212-222, 2006.
- Daly M, Daly S. On the feeding ecology of *Psammomys obesus* (Rodentia, gerbillidae) in the Wadi Saoura, Algeria. *Mammalia* 35,546-561, 1973.
- Leibowitz G, Yuli M, Donath MY.  $\beta$ -Cell glucotoxicity in the *Psammomys obesus* model of type 2 diabetes. *Diabetes* 50 (suppl 1):S113-S117, 2001.
- Kaiser N, Yuli M, Uçkaya G, Opreacu AI, Berthault M, Kargar C, Donath MY, Cerasi E, Ktorza A. Dynamic changes in  $\beta$ -cell mass and pancreatic insulin during the evolution of nutrition-dependent diabetes in *psammomys obesus*: Impact of glycemic control. *Diabetes* 54: 138-145, 2005.
- Uçkaya G, Delagrance P, Chavanieu A, Grassy G, Berthault MF, Ktorza A, Cerasi A, Leibowitz G, Kaiser N. Improvement of metabolic state in an animal model of nutrition-dependent type 2 diabetes following treatment with S 23521, a new glucagon-like peptide 1 (GLP-1) analogue. *Journal of Endocrinology* 184: 505-513, 2005.
- Schmidt-Nielsen K. Desert animals. *Oxford University press*, pp183-186, 1964.
- Koceir EHA. Etude du métabolisme glucidique et lipidique de l'hépatocyte isolé de rat des sables (*Psammomys obesus*) au cours du développement du syndrome diabétique. Influence nutritionnelle, hormonale et pharmacologique. Thèse ISN-USTHB, Alger, 2003.
- Horio F, Teradaira S, Imamura T, Anunciado RVP, Kobayashi M, Namikawa T, Niki I. The HND mouse, a nonobese model of type 2 diabetes mellitus with impaired insulin secretion. *European Journal of Endocrinology* 153: 971-979, 2005.
- Lam PP, Leung YM, Sheu L, Ellis J, Tshushima RG, Osborne LR, Gaisano HY. Transgenic mouse overexpressing syntaxin-1A as a diabetes model. *Diabetes* 54:2744-2754, 2005.
- Kelley DD, Wing R, Buonocore C, Sturis J, Polonsky K, Fitzsimmons M. (1993). Relative Effects of Calorie Restriction and Weight Loss in Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 1287-1293, 1993.

Metabolic and Functional Research on Diabetes (Online) Vol 2: 5-8, 2009

18. Christiansen MP, Linfoot PA, Neese RA, Hellerstein MK. Effect of Dietary Energy Restriction on Glucose Production and Substrate Utilization in Type 2 Diabetes. *Diabetes* 49:1691–1699, 2000.
19. Kirk JK, Graves DE, Craven TE, Lipkin EW, Austin M, Margolis KL. Restricted-carbohydrate diets in patients with type 2 diabetes: A meta-analysis. *J Am Diet Assoc* 108: 91-100, 2008.
20. Weigle DS, Duell PB, Connor WE, Steiner RA, Soules MR, Kuijper JL. Effect of Fasting-Refeeding, and Dietary Fat Restriction on Plasma Leptin Levels. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 561–565, 1997.
21. Oishi K, Ohkura N, Matsuda J, Ishida N. Food deprivation induces adipose plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression without accumulation of plasma PAI-1 in genetically obese and diabetic *db/db* mice. *Thromb Haemost* 98: 864–870, 2007.

---

Corresponding author: Prof. W J Malaisse, Laboratory of Experimental Hormonology, Université Libre de Bruxelles ULB, 808 Route de Lennik, B-1070 Brussels, Belgium, Fax +32-2-5556356  
E-mail:malaisse@ulb.ac.be

## Intermittent fasting modulation of the diabetic syndrome in sand rats. II. *In vivo* investigations

LOUIZA BELKACEMI<sup>1</sup>, GHALEM SELSELET-ATTOU<sup>1</sup>, KARIM LOUCHAMI<sup>2</sup>,  
ABDULLAH SENER<sup>2</sup> and WILLY J. MALAISSE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Technologie Alimentaire et Nutrition, Université de Mostaganem, Mostaganem, Algeria;

<sup>2</sup>Laboratory of Experimental Hormonology, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

Received July 14, 2010; Accepted August 16, 2010

DOI: 10.3892/ijmm\_00000523

**Abstract.** This study deals with the effects of daily intermittent fasting for 15 h upon the development of diabetes in sand rats exposed to a hypercaloric diet. The same pattern of daily intermittent fasting was imposed on sand rats maintained on a purely vegetal diet (control animals). Over the last 30 days of the present experiments, non-fasting animals gained weight, whilst intermittently fasting sand rats lost weight. In this respect, there was no significant difference between control animals and either diabetic or non-diabetic sand rats exposed to the hypercaloric diet. The postprandial glycemia remained fairly stable in the control animals. During a 3-week transition period from a purely vegetal to a hypercaloric diet, the postprandial glycemia increased by  $5.95 \pm 1.26$  mM (n=6) in diabetic sand rats, as distinct from an increase of only  $0.45 \pm 0.56$  mM (n=6) in the non-diabetic animals. During the intermittent fasting period, the postprandial glycemia decreased significantly in the diabetic animals, but not so in the non-diabetic sand rats. Before the switch in food intake, the peak glycemia at the 30th min of an intraperitoneal glucose tolerance test was already higher in the diabetic than non-diabetic rats. In both the non-diabetic and diabetic sand rats, intermittent fasting prevented the progressive deterioration of glucose tolerance otherwise observed in non-fasting animals. These findings reveal that, at least in sand rats, intermittent daily fasting prevents the progressive deterioration of glucose tolerance otherwise taking place when these animals are exposed to a hypercaloric diet.

### Introduction

Overabundant food intake with chronic positive energy balance leads to metabolic disorders such as obesity and type 2

diabetes. Chronic moderate reduction in energy intake results in the opposite effects, namely increased insulin sensitivity and improved glucose homeostasis (1-3). In fact, caloric restriction is considered as a common treatment for obesity, insulin resistance and type 2 diabetes (4).

The caloric restriction may occur in different manner, either a relative decrease of food intake, e.g. by regimens restricted in their carbohydrate (5-7) or lipid content (8), or otherwise a total short (9,10) or prolonged (8) fasting.

In this study, we explored another modality of caloric restriction consisting in a daily intermittent fasting for 15 h, i.e. from 5 p.m. to 8 a.m., over a period of 30 days. To study this, we exploited a desert gerbil, *Psammomys obesus* in which the diabetes syndrome is similar to that found in type 2 diabetic human patients (11). Sand rats were indeed selected for the present investigations because they represent the most appropriate animal model for induction of diabetes as a result of exposure to a diet of increased caloric value.

In the first report in this series, we dealt mainly with such items as the biotope and type of vegetal diet of sand rats (*Psammomys obesus*) in their desertic habitat, as well as capture modalities, emphasis being placed on the daily pattern of food intake by these animals in their natural environment (12). Taking such a pattern into consideration, the major aim of the present study was to explore the possible effects of daily intermittent fasting for 15 h, i.e. from 5 p.m. to 8 a.m., upon the time-related changes in body weight and glucose tolerance provoked in sand rats by the transition from a purely vegetal diet to a hypercaloric one.

### Materials and methods

The design of the present experiments was already described in details in a prior report (12). Briefly, 52 sand rats were captured in April in the region of Abadla (Béchar Wilaya, Algeria) and transported to the Laboratory (Mostaganem University, Algeria). After 15 days of acclimatization, during which the sand rats had only access to a vegetal diet of Chenopodiaceae, and during a subsequent 20-day transition period, the 14 heavier (and presumably oldest) sand rats were maintained on the same vegetal diet (control animals) whilst the other 38 rats were given access to salty water and a mixed diet composed to 20 g per animal and per day of a standard laboratory chow, with an energetic value of 2.90 kcal/g, and

---

*Correspondence to:* Professor Willy J. Malaisse, Laboratory of Experimental Hormonology, Université Libre de Bruxelles, 808 Route de Lennik, B-1070 Brussels, Belgium  
E-mail: malaisse@ulb.ac.be

**Key words:** sand rats, intermittent fasting, glucose tolerance

Table I. Flow chart of study design.

Capture of rats (n=52)		
Conditioning period: fed ad libitum a vegetal diet for 3 days (n=52)		
Acclimatization period: fed a vegetal diet (representing 100% of body wt.) for 15 days (n=52)		
Selection of control versus non-diabetic or diabetic sand rats		
Heaviest sand rats (n=14)	Lightest sand rats (n=38)	
(Control sand rats)	(Non-diabetic and diabetic sand rats)	
Transition period: 20 days starting at end of acclimatization period		
Maintained at vegetal diet	First week: 20 g chow + vegetal diet (75% body wt.)	
(100% body wt. for 3 weeks)	Second week: 20 g chow + vegetal diet (50% body wt.)	
	Third week: 20 g chow + vegetal diet (25% body wt.)	
Last day of transition period: postprandial glycemia		
Glycemia <0.7 mM (n=19)	Glycemia >8.3 mM (n=19)	
(Non-diabetic sand rats)	(Diabetic sand rats)	
Non-fasting versus intermittent fasting period: last 30 days of present experiments		
Non-fasting control rats (n=10)	Non-fasting non-diabetic rats (n=9)	Non-fasting diabetic rats (n=13)
Fasting control rats (n=4)	Fasting non-diabetic rats (n=10)	Fasting diabetic rats (n=6)
Fed vegetal diet	Fed chow diet	Fed chow diet

decreasing amounts of the vegetal diet, with an energetic value of 0.42 kcal/g, the latter amounts representing 75% (first week), 50% (second week) and 25% (third week) of the animal body weight, instead of 100% of the body weight during the acclimatization period (Table I). Based on the measurement of postprandial glycemia, these 38 sand rats were then divided in two groups of 19 animals each referred to as either non-diabetic (glycemia <7.0 mM) or diabetic (>8.3 mM). During the last 30 days of the present experiments, the animals were given access to either the vegetal diet (control animals) or hypercaloric diet (diabetic and non-diabetic rats), some of the sand rats in each group undergoing intermittent daily fasting from 5 p.m. to 8 a.m. the next day. In the intermittently fasting rats, the postprandial glycemia was measured 2 h after reintroduction of food and, if so required salty water, at 8 a.m. An intraperitoneal glucose tolerance test was performed in the fasting or non-fasting diabetic and non-diabetic sand rats at the 10th, 20th and 29th of the last 30 day period. For purpose of comparison with the fasting animals, the non-fasting sand rats were also deprived of food from 5 p.m. on the day before. After a 15 h of fasting, blood samples were collected from the saphenous vein (0 min sample). Then, a 20% solution of glucose (2 g/kg body weight) was injected intraperitoneally, followed by blood sampling at 30 and 120 min after the injection. The body weight and postprandial glycemia, measured with a glucometer in a blood sample obtained from the saphenous vein, were recorded at times indicated in the text and figure. During the last 4 weeks of the present experiments, the food intake was measured every day.

All results are presented as mean values ( $\pm$  SEM) together with either the number of individual observations (n) or degree of freedom (df). The statistical significance of

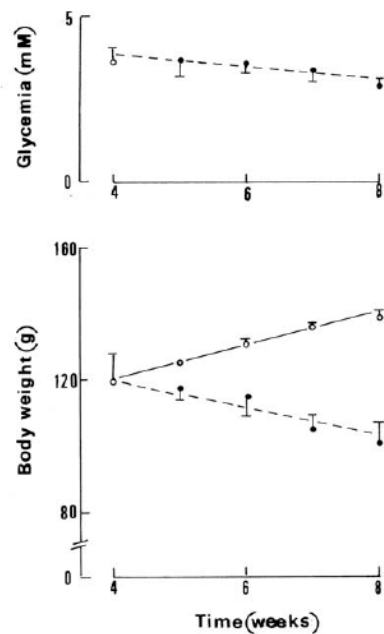


Figure 1. Upper panel: time course for the changes in postprandial glycemia in intermittently fasting control sand rats. Mean values ( $\pm$  SEM) refer to 4 animals at each time point. Lower panel: time course for the changes in body weight during the fasting or non-fasting period in control sand rats. At week 4, the mean absolute value ( $\pm$  SEM) refer to 8 animals. At weeks 5 to 8, the results (mean  $\pm$  SEM) refer to 4 animals and correspond to the paired changes above (non-fasting animals; open circles) or below (fasting animals; closed circles) the measurement made at week 4.

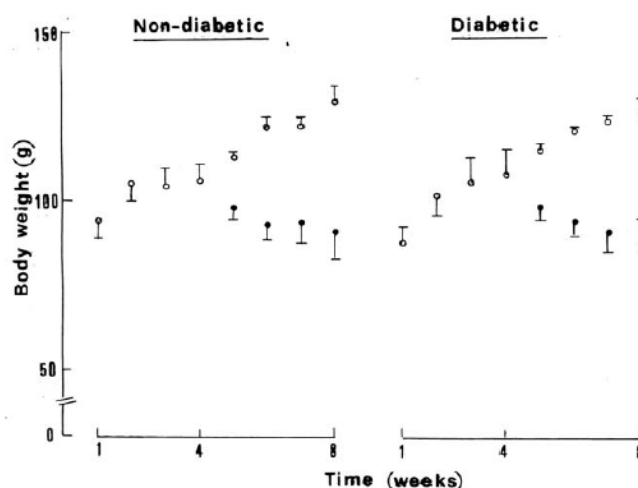


Figure 2. Time course for the changes in body weight during the transition period (week 1 to week 4) and fasting (or non-fasting) period (week 4 to week 8) in non-diabetic and diabetic sand rats. Mean absolute values ( $\pm$  SEM) refer to 19 rats from week 1 to week 4. The results from week 5 to week 8 refer to the mean values ( $\pm$  SEM) for 6-13 animals and correspond to the paired changes above (non-fasting animals; open circles) or below (fasting animals; closed circles) the measurement made at week 4.

differences between mean values was assessed by use of Student's t-test.

## Results

**Time course of changes in body weight.** During the 3-week transition period, the change in body weight failed to differ significantly ( $df=34$ ;  $p>0.1$ ) in diabetic and non-diabetic rats. It consisted in a gain of  $15.5\pm 2.6$  g ( $n=38$ ), representing a  $17.9\pm 2.7\%$  ( $p<0.001$ ) increase in body weight relative to the value recorded at the onset of the transition period.

At the end of this transition period, the mean body weight also failed to differ significantly ( $p>0.8$ ) in diabetic rats ( $107.4\pm 7.9$  g;  $n=19$ ) and non-diabetic rats ( $105.5\pm 5.3$  g;  $n=19$ ). These values remained somewhat lower, albeit no more significantly so, from that recorded at the same time in the control rats ( $120.0\pm 8.6$  g;  $n=8$ ). When these control rats were further examined over the ensuing 4 weeks, their body weight increased by  $18.8\pm 2.4$  g ( $n=4$ ;  $p<0.005$ ), representing a  $17.2\pm 1.6\%$  increase relative to the value measured at the onset of this 4-week period. The intermittently fasting control rats, however, lost  $20.0\pm 7.4$  g ( $n=4$ ) over the same period, this representing a  $15.3\pm 4.6\%$  ( $p<0.05$ ) relative decrease. Neither the gain in body weight recorded in the non-fasting control rats ( $+18.8\pm 2.4$  g), nor the fall in body weight observed in the fasting control rats ( $-20.0\pm 7.4$  g) were significantly different ( $p>0.7$  or more) from the corresponding mean values found in the diabetic and non-diabetic rats, i.e.  $+21.1\pm 2.8$  g ( $n=22$ ) and  $-18.4\pm 6.4$  g ( $n=16$ ) in non-fasting and fasting animals, respectively. The pattern of changes in body weight observed in the control animals over the four weeks preceding sacrifice is illustrated in Fig. 1.

Over the last 30 days of the present experiments, the non-fasting diabetic rats gained  $19.2\pm 3.5$  g body wt. ( $n=13$ ;

$p<0.001$ ); this representing a  $21.7\pm 3.7\%$  ( $n=13$ ) relative increase over the value recorded at the onset of the same period. In the fasting diabetic rats, the situation was quite different ( $p<0.001$ ) with a mean fall in body wt. of  $24.2\pm 11.4$  g ( $n=6$ ;  $p<0.09$ ), corresponding to a  $15.0\pm 7.2\%$  relative decrease ( $p<0.1$ ).

A comparable situation prevailed in the non-diabetic rats. Indeed, the non-fasting non-diabetic rats gained  $23.9\pm 4.5$  g ( $n=9$ ;  $p<0.001$ ) over the same period of 30 days, this representing a  $22.3\pm 3.4\%$  ( $n=9$ ) relative increase. The fasting non-diabetic rats lost  $15.0\pm 7.9$  g ( $n=10$ ;  $p<0.1$ ), this corresponding to an  $11.6\pm 7.1\%$  relative decrease ( $p>0.1$ ). None of these values differed significantly from those recorded in diabetic rats. Fig. 2 illustrates the results collected in both the non-diabetic and diabetic rats.

**Food intake.** The mean values for food intake, as derived from daily measurements during each successive weeks of the non-fasting or intermittent fasting period, are listed in Table II. In the non-fasting control animals, it averaged  $82.3\pm 9.5$  g/day per rat, corresponding to a caloric intake of  $34.6\pm 4.0$  kcal/day per rat. In the non-fasting non-diabetic and diabetic animals, respectively, it averaged  $16.6\pm 0.6$  and  $16.3\pm 0.6$  g/day per rat, corresponding to a caloric intake close to  $47.7\pm 1.7$  kcal/day per rat. Such a caloric intake thus appeared somewhat higher ( $p<0.02$ ) in the animals fed the chow diet as distinct from vegetal diet.

When the latter animals underwent intermittent fasting, the decrease in food intake ( $p<0.004$ ) from  $82.3\pm 9.5$  to  $33.5\pm 6.3$  g/day was commensurate with the length of the fasting period (15 h/24 h), i.e. an expected decrease in food intake from  $82.3\pm 9.5$  to  $30.9\pm 0.6$  g/day. However, when the non-diabetic or diabetic animals underwent intermittent fasting the decrease in food intake ( $p<0.001$ ) from  $16.4\pm 0.4$  g/day to

Table II. Food intake.

Rats	Week 5	Week 6	Week 7	Week 8
Non-fasting control (n=6)	87.3±9.5 <sup>a</sup>	80.4±9.2	79.5±8.0	81.9±11.3
Fasting control (n=4)	34.6±6.7	33.8±7.9	32.7±5.2	33.0±5.2
Non-fasting non-diabetic (n=6)	15.9±0.7	16.6±0.6	16.9±0.5	16.8±0.6
Fasting non-diabetic (n=6)	11.7±0.5	10.0±0.6	9.8±0.5	9.4±0.7
Non-fasting diabetic (n=6)	15.8±0.5	16.3±0.5	16.6±0.6	16.6±0.7
Fasting diabetic (n=6)	10.3±1.3	9.5±0.8	9.7±0.5	9.4±0.7

<sup>a</sup>All results are expressed as g/day per rat.

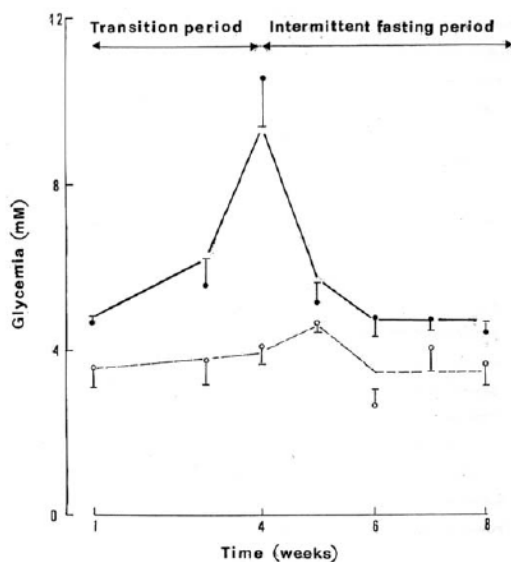


Figure 3. Time-related changes in the postprandial glycemia of fasting diabetic (closed circles and solid line) and non-diabetic (open circles and dashed line) sand rats. Mean values ( $\pm$  SEM) are derived from 6 individual observations at each time point. The horizontal lines (weeks 6 to 8) refer to the mean values during the last 2 weeks of the intermittent fasting period.

10.0±0.5 g/day (n=12 in both cases) was less pronounced ( $p<0.001$ ) than that theoretically calculated from the length of the fasting period, i.e. an expected decrease in food intake down to 6.3±0.1 g/day. Nevertheless, when the intermittent fasting-induced decrease in food intake was converted to a decrease in caloric intake, no significant difference was anymore observed between control animals (48.8±12.9 g x 0.42 kcal/g = 20.5±5.4 kcal), and non-diabetic or diabetic animals (6.4±0.6 g x 2.90 kcal/g = 18.6±1.7 kcal). This coincides with the fact that the changes in body weight in non-fasting versus fasting animals are also comparable in control animals and non-diabetic or diabetic animals.

The comparison between food intake and changes in body weight allows to rule out, in the fasting rats, any increase in

caloric expenditure, as could otherwise conceivably be attributed to the stress and anxiety caused by intermittent fasting. For instance, in the fasting control rats, the sum of caloric intake (14.1 kcal/day) and estimated caloric generation attributable to the daily decrease (0.71 g) in body weight (assuming mainly a loss of fat, i.e. 0.71 g times 7 kcal/g or 5.0 kcal/day) would imply a caloric expenditure close to 19.1 kcal/day. In the non-fasting control rats, the difference between caloric intake (34.6 kcal/day) and postulated caloric expenditure (if indeed comparable to that of fasting animals) would correspond to a daily gain of 15.5 kcal/day or, relative to the daily gain in body weight (0.67 g/day), to an unrealistic caloric investment of 23.1 kcal/g to cover the gain in body weight. In turn, this implies that the caloric expenditure was higher in non-fasting sand rats than the intermittently fasting animal. For instance, if it were postulated that the gain in body weight in non-fasting animals correspond mainly to an increase in adipose tissue mass, the caloric expenditure would correspond to the difference between caloric intake (34.6 kcal/day) and postulated caloric investment (0.67 g/day times 7 kcal/g or 4.7 kcal/day), i.e. 29.9 kcal/g. The caloric expenditure would then appear about one third lower in fasting than in non-fasting control sand rats.

**Postprandial glycemia.** The postprandial glycemia was measured in the intermittently fasting control animals 2 h after allowing them again access to food at 8.00 a.m. Before the intermittent fasting period, it averaged 3.63±0.45 mM (n=4). As illustrated in Fig. 1 (upper panel), it then remained fairly stable. Even after 4 weeks of intermittent fasting, it was only 0.74±0.30 mM lower (n=4;  $p<0.1$ ) than that measured at the onset of this fasting period.

A different situation prevailed in the non-diabetic and diabetic fasting animals. Just before the switch in food intake, the postprandial glycemia was already somewhat lower, albeit not significantly so ( $p<0.1$ ) in non-diabetic rats (3.61±0.49 mM; n=6) than in diabetic ones (4.68±0.15 mM; n=6). Such a difference became more pronounced ( $p<0.06$ ) 2 weeks after the switch in food intake with mean values of 3.75±0.58 mM (n=6) in non-diabetic rats and 5.59±0.60 mM (n=6) in diabetic rats (Fig. 3). It became highly significant ( $p<0.001$ ) 3 weeks after the switch, at which time all measurements in the diabetic rats exceeded 8.3 mM (10.63±1.22 mM; n=6), whilst averaging no more than 4.06±0.41 mM (n=6) in the non-diabetic rats. As a matter of fact, over this 3-week

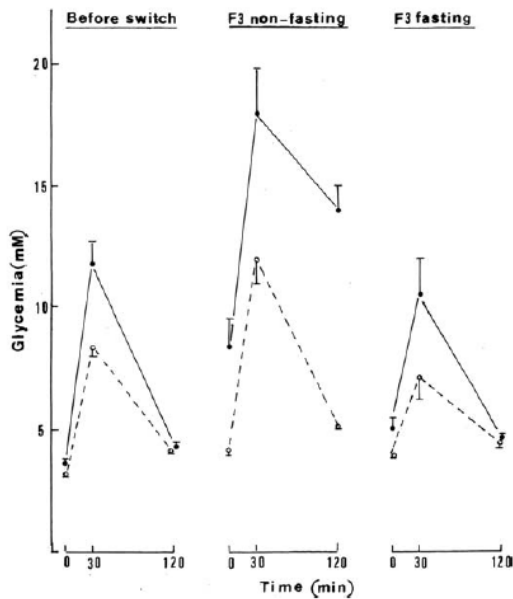


Figure 4. Pattern of changed in glycemia during intraperitoneal glucose tolerance tests conducted in either non-diabetic (open circles and dashed line) or diabetic (closed circles and solid line) sand rats examined before the switch in food intake (left) and at the end of the non-fasting (middle) or intermittent fasting (right) period. Mean values ( $\pm$  SEM) refer to 12 rats before the switch and 5 animals thereafter.

transition period, the postprandial glycemia increased by  $5.95 \pm 1.26$  mM ( $n=6$ ) in the diabetic rats, as compared ( $p<0.005$ ) to an increase of only  $0.45 \pm 0.56$  mM ( $n=6$ ;  $p>0.4$ ) in the non-diabetic rats (Fig. 3).

A comparable situation was observed over the same 3-week transition period in the non-fasting rats, in which the postprandial glycemia averaged before the switch in food intake and at the end of the transition period, respectively,  $3.51 \pm 0.26$  and  $4.96 \pm 0.39$  mM in the non-diabetic rats ( $n=9$ ) and  $3.97 \pm 0.19$  mM and  $11.70 \pm 0.92$  mM in the diabetic rats ( $n=13$ ). Pooling all available data, the postprandial glycemia was thus significantly higher ( $p<0.03$ ) in diabetic rats ( $4.19 \pm 0.16$  mM;  $n=19$ ) than in non-diabetic rats ( $3.55 \pm 0.24$  mM;  $n=15$ ) already before the switch in food intake.

During the intermittent fasting period, the postprandial glycemia failed to decrease significantly in the non-diabetic rats, with a mean weekly fall averaging  $0.09 \pm 0.39$  mM ( $n=24$ ;  $p>0.8$ ). In the fasting diabetic rats, however, such a weekly fall averaged  $1.53 \pm 0.58$  mM ( $n=24$ ;  $p<0.02$ ). As documented in Fig. 3, such a decrease of postprandial glycemia in the diabetic rats was most pronounced during the first week of intermittent fasting when it averaged  $5.45 \pm 1.11$  mM ( $n=6$ ). The data illustrated in Fig. 3 also indicate that over the last two weeks of the intermittent fasting period the mean postprandial glycemia remained significantly higher ( $p<0.005$ ) in diabetic rats ( $4.67 \pm 0.21$  mM;  $n=18$ ) than in non-diabetic rats ( $3.44 \pm 0.30$  mM;  $n=18$ ).

*Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT)*. As expected, before the switch in food intake, the IPGTT yielded virtually identical results in rats later assigned to a non-fasting or intermittently fasting schedule. Already at this early stage, however, the results of the IPGTT differed in rats later allocated to the non-diabetic and diabetic group (Fig. 4). Indeed, whilst the zero and 120th min of the test yielded in the diabetic rats mean values slightly but not significantly higher than those recorded in the non-diabetic rats, the peak glycemia at the 30th min was much higher ( $p<0.003$ ) in diabetic rats ( $11.80 \pm 0.89$  mM;  $n=12$ ) than in non-diabetic rats ( $8.38 \pm 0.39$  mM;  $n=12$ ).

During the non-fasting or intermittently fasting period, the situation also differed in non-diabetic and diabetic animals. In the non-fasting non-diabetic rats, a progressive deterioration of glucose tolerance was observed ( $n=6$ ). The area under the curve indeed increase ( $p<0.005$ ) from  $732.9 \pm 42.5$  mM.min ( $n=6$ ) at the end of the non-fasting period. Moreover, there was a highly significant positive correlation ( $r=+0.5172$ ;  $n=24$ ;  $p<0.01$ ) between the individual values for such an area and the ranking (1 to 4) of the test day (before the switch in food intake and 10, 20 or 29 days after the onset of the non-fasting period). Such a deterioration failed to occur in the intermittently fasting non-diabetic animals, in which the area under the curve was no more higher at the end of the intermittent fasting period ( $689.3 \pm 54.1$  mM.min;  $n=6$ ) than before the switch in food intake ( $745.1 \pm 39.6$  mM.min;  $n=6$ ). As a matter of fact, in these fasting non-diabetic rats, the correlation coefficient between the individual values for the area under the curve and the ranking of the test day now yielded a negative value ( $r=-0.2882$ ;  $n=24$ ), which failed however to achieve statistical significance ( $p>0.1$ ). In other words, after 20 to 29 days of intermittent fasting, the area under the curve during the IPGTT represented no more than  $57.6 \pm 4.4\%$  ( $n=12$ ;  $p<0.001$ ) of the mean corresponding values found at the same time in the non-fasting non-diabetic rats ( $100.0 \pm 6.5\%$ ;  $n=12$ ).

In the non-fasting animals, the deterioration of glucose tolerance was more rapid in diabetic than in non-diabetic rats. First and as alluded to above, the area under the curve during the IPGTT was already higher ( $p<0.005$ ) in diabetic rats ( $954.8 \pm 60.6$  mM.min;  $n=12$ ) than in non-diabetic animals ( $739.0 \pm 27.8$  mM.min;  $n=12$ ) before the switch in food intake. Second, in the non-fasting diabetic rats it increased ( $p<0.025$ ) from  $967.2 \pm 113.4$  mM.min ( $n=6$ ) before the switch in food intake to  $1494.3 \pm 155.2$  mM.min ( $n=6$ ) at the 10th day of the non-fasting period, whilst no significant change ( $p>0.8$ ) was recorded over the same length of time in the non-fasting non-diabetic rats ( $732.9 \pm 42.5$  mM.min versus  $757.2 \pm 96.2$  mM.min;  $n=6$  in both cases). Last, whilst, in the latter animals, a later increase ( $p<0.03$ ) to  $1036.6 \pm 68.5$  mM.min ( $n=12$ ) was recorded 20 and 29 days after the onset of the non-fasting period, such was not the case in the non-fasting diabetic rats, in which the mean value reached at day 10 ( $1494.3 \pm 155.2$  mM.min;  $n=6$ ) failed to differ significantly ( $p>0.4$ ) from that recorded at days 20 and 29 ( $1664.0 \pm 128.9$  mM.min;  $n=12$ ). In the intermittently fasting diabetic rats, the area under the curve of the IPGTT failed to differ significantly before the switch in food intake and at

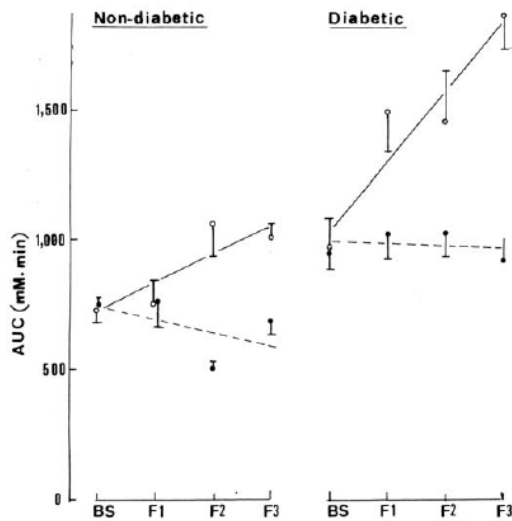


Figure 5. Area under the curve (AUC) during intraperitoneal glucose tolerance tests conducted in either non-fasting (open circles and solid line) or intermittently fasting (closed circle and dotted line) non-diabetic (left) and diabetic (right) sand rats examined before the switch in food intake (BS) at the 10th, 20th and 29th day (F1, F2 and F3) of the fasting (or non-fasting) period. Mean values ( $\pm$  SEM) refer to 6 individual observations at each time point. The oblique lines corresponding to the regression lines.

any time during the fasting period (Fig. 5). Such an area was lower in the fasting diabetic rats than in the non-fasting diabetic rats, whether during the first ( $p < 0.03$ ) or last ( $p < 0.001$ ) IPGTT performed during this period.

### Discussion

An excess intake of calories favours the development of such diseases as obesity and type 2 diabetes. Inversely, an alimentary restriction may protect against these diseases. For instance, in rats and mice, a decrease by 30 to 40% of daily food intake or the alteration between 24 h of fasting followed by 24 h of refeeding were found efficient in such a perspective (9,13).

The present results clearly indicate that a third approach, i.e. a daily intermittent fasting for 15 h over a period of 30 days opposes the development of glucose intolerance or frank diabetes in sand rats otherwise exposed to a hypercaloric diet.

Several factors could conceivably participate in such a beneficial effect. The first and major factor consists in the lower caloric intake in intermittently fasting sand rats as compared to non-fasting animals. It could be speculated, however, that fasting and non-fasting animals also differ from one another in their caloric expenditure, e.g. as resulting from the stress and anxiety caused by intermittent fasting. Several findings argue against the latter hypothesis. First, the comparison between food intake and changes in body weight clearly indicates that the caloric expenditure is not higher, but actually lower, in fasting than in non-fasting sand rats.

Second, while the sand rats, when first in captivity, exhibited stress by scraping and gnawing their cages, no obvious difference in behaviour was later recorded during the fasting versus non-fasting period. At the most, the fasting rats gave the impression of some tiredness in the morning, before being again given access to food. Third, in their natural biotope, the sand rats are considered as diurnal animals (12). Hence, the food deprivation in the intermittently fasting animals took place during the presumably resting part of their physiological activity cycle. It should not be ruled out, however, that, in their natural biotope, the sand rats remain also somewhat active at night in their burrows (12).

Our study also confirms that, in sand rats, the switch from a purely vegetal diet to a hypercaloric one may either result in overt diabetes or fail to increase significantly postprandial glycemia (14). This difference in the response to the hypercaloric diet is currently attributed to the genetic background, with the existence of two distinct lineages of sand rats, i.e. diabetes prone and diabetes resistant animals (15,16). The latter proposal is consistent with the present finding that, before the switch in food intake from the vegetal to hypercaloric diet, the postprandial glycemia was already higher ( $p < 0.03$ ) in sand rats later identified as diabetic ( $4.19 \pm 0.16$  mM;  $n=19$ ) than in the animals later considered as non-diabetic ( $3.55 \pm 0.24$  mM;  $n=19$ ). Likewise, before the switch in food intake, the area under the glycemic curve during an intraperitoneal glucose tolerance test was already higher ( $p < 0.005$ ) in the sand rats that eventually developed diabetes ( $954.8 \pm 60.6$  mM.min;  $n=12$ ) than in those who failed to do so ( $739.0 \pm 27.8$  mM.min;  $n=12$ ).

At variance with some other studies, in which the sand rats became diabetic after only 5 days exposure to a hypercaloric diet (16-18), the development of diabetes was more slow in the present study. Thus, as judged from either the difference between diabetic and non-diabetic sand rats at each time point or the changes recorded during the transition period in the diabetic animals, a significant increase of postprandial glycemia in the latter animals was only recorded 21 days after introduction of the hypercaloric diet, whilst still failing to achieve statistical significance 14 days after such an introduction. These two distinct time-related patterns in the development of diabetes may well be related to the fact that, in the present study but not so in the previous ones, the switch from the vegetal to hypercaloric diet was progressive over a 3-week transition period, instead of being immediate.

During such a transition period, no significant difference was found in terms of body weight between diabetic and non-diabetic sand rats. Such was also the case during the later 30-days non-fasting or intermittent fasting period. In both diabetic and non-diabetic sand rats, as well as in control animals, the intermittent fasting provoked a sizeable decrease in body weight, contrasting with the further gain in body weight recorded in the non-fasting sand rats. This decrease of body weight coincides, in both fasting diabetic and non-diabetic sand rats, with a loss of visceral fat mass observed at sacrifice (unpublished observation).

The reduction in body weight, especially in adiposity, is associated with improvement in glucose tolerance (19) and insulin action (3,5). In our study, this improvement of glucose tolerance was reflected both by a reduced area under the

glucose curve during the IPGTT in the fasting groups compared to the non-fasting ones and by a reduced postprandial glycemia which reached values comparable to those recorded before the switch period i.e., before the development of diabetes. The decrease in body weight observed in the intermittent fasting rats and resulting from a lesser food intake, may indeed contribute to the improvement of glucose tolerance, e.g. through a correction of insulin resistance (6,20-22). Such a change in insulin resistance was indeed observed in the present study at sacrifice (unpublished observation).

It cannot be ignored, however, that fasting does not always result in a body weight loss. For instance, in the investigations conducted by Ason *et al* (9) in mice submitted to an alternate day fasting, the food intake on the day following fasting was comparable to that consumed in two days by the non-fasting mice fed *ad libitum*. In human subjects, such an alternate day fasting schedule is uneasy to be respected over a long period because of the discouraging hunger feeling (23). Obese subjects even refuse to follow such a schedule. The results of this study, inspired by the daily fasting period during the Ramadan (12), indicate that, under the present experimental conditions, the food intake remained lower in intermittently fasting animals than in non-fasting rats, suggesting that the frustration during the fasting period did not result in a compensatory excessive food intake during the subsequent non-fasting period of the day.

To our knowledge, it remains to be investigated whether a comparable feeding pattern may prove to be acceptable and efficient in human subjects, e.g. in the perspective of restoring normal body weight in obese subjects.

#### Acknowledgements

We are grateful to C. Demesmaeker for secretarial help.

#### References

- Arciero PJ, Vukovich MD, Holloszy JO, Racette SB and Kohrt WM: Comparison of short-term diet and exercise on insulin action in individuals with abnormal glucose tolerance. *J Appl Physiol* 86: 1930-1935, 1999.
- Märkovic TP, Campbell LV, Balasubramanian S, Jenkins AB, Fleury AC, Simons LA and Chisholm DJ: Beneficial effect on average lipid levels from energy restriction and fat loss in obese individuals with or without type 2 diabetes. *Diabetes Care* 21: 695-700, 1998.
- Gazdag AN, Wetter TJ, Davidson RT, Robinson KA, Buse MG, Yee AJ, Turcotte LP and Cartee GD: Lower caloric intake enhances muscle insulin action and reduces hexosamine levels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R504-R512, 2000.
- Wetter TJ, Gazdag AC, Dean DJ and Cartee GD: Effect of calorie restriction on in vivo glucose metabolism by individual tissues in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 276: 728-738, 1999.
- Kelley DE, Wing R, Buonocore C, Sturis J, Polonsky K and Fitzsimmons M: Relative effects of calorie restriction and weight loss in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 1287-1293, 1993.
- Christiansen MP, Linfoot PA, Neese RA and Hellerstein MK: Effect of dietary energy restriction on glucose production and substrate utilization in type 2 diabetes. *Diabetes* 49: 1691-1699, 2000.
- Kirk JK, Graves DE, Craven TE, Lipkin EW, Austin M and Margolis KL: Restricted-carbohydrate diets in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis. *J Am Diet Assoc* 108: 91-100, 2008.
- Weigle DS, Duell PB, Connor WE, Steiner RA, Soules MR and Kuijper JL: Effect of fasting-refeeding, and dietary fat restriction on plasma leptin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 561-565, 1997.
- Anson RM, Guo Z, De Cabo R, Iyuni T, Rios M, Hagepanos A, Ingram DK, Lane MA and Mattson MP: Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from caloric intake. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6216-6220, 2003.
- Oishi K, Ohkura N, Matsuda J and Ishida N: Food deprivation induces adipose plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression without accumulation of plasma PAI-1 in genetically obese and diabetic db/db mice. *Thromb Haemost* 98: 864-870, 2007.
- Kalderon B, Gutman A, Levy E, Shafir E and Adler JH: Characterization of stages in development of obesity-diabetes syndrome in sand rat (*Psammomys obesus*). *Diabetes* 35: 717-724, 1986.
- Belkacemi L, Selselet-Attou G, Sener A and Malaisse WJ: Intermittent fasting modulation of the diabetic syndrome in sand rats. I. Background information and experimental design. *Met Funct Res Diab* 2: 5-8, 2009.
- Goodrick CL, Ingram DK, Reynolds MA, Freeman JR and Cider N: Effects of intermittent feeding upon growth, activity, and lifespan in rats allowed voluntary exercise. *Mech Ageing Dev* 55: 69-87, 1990.
- Nesher R, Warwar N, Khan A, Efenic S, Cerasi E and Kaiser N: Defective stimulus-secretion coupling in islets of *Psammomys obesus*, an animal model for type 2 diabetes. *Diabetes* 50: 308-314, 2001.
- Kalman R, Lazarovici G, Bar-On H and Ziv E: The sand rats (*Psammomys obesus*): morphologic, physiologic and biochemical characteristics of a model for type II diabetes mellitus. *Contemp Top Lab Anim Sci* 35: 67-70, 1996.
- Kaiser N, Yuli M, Uçkaya G, Opreescu AI, Berthault MF, Kargar C, Donath MY, Cerasi E and Ktorza A: Dynamic changes in B-cell mass and pancreatic insulin during the evolution of nutrition-dependent diabetes in *Psammomys obesus*. Impact of glycemic control. *Diabetes* 54: 138-145, 2005.
- Donath MY, Gross DJ, Cerasi E and Kaiser N: Hyperglycemia-induced B-cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes* 48: 738-744, 1999.
- Nesher R, Gross DJ, Donath MY, Cerasi E and Kaiser N: Interaction between genetic and dietary factors determines B-cell function in *Psammomys obesus*, an animal model of type 2 diabetes. *Diabetes* 48: 731-737, 1999.
- Weindruch R, Keenan KP, Carney GM, Fernandes G, Feuers RJ, Floyd RA, Halter JB, Ramsey JJ, Richardson A, Roth GS and Spindler SR: Caloric restriction mimetics: metabolic interventions. *J Gerontol* 56A (Special issue 1): 20-33, 2001.
- DeFronzo R: The triumvirate: B-cell, muscle, liver: a collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 37: 667-687, 1988.
- Guldstrand M, Ahrén N and Adamson U: Improved B-cell function after standardized weight reduction in severely obese subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E557-E565, 2003.
- Shafir E, Zif E and Kalman R: Nutritionally induced diabetes in desert rodents as models of type 2 diabetes: *Acomys cahirinus* (spiny mice) and *Psammomys obesus* (desert gerbil). *ILAR J* 47: 212-222, 2006.
- Heilbronn LK, Smith SR, Martin CK, Anton SD and Ravussin E: Alternate-day fasting in nonobese subjects: effects on body weight, body composition, and energy metabolism. *Am J Clin* 81: 69-73, 2005.

## Intermittent fasting modulation of the diabetic syndrome in sand rats. III. Post-mortem investigations

LOUIZA BELKACEMI<sup>1</sup>, GHALEM SELSELET-ATTOU<sup>1</sup>, NURDAN BULUR<sup>2</sup>,  
KARIM LOUCHAMI<sup>2</sup>, ABDULLAH SENER<sup>2</sup> and WILLY J. MALAISSE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Technologie Alimentaire et Nutrition, Université de Mostaganem, Mostaganem, Algeria;

<sup>2</sup>Laboratory of Experimental Hormonology, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

Received September 24, 2010; Accepted October 25, 2010

DOI: 10.3892/ijmm.2010.556

**Abstract.** The present report concerns several post-mortem variables examined in sand rats that were either maintained on a vegetal diet (control animals) or exposed first during a 20-day transition period to a mixed diet consisting of a fixed amount of a hypercaloric food and decreasing amounts of the vegetal food and then to a 30-day experimental period of exposure to the hypercaloric food. During the latter period, all animals were either given free access to food or fasting daily for 15 h, i.e. from 5.00 p.m. to 8.00 a.m. The body weight, liver wet weight, pancreas wet weight, plasma glucose and haemoglobin A1c concentration, plasma insulin concentration, insulinogenic index, insulin resistance HOMA, plasma cholesterol and triglyceride concentration, liver triglyceride and phospholipid content were all measured. Pancreatic islet (insulin, GLUT2) and liver (lipid droplets) histology were also examined. The main findings consisted in a lower body weight of fasting than non-fasting animals, a higher liver weight in non-diabetic and diabetic rats than in control non-fasting (but not so in fasting) animals, a decrease of pancreas weight in non-diabetic and diabetic as distinct from control animals, a fasting-induced decrease in plasma glucose, plasma insulin and insulin resistance HOMA, plasma cholesterol and triglyceride concentration and triglyceride liver content.

### Introduction

Food excess and sedentary behaviour, characterizing modern society, cause many metabolic disturbances, especially in glucose and lipid homeostasis. These metabolic disorders

participate to the development of insulin resistance in target organs. For instance, the liver accumulation of triglycerides resulting from high energy food intake is known to be associated with hepatic insulin resistance (1). The development of insulin resistance may also eventually lead to deterioration of insulin secretion, for instance as a result of pancreas exhaustion. The combination of these two disturbances results in type 2 diabetes or the metabolic syndrome, i.e. major metabolic diseases besides obesity.

Correction of feeding behaviour by decreasing food intake could have an opposite effect and could improve insulin resistance and/or insulin secretion, and consequently delay the consequences of perturbations in these variables.

The major aim of the present series of reports is to explore the possible effects of a daily intermittent fasting for 15 h, i.e. from 5 p.m. to 8 a.m., upon the development of the diabetic syndrome provoked, in sand rats, by the transition from a vegetal diet to a hypercaloric one. In the first report, attention was drawn to such items as the biotope and type of vegetal diet of the sand rats (*Psammomys obesus*) in their desertic habitat, with emphasis on the daily pattern of food intake by these animals in their natural environment (2). The second report concerned mainly the time-related changes in body weight, postprandial glycemia and glucose tolerance provoked in the sand rats by the transition from the purely vegetal diet to the hypercaloric diet and the comparison between non-fasting and intermittently fasting animals during a further 30-day period of exposure to the hypercaloric diet (3). The present report deals with several variables examined when the animals were sacrificed at the end of the latter period.

### Materials and methods

The design of the present experiments conducted in 52 sand rats, up to the time of sacrifice, was already described in detail in two prior reports (2,3). Briefly, after capture and after 15 days of acclimatization, during which the sand rats had only access to a vegetal diet, they were, during a subsequent 20-day transition period either maintained on the same vegetal diet (14 control animals) or given access to a mixed diet composed of standard laboratory chow (20 g per animal per day) and decreasing amounts of the vegetal diet (representing 75% during the first week, 50% during the second week and 25% during the third week of animal body weight). In the

---

*Correspondence to:* Professor W.J. Malaisse, Laboratory of Experimental Hormonology, Université Libre de Bruxelles, 808 Route de Lennik, B-1070 Brussels, Belgium  
E-mail: malaisse@ulb.ac.be

**Key words:** sand rats, intermittent fasting, body, liver and pancreas weight, plasma glucose, haemoglobin A1c, insulin, cholesterol and triglyceride, liver triglyceride and phospholipid, pancreatic insulin and GLUT2

Table I. Body, liver and pancreas weight.

Rats	Body wt.	Liver wt.		Pancreas wt.	
	(g)	(g)	(% of body wt.)	(mg)	(% body wt.)
Control non-fasting	127.5±4.2 (10)	4.03±0.18 (10)	3.19±0.16 (10)	316±37 (10)	2.49±0.29 (10)
Control fasting	111.3±14.3 (4)	5.03±0.17 (4)	4.83±0.82 (4)	271±47 (4)	2.74±0.86 (4)
Non-diabetic non-fasting	126.7±10.5 (9)	5.03±0.25 (9)	4.15±0.32 (9)	260±50 (9)	2.02±0.28 (9)
Non-diabetic fasting	93.0±4.8 (10)	4.65±0.28 (10)	5.07±0.30 (10)	172±23 (10)	1.74±0.28 (10)
Diabetic non-fasting	112.7±6.8 (13)	4.70±0.25 (13)	4.22±0.17 (13)	206±20 (13)	1.80±0.12 (13)
Diabetic fasting	113.3±11.5 (6)	4.77±0.51 (6)	4.22±0.18 (6)	207±21 (6)	1.85±0.12 (6)

latter case, the 38 sand rats were then divided in two groups of 19 animals each referred to as either non-diabetic (glycemia <7.0 mM) or diabetic (glycemia >8.3 mM). During the last 30 days of the present experiments, the animals were given access to either the vegetal diet (control animals) or the hypercaloric standard laboratory chow (diabetic and non-diabetic animals), some of the sand rats in each group undergoing intermittent fasting from 5 p.m. to 8 a.m. the next day. One day after the end of the experimental period of intermittent fasting, whenever applied, all sand rats were sacrificed in the postprandial state under anesthesia with ketamine chlorhydrate injected intraperitoneally. Blood was collected from the jugular vein in either heparinized tubes or in the presence of EDTA for haemoglobin A1c measurement.

The analytical methods used for the measurement of plasma glucose (4), hemoglobin A1c (5), insulin (6) were previously described in the cited references. Plasma cholesterol and triglycerides were measured by an ELITech (France) kit. Liver triglycerides (CHOD-PAP; Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) and phospholipids (PAP 150; Biomerieux, Lyon, France) were measured in hepatic extracts (7), using the cited enzymatic kits.

For immunodetection of insulin, pancreatic rehydrated paraffin sections were blocked 1 h at room temperature with 1:20 normal goat serum (Vector Laboratories, Belgium) in PBS for non-specific reactions. The slides were incubated with primary anti-insulin (12018, Sigma-Aldrich, Belgium) mouse monoclonal antibody overnight at 4°C at a concentration of 1/3000 in normal goat serum (1/20 in PBS). The secondary antibody, Rhodamine Red X-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) (115-295-146, Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA) was applied at a dilution of 1/100 in PBS/normal goat serum for 30 min at room temperature. The slides were mounted and DNA was counterstained with DAPI (Prolong® Gold antifade, Molecular Probes). The staining patterns were observed with an Axioplan and recorded with an Axiocam (Carl Zeiss, Germany).

For GLUT2 staining, immunodetection followed the standard ABC-DAB technique (8) using the avidin-biotin kit (Vector Laboratories). The slides were incubated overnight at 4°C with the first antibody: anti-Glut2 (sc-9117, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA), a rabbit polyclonal antibody raised against amino acids 32-98 of GLUT2 of human origin. The primary antibody was used at dilutions 1/100 to 1/1000

in PBS with appropriate blocking serum at a dilution of 1/20. Purified immunoglobulins (IgG) (Sigma-Aldrich) from non-immunized rabbit were used as negative controls. The slides were further incubated with the secondary biotinylated antibody: goat anti-rabbit IgG (H+L) (BA-1000, Vector Laboratories) at a dilution of 1/300 in PBS for 30 min, at room temperature. The staining pattern was ascertained with an Axioplan and recorded with an Axiocam (Carl Zeiss).

For the histological study of the liver, hepatic samples were fixed in Bouin solution and embedded in paraffin. Sections (5 µm) were deparaffined and rehydrated for hematoxylin-eosin staining. The liver slides were examined under light microscopy.

All results are presented as mean values (± SEM) together with the number of individual observations (n) or degree of freedom (df). The statistical significance of differences between mean values was assessed by use of Student's t-test.

## Results

**Body, liver and pancreas weight.** Whether in the fasting or non-fasting animals, the final body weight (wt.) failed to differ significantly in the control, diabetic and non-diabetic rats, with an overall mean value of 121.2±4.3 g (n=32) in non-fasting animals, as distinct (p<0.02) from 102.8±5.2 g (n=20) in fasting animals (Table I).

In absolute terms, the liver wet weight was higher in non-fasting diabetic rats (4.70±0.25 g; n=13; p<0.06) and non-fasting non-diabetic rats (5.03±0.25 g; n=9; p<0.005) than in non-fasting control animals (4.03±0.18 g; n=10). Likewise, relative to body weight, the liver wet weight was significantly higher (p<0.02 or less) in non-fasting diabetic rats (4.22±0.17%; n=13) and non-diabetic rats (4.15±0.32%; n=9) than in non-fasting control rats (3.19±0.16%; n=10). In the fasting rats, the liver/body weight ratio averaged 121.4±7.2% (n=20; p<0.004) of the mean corresponding values recorded in non-fasting animals of the same group (control, diabetic or non-diabetic), i.e. 100.0±3.0% (n=32). In absolute terms, however, the liver wet wt. failed to differ significantly (p>0.4) in fasting versus non-fasting animals, with respective overall mean values of 4.76±0.20 g (n=20) and 4.59±0.15 g (n=32).

In mirror image of the liver data, the wet weight of the pancreas was, in the non-fasting animals, lower (p<0.05) in the diabetic and non-diabetic rats (227±24 mg; n=22) than in

Table II. Plasma glucose and insulin concentrations, insulinogenic index and insulin resistance HOMA at sacrifice.

Rats	Plasma glucose (mM)	Plasma insulin ( $\mu$ g/l)	Insulinogenic index ( $\mu$ g/mol)	Insulin resistance HOMA (mM $\mu$ g/l)
Control non-fasting	4.46 $\pm$ 0.28 (10)	1.55 $\pm$ 0.60 (4)	409 $\pm$ 162 (4)	5.9 $\pm$ 0.3 (4)
Control fasting	2.89 $\pm$ 0.25 (4)	1.08 $\pm$ 0.41 (4)	385 $\pm$ 151 (4)	3.1 $\pm$ 1.1 (4)
Non-diabetic non-fasting	4.61 $\pm$ 0.45 (9)	2.95 $\pm$ 0.37 (4)	653 $\pm$ 110 (4)	13.4 $\pm$ 1.1 (4)
Non-diabetic fasting	4.12 $\pm$ 0.48 (10)	2.25 $\pm$ 0.29 (7)	536 $\pm$ 65 (7)	10.6 $\pm$ 2.4 (7)
Diabetic non-fasting	16.56 $\pm$ 1.52 (13)	9.35 $\pm$ 2.34 (8)	599 $\pm$ 135 (8)	156.0 $\pm$ 45.6 (8)
Diabetic fasting	6.49 $\pm$ 0.74 (6)	6.14 $\pm$ 1.51 (5)	1,130 $\pm$ 360 (5)	35.1 $\pm$ 6.4 (5)

the control rats (316 $\pm$ 37 mg; n=10), such a difference being most marked (p<0.02) in the diabetic rats and failing to achieve statistical significance in the non-diabetic rats. The values recorded in the fasting rats averaged 80.5 $\pm$ 6.7% (n=20; p<0.08) of the corresponding mean values found in non-fasting rats of the same group (control, diabetic, non-diabetic), i.e. 100.0 $\pm$ 7.3% (n=32). Likewise, when expressed relative to body weight, the pancreatic weight represented no more than 1.82 $\pm$ 0.09 and 1.88 $\pm$ 0.19% (n=19 in both cases) in diabetic and non-diabetic rats, as compared (p<0.04 and p<0.06) to 2.56 $\pm$ 0.30% (n=14) in control animals.

**Plasma glucose and HbA1c.** At sacrifice, the plasma glucose concentration was comparable in non-fasting control animals (4.46 $\pm$ 0.28 mM; n=10) and non-fasting non-diabetic rats (4.61 $\pm$ 0.45 mM; n=9), and much higher (p<0.001) in non-fasting diabetic rats (16.56 $\pm$ 1.52 mM; n=13). In the diabetic rats, it decreased (p<0.001) to 6.49 $\pm$ 0.74 mM (n=6) in fasting animals. Likewise, in the control and non-diabetic rats, the mean value found in fasting animals (3.77 $\pm$ 0.38 mM; n=14) represented no more than 82.4 $\pm$ 8.1% (n=14; p<0.08) of the mean corresponding values (100.0 $\pm$ 5.6%; n=19) recorded in non-fasting rats of the same group. As a matter of fact, such a decrease was highly significant (p<0.01) in the fasting control rats (2.89 $\pm$ 0.25 mM; n=4), whilst failing to achieve statistical significance in the fasting non-diabetic rats (4.12 $\pm$ 0.48 mM; n=10). The latter two mean values nevertheless failed to differ significantly from one another (p>0.1), and remained both lower (p<0.02 or less) than that measured in the fasting diabetic rats.

In fair agreement with the plasma glucose data, the HbA1c measurements yielded much higher values (p<0.001) in non-fasting diabetic rats (4.78 $\pm$ 0.46%; n=13) than in non-fasting control animals (1.98 $\pm$ 0.16%; n=10). In the non-fasting non-diabetic rats, it averaged 2.73 $\pm$ 0.33% (n=9) and, as such, was somewhat higher (p<0.05) than in non-fasting control animals but much lower (p<0.005) than in non-fasting diabetic rats. In the fasting diabetic rats the HbA1c (3.47 $\pm$ 0.14%; n=6) was somewhat lower (p<0.08) than in the non-fasting diabetic rats. However, such was not the case when comparing fasting to non-fasting animals in the other two groups of rats (control and non-diabetic). For instance, in the fasting non-diabetic rats, the HbA1c (3.21 $\pm$ 0.31%; n=10) represented 117.4 $\pm$ 11.4% of the corresponding mean value found in non-fasting non-diabetic rats, as distinct (p<0.01)

from 72.5 $\pm$ 2.9% (n=6) when comparing fasting diabetic rats to non-fasting diabetic rats.

**Plasma insulin concentration, insulinogenic index and insulin resistance HOMA.** Whether in intermittently fasting or non-fasting animals, the plasma insulin concentration was highest in the diabetic rats and lowest in the control animals (Table II). Thus, relative to the corresponding mean values found in diabetic rats (100.0 $\pm$ 17.4%; n=13) examined under the same nutritional conditions (fasting or non-fasting), the measurements made in non-diabetic rats only represented 34.8 $\pm$ 3.3% (n=11; p<0.005), an even lower value (p<0.005) being recorded in control animals (17.1 $\pm$ 3.7%; n=8). The mean plasma insulin concentration was always lower in the intermittently fasting animals than in the non-fasting rats, the values recorded in the former animals representing 71.3 $\pm$ 8.6% (n=16; p<0.005 *versus* unity) of the corresponding reference values found in the non-fasting rats (100.0 $\pm$ 15.1%; n=16).

A different situation prevailed for the insulinogenic index, i.e. the ratio between plasma insulin and glucose concentrations (Table II). First, no significant difference was anymore observed between diabetic, non-diabetic and control rats. Indeed, relative to the corresponding mean values found in diabetic rats (100.0 $\pm$ 17.7%; n=13), examined under the same nutritional conditions, the measurements made in non-diabetic and control rats averaged, respectively, 69.8 $\pm$ 11.7% (n=11; p>0.18 *versus* diabetic rats) and 51.1 $\pm$ 15.4% (n=8; p<0.08 *versus* diabetic rats). The latter two percentages were both significantly higher than the corresponding values found for plasma insulin concentration in either the non-diabetic rats (p<0.01) or control animals (p<0.05). Second, no significant change in the insulinogenic index was anymore observed when comparing intermittently fasting to non-fasting rats. In the former rats, the insulinogenic index averaged (118.4 $\pm$ 23.2%; n=16; p>0.4 *versus* unity) of the corresponding reference values found in the non-fasting rats (100.0 $\pm$ 14.5%; n=16).

The HOMA for insulin resistance, taken as the product of plasma insulin concentration ( $\mu$ g/l) times than glucose concentrations (mM), only represented in the non-diabetic rats 21.4 $\pm$ 5.2% (n=11; p<0.001) of the mean corresponding values found in diabetic rats examined under the same nutritional conditions (100.0 $\pm$ 18.4%; n=13). It was further decreased (p<0.03) to 6.6 $\pm$ 1.7% (n=8) of such mean values

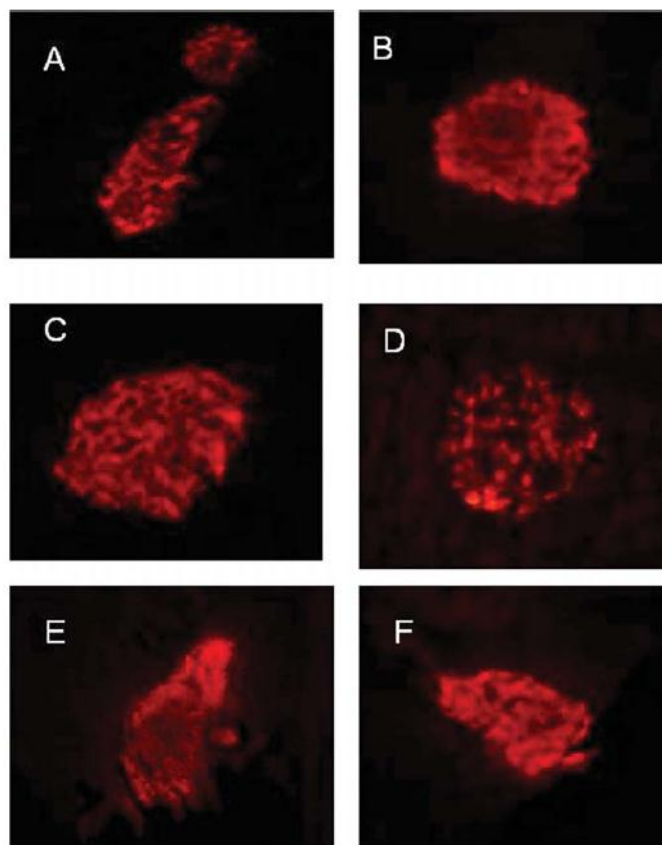


Figure 1. Immunodetection of insulin in the pancreas of fasting control (A), diabetic (C) and non-diabetic (E) and non-fasting control (B), diabetic (D) and non-diabetic (F) sand rats. Immunohistochemical labelling was performed using fluorescein-labeled secondary antibody. Both manipulations were conducted at a 1:3000 dilution (magnification x40).

in the control animals. It averaged, in the intermittently fasting rats,  $54.7 \pm 10.8\%$  ( $n=16$ ;  $p < 0.01$ ) of the mean corresponding values ( $100.0 \pm 16.6\%$ ;  $n=16$ ) found in non-fasting rats in the same group of animals (control, non-diabetic or diabetic rats).

**Plasma cholesterol and triglyceride concentration.** Whether in the fasting or non-fasting rats, the plasma cholesterol concentration was significantly higher in the diabetic and non-diabetic rats than in the control ones. It failed to differ significantly in the diabetic and non-diabetic rats, whether in the fasting ( $p > 0.1$ ) or non-fasting ( $p < 0.1$ ) animals. It was significantly lower in the fasting than non-fasting rats in both the control animals ( $p < 0.05$ ) and diabetic rats ( $p < 0.025$ ), but not so in the non-diabetic rats. Pooling together all available data, it averaged in the fasting rats  $82.6 \pm 5.2\%$  ( $n=20$ ;  $p < 0.03$ ) of the corresponding values found in the non-fasting animals of the same group (control, diabetic, non-diabetic), i.e.  $100.0 \pm 5.1\%$  ( $n=32$ ).

The plasma triglyceride concentration was significantly higher ( $p < 0.02$  or less) in the non-fasting diabetic rats ( $1,815 \pm 307$  mg/l;  $n=13$ ) and non-fasting non-diabetic rats ( $2,041 \pm 397$  mg/l;  $n=9$ ) than in non-fasting control animals ( $893 \pm 99$  mg/l;  $n=10$ ). It failed to differ significantly in the non-diabetic and diabetic rats, whether in the non-fasting ( $p > 0.6$ ) or fasting ( $p > 0.7$ ) animals. It averaged  $1,362 \pm 254$  mg/l ( $n=6$ ) and  $1,478 \pm 193$  mg/l ( $n=10$ ) in the fasting diabetic and non-diabetic rats, respectively, representing  $73.4 \pm 7.6\%$  ( $n=16$ ;  $p < 0.07$ ) of the mean corresponding values found in non-fasting rats of the same status (diabetic or non-diabetic animals), i.e.  $100.0 \pm 10.2\%$  ( $n=22$ ). Such a decrease in the fasting versus non-fasting rats was not observed, however, in the control rats.

**Liver triglyceride and phospholipid content.** Whether in non-fasting or intermittently fasting rats, the liver triglyceride content was higher in non-diabetic and diabetic animals than in the control ones (Table III). It averaged in the former

Table III. Lipid data.

Rats	Plasma cholesterol (mg/l)	Plasma triglycerides (mg/l)	Liver TG <sup>a</sup> ( $\mu$ mol/g)	Liver PL <sup>b</sup> ( $\mu$ mol/g)
Control non-fasting	607 $\pm$ 57 (10)	893 $\pm$ 99 (10)	3.52 $\pm$ 0.56 (4)	20.29 $\pm$ 0.94 (4)
Control fasting	398 $\pm$ 28 (4)	1,185 $\pm$ 575 (2)	2.24 $\pm$ 0.24 (4)	13.15 $\pm$ 2.70 (4)
Non-diabetic non-fasting	1,217 $\pm$ 111 (9)	2,041 $\pm$ 397 (9)	12.41 $\pm$ 2.86 (4)	21.67 $\pm$ 1.63 (4)
Non-diabetic fasting	1,211 $\pm$ 78 (10)	1,478 $\pm$ 193 (10)	5.16 $\pm$ 0.74 (4)	19.07 $\pm$ 0.94 (4)
Diabetic non-fasting	1,558 $\pm$ 138 (13)	1,815 $\pm$ 307 (13)	14.85 $\pm$ 8.92 (4)	20.90 $\pm$ 1.61 (4)
Diabetic fasting	1,025 $\pm$ 72 (6)	1,362 $\pm$ 254 (6)	6.29 $\pm$ 1.39 (4)	20.42 $\pm$ 0.47 (4)

<sup>a</sup>The liver triglyceride content is expressed as  $\mu$ mol glycerol per g liver wet wt. <sup>b</sup>The liver phospholipid content is expressed as  $\mu$ mol choline per g liver wet wt.

animals 321.6 $\pm$ 92.2% (n=16) of the mean corresponding values found under the same experimental conditions (non-fasting or fasting) in the latter animals (100.0 $\pm$ 8.9%; n=8). It averaged in the intermittently fasting rats 49.3 $\pm$ 5.0% (n=12; p<0.02) of the mean corresponding values found in non-fasting rats (100.0 $\pm$ 19.5%; n=12). No significant difference was found between the non-diabetic and diabetic rats, whether in non-fasting rats or intermittently fasting animals.

As judged from the measurement of choline, the sole significant difference in the liver phospholipid content consisted in a lower value (p<0.05) found in the intermittently fasting as compared to non-fasting control rats (Table III).

**Pancreatic islet histology.** The staining for insulin was comparable in control, non-diabetic and diabetic sand rats (Fig. 1). It appeared somewhat less marked in fed than in fasting rats of the same group (control, diabetic, non-diabetic). There was no obvious difference for the GLUT2 staining in the different types of sand rats (Fig. 2).

**Liver histology.** No lipid droplet was observed in the liver of control sand rats, whether in non-fasting or fasting animals (Fig. 3). However, in both diabetic and non-diabetic sand rats, obvious accumulation of lipid droplets was observed this being more pronounced in non-fasting than in fasting animals (Fig. 3).

## Discussion

The present study documents both the undesirable effects in sand rats or a hypercaloric diet, as distinct from a purely vegetal diet, upon selected metabolic and hormonal variables, and the beneficial effects of intermittent fasting upon the same variables in the animals exposed to the hypercaloric diet.

**Glucose homeostasis.** The present measurements of plasma glucose concentration extend our prior observations (3) on the improvement of glucose homeostasis in the diabetic sand rats undergoing intermittent fasting. These postprandial measurements are likely to reflect the long-term regulation of glycemia. There was indeed a close parallelism between the

mean values for plasma glucose concentration and haemoglobin A1c. For instance, in the non-fasting or fasting diabetic and non-diabetic sand rats, there was a highly significant positive correlation (r= +0.6751; n=38; p<0.001) between these two variables. The results listed in Table II indicate that the fasting-induced decrease of glycemia could not be attributed to a higher rate of insulin secretion. On the contrary, the mean plasma insulin concentration was always lower in fasting sand rats than in non-fasting animals of the same group (control, non-diabetic, diabetic).

The improvement of glucose homeostasis caused by intermittent fasting appears, however, largely attributable to a decrease of insulin resistance, otherwise prevailing in the diabetic sand rats exposed to the hypercaloric diet. This proposal is supported by the tight correlation (r= +0.7454; n=32; p<0.001) found between the postprandial plasma glucose concentration and HOMA for insulin resistance (logarithmic values). It could obviously be objected that such a correlation is not meaningful since one of the two variables under consideration, i.e. the plasma glucose concentration, is taken into consideration to calculate the other variable, i.e. the HOMA for insulin resistance. Therefore, the HOMA for insulin resistance (logarithmic values) was compared to the haemoglobin A1c. In the 28 sand rats in which these two variables had been measured, a significant positive correlation (r= +0.4320; n=28; p<0.03) was again observed, thus reinforcing the view that insulin resistance was indeed a significant determinant of the perturbation of glucose homeostasis in the present experiments.

**Body weight.** The present study also documents that, in sand rats, intermittent fasting for 15 h over a period of 30 days eventually results in lower values for body weight, whether in control animals maintained on a vegetable diet or in rats exposed to a hypercaloric diet. In this respect, the present results closely resemble those collected in the same animals a week before sacrifice (3). For instance, in the animals exposed to the hypercaloric diet, the measurements of body weight averaged 110.0 $\pm$ 4.0 g (n=38) a week before sacrifice and 110.9 $\pm$ 4.4 g (n=38) at sacrifice, with a correlation coefficient between the two series of measurements amounting to +0.9094 (n=38; p<0.001). It should be stressed, however, that no

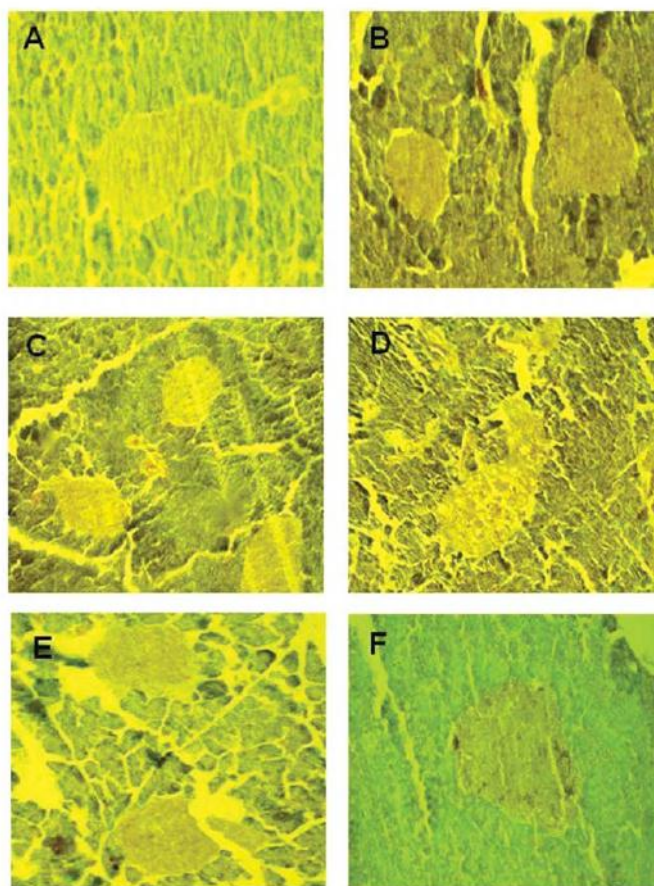


Figure 2. Immunodetection of GLUT2 by anti-GLUT2 (1/100) in the pancreas of fasting control (A), diabetic (C) and non-diabetic (E) and non-fasting control (B), diabetic (D) and non-diabetic (F) sand rats. Immunohistochemical labelling was performed using avidin-biotin-peroxidase complex with diaminobenzidine (magnification x40).

significant difference in body weight was found between non-diabetic or diabetic sand rats as compared to control animals, whether in the fasting or non-fasting groups ( $p > 0.1$  or more).

**Lipid variables.** The exposure to the hypercaloric diet and intermittent fasting also affected lipid variables in both liver and plasma. Thus, despite virtually identical liver phospholipid content, the mean triacylglycerol hepatic content, expressed relative to liver wet weight, was much higher ( $p < 0.03$ , comparison of mean geometric values) in the non-fasting sand rats exposed to the hypercaloric diet ( $10.19 \pm 2.82 \mu\text{mol/g}$ ;  $n=8$ ) than in the non-fasting control animals ( $3.37 \pm 0.59 \mu\text{mol/g}$ ;  $n=4$ ). This situation prevailed despite the fact that both the absolute values for liver wet weight and the liver/body weight ratios were higher ( $p < 0.01$ ) in non-fasting rats exposed to the hypercaloric diet ( $4.84 \pm 0.18 \text{ g}$  and  $4.19 \pm 0.16\%$ ;  $n=22$ ) than in the non-fasting control animals ( $4.03 \pm 0.18 \text{ g}$  and  $3.19 \pm 0.16\%$ ;  $n=10$ ). The

higher triglycerides accumulation in liver was also confirmed by histological examination of liver (Fig. 3). In fact, we observed a large number of lipid droplets in hepatic section which may represent the non-alcoholic steatohepatitis.

In fasting rats, the liver triglyceride content was also higher ( $p < 0.001$ ) in the diabetic and non-diabetic animals ( $5.48 \pm 0.63 \mu\text{mol/g}$ ;  $n=8$ ) than in the control ones ( $2.20 \pm 0.25 \mu\text{mol/g}$ ;  $n=4$ ). In all cases, the intermittent fasting decreased the liver triglyceride content, the values recorded in the fasting rats representing, on average, only half of those found in non-fasting animals of the same type (control, diabetic, non-diabetic). This coincided, especially in diabetic and non-diabetic sand rats, with a decreased number and size of lipid droplets in the liver of fasting animals as compared to non-fasting animals. Thus, intermittent fasting minimized the hepatic steatosis otherwise caused by high energy feeding.

These changes were, as a rule, paralleled by comparable changes in plasma triglyceride concentration. Thus, such a

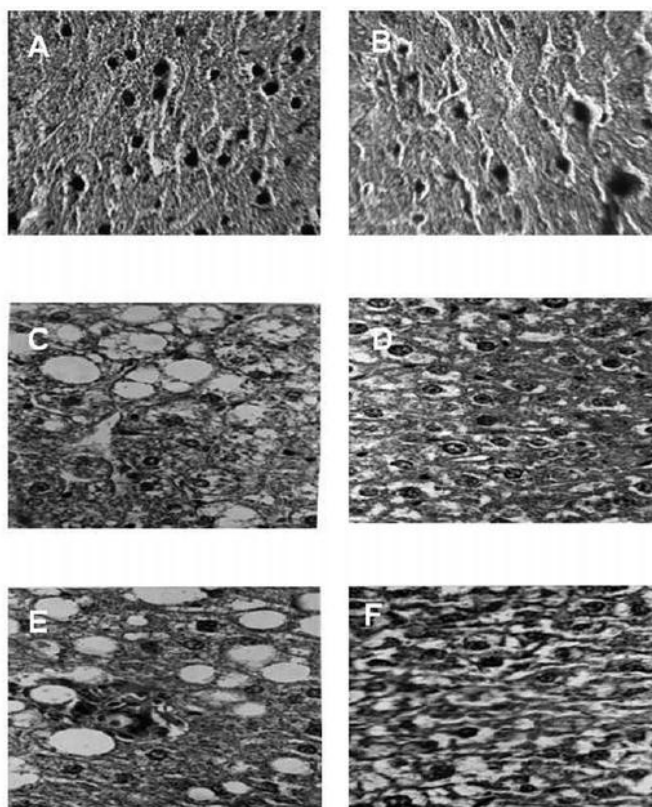


Figure 3. Hematoxylin-eosin stained liver histological slides obtained from non-fasting control (A), diabetic (C) and non-diabetic (E) sand rats, and fasting control (B), diabetic (D) and non-diabetic (F) animals (magnification x40).

concentration was higher in non-fasting diabetic and non-diabetic sand rats than in non-fasting control animals. In the former sand rats, it was decreased by intermittent fasting. Moreover, when considering all sand rats for which both the liver triglyceride content and plasma triglyceride concentration were available, a highly significant positive correlation ( $r = +0.6536$ ;  $n = 22$ ;  $p < 0.001$ ) was found between these two variables.

Likewise, the plasma cholesterol concentration was higher in diabetic and non-diabetic sand rats than in control animals, whether in fasting or non-fasting animals. It was about 20% lower ( $p < 0.03$ ) in fasting sand rats than in non-fasting animals of the same type (control, diabetic, non-diabetic).

The accumulation of triglycerides in the liver is closely associated with hepatic insulin resistance (1), there being an inverse relationship between hepatic triglyceride content and hepatic insulin sensitivity (9). The decrease in hepatic triglyceride content in fasting sand rats could thus improve hepatic insulin sensitivity and, by doing so, contribute to the decrease in insulin resistance observed in this study in the same animals. Since hepatic insulin resistance coincides with a lesser sensitivity of the liver to the suppressive effects of

insulin on hepatic glucose and VLDL production (10), the reduction of non-alcoholic steatohepatitis after the 30 days of intermittent fasting may also contribute to the concomitant improvement of hyperglycemia and hyperlipidemia. In turn, the improvement of glucose homeostasis may participate in a decrease of cholesterol synthesis. According to Scoppola *et al* (11), there is indeed a positive correlation between glycated haemoglobin concentration and the urinary excretion of mevalonate, taken as an indicator of cholesterol synthesis. The decrease in cholesterol synthesis may also involve the relationship between insulin sensitivity and cholesterol absorption, as proposed by Simonen *et al* (12).

**Pancreatic islet functional and morphological status.** In both non-fasting and fasting sand rats, the plasma insulin concentration was higher in non-diabetic animals than in control ones, and further increased in diabetic sand rats. It was always lower in fasting rats than in non-fasting animals. As already mentioned, this suggests that neither the deterioration of glucose homeostasis in sand rats exposed to the hypercaloric diet nor its improvement in intermittently fasting animals may be primarily attributable to changes in insulin output.

The insulinogenic index, i.e. the ratio of plasma insulin/glucose concentrations, was calculated to assess the secretory responsiveness of insulin-producing cells to the hexose. In the euglycemic control and non-diabetic sand rats, it only represented  $61.9 \pm 9.3\%$  ( $n=19$ ) of the mean corresponding values ( $100.0 \pm 17.7\%$ ;  $n=13$ ) found in diabetic rats examined in the same nutritional status (non-fasting or fasting animals). Such a difference ( $p < 0.05$ ) is reminiscent of the increased insulin output from pieces of pancreatic tissue, when comparing sand rats exposed to a vegetable diet or remaining euglycemic when exposed to a mixed diet of vegetables and usual laboratory chow to moderately hyperglycaemic sand rats also exposed to the mixed diet (13). As a matter of fact, there was a close to perfect correlation ( $r = +0.9841$ ) between the mean insulinogenic index in the latter 3 groups of sand rats and the corresponding values found in the present study in control, non-diabetic and diabetic animals. The results collected in the latter diabetic animals represent a first indication that, under the present experimental conditions, the diabetic sand rats had not yet reached the later stage of impaired  $\beta$ -cell function documented in prior studies (13,14).

It should be stressed that, in the fasting animals, the insulinogenic index was not significantly lower than in the non-fasting sand rats of the same group (control, non-diabetic and diabetic). As a matter of fact, the trend, if any, was, especially in the diabetic sand rats, towards an increase of the insulinogenic index. Thus, after logarithmic conversion of all available data, the values recorded in the fasting sand rats averaged  $151.1 \pm 54.5\%$  ( $df=26$ ) of the mean corresponding values recorded in non-fasting animals of the same group. This is an important finding. It documents that the intermittent fasting failed to affect adversely the insulin secretory responsiveness to glucose, unlike the severe reduction in such a responsiveness otherwise observed after starvation for one or more days (15).

The present histological documents also indicate that the  $\beta$ -cells of non-fasting or fasting diabetic sand rats displayed no sizeable reduction of insulin content, at variance with the situation found in more severely diabetic sand rats (13). The immunodetection of GLUT2 also failed to reveal any major anomaly in the diabetic sand rats.

In conclusion, the present study documents that, in sand rats exposed to a hypercaloric diet, intermittent fasting improves glucose homeostasis, apparently mainly through a decrease in insulin resistance, decreases body weight, opposes the liver steatosis, hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia otherwise found in sand rats exposed to the hypercaloric diet, and fails to alter both the insulin secretory responsiveness to glucose and insulin content of pancreatic islets. To the extent that these findings might be extrapolated to human subjects, with type II diabetes or prone to develop such a disease, the present intermittent fasting procedure, which is somehow reminiscent of the daily fasting period during the Ramadan, may well be recommended as a suitable approach to prevent, minimize or correct the metabolic and hormonal defects found in such subjects.

## Acknowledgments

This study was supported in part by a grant from the Belgian Foundation for Scientific Medical Research (3.4520.07). We are grateful to A. Chwalik, P. D'Hont and A. Dufour for technical assistance and C. Demesmaeker for secretarial help.

## References

1. Yki-Jarvinen H: Fat in the liver and insulin resistance. *Ann Med* 37: 347-356, 2005.
2. Belkacemi L, Selselet-Attou G, Sener A and Malaisse WJ: Intermittent fasting modulation of the diabetic syndrome in sand rats. I. Background information and experimental design. *Metab Funct Res Diab* 2: 5-8, 2009.
3. Belkacemi L, Selselet-Attou G, Louchami K, Sener A and Malaisse WJ: Intermittent fasting modulation of the diabetic syndrome in sand rats. II. *In vivo* investigations. *Int J Mol Med* 26: 759-765, 2010.
4. Bergmeyer HU and Berndt E: Glucose determination with glucose oxidase and peroxidase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer HU (ed). Academic Press, New York, pp1205-1215, 1974.
5. Ersser RS, Barlow GB, Drew RG and Hjelm M: Packing materials suitable for rapid, analytical, low-pressure chromatography of hemoglobins on midgel columns. *Biomed Chromatogr* 1: 183-188, 1986.
6. Leclercq-Meyer V, Marchand J, Woussen-Colle MC, Giroix M-H and Malaisse WJ: Multiple effects of leucine on glucagon, insulin and somatostatin secretion from the perfused rat pancreas. *Endocrinology* 116: 1168-1174, 1985.
7. Folch J, Lees M and Sloane-Stanley GH: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509, 1957.
8. Hsu SM, Raine L and Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580, 1981.
9. den Boer M, Voshol PJ, Kuipers F, Havekes LM and Romijn JA: Hepatic steatosis: a mediator of the metabolic syndrome. Lessons from animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 644-649, 2004.
10. Bacon BR, Farahvash MJ and Janney CG: Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 107: 1103-1109, 1994.
11. Scoppola A, Montecchi FR, Menzenger G and Lala A: Urinary mevalonate excretion rate in type 2 diabetes: role of metabolic control. *Atherosclerosis* 156: 357-361, 2001.
12. Simonen P, Gylling H, Howard AN and Miettinen TA: Introducing a new component of the metabolic syndrome: low cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr* 72: 82-88, 2000.
13. Malaisse WJ, Like AA, Malaisse-Lagae F, Gleason RE and Soeldner JS: Insulin secretion in vitro by the pancreas of the sand rats (*Psammomys obesus*). *Diabetes* 17: 752-759, 1968.
14. Kaiser N, Yuli M, Uçkaya G, Oprescu AI, Berthoult M-F, Kargar C, Donath MY, Cerasi E and Ktorza A: Dynamic changes in  $\beta$ -cell mass and pancreatic insulin during the evolution of nutrition-dependent diabetes in *Psammomys obesus*. *Diabetes* 54: 138-145, 2005.
15. Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F and Wright PH: Effect of fasting upon insulin secretion in the rat. *Am J Physiol* 213: 843-848, 1967.

**Mini-review: Intermittent fasting: a caloric restriction alternative for diabetes, cardiovascular disease and diabetic nephropathy prevention**

**Louiza Belkacemi, Ghalem Selselet-Attou**

*Laboratoire de Technologie Alimentaire et Nutrition, Université de Mostaganem, Algérie*

(Received 07 January 2011, accepted 20 April 2011)

**ABSTRACT**

Calories intake excess induces metabolic disturbances leading to the outcome of chronic diseases. Caloric restriction and intermittent fasting (IF) are two diet manipulations used to reverse the negative effect of calories overabundance. Several studies have proven effectiveness of these two paradigms to prevent development of many diseases such as diabetes type 2, cardiovascular diseases and nephropathy. Some of them reported that intermittent fasting, more precisely the alternate day fasting, may even produces more beneficial effect in delaying several diseases. Intermittent fasting modulates insulin resistance, oxidative stress and even proapoptotic events, i.e. risk factors involved in diseases prevalence. Indeed, IF enhances insulin-mediated glucose uptake, prevent and/or corrects dyslipidemia, reduces reactive oxygen species (ROS) and attenuates p53 and p38 expression disfavoring thereby apoptosis. In this mini review, we summarize some studies reporting in which way intermittent fasting may be beneficial for modulating disease risk factors.

**KEY WORDS:** Intermittent fasting, diabetes, nephropathy, cardiovascular disease.

**INTRODUCTION**

Several studies report that the main factor affecting markedly the outcome of numerous diseases, reducing thereby lifespan, is food intake (1, 2). In fact, calories intake excess, characterizing the modern society, leads to free radicals production which cause several damaging effects as they can attack lipids, protein/enzymes, carbohydrates, and DNA, causing membrane damage, protein modification and cell death induced by DNA fragmentation and lipid peroxidation. These oxidative stress-damages are involved in the pathophysiological role of several diseases like diabetes, heart disease (atherosclerosis), and nephropathy. Besides its effect on oxidative stress, overeating causes many metabolic disorders, especially glucidic and lipid ones, involved in development of previous diseases

However, dietary restriction by limiting energy intake reduces the rate of oxidative damage to the cells by decreasing free radicals production (3), and prevents chronic diseases (3) or delays the onset of age-associated pathologies (5).

Two paradigms of dietary restriction have been widely examined in rats, mice and even in human to assess their effects upon life span. The first paradigm concerns caloric restriction (CR) which is defined as a reduction in calorie intake below usual ad libitum intake without malnutrition. Generally, food intake is limited to 60–85% of daily energy needs. The second paradigm involves intermittent fasting (IF) or alternate day fasting (ADF) which consists in total food deprivation for a full day that alternates with a “feast day” on which food is consumed ad libitum. The fast and feast periods are typically 24 h each, but they may vary.

Several authors by proving the health benefits of IF upon chronic disease offspring recommend this diet regimen for human, as an alternative for a daily caloric restriction (6), to prevent numerous metabolic imbalances leading to cellular and molecular disturbances.

In this mini-review we summarize some literatures dealing with intermittent fasting paradigm. Our objective is to summarize effect of IF upon chronic diseases prevention both in animal and human trials.

**EFFECT OF INTERMITTENT FASTING ON DIABETES PREVENTION**

Rodents and monkeys maintained on IF exhibit enhanced insulin sensitivity (7) resulting in an eventual enhanced glucose mobilization and an enhanced insulin sensitivity, both of which serve to maintain a supply of glucose for the vital organs, central nervous system and gonads to support these critical organs in time of limited energy intake (8). This improvement of insulin sensitivity may be explained by increases in fatty acid oxidation in liver and muscle observed with ADF (9). It was also proposed that circulating free fatty acids are essential for efficient glucose-induced insulin release from pancreatic islets of 18- to 24-h-fasted animals (10). The ability of ADF to decrease visceral fat cell size may also be beneficial for insulin sensitivity (11) in the sense that fat depletion caused by caloric restriction induces a reduction in peripheral and hepatic insulin resistance (12). This contributes to reduce diabetes risk since visceral fat may play an essential role in the development of type 2 diabetes through increasing insulin resistance (13).

Anson and coworkers (14), in comparing caloric restriction to ADF effects, found that intermittent fasting resulted in beneficial effects that met or exceeded those of 40% caloric restriction including reduced serum glucose and insulin levels. This beneficial effect of IF was independent from overall caloric intake. Intermittent fasting without an overall reduction in food intake improves glucose regulation (2). Indeed, it is the reduction of meal frequency which is the cause of these beneficial improvements (14). Therefore, all these positive adaptations to IF would be expected to decrease the risk of diabetes. Moreover, Pederson and colleagues (15) found that 77% of the BB rats fed ad libitum control diets developed diabetes; whereas only 52% of the animals subjected to alternate day fasting became diabetic.

Reducing incidence of diabetes by intermittent fasting may happen in human since Halberg and coworkers (16) found that IF increased insulin action on whole body glucose uptake. In another study (17), healthy non obese men and women showed decreases in fasting insulin.

Increasing plasma adiponectin concentration occurring after each fasting period may explain insulin sensitivity

improvement. In fact, adiponectin is positively correlated to insulin sensitivity in humans (18) and in this way increases in circulating adiponectin would be able to exert an insulin-sensitizing effect. The same authors concluded that cycles of feast and famine are important as an initiator of thrifty genes leading to improvements in metabolic function.

In case of diabetes, hyperglycemia, the hallmark of this metabolic disease, leads to an increase in reactive oxygen species (ROS) formation that can lead to the oxidation of several biomolecules like lipids, proteins and nucleic acids (19). This hyperglycemia-mediated ROS production is thought to cause several comorbid conditions associated to diabetes, like cardiovascular diseases (20), nephropathy (21, 22) among others. Tikoo and collaborators (21) reported that IF lowers the oxidative stress because it decreases the lipid peroxidation and increases the superoxide dismutase level.

According to Anson and coworkers (14), the alternating periods of anabolism and catabolism may play a mechanistic role in triggering increases in cellular stress resistance and the repair of damaged biomolecules or cells. On the other hand, superior neuroprotective efficacy of IF compared with limited daily feeding documented in their study is consistent with enhancement of cellular stress resistance that results from the stress associated with fasting rather than an overall reduction in caloric intake. It seems that changes in neuroendocrine factors, as well changes in blood serum constituents induced by intermittent fasting, lead to increases in stress protection (17).

#### EFFECT OF INTERMITTENT FASTING ON CARDIOVASCULAR DISEASES PREVENTION

Numerous studies have proved the cardioprotective effect of intermittent fasting through the cardiovascular disease biomarkers response to the intermittent food deprivation. Blood pressure, which represents a major risk factor for cardiovascular diseases (23), is significantly lowered by IF both in normal (2, 24, 25) and diabetic (21) rats, and even obese human adults (6). This lowering may be attributed to enhancement of insulin sensitivity by IF, knowing that insulin resistance plays a role in initiating hypertension (26), and thereby decreasing blood pressure may help to prevent cardiovascular problems. Jones et al. (27) suggested that reduced sympathetic tone by short term food deprivation mediates the rapid reductions in mean arterial blood pressure. Wittnich and Wallen (28) found that, in spontaneously hypertensive male rats with myocardial hypertrophy, food deprivation for 24 hours induced increasing myocardial glycogen. This led them to suggest a development of regimens based on food deprivation followed by refeeding designed to protect the hypertrophied heart during metabolic stress.

Intermittent fasting exhibits decrease heart rate (24, 25) implying increased heart rate variability (24) which is associated with improved cardiovascular function (3). In rat, this high heart rate variability is related to a reduction of physical activity both during the fasting and feeding days, especially at night (2). The other risk factor well known to contribute for cardiovascular disease offspring is the altered circulating lipid concentrations, i.e. elevated plasma concentration of cholesterol, triglycerides and LDL-cholesterol. These biomarkers of lipid metabolism disturbances are improved by intermittent food deprivation. Several works reported decreases in triacylglycerol concentrations, LDL-cholesterol (3, 4, 16), and increases in HDL-cholesterol concentrations were also observed (4, 16, 21). The same observations were found by Varady and coworkers (6) in obese adults in which total and LDL-cholesterol concentrations decreased by 21% and 25%, respectively, after 8 weeks of ADF, and triacylglycerol concentrations was lowered by 32%. These positive alterations in cholesterol, triglycerides and LDL-cholesterol

levels, as well as the anti-oxidative effect of intermittent fasting are expected to suppress atherosclerosis.

Finally, the cardioprotective role of IF may be explained by repeated mild stress that induces expression of genes that enhance the ability of cells to cope with more severe stress (29).

#### EFFECT OF INTERMITTENT FASTING ON RENAL DISEASES PREVENTION

Renal disease is another healthy problem which could be suppressed or at least delayed by mean of intermittent food deprivation. In their study, Tikoo et al. (21) assessed intermittent fasting effect upon the physiological and biochemical parameters associated to diabetes nephropathy. They found that IF resulted in a significant decrease in blood urea nitrogen and plasma creatinine levels after 8 weeks of induction of diabetes in streptozotocin-induced diabetic rats. Besides, the incidence and intensity of glomerular hypertrophy and vacuolisations observed in ad libitum fed diabetic rat kidney were much lower in intermittent fasting diabetic rats. The same authors tried to find out the mechanism underlying the nephroprotective effect of intermittent fasting. According to their results, they suggested that the inverse relationship between the Sir2 expression and the p53 one is made favorable by IF in way to prevent renal injury. Indeed, the down expression of Sir2 mediates the upregulation of p53 expression. Consequently, under diabetic conditions, increases p53 expression is associated with renal apoptosis. Attenuation of p53 expression, mediated by Sir2 activation in diabetic rats kept on IF regimen prevents them from diabetic nephropathy outcome. Caspases-3 and protein kinase p38 count among others proapoptotic actors involved in the onset of diabetic nephropathy, and which are influenced by IF in way to prevent apoptosis in kidney. Cleavage of caspases-3, a protein counting among others caspases family playing a central role in diabetic nephropathy via the induction/execution of apoptosis (22), is reduced by intermittent fasting (21). Activation of p38, a mediator of apoptotic cell death occurring under diabetic conditions, is decreased by IF.

#### CONCLUSION

Studies reviewed in this article present evidences for the beneficial effects of intermittent fasting upon biochemical and organic parameters that play a negative role in the physiopathology of various chronic diseases. The majority of these studies dealt with the 24 hours alternate day fasting. There is no doubt concerning the effectiveness of this kind of intermittent fasting, but the question which can be raised concerns the feasibility of this 24 hours fasting in human. Hunger feeling may discourage the subjects to adopt this regimen for a long time. Reducing the length of fasting time or limiting the frequency of meal to one meal a day may be more acceptable to profit from intermittent fasting regimen benefits without frustration.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to convey their sincere thanks to Prof WJ Malaisse for correcting this paper.

#### REFERENCES

1. Masoro EJ. Caloric restriction and aging: an update. *Exp Gerontol* 35: 299–305, 2000.
2. Wan R, Camandola S, Mattson MP. Intermittent Food Deprivation Improves Cardiovascular and Neuroendocrine Responses to Stress in Rats. *J Nutr* 133: 1921–1929, 2003.
3. Mattson MP, Wan R. Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the

- cardiovascular and cerebrovascular systems. *J Nutr Biochem* 16: 129-137, 2005.
4. Heilbronn LK, Smith SR, Martin CK, Anton SD, Ravussin E. Alternate-day fasting in non obese subjects: effects on body weight, body composition, and energy metabolism. *Am J Clin Nutr* 81: 69-73, 2005.
  5. Weindruch R, Keenan KP, Carney JM, Fernandes G, Feuers RJ, Floyd RA, Halter JB, Ramsey JJ, Richardson A, Roth GS, Spindler SR. Caloric Restriction Mimetics: Metabolic Interventions. *J Gerontol* 56: 20-33, 2001.
  6. Varady KA, Bhutani S, Church MC, Klempel MC. Short-term modified alternate-day fasting: a novel dietary strategy for weight loss and cardioprotection in obese adults. *Am J Clin Nutr* 90: 1138-1143, 2009.
  7. Goodrick CL, Ingram DK, Reynolds MA, Freeman JR, Cider N. Effects of intermittent feeding upon body weight and lifespan in inbred mice: interaction of genotype and age. *Mech Ageing Dev* 55: 69-87, 1990.
  8. Martin B, Mattson MP, Maudsley S. Caloric restriction and intermittent fasting: Two potential diets for successful brain aging. *Ageing Res Rev* 5: 332-353, 2006.
  9. Krizova E and Simek V. Effect of intermittent feeding with high-fat diet on changes of glycogen, protein and fat content in liver and skeletal muscle in the laboratory mouse. *Physiol Res* 45: 379-383, 1996.
  10. Stein DT, Esser V, Stevenson BE, Lane KE, Whiteside JH, Daniels MB, Chen S, Mc Garry JD. Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *J Clin Invest* 97: 2728-2735, 1996.
  11. Varady KA, Roohk DJ, Loe YC, Mc Evoy-Hein BK, Hellerstein MK. Effects of modified alternate-day fasting regimens on adipocyte size, triglyceride metabolism, and plasma adiponectin levels in mice. *J Lipid Res* 48: 2212-2219, 2007.
  12. Brazilai N and Ganniely I. The role of fat depletion in the biological benefits of caloric restriction. *J Nutr* 131: 903S-906S, 2001.
  13. Sironi AM, Gastaldelli A, Mari A, Ciociaro D, Postano V, Buzzigoli E, Ghione S, Turchi S, Lombardi SM, Ferrannini E. Visceral Fat in Hypertension Influence on Insulin Resistance and  $\beta$ -Cell Function. *Hypertension* 44:127-133, 2004.
  14. Anson RM, Guo Z, De Cabo R, Iyun T, Rios M, Hagepanos A, Ingram DK, Lane MA, Mattson MP. Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. *Proc Natl Acad Sci* 100: 6216-20, 2003.
  15. Pederson CR, Hagemann I, Bock T, Buschard K. Intermittent feeding and fasting reduces diabetes incidence in BB rats. *Autoimmunity* 30: 243-250, 1999.
  16. Halberg N, Henriksen M, Soderhamn N, Stallknecht B, Ploug T, Schjerling P, Dela F. Effect of intermittent fasting and refeeding on insulin action in healthy men. *J Appl Physiol* 99: 2128-2136, 2005.
  17. Allard JS, Heilbronn LK, Smith C, Hunt ND, Ingram DK, Ravussin E, Pennington CALERIE Team, De Cabo R. In vitro cellular adaptations of indicators of longevity in response to treatment with serum collected from humans on calorie restricted diets. *PLoS ONE* 3: e3211, 2008.
  18. Murakami H, Ura N, Furuhashi M, Higashiura K, Miura T, Shimamoto K. Role of adiponectin in insulin-resistant hypertension and atherosclerosis. *Hypertens Res* 26: 705-710, 2003.
  19. Santos RX, Cardoso S, Silva S, Correia S, Carvalho C, Crisostomo J, Rodrigues L, Amaral C, Louro T, Matafome P, Santos M.S, Preença T, Duarte AI, Seiça R, Moreira P.I. Food deprivation promotes oxidative imbalance in rat brain. *J Food Sci* 74: H8-H13, 2009.
  20. Wright jr E, Scism-Bacon JL, Glass C. Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. *Int J Clin Pract* 60: 308-314, 2006.
  21. Tikoo K, Tripathi DN, Kabra DG, Sharma V, Gaikwad AB. Intermittent fasting prevents the progression of type I diabetic nephropathy in rats and changes the expression of Sir2 and p53. *FEBS Letters* 581: 1070-1078, 2007.
  22. Wagener FADTG, Dekker D, Berden J. H. Scharstuhl A, van der Vlag J. The role of reactive oxygen species in apoptosis of the diabetic kidney. *Apoptosis* 14: 1451-1458, 2009.
  23. Padwal R, Straus S.E, Mc Alister F.A. Cardiovascular risk factors and theirs effects on the decision to treat hypertension: evidence based review. *BMJ* 322: 977-980, 2001.
  24. Ahmet I, Wan R, Mattson MP, Lakatta EG, Talan M. Cardioprotection by intermittent fasting in rats. *Circulation* 112:3115-3121, 2005.
  25. Mager DE, Wan R, Brown M, Cheng A, Wareski P, Abernethy DR, Mattson MP. Caloric restriction and intermittent fasting alter spectral measures of heart rate and blood pressure variability in rats. *FASEB J* 20: 631-637, 2006.
  26. Shehata MF. Genetic and dietary salt contributors to insulin resistance in Dahl salt-sensitive rats. *Cardiovasc Diab* 7:7, 2008.
  27. Jones MA, Vaness JM, Casto RM, Overton J.M. Influence of food deprivation on sympathetic support of blood in the spontaneously hypertensive rat. *Nutr Res* 18: 1581-1594, 1998.
  28. Wittnich C and Wallen WJ. Sex differences in response to dietary manipulation in rats with hypertension and myocardial hypertrophy. *Am J Clin Nutr* 66:1428-1435, 1997.
  29. Mattson MP, Chan SL, Duan W. Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet and behavior. *Physiol Rev* 82: 637-672, 2002.

Corresponding author: L Belkacemi, Laboratoire de Technologie Alimentaire et Nutrition, Université de Mostaganem, Algérie  
E-mail: belkacemilouiza@yahoo.fr

## Research Article

# Intermittent Fasting Modulation of the Diabetic Syndrome in Streptozotocin-Injected Rats

Louiza Belkacemi,<sup>1</sup> Ghalem Selselet-Attou,<sup>1</sup> Emeline Hupkens,<sup>2</sup> Evrard Nguidjoe,<sup>3</sup>  
Karim Louchami,<sup>2</sup> Abdullah Sener,<sup>2</sup> and Willy J. Malaisse<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Technologie Alimentaire et Nutrition, Université de Mostaganem, 1070 Mostaganem, Algeria

<sup>2</sup>Laboratory of Experimental Hormonology, Université Libre de Bruxelles, 808 Route de Lemnik, 1070 Brussels, Belgium

<sup>3</sup>Laboratory of Pharmacology, Université Libre de Bruxelles, 808 Route de Lemnik, 1070 Brussels, Belgium

Correspondence should be addressed to Willy J. Malaisse, malaisse@ulb.ac.be

Received 26 July 2011; Revised 9 October 2011; Accepted 13 October 2011

Academic Editor: A. N. Balamurugan

Copyright © 2012 Louiza Belkacemi et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

This study investigates the effects of intermittent overnight fasting in streptozotocin-induced diabetic rats (STZ rats). Over 30 days, groups of 5-6 control or STZ rats were allowed free food access, starved overnight, or exposed to a restricted food supply comparable to that ingested by the intermittently fasting animals. Intermittent fasting improved glucose tolerance, increased plasma insulin, and lowered Homeostatis Model Assessment index. Caloric restriction failed to cause such beneficial effects. The  $\beta$ -cell mass, as well as individual  $\beta$ -cell and islet area, was higher in intermittently fasting than in nonfasting STZ rats, whilst the percentage of apoptotic  $\beta$ -cells appeared lower in the former than latter STZ rats. In the calorie-restricted STZ rats, comparable findings were restricted to individual islet area and percentage of apoptotic cells. Hence, it is proposed that intermittent fasting could represent a possible approach to prevent or minimize disturbances of glucose homeostasis in human subjects.

## 1. Introduction

Overabundant food intake with chronic positive energy balance leads to obesity and type 2 diabetes, whilst reduction in food intake, by increasing insulin sensitivity and improving glucose homeostasis, is currently recommended in the treatment of these metabolic disorders [1–4]. Such a caloric restriction may include a relative decrease of food intake [5–7] or otherwise either a total short [8, 9] or prolonged [10] fasting.

Intermittent overnight fasting, inspired by the daily fasting period during the Ramadan, was recently reported to prevent the progressive deterioration of glucose tolerance otherwise taking place in sand rats exposed to a hypercaloric diet [11–13]. The major aim of the present study was to investigate whether a comparable benefit of intermittent fasting may prevail in streptozotocin-induced diabetic rats.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Streptozotocin-Induced Diabetes.** Eight to 10 weeks after birth, female Wistar rats (Charles River, Wilmington, MA, USA) were injected intraperitoneally, after overnight starvation, with streptozotocin (STZ, 65 mg/kg body wt.) freshly dissolved in a citrate buffer (50 mM, pH 4.5). These rats were given access during the night after the injection of streptozotocin to a solution of saccharose (10 g/100 mL) to prevent possible hypoglycemia. Control rats were injected with the citrate buffer. Five days after the injection of streptozotocin, the glycemia was measured with the help of glucometer (Lifescan Benelux, Beerse, Belgium) in blood obtained from caudal vein. Only those rats displaying a glycemia in excess of 16.7 mM were kept for further investigations.

**2.2. Starvation and Restricted Food Supply.** In order to compare the effects of an intermittent fasting, mimicking

the Ramadan fasting, to that of a caloric restriction, the experimentation in both control and STZ rats was conducted over two successive periods. Twenty days after the injection of either streptozotocin (STZ rats) or the citrate buffer vehicle (control rats), the rats were either given free access to food throughout the experimental period (NF: nonfasting rats), deprived of food and water from 5 p.m. to 8 a.m. (IF: intermittently fasting rats) or given access from 5 p.m. onwards to an amount of food comparable to that ingested by the IF rats (CR: calorie-restricted rats). Relative to the food intake in NF rats, such a caloric restriction represented a 20% decrease in food intake in the control animals and a 40% decrease of food intake in the STZ rats.

**2.3. Body Weight and Food Intake.** The initial body weight was measured before the injection of streptozotocin or its citrate buffer vehicle, 7 days thereafter, 20 days thereafter, on day 4, 7, 11, 14, 18, 21, and 27 of the final 30 days experimental period and at sacrifice, after overnight starvation. Likewise, food intake was measured 15 to 20 days (6 measurements) after injection of STZ or its vehicle in 6 control rats and 3 groups of 5-6 STZ rats, and daily (26 measurements) during the last 30 days experimental period.

**2.4. Intraperitoneal Glucose Tolerance Test (IPGTT).** An IPGTT [14, 15] was conducted in all rats on day 10, 20, and 29 of the final 30 days experimental period, after overnight starvation. A solution of D-glucose (20%, w/v) in distilled H<sub>2</sub>O was intraperitoneally injected in conscious rats in order to deliver 2 g D-glucose per kg body weight. The glycemia was measured by a glucometer before and 30, 60, and 120 min after the administration of D-glucose in blood samples obtained from a caudal vein. The total and incremental areas under the glycemic curve (AUC) were computed in each individual experiment.

**2.5. Sacrifice.** At the end of the experimental period, the rats were sacrificed after overnight starvation and under anesthesia provoked by the intraperitoneal injection of a solution containing ketamine and xylocaine. Blood samples were obtained from the heart and placed in heparinized tubes, the plasma being then separated by centrifugation and stored at -80°C. The plasma D-glucose [16] and insulin [17] concentrations were measured by methods described in the cited references. These measurements were used to calculate the insulinogenic index (i.e., the ratio between the plasma insulin concentration, expressed as mU/L, and the difference between the plasma D-glucose concentration, expressed as mM, and 4.0 mM, considered as the threshold value for stimulation of insulin secretion by the hexose) and the HOMA index (i.e., the product of the plasma insulin concentration, expressed as  $\mu$ U/mL, times the plasma D-glucose concentration, expressed as mM). The pancreas were either used for the isolation of islets or fixed for immunohistochemical examination.

**2.6. Insulin Secretion In Vitro.** Groups of 4 islets each, obtained by the collagenase procedure [18], were incubated

at 37°C for 90 min in 0.5 mL of a salt-balanced medium [19] containing bovine serum albumin (5 mg/mL) and equilibrated against a mixture of O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95/5, v/v). The insulin released by the islets during incubation and their final insulin content were measured by radioimmunoassay [17].

**2.7. Immunohistochemical Study.** For immunodetection of insulin, pancreatic rehydrated paraffin sections were blocked 1 h at room temperature with 1:20 normal goat serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) in PBS for nonspecific reactions. The slides were incubated with primary anti-insulin (12018, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) mouse monoclonal antibody overnight at 4°C at a concentration of 1/3000 in normal goat serum (1/20 in PBS). The secondary antibody, Rhodamine Red X-conjugated goat anti-mouse IgG (H + L) (115-295-146, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) was applied at a dilution of 1/200 in PBS/normal goat serum for 30 min at room temperature. The slides were mounted, and DNA was counterstained with DAPI (In Vitrogen, Merelbeke, Belgium). The staining patterns were observed with an Axioplan and recorded with an Axiocam (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

**2.8.  $\beta$ -Cell Mass Assessment.** Pancreatic sections were stained for insulin using standard ABC-DAB technique [20]. The slides were incubated overnight at 4°C with the first antibody: anti-insulin (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA) at dilution 1:500 in PBS with appropriate blocking serum at a dilution of 1/20. Purified immunoglobulins (IgG) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) from nonimmunized rabbit were used as negative controls. The slides were further incubated with the secondary biotinylated antibody: goat anti-rabbit IgG (H+L) (BA-1000, Vector Laboratories) at a dilution of 1/300 in PBS for 30 min, at room temperature.  $\beta$ -cell mass was measured by point-counting morphometry on these immunoperoxidase-stained sections [21]. The measurement was performed on live using Leica Microsystems microscope (Heerbrugg, Switzerland). A grill of 110 points was used to assess insulin positive stained islet on each field.

**2.9. Individual  $\beta$ -Cell Area.** Individual  $\beta$ -cell area was determined by using image J logician on immunofluorescence stained sections of pancreas used for  $\beta$ -cell apoptosis assessment. The  $\beta$ -cell area was calculated from the ratio between individual area and  $\beta$ -cell nuclei number within the area taken in consideration.

**2.10. Glucagon Immunodetection.** For glucagon immunodetection, the same procedure as that described for insulin immunodetection by the ABC-DAB technique [20] was used. The sole difference consisted in the first antibody, that is, antiglucagon (A0565, Dako, Carpinteria, CA, USA) used at dilution 1:400.

**2.11. Apoptosis Detection.** The quantification of  $\beta$ -cell apoptosis by the TUNEL method was performed using the *in situ Cell Death Detection kit*, POD (Roche Diagnostics,

Vilvorde, Belgium). At the end of this procedure, the pancreatic sections were rinsed with PBS and eventually exposed overnight at 4°C to primary anti-insulin antibody (see above) followed by exposition for 30 min at 20°C to the Rhodamine Red X-conjugated secondary antibody (1/200 dilution). The apoptotic index represents the ratio between positive and total nuclei of insulin-producing cells in each islet.

**2.12. Presentation of Results.** All results are presented as mean values ( $\pm$ SEM), together with the number of separate determinations ( $n$ ). The statistical significance of differences between mean values was assessed by use of Student's  $t$ -test.

### 3. Results

**3.1. Body Weight.** At day zero of the last 30 days experimental period, the mean body weights of the control and STZ rats did not differ significantly ( $P > 0.52$ ) from one another, with an overall mean value of  $223 \pm 4$  g ( $n = 33$ ). Over the 2 weeks following the injection of either streptozotocin or the citrate buffer vehicle, the changes in body weight averaged  $+17.6 \pm 4.0$  g ( $n = 16$ ) in control rats, as distinct ( $P < 0.005$ ) from  $-2.0 \pm 5.0$  g ( $n = 17$ ) in STZ rats. Over the last 30 days of the experiments, the changes in body weight failed to differ significantly, whether in the control or STZ rats, when comparing IF animals to NF animals, with overall mean values of  $+33.8 \pm 2.7$  g ( $n = 10$ ) in the control rats and  $-15.9 \pm 4.4$  g ( $n = 11$ ) in the STZ rats. Expressed as a daily change in body weight, these two mean values were not significantly different ( $P > 0.4$  or more) from those recorded in the same type of rats (control or STZ) over the 2-week period following the injection of streptozotocin or the citrate buffer vehicle. Over the last 30 days of the experiments, the gain in body weight was much lower ( $P < 0.04$  or less) in the CR animals than in the IF animals, with mean values of  $+6.0 \pm 3.1$  g ( $n = 6$ ) in control rats and  $-47.5 \pm 8.7$  g ( $n = 6$ ) in STZ rats (Figure 1). A comparable situation ( $P < 0.07$  or less) prevailed when considering the changes in body weight over the entire experimental period.

**3.2. Food Intake.** As indicated in Table 1, the food intake over the last 6 days of the control period (day 15 to day 20 after the injection of STZ or its solvent), was more than twice higher ( $P < 0.001$ ) in the STZ rats than in the control animals. Such a difference persisted when comparing fed control and STZ rats over the 30 days experimental period. In the IF and CR rats examined during the last 30 days experimental period, the food intake was again almost twice higher ( $P < 0.001$ ) in STZ rats than in control animals.

The individual values considered in Table 1 represented the mean of 6–26 measurements in each rat. During the last 6 days of the control period, the variation coefficient (SD/mean) for the 6 successive measurements made in each rat amounted to  $7.3 \pm 0.6\%$  ( $n = 23$ ) in control and STZ rats. Likewise, over the last 30 days of the present experiments, the variation coefficient for the 26 measurements made during this period averaged  $9.9 \pm 0.8\%$  ( $n = 5$ ) and  $9.1 \pm 1.1\%$  ( $n = 5$ ) in NF control and STZ rats, respectively, as compared

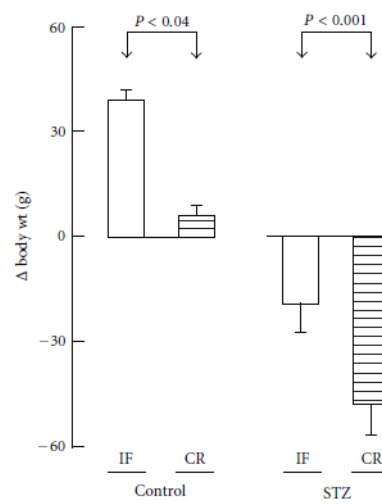


FIGURE 1: Comparison between the changes in body weight over the last 30 days experimental period in IF and CR control or streptozotocin rats. Mean values ( $\pm$ SEM) refer to 5–6 individual measurements.

TABLE 1: Food intake (g/day per rat).

Rats		Control period (last 6 days) <sup>a</sup>	Experimental period (30 days) <sup>b</sup>
Control	NF		$20.1 \pm 0.3$ (5)
	IF		$15.3 \pm 0.5$ (5)
	CR	$18.7 \pm 0.1$ (6)	$15.0 \pm 0.1$ (6)
STZ	NF	$44.5 \pm 1.8$ (5)	$46.0 \pm 0.7$ (5)
	IF	$42.9 \pm 0.9$ (6)	$25.8 \pm 0.6$ (6)
	CR	$44.2 \pm 1.6$ (6)	$26.5 \pm 1.0$ (6)

<sup>a</sup>Each individual value represents the mean of 6 successive determinations.

<sup>b</sup>Each individual value represents the mean of 26 determinations.

( $P < 0.001$ ) to  $15.5 \pm 0.3\%$  ( $n = 5$ ) and  $16.5 \pm 0.3\%$  ( $n = 6$ ) in IF control and STZ rats.

**3.3. IPGTT.** The paired difference between the glycemia at min 30 and min zero of the IPGTT was comparable ( $P > 0.77$ ) in control rats ( $6.31 \pm 0.62$  mM;  $n = 48$ ) and STZ rats ( $6.68 \pm 1.15$  mM;  $n = 52$ ).

The profile of glycemia during the IPGTT conducted in control rats is illustrated in Figure 2. The total AUC averaged in the IF and CR control rats, respectively,  $94.0 \pm 3.9\%$  ( $n = 16$ ) and  $96.1 \pm 2.8\%$  ( $n = 17$ ) of the mean corresponding values recorded on the same day in the fed control rats ( $100.0 \pm 5.0\%$ ;  $n = 15$ ). None of these mean values differed significantly from one another ( $P > 0.35$  or more). However, as documented by the data listed in Table 2, the incremental AUC tended to be lower in IF and CR control rats than in fed control rats. Thus, the values recorded in IF and CR

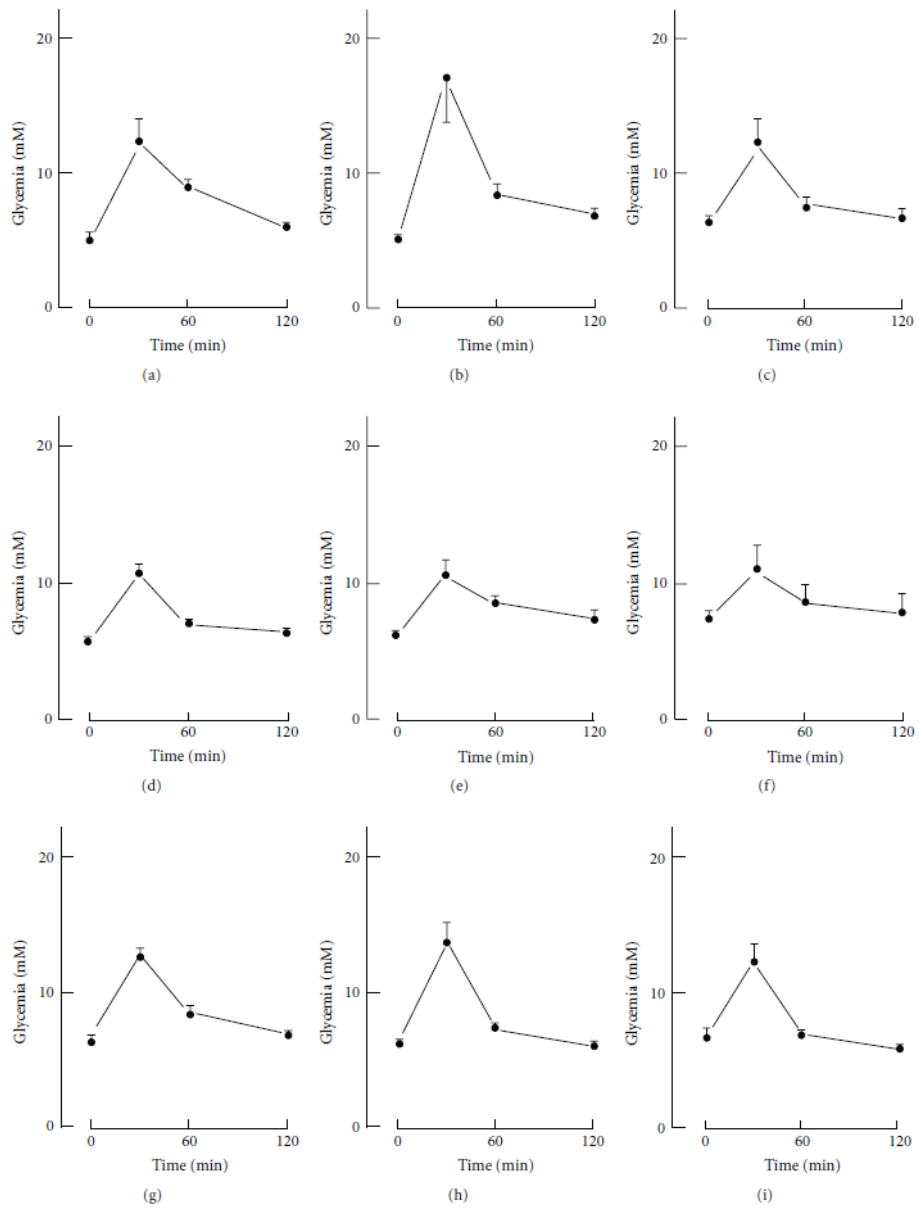
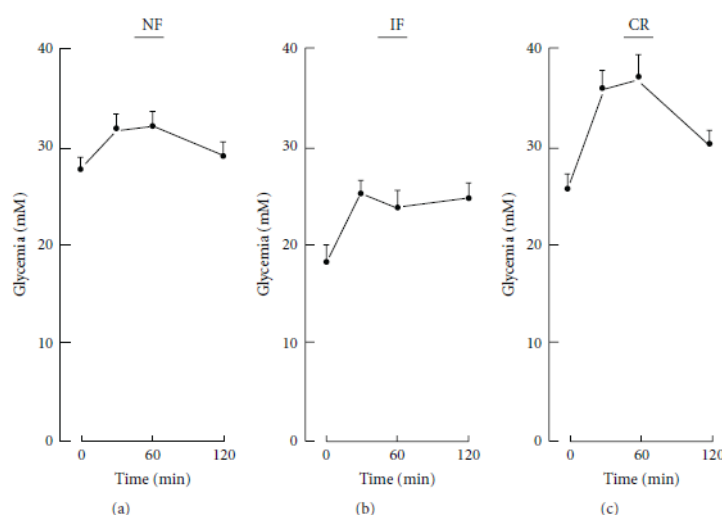


FIGURE 2: Glycemic profile during IPGTT conducted on day 10 (left), 20 (middle), and 29 (right) of the final experimental period in NF (upper panels), IF (middle panels), and CR (lower panels) control rats. Mean values ( $\pm$ SEM) refer to 5-6 individual experiments.

TABLE 2: IPGTT glycemic data in control rats.

Rats	Day	Time zero (mM)	Total AUC (mM·min)	Incremental AUC (mM·min)	(n)	
Control	NF	10	5.12 ± 0.59	1,027 ± 73	412 ± 120	(5)
		20	5.21 ± 0.27	1,177 ± 121	552 ± 104	(5)
		29	6.44 ± 0.38	998 ± 104	225 ± 77	(5)
Control	IF	10	5.79 ± 0.36	927 ± 28	233 ± 49	(6)
		20	6.16 ± 0.42	1,014 ± 49	275 ± 28	(5)
		29	7.50 ± 0.49	1,061 ± 97	161 ± 113	(5)
Control	CR	10	6.54 ± 0.32	1,081 ± 34	295 ± 52	(5)
		20	6.21 ± 0.30	1,044 ± 30	299 ± 42	(6)
		29	6.64 ± 0.74	959 ± 56	160 ± 75	(6)

FIGURE 3: Glycemic profile during IPGTT conducted in NF (a), IF (b), and CR (c) STZ rats. Mean values ( $\pm$ SEM) refer to 15–20 individual experiments.

control rats, respectively, averaged  $59.1 \pm 15.3\%$  ( $n = 16$ ) and  $65.3 \pm 9.5\%$  ( $n = 17$ ) of the mean corresponding values recorded on the same day in the fed control rats ( $100.0 \pm 15.1\%$ ;  $n = 15$ ). Such a difference only achieved statistical significance ( $P < 0.04$ ) when comparing the overall mean value recorded in both IF and CR rats ( $62.3 \pm 9.5\%$ ;  $n = 33$ ) to that found in the fed control rats.

In the STZ rats, the results of the IPGTT were closely comparable in 4 groups of NF animals examined 20 days after the injection of streptozotocin on day 10, 20, and 29 of the final experimental period. Hence, these results were pooled together. Likewise, the results of the IPGTT conducted on day 10, 20, and 29 of the final experimental period were pooled together in either the IF or CR STZ rats (Figure 3). The time zero glycemia was lower ( $P < 0.007$  or less) in IF rats than in either NF or CR rats, no significant difference ( $P > 0.24$ ) being observed between the latter two groups of STZ rats (Table 3). Likewise, the total AUC was lower ( $P < 0.001$ ) in IF rats than in either NF or CR rats, which

TABLE 3: IPGTT glycemic data in STZ rats.

Rats	Time zero (mM)	Total AUC (mM·min)	Incremental AUC (mM·min)	(n)
NF	27.84 ± 1.17	3,681 ± 155	279 ± 153	(20)
IF	17.97 ± 1.85	2,825 ± 174	668 ± 149	(15)
CR	25.38 ± 1.70	3,988 ± 194	943 ± 205	(17)

failed to differ significantly ( $P > 0.21$ ) from one another. The incremental area, however, was not significantly different ( $P > 0.08$  or more) in IF rats, as compared to either NF or CR rats, being only significantly higher ( $P < 0.02$ ) in the CR rats than in the NF diabetic rats.

#### 3.4. Plasma D-Glucose, Insulin Concentrations, and Insulino-genic and HOMA Indices at Sacrifice.

The plasma D-glucose

TABLE 4: Plasma D-glucose and insulin concentrations at sacrifice.

Rats		Plasma D-glucose (mM)	Plasma insulin ( $\mu\text{U/mL}$ )	Insulinogenic index (mU/mmol)	HOMA (mM $\cdot\mu\text{u/mL}$ )
Control	NF	8.61 $\pm$ 0.88 (5)	38 $\pm$ 6 (5)	8.63 $\pm$ 2.08 (5)	336 $\pm$ 73 (5)
	IF	8.12 $\pm$ 1.08 (5)	32 $\pm$ 2 (5)	9.44 $\pm$ 3.42 (5)	264 $\pm$ 45 (5)
	CR	7.80 $\pm$ 0.72 (6)	45 $\pm$ 2 (5)	14.61 $\pm$ 4.51 (5)	336 $\pm$ 68 (5)
STZ	NF	35.80 $\pm$ 2.47 (5)	16 $\pm$ 2 (5)	0.48 $\pm$ 0.08 (5)	548 $\pm$ 57 (5)
	IF	22.91 $\pm$ 4.30 (6)	22 $\pm$ 5 (6)	1.17 $\pm$ 0.51 (6)	419 $\pm$ 45 (6)
	CR	26.35 $\pm$ 4.20 (6)	25 $\pm$ 5 (6)	1.16 $\pm$ 0.52 (6)	592 $\pm$ 129 (6)

concentration was about 3-4 times higher in STZ rats than in control rats (Table 4). In the control rats, it was comparable ( $P > 0.49$  or more) in NF, IF, and CR animals (Table 4). In the STZ rats, however, the overall mean value found in the IF and CR animals ( $24.63 \pm 2.91$ ;  $n = 12$ ) was significantly lower ( $P < 0.04$ ) than that recorded in the NF STZ rats.

The plasma insulin concentration was about twice lower in STZ rats than in control animals. In the latter animals, the mean values recorded in either the IF or CR animals did not differ significantly ( $P > 0.26$  or more) from that found in the NF animals. Such was also the case ( $P > 0.15$  or more) in the STZ rats.

As illustrated in Figure 4, no significant correlation was observed between plasma insulin and D-glucose concentration in the 15 control animals ( $r = +0.0416$ ;  $P > 0.1$ ), whilst a highly significant negative correlation between these two variables prevailed in the 17 STZ rats ( $r = -0.6892$ ;  $P < 0.004$ ). Covariance analysis, however, indicated that the two regression lines failed to differ significantly from one another in either their slope ( $F = 0.567$ ;  $f = 1, 28$ ;  $P > 0.25$ ) or elevation ( $F = 2.156$ ;  $f = 1, 28$ ;  $P > 0.1$ ).

The insulinogenic index was much higher ( $P < 0.001$ ) in control rats ( $10.60 \pm 1.84$  mU/mmol;  $n = 15$ ) than in STZ animals ( $0.90 \pm 0.21$  mU/mmol;  $n = 17$ ). In each of these two sets of rats, no significant difference was found between NF, IF or CR animals. At the most, there was a trend ( $P < 0.09$ ) towards a higher value for the insulinogenic index in IF and CR diabetic rats ( $1.17 \pm 0.34$  mU/mmol;  $n = 12$ ) than in the NF STZ rats ( $0.48 \pm 0.08$  mU/mmol;  $n = 5$ ).

The HOMA index for insulin resistance did not differ significantly in the 3 groups of control rats, with an overall mean value of  $312 \pm 35$  mM $\cdot\mu\text{u/mL}$  ( $n = 15$ ). Such was also the case in the STZ rats, with an overall mean value of  $518 \pm 51$  mM $\cdot\mu\text{u/mL}$  ( $n = 17$ ) significantly higher ( $P < 0.004$ ) than that recorded in the control animals.

**3.5. Pancreatic Islet Data.** The release of insulin by islets prepared from control rats and incubated for 90 min at 8.3 mM D-glucose averaged  $87.3 \pm 12.7$   $\mu\text{U}/\text{islet}$  ( $n = 40$ ). As illustrated in Figure 5, the concentration-response relationship for insulin output at increasing concentration of the hexose was comparable in NF, IF, and CR control rats. At the most, there was a trend towards higher mean values in islets prepared from IF and CR control rats as distinct from NF control rats and incubated at 2.8 mM and 8.3 mM D-glucose. However, a significant difference between the mean values recorded at each D-glucose concentration in each type

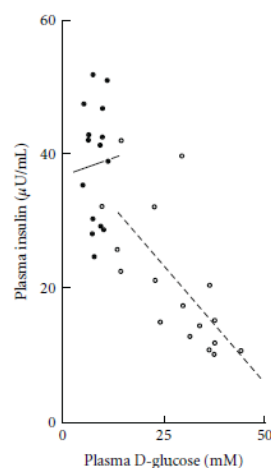


FIGURE 4: Comparison between plasma insulin and D-glucose concentrations found at sacrifice in control (closed circles and solid line) and STZ (open circles and dashed line) rats. The two oblique lines correspond to the regression lines.

of control rats (NF, IF, and CR) was only observed once ( $P < 0.02$ ) among nine comparisons.

The final insulin content of the islets prepared from control rats failed to differ significantly after incubation at 2.8, 8.3, or 16.7 mM D-glucose. Pooling all available data, it averaged, relative to the overall mean value recorded in each experiment after incubation at the three hexose concentrations,  $96.0 \pm 5.5\%$  ( $n = 39$ ),  $98.8 \pm 3.8\%$  ( $n = 40$ ), and  $105.0 \pm 3.3\%$  ( $n = 40$ ) in islets first exposed to 2.8, 8.3, and 16.7 mM, respectively. None of these mean values differed significantly from one another. Likewise, no significant difference was observed between the mean values for the insulin content of the islets prepared from NF control rats ( $347.2 \pm 18.0$   $\mu\text{U}/\text{islet}$ ;  $n = 30$ ) and either IF control rats ( $303.0 \pm 14.0$   $\mu\text{U}/\text{islet}$ ;  $n = 30$ ) or CR control rats ( $385.1 \pm 16.4$   $\mu\text{U}/\text{islet}$ ;  $n = 29$ ). In a further experiment conducted in IF control rats, the insulin content again failed to differ significantly from that recorded in the fed control rats after incubation at either 2.8 or 16.7 mM D-glucose. Only the mean value found in this further experiment in the islets from IF control rats after incubation at 8.3 mM happened to

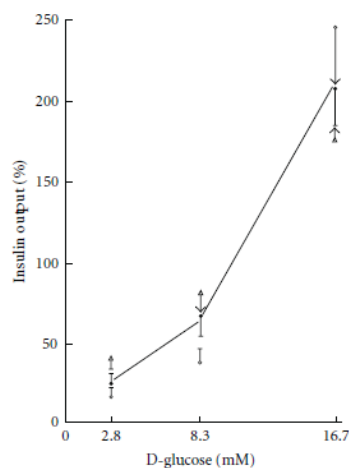


FIGURE 5: Insulin output by islets from NF control rats (open circles), IF control rats (closed circles), and CR control rats (open triangles) incubated at increasing concentrations of D-glucose. All results are expressed relative to the overall mean values recorded at the three concentrations of the hexose in each type of rats. Mean values ( $\pm$ SEM) refer to 10 (NF and CR rats) or 20 (IF rats) separate measurements, the SEM bar ending by an arrow whenever it exceeded the space to the next mean value. The solid line refers to the overall mean value recorded in the three groups of rats at each hexose concentration.

be lower ( $P < 0.01$ ) than that otherwise recorded under the same experimental condition in the fed control rats.

The release of insulin ( $\mu\text{U}/\text{islet}$  per 90 min) by islets prepared from STZ rats averaged, at 2.8, 8.3, and 16.7 mM D-glucose, respectively,  $2.08 \pm 0.91$  ( $n = 28$ ),  $4.01 \pm 1.01$  ( $n = 36$ ), and  $7.18 \pm 1.70$  ( $n = 36$ ). It was thus significantly higher ( $P < 0.02$ ) at 16.7 mM D-glucose than at 2.8 mM D-glucose. As judged from the mean values for insulin output and content measured in each experiment, the release of insulin represented  $32.7 \pm 11.7\%$  ( $n = 4$ ),  $43.0 \pm 19.4\%$  ( $n = 5$ ), and  $62.6 \pm 32.1\%$  ( $n = 5$ ) of the final insulin content of the islets after incubation at 2.8, 8.3, and 16.7 mM D-glucose, respectively. The insulin content of the islets prepared from STZ rats, expressed relative to the mean value found in each experiment in islets first incubated at 8.3 and 16.7 mM D-glucose ( $9.7 \pm 1.6 \mu\text{U}/\text{islet}$ ;  $n = 70$ ), averaged  $165.5 \pm 27.8\%$  ( $n = 28$ ) after exposure to 2.8 mM D-glucose,  $105.1 \pm 20.1\%$  ( $n = 35$ ) after exposure to 8.3 mM D-glucose, and  $94.8 \pm 17.4\%$  ( $n = 35$ ) after exposure to 16.7 mM D-glucose. Such a progressive decrease in insulin content as a function of the concentration of the hexose during incubation was validated by the significant difference ( $P < 0.03$ ) found between the highest and lowest of these three percentages. In these respects, no significant difference was observed between NF, IF and CR diabetic animals.

Both the insulin output and islet insulin content were dramatically lower in STZ rats than in control animals. For

instance, over 90 min incubation at 8.3 mM D-glucose, the mean insulin output by islets from STZ rats did not exceed  $4.01 \pm 1.01 \mu\text{U}/\text{islet}$  ( $n = 36$ ), as distinct from a mean value of  $87.3 \pm 12.7 \mu\text{U}/\text{islet}$  ( $n = 40$ ) in control animals. Likewise, after 90 min incubation at 2.8 mM D-glucose, the insulin content of the islets did not exceed  $5.9 \pm 1.3 \mu\text{U}/\text{islet}$  ( $n = 28$ ) in STZ rats, as distinct ( $P < 0.001$ ) from  $331.5 \pm 20.8 \mu\text{U}/\text{islet}$  ( $n = 29$ ) in control animals.

**3.6. Islet Immunocytochemistry.** The detection of insulin-producing cells by the ABC-DAB technique yielded comparable images in NF, IF and CR control rats (Figures 6(a), 6(b), and 6(c)). In the STZ rats, however, the same technique revealed a severe decrease in insulin staining, such a decrease being apparently most pronounced in the NF animals (Figures 6(d), 6(e), and 6(f)). The immunodetection of glucagon-producing cells, by a comparable ABC-DAB technique is illustrated in Figure 7. In the NF, IF, and CR control rats, the glucagon-producing cells were typically located at the periphery of the islets. In the STZ rats, however, an apparently increased number of glucagon-producing cells seemed to invade the center of the islets.

The relative value occupied by  $\beta$ -cells in serial sections of the whole pancreas did not exceed  $0.20 \pm 0.05\%$  ( $n = 9$ ) in STZ rats, as compared ( $P < 0.001$ ) to  $1.06 \pm 0.07\%$  ( $n = 9$ ) in control animals. The values recorded in the IF and CR control rats did not differ significantly ( $P > 0.23$ ) from those found in the NF control rats (Table 5). In the STZ rats, however, both the relative and absolute values for  $\beta$ -cell mass were higher ( $P < 0.07$  or less) in IF than NF animals, such not being the case when comparing CR and NF STZ rats. When multiplied by the weight of the pancreas measured after 5 min evaporation of formol, the total  $\beta$ -cell mass appeared somewhat lower in IF control rats ( $5.7 \pm 1.3 \text{ mg}$ ;  $n = 3$ ) than in either NF control rats ( $11.1 \pm 1.5 \text{ mg}$ ;  $n = 3$ ;  $P < 0.05$ ) or CR control rats ( $9.6 \pm 1.0 \text{ mg}$ ;  $n = 3$ ;  $P < 0.08$ ), with an overall mean value ( $8.8 \pm 1.0 \text{ mg}$ ;  $n = 9$ ) one order of magnitude higher ( $P < 0.001$ ) than that recorded in the STZ rats ( $1.5 \pm 0.4 \text{ mg}$ ;  $n = 9$ ). In these experiments, the mean pancreatic weight failed to differ significantly ( $P > 0.66$ ) in control animals ( $0.84 \pm 0.09 \text{ g}$ ;  $n = 9$ ) and STZ rats ( $0.79 \pm 0.04 \text{ g}$ ;  $n = 9$ ). In both cases, however, and relative to the mean values found in NF animals ( $100.0 \pm 2.8\%$ ;  $n = 6$ ), those recorded in the IF rats ( $68.9 \pm 7.5\%$ ;  $n = 6$ ) were significantly lower ( $P < 0.02$ ) than those measured in the CR rats ( $99.9 \pm 8.0\%$ ;  $n = 6$ ).

The latter data were in fair agreement with the direct measurement of pancreas wet weight at sacrifice with a paired ratio between the values obtained by direct measurement at sacrifice and those reached after fixation averaging  $97.7 \pm 4.2\%$  ( $n = 17$ ). Even when expressed relative to body weight, the pancreatic wet weight at sacrifice represented in the IF rats no more than  $80.8 \pm 5.5\%$  ( $n = 6$ ;  $P < 0.06$ ) of that recorded in the CR rats ( $100.0 \pm 6.6\%$ ;  $n = 7$ ) of the same group (control or STZ rats).

As indicated in Table 6, the individual  $\beta$ -cell area averaged in the STZ rats  $135.8 \pm 5.2\%$  ( $n = 60$ ;  $P < 0.001$ ) of the mean corresponding value found in control animals

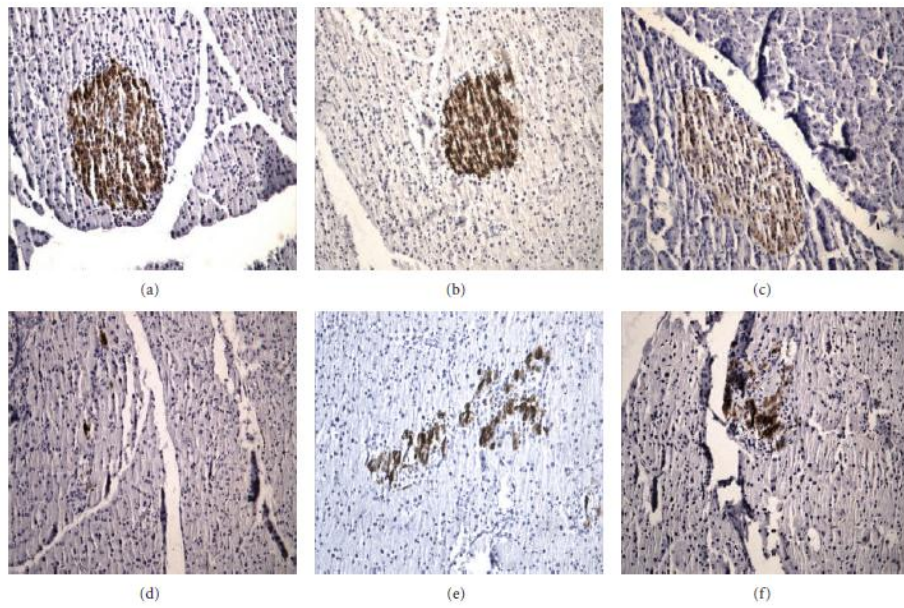


FIGURE 6: Immunodetection of insulin by the ABC-DAB technique in NF (a, d), IF (b, e), and CR (c, f) control (a, b, c) and STZ (d, e, f) rats.

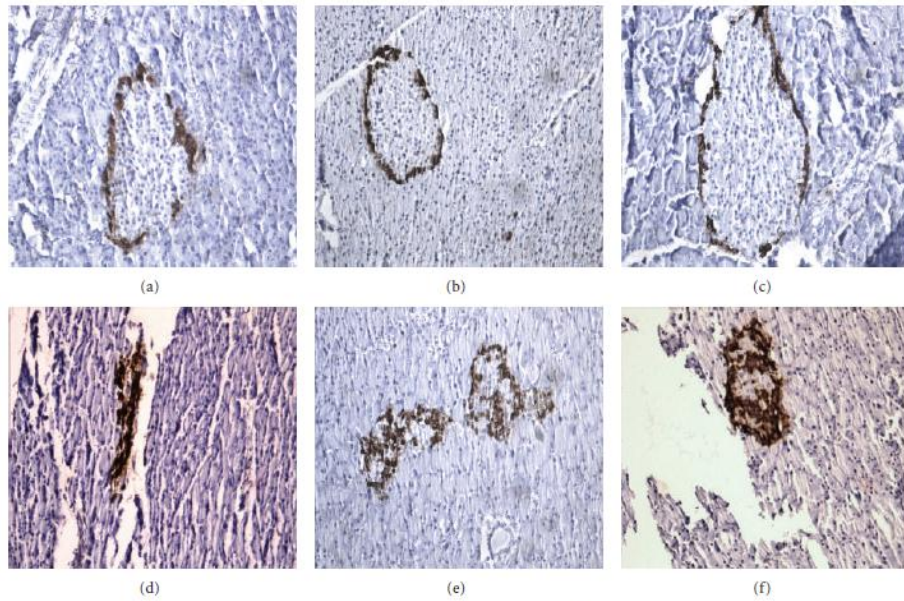


FIGURE 7: Immunodetection of glucagon by the ABC-DAB technique in NF (a, d), IF (b, e), and CR (c, f) control (a, b, c) and STZ (d, e, f) rats.

TABLE 5: Relative and absolute values for total  $\beta$ -cell mass.

Rats	Relative volume (%)	Pancreas weight (g)	$\beta$ -cell mass (mg)
Control NF	10.76 $\pm$ 0.73 (3)	1.03 $\pm$ 0.06 (3)	11.12 $\pm$ 1.46 (3)
Control IF	10.39 $\pm$ 2.04 (3)	0.55 $\pm$ 0.05 (3)	5.67 $\pm$ 1.28 (3)
Control CR	10.56 $\pm$ 0.70 (3)	0.92 $\pm$ 0.13 (3)	9.58 $\pm$ 0.95 (3)
STZ NF	1.11 $\pm$ 0.08 (3)	0.81 $\pm$ 0.01 (3)	0.90 $\pm$ 0.06 (3)
STZ IF	3.71 $\pm$ 0.88 (3)	0.68 $\pm$ 0.03 (3)	2.55 $\pm$ 0.64 (3)
STZ CR	1.31 $\pm$ 0.55 (3)	0.88 $\pm$ 0.06 (3)	1.20 $\pm$ 0.57 (3)

TABLE 6: Individual  $\beta$ -cell and islet area.

Rats	Sample	Individual $\beta$ -cell area ( $\mu\text{m}^2$ )	Individual islet areas ( $\text{mm}^2 \times 10^3$ )
Control NF	1	116.2 $\pm$ 3.0 (10)	23.72 $\pm$ 2.67 (10)
	2	102.4 $\pm$ 4.5 (10)	21.49 $\pm$ 1.85 (10)
Control IF	1	123.6 $\pm$ 8.5 (10)	24.15 $\pm$ 3.13 (10)
	2	130.9 $\pm$ 8.7 (10)	14.50 $\pm$ 1.50 (10)
Control CR	1	119.5 $\pm$ 8.3 (10)	23.30 $\pm$ 2.69 (10)
	2	117.3 $\pm$ 6.7 (10)	24.12 $\pm$ 1.61 (10)
STZ NF	1	157.1 $\pm$ 25.2 (10)	1.11 $\pm$ 0.23 (10)
	2	131.1 $\pm$ 11.9 (10)	1.57 $\pm$ 0.30 (10)
STZ IF	1	192.5 $\pm$ 14.0 (10)	3.34 $\pm$ 0.55 (10)
	2	186.4 $\pm$ 12.1 (10)	5.63 $\pm$ 1.18 (10)
STZ CR	1	145.4 $\pm$ 8.5 (10)	5.94 $\pm$ 1.13 (10)
	2	156.8 $\pm$ 8.4 (10)	4.20 $\pm$ 1.18 (10)

(100.0  $\pm$  2.3%;  $n = 60$ ) exposed to the same feeding schedule (NF, IF, or CR). Whether in control rats or STZ rats, the mean  $\beta$ -cell area was significantly higher ( $P < 0.04$  or less) in IF animals than in NF and/or CR animals. Thus, relative to the corresponding mean value found in the NF animals of the same group (control or STZ), that is, 100.0  $\pm$  5.0% ( $n = 40$ ), the values recorded in CR and IF animals averaged, respectively, 107.0  $\pm$  3.1% ( $n = 40$ ;  $P > 0.24$ ) and 123.9  $\pm$  4.3% ( $n = 40$ ;  $P < 0.001$ ), the latter mean value being also significantly higher ( $P < 0.003$ ) than the former one.

As also documented in Table 6, the individual islet area represented in STZ rats 14.8  $\pm$  1.9% ( $n = 60$ ;  $P < 0.001$ ) of that found in the control animals (100.0  $\pm$  4.5%;  $n = 60$ ) exposed to the same feeding schedule (NF, IF or CR). In the control animals, such a mean islet area (expressed as  $\text{mm}^2 \times 10^3$ ) was not significantly different in NF rats (22.6  $\pm$  1.6;  $n = 20$ ), IF rats (19.3  $\pm$  1.9;  $n = 20$ ), and CR rats (23.7  $\pm$  1.5;  $n = 20$ ). In the STZ animals, however, it increased from 1.34  $\pm$  0.19 ( $n = 20$ ) in the NF rats to 4.50  $\pm$  0.69 ( $n = 20$ ;  $P < 0.001$ ) in the IF rats and to 5.07  $\pm$  0.82 ( $n = 20$ ;  $P < 0.001$ ) in the CR rats, the latter two mean values failing to differ significantly ( $P > 0.59$ ) from one another.

Figure 8 illustrates the immunodetection of  $\beta$ -cells using rhodamine-labelled secondary antibody, and Figure 9 the immunodetection of apoptotic  $\beta$ -cells by the TUNEL procedure. In the control animals, the percentage of apoptotic islet  $\beta$ -cells was comparable in NF, IF, and CR rats, with an

overall mean value not exceeding 4.31  $\pm$  0.10% ( $n = 15$ ), as distinct ( $P < 0.001$ ) from 14.31  $\pm$  1.49% ( $n = 15$ ) in STZ rats (Table 7). In the latter rats, the values recorded in IF and CR animals (11.45  $\pm$  0.76%;  $n = 10$ ) appeared lower ( $P < 0.004$ ) than that found in the NF animals (20.03  $\pm$  2.90%;  $n = 5$ ), but the total number of  $\beta$ -cells examined in the NF STZ rats (101  $\pm$  1 cells;  $n = 5$ ) was much lower ( $P < 0.001$ ) than that examined in the IF and CR rats (663  $\pm$  62 cells;  $n = 10$ ). Incidentally, even the latter value remained much lower ( $P < 0.001$ ) than the total number of  $\beta$ -cells examined in the control animals (2,236  $\pm$  161 cells;  $n = 15$ ).

#### 4. Discussion

In the light of a prior study conducted in sand rats [11–13], the major aim of the present experiments was to investigate the potential benefit of intermittent fasting in STZ-induced diabetic rats. Parallel experiments were here conducted in control animals.

As expected, the glycemia (or plasma D-glucose concentration) and the total AUC during an IPGTT were much higher in STZ rats than in control animals. Even the incremental AUC during the IPGTT was higher ( $P < 0.006$ ) in STZ rats (608  $\pm$  105 mM·min;  $n = 52$ ) than in control animals (287  $\pm$  29 mM·min;  $n = 48$ ) despite a comparable initial increment in glycemia 30 min after the injection of D-glucose. Also, as expected, the plasma insulin concentration, the insulinogenic index, the secretion of insulin by isolated islets, their insulin content, the relative volume occupied by the  $\beta$ -cells in serial sections of the whole pancreas and the individual islet area were much lower in STZ rats than in control animals. Incidentally, a positive secretory response to D-glucose was still observed in isolated pancreatic islets from STZ rats, this coinciding with a progressive decrease in their final insulin content after incubation at increasing concentrations of D-glucose. Such a decrease was not observed, however, in pancreatic islets from control animals. Last, the HOMA for insulin resistance and percentage of apoptotic  $\beta$ -cells were also significantly higher in STZ rats than in control animals.

In terms of morphological findings, there was, as a rule, little to distinguish between NF, IF, and CR control animals. At the most, there was a trend ( $P < 0.02$ ) towards a higher individual  $\beta$ -cell area in IF than in NF control rats. Moreover, the pancreatic wet weight and, hence, total  $\beta$ -cell mass appeared lower ( $P < 0.04$  or less) in IF control rats than in NF control rats. A comparable situation ( $P < 0.02$ ) prevailed when comparing the pancreatic wet weight in IF STZ rats and NF STZ rats.

In the STZ rats, the major other changes attributable to differences in feeding schedule concerned, in terms of morphological findings, the relative and absolute values for  $\beta$ -cell mass, the individual  $\beta$ -cell and islet area and the percentage of apoptotic  $\beta$ -cells. In the IF STZ rats, the relative and absolute values for  $\beta$ -cell mass, as well as the individual  $\beta$ -cell area and islet area, were all higher than in NF STZ rats, whilst the percentage of apoptotic cells appeared lower in IF than NF STZ rats. In the CR STZ rats, comparable findings

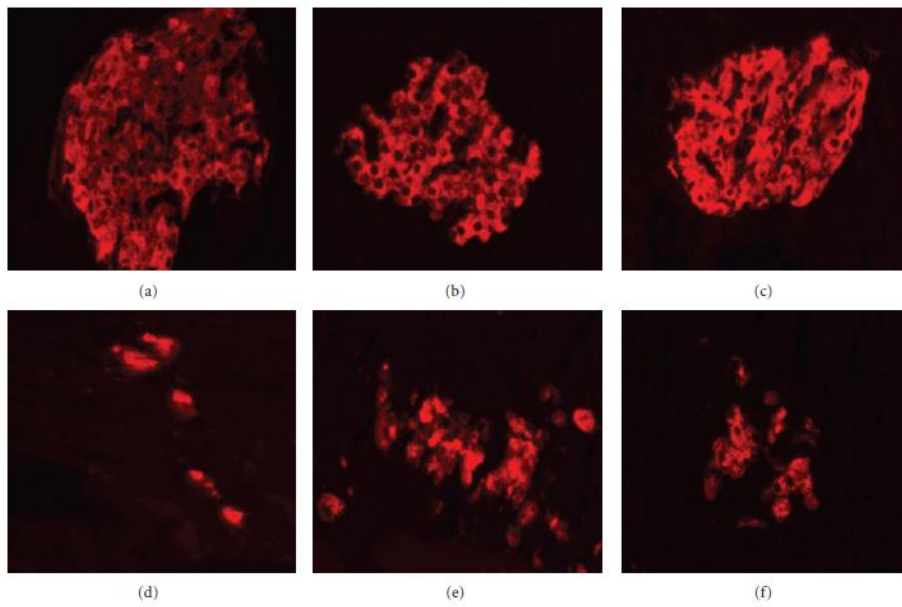


FIGURE 8: Immunodetection of insulin using rhodamine-conjugated secondary antibody in NF (a, d), IF (b, e), and CR (c, f) control (a, b, c) and STZ (d, e, f) rats.

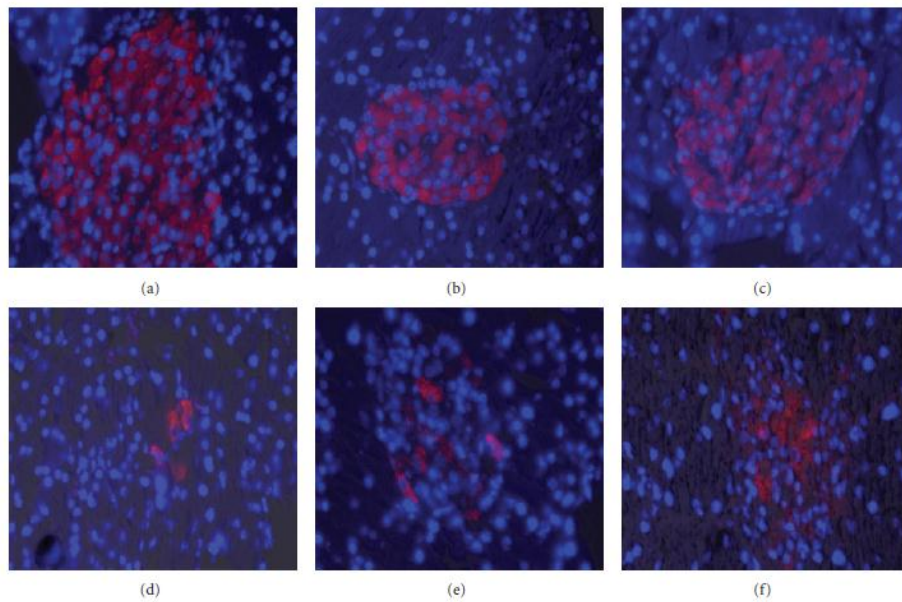


FIGURE 9: Detection of apoptotic  $\beta$ -cells by the TUNEL technique in insulin-stained pancreatic islet cells from NF (a, d), IF (b, e), and CR (c, f) control (a, b, c) and STZ (d, e, f) rats.

TABLE 7: Number and percentage of apoptotic  $\beta$ -cells.

Rats	TUNEL plus cell number	Total cell number	Apoptotic $\beta$ -cells (%)
Control NF	113 $\pm$ 14 (5)	2,452 $\pm$ 325 (5)	4.65 $\pm$ 0.21 (5)
Control IF	70 $\pm$ 7 (5)	1,732 $\pm$ 152 (5)	4.02 $\pm$ 0.10 (5)
Control CR	107 $\pm$ 12 (5)	2,525 $\pm$ 219 (5)	4.26 $\pm$ 0.07 (5)
STZ NF	19 $\pm$ 2 (5)	101 $\pm$ 17 (5)	20.03 $\pm$ 2.90 (5)
STZ IF	68 $\pm$ 5 (5)	643 $\pm$ 66 (5)	10.68 $\pm$ 0.38 (5)
STZ CR	90 $\pm$ 23 (5)	683 $\pm$ 113 (5)	12.22 $\pm$ 1.46 (5)

were restricted to the individual islet area and percentage of apoptotic cells.

The much higher percentage of apoptotic  $\beta$ -cells in STZ rats, as compared to control animals, is likely attributable to two major factors. First, the  $\beta$ -cell cytotoxic effect of STZ should not be ignored. According to Morimoto et al. [22], apoptosis of  $\beta$ -cells is already detected 6 hours after the injection of STZ, even before the onset of hyperglycemia. In this respect, it should be kept in mind that 3 to 14 days after STZ administration, infiltration of the islets by mononuclear cells takes place, eventually resulting in the removal of apoptotic cells by unspecific macrophages [23, 24]. Hence, the present data may well underestimate the apoptosis index otherwise prevailing during the first days after STZ administration. A second factor consists of the hyperglycemia resulting from STZ administration, since *in vitro* exposure of pancreatic islets to high concentrations of glucose also induces  $\beta$ -cell apoptosis [24].

The latter process may account, in part at least, for the apparent differences between IF and CR STZ rats, in terms of both relative  $\beta$ -cell mass and individual  $\beta$ -cell area. Thus, according to the data listed in Tables 3 and 4, the glycemia (or plasma D-glucose concentration) after overnight starvation, expressed relative to the mean corresponding values found in NF STZ rats averaged in the IF STZ rats 64.9  $\pm$  5.7% ( $n = 21$ ), as distinct ( $P < 0.01$ ) from 86.6  $\pm$  5.6% ( $n = 23$ ) in the CR STZ rats. The mean values for both the total and incremental AUC during the IPGTT were also higher in CR STZ rats than in IF STZ rats (Table 3). Such differences in glucose homeostasis coincided with higher mean values for both the relative volume of  $\beta$ -cells and their individual area in IF STZ rats as distinct from CR STZ rats (Tables 5 and 6). Thus, the mean relative value of  $\beta$ -cells was almost twice higher in IF than CR STZ rats, whilst the mean individual  $\beta$ -cell area represented in the IF STZ rats 125.4  $\pm$  6.0% ( $n = 20$ ;  $P < 0.002$ ) of that found in CR STZ rats (100.0  $\pm$  4.0%;  $n = 20$ ). Despite the vastly different magnitude of the IF/CR ratio for these two variables, the difference between CR and IF STZ rats remained highly significant ( $P < 0.005$ ) when pooling together the results recorded for each of these variables.

The individual  $\beta$ -cell area was also always significantly higher in STZ rats than in control animals exposed to the same dietary schedule (Table 6). These converging findings concerning differences in individual  $\beta$ -cell area as a function of glucose tolerance are reminiscent of the hypertrophy of  $\beta$ -cells found either *in vitro* after exposure to a high

concentration of D-glucose [25] or *in vivo* in rats which became hyperglycemic after partial pancreatectomy [26] and currently ascribed to a compensatory mechanism in residual  $\beta$ -cells no more susceptible to undergo mitosis [27].

The latter consideration is not meant to deny that in addition to  $\beta$ -cell hypertrophy, an increase in  $\beta$ -cell number, possibly attributable to transdifferentiation of glucagon-producing to insulin-producing cells [28, 29], may participate in the difference in relative or total  $\beta$ -cell mass between NF and IF STZ rats, as also suggested by the total cell numbers listed in Table 7.

A beneficial effect of intermittent fasting from 5 p.m. to 8 a.m. in STZ rats was documented by a decrease in glycemia at time zero of the IPGTT; a decrease in the total glycaemic AUC during the IPGTT; a lower plasma D-glucose concentration at sacrifice after overnight starvation, and a trend towards a higher plasma insulin concentration and insulinogenic index and a lower HOMA index at sacrifice. For the latter three variables, the geometric means of the relevant variable (plasma insulin concentration, insulinogenic index, and inverse of HOMA index) yielded a significant difference ( $P < 0.025$ ) between NF (100.0  $\pm$  6.9%;  $n = 15$ ) and IF (164.4  $\pm$  29.5%;  $n = 18$ ) STZ rats. Furthermore, no significant adverse effect of intermittent fasting ( $P > 0.49$ ) was observed in terms of the changes in body weight of the STZ rats over the 30 days final experimental period, when comparing NF animals (-12.4  $\pm$  2.8 g;  $n = 5$ ) to IF rats (-18.8  $\pm$  7.9 g;  $n = 6$ ).

A different situation prevailed in the calorie-restricted STZ rats. No statistically significant beneficial effects of caloric restriction in the STZ rats was observed when comparing NF to CR diabetic animals. Moreover, the decrease in body weight observed in the STZ rats during the final 30 days experimental period was 2.5 to 3.8 times higher ( $P < 0.001$ ) in CR rats than in IF and NF animals, respectively.

Even in control rats, the gain in body weight was much lower in CR animals than in IF ones (Figure 1). This coincided with lower mean values for the plasma insulin concentration, insulinogenic index, and HOMA index in IF control rats than in CR control rats examined at sacrifice after overnight starvation (Table 4). Thus, for these three variables, the values recorded in IF control rats averaged 71.6  $\pm$  8.6% ( $n = 15$ ;  $P < 0.06$ ) of the mean corresponding values found in CR control rats (100.0  $\pm$  11.5%;  $n = 15$ ). Since such distinctions between IF and CR control rats could not be ascribed to any difference in either food intake or the responsiveness to D-glucose of isolated pancreatic islets incubated *in vitro*, they suggest a more stressful situation in CR control rats than in IF control animals. To a large extent, a comparable situation may prevail in CR as distinct from IF diabetic animals.

In conclusion, therefore, the present study allows to extend to streptozotocin-induced diabetic rats, the proposal that intermittent fasting exerts a beneficial effect on glucose tolerance [11–13]. In our opinion, such a dietary approach merits to be also considered as a possible approach to prevent or minimize, if not correct, disturbances of glucose homeostasis in human subjects.

## Acknowledgment

The authors are grateful to C. Demesmaecker for secretarial help.

## References

- [1] P. J. Arciero, M. D. Vukovich, J. O. Holloszy, S. B. Racette, and W. M. Kohrt, "Comparison of short-term diet and exercise on insulin action in individuals with abnormal glucose tolerance," *Journal of Applied Physiology*, vol. 86, no. 6, pp. 1930–1935, 1999.
- [2] T. P. Markovic, L. V. Campbell, S. Balasubramanian et al., "Beneficial effect on average lipid levels from energy restriction and fat loss in obese individuals with or without type 2 diabetes," *Diabetes Care*, vol. 21, no. 5, pp. 695–700, 1998.
- [3] A. C. Gazdag, T. J. Wetter, R. T. Davidson et al., "Lower calorie intake enhances muscle insulin action and reduces hexosamine levels," *The American Journal of Physiology*, vol. 278, no. 2, pp. R504–R512, 2000.
- [4] T. J. Wetter, A. C. Gazdag, D. J. Dean, and G. D. Cartee, "Effect of calorie restriction on in vivo glucose metabolism by individual tissues in rats," *The American Journal of Physiology*, vol. 276, pp. 728–738, 1999.
- [5] D. E. Kelley, R. Wing, C. Buonocore, J. Sturis, K. Polonsky, and M. Fitzsimmons, "Relative effects of calorie restriction and weight loss in noninsulin-dependent diabetes mellitus," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 77, no. 5, pp. 1287–1293, 1993.
- [6] M. P. Christiansen, P. A. Linfoot, R. A. Neese, and M. K. Hellerstein, "Effect of dietary energy restriction on glucose production and substrate utilization in type 2 diabetes," *Diabetes*, vol. 49, no. 10, pp. 1691–1699, 2000.
- [7] J. K. Kirk, D. E. Graves, T. E. Craven, E. W. Lipkin, M. Austin, and K. L. Margolis, "Restricted-carbohydrate diets in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis," *Journal of the American Dietetic Association*, vol. 108, no. 1, pp. 91–100, 2008.
- [8] D. S. Weigle, P. B. Druell, W. E. Connor, R. A. Steiner, M. R. Soules, and J. L. Kuijper, "Effect of fasting, refeeding, and dietary fat restriction on plasma leptin levels," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 82, no. 2, pp. 561–565, 1997.
- [9] R. M. Anson, Z. Guo, R. de Cabo et al., "Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 10, pp. 6216–6220, 2003.
- [10] K. Oishi, N. Ohkura, J. Matsuda, and N. Ishida, "Food deprivation induces adipose plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression without accumulation of plasma PAI-1 in genetically obese and diabetic db/db mice," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 98, no. 4, pp. 864–870, 2007.
- [11] L. Belkacemi, G. Selselet-Attou, A. Sener, and W. J. Malaisse, "Intermittent fasting modulation of the diabetic syndrome in sand rats. I. Background information and experimental design," *Metabolic and Functional Research on Diabetes*, vol. 2, pp. 5–8, 2009.
- [12] L. Belkacemi, G. Selselet-Attou, K. Louchami, A. Sener, and W. J. Malaisse, "Intermittent fasting modulation of the diabetic syndrome in sand rats. II. In vivo investigations," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 26, no. 5, pp. 759–765, 2010.
- [13] L. Belkacemi, G. Selselet-Attou, N. Bulur, K. Louchami, A. Sener, and W. J. Malaisse, "Intermittent fasting modulation of the diabetic syndrome in sand rats. III. Post-mortem investigations," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 27, no. 1, pp. 95–102, 2011.
- [14] F. Horio, S. Teradaira, T. Imamura et al., "The HND mouse, a nonobese model of type 2 diabetes mellitus with impaired insulin secretion," *European Journal of Endocrinology*, vol. 153, no. 6, pp. 971–979, 2005.
- [15] P. P. Lam, Y. M. Leung, L. Sheu et al., "Transgenic mouse overexpressing syntaxin-1A as a diabetes model," *Diabetes*, vol. 54, no. 9, pp. 2744–2754, 2005.
- [16] H. U. Bergmeyer and E. Berndt, "Glucose determination with glucose oxidase and peroxidase," in *Methods of Enzymatic Analysis*, H. U. Bergmeyer, Ed., pp. 1205–1215, Academic Press, New York, NY, USA, 1974.
- [17] V. Leclercq-Meyer, J. Marchand, and M. C. Woussen-Colle, "Multiple effects of leucine on glucagon, insulin, and somatostatin secretion from the perfused rat pancreas," *Endocrinology*, vol. 116, no. 3, pp. 1168–1174, 1985.
- [18] F. Malaisse-Lagae and W. J. Malaisse, "Insulin release by pancreatic islets," in *Methods in Diabetes Research*, J. Larner and S. Pohl, Eds., vol. 1, part B, pp. 147–152, John Wiley & Sons, New York, NY, USA, 1984.
- [19] W. J. Malaisse, C. Maggetto, V. Leclercq-Meyer, and A. Sener, "Interference of glycogenolysis with glycolysis in pancreatic islets from glucose-infused rats," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 91, no. 2, pp. 432–436, 1993.
- [20] S. M. Hsu, L. Raine, and H. Fanger, "Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures," *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 29, no. 4, pp. 577–580, 1981.
- [21] M. Biarnés, M. Montolio, V. Nacher, M. Raurer, J. Soler, and E. Montanya, "β-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia," *Diabetes*, vol. 51, no. 1, pp. 66–72, 2002.
- [22] S. Morimoto, C. A. Mendoza-Rodríguez, M. Hiriart, M. E. Larrieta, P. Vital, and M. A. Cerbón, "Protective effect of testosterone on early apoptotic damage induced by streptozotocin in rat pancreas," *Journal of Endocrinology*, vol. 187, no. 2, pp. 217–224, 2005.
- [23] Z. Li, F. A. Karlsson, and S. Sandler, "Islet loss and alpha cell expansion in type 1 diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin administration in mice," *Journal of Endocrinology*, vol. 165, no. 1, pp. 93–99, 2000.
- [24] S. Lenzen, "The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes," *Diabetologia*, vol. 51, no. 2, pp. 216–226, 2008.
- [25] H. E. Miley, E. A. Shearer, P. D. Brown, and L. Best, "Glucose-induced swelling in rat pancreatic β-cells," *Journal of Physiology*, vol. 504, no. 1, pp. 191–198, 1997.
- [26] J. C. Jonas, A. Sharma, W. Hasenkamp et al., "Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic β cell differentiation in an animal model of diabetes," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 20, pp. 14112–14121, 1999.
- [27] G. C. Weir, D. R. Laybutt, H. Kaneto, S. Bonner-Weir, and A. Sharma, "β-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes," *Diabetes*, vol. 50, supplement 1, pp. S154–S159, 2001.
- [28] Z. Liu and J. F. Habener, "Alpha cells beget beta cells," *Cell*, vol. 138, no. 3, pp. 424–426, 2009.
- [29] P. Collombat, X. Xu, P. Ravassard et al., "The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into α and subsequently β cells," *Cell*, vol. 138, no. 3, pp. 449–462, 2009.



# **CURRICULUM VITAE**

---

# Curriculum Vitae

## Informations personnelles.

---

**Nom** : BELKACEMI

**Prénom** : Louiza

**Situation Familiale** : Mariée

**Date et Lieu de Naissance** : 03.08.1977 à Mostaganem

**Nationalité** : Algérienne.

**Adresse** : Bat E n°21 cité des 296 logts Tigditt. Mostaganem

**Email** : lbelkacemi@hotmail.fr.

## Diplômes.

---

**1994** : Baccalauréat en Science de la Nature et de la Vie (mention A.bien).

**Juin 2000** : Diplôme d'ingénieur d'état en génie biologique à l'USTHB (Bab ezzouar, Alger).

**Juin 2005** : Diplôme de magister en agronomie à l'université de Mostaganem.

**Décembre 2005 à ce jour** : Préparation d'une thèse de doctorat en sciences agronomiques.

**Février 2011** : Obtention d'un certificat belge pour la manipulation des animaux de laboratoire.

**Juin 2011** : Diplôme de licence en lettres anglaises à l'université de Mostaganem

## Expériences professionnelles.

---

**Septembre 2005 à ce jour** : Enseignante à l'université de Mostaganem au département de Biotechnologie (Maitre assistante catégorie A).

**Janvier 2004 - Juillet 2005** : Pré-emploi au sein de la chambre de pêche et d'aquaculture de la wilaya de Mostaganem.

**Février 2004 - Juin 2005** : Enseignante vacataire à l'université de Mostaganem, au département d'agronomie assurant le module de biologie moléculaire au 3<sup>ème</sup> année biotechnologie.

**Janvier - Mai 2001 :** Enseignante vacataire de lettres françaises au CEM Belaid Toufik à Mostaganem.

## **Stages et bourses.**

---

**Juin 1999- Juin 2000 :** Stage au service de microbiologie du laboratoire régional du groupe avicole de l'ouest (GAO, Mostaganem).

**Juin 2003- Décembre 2004 :** Stage au laboratoire de l'hôpital de Ain Tedless de Mostaganem (service d'analyses biochimiques).

**Juin 2003- Décembre 2004 :** Stage au niveau de la maison des diabétiques de la wilaya de Mostaganem.

**Décembre 2006- Février 2007 :** Stage au laboratoire vétérinaire de Mostaganem (service d'histologie anatomie pathologie).

**20 octobre au 13 novembre 2008 :** Stage en Belgique dans le cadre de la thèse de doctorat, au sein du laboratoire d'hormonologie expérimentale (faculté de médecine, ULB).

**06 octobre 2009 au 31 août 2010:** bourse d'étude PNE pour finalisation de la thèse de doctorat, au sein du laboratoire d'hormonologie expérimentale (faculté de médecine, ULB).

**Avril 2010 :** Formation FSTAL pour la manipulation des animaux de laboratoire.

## **Publications et communications :**

---

### **Publications :**

- **Belkacemi L**, Selselet-Attou G, Hupkens E, Nguidjoe E, Louchami K, Sener A, Malaisse WJ (2012). Intermittent fasting modulation of the diabetic syndrome in streptozotocin-injected rats. *Int. J. Endocrinol* 2012:12 pages.
- **Belkacemi, L**, Selselet-Attou G (2011). Mini-review: Intermittent fasting: a caloric restriction alternative for diabetes, cardiovascular disease and diabetic nephropathy prevention. *MEFRED* 4: 9-11.
- **Belkacemi, L**, Selselet-Attou G, Bulur N, Louchami K, Sener A, Malaisse WJ (2011). Intermittent fasting modulation of the diabetic syndrome in sand rats. III. Post-mortem investigations. *International Journal of Molecular Medicine* 27: 95-102.

- **Belkacemi L**, Selselet-Attou G, Louchami K, Sener A, Malaisse WJ (2010). Intermittent fasting modulation of the diabetic syndrome in sand rats. II. In vivo investigations. *International Journal of Molecular Medicine* 26: 759-765
- Ait saada, D., Selselet attou, G., **Belkacemi, L.**, Ait chabane, O., Italhi, M., Bekada, A. M. A. and Kati, D (2010). Effect of Ramadan fasting on glucose, glycosylated haemoglobin, insulin, lipids and proteinous concentrations in women with non-insulin dependent diabetes mellitus. *African Journal of Biotechnology*: Vol. 9 (1), pp. 087-094.
- **Belkacemi, L**, Selselet-Attou G, Sener A, Malaisse WJ (2009). Intermittent fasting modulation of the diabetic syndrome in sand rats. I. Background information and experimental design. *Met Funct Res Diab*: Vol 2: 5-8.

### **Communications orales et écrites:**

- **Belkacemi, L**, Hupkens, E, Nguidjoe, E, Louchami K, Selselet-Attou G Sener A, Malaisse WJ (2012). Effet du jeûne intermittent sur les îlots pancréatiques de rats wistar diabétiques. 1<sup>er</sup> congrès international de la société Algérienne de nutrition. 5 et 6 décembre, Oran, Algérie.
- **Belkacemi, L**, Selselet-Attou G, Hupkens, E, Nguidjoe, E, Louchami K, Sener A, Malaisse WJ (2011). A comparative study of intermittent fasting and caloric restriction effect on diabetic syndrome in streptozotocin-injected rats. Oral communication in 3<sup>rd</sup> International Brussels Pancreatic Islet Symposium, Brussels, Belgium, July 3-5.
- **Belkacemi, L**, Selselet-Attou G, Bulur N, Louchami K, Sener A, Malaisse WJ (2011). Effet du jeûne intermittent sur la stéatose hépatique chez le rat de sable atteint de diabète de type 2. Présentation orale à la 2<sup>ème</sup> journée de doctorants de l'université de Mostaganem.
- **Belkacemi, L**, Selselet-Attou G, Bulur N, Louchami K, Sener A, Malaisse WJ (2010). Intermittent fasting Ramadan mimic improves insulin sensitivity in diet-induced diabetic sand rats. Poster in 1<sup>st</sup> international congress of Controversies in Longevity, health and aging (CoLONGY), Barcelona, Spain, June 24-27.
- **Belkacemi, L.**, G. Selselet-Attou, K. Louchami, A. Sener, W.J.Malaisse (2009). Effet du jeûne intermittent sur la dyslipidémie chez le Psammomys obesus. Poster au 4<sup>ème</sup> congrès de la société Française de nutrition, Montpellier 10-12 décembre.

- **Belkacemi, L., G. Selselet-Attou, K. Louchami, N. Bulur, A. Sener, W.J.Malaisse (2009).** Effect of intermittent fasting on glucose homeostasis in Psammomys obesus rats. Oral communication in 2nd International Brussels Pancreatic Islet Symposium, June 18-21.

## **Encadrements pour projet de fin d'étude.**

---

**2005-2006 :** Encadrement d'un binôme en génie biologique sur l'évaluation de quelques paramètres lipidiques au cours de la ménopause.

**2006-2007 :** Encadrement d'étudiantes (3 binômes et un monôme) en génie biologique sur les thèmes suivants :

- Effet du mauvais contrôle glycémique sur les paramètres lipidiques chez les diabétiques de type 2.
- Etude de l'obésité comme facteur de risque de l'athérosclérose.
- Etude de certains paramètres lipidiques au cours du développement du diabète chez les rats de sable : Psammomys obesus.
- Effet d'un régime hypercalorique sur l'homéostasie glucidique chez les rats de sable : Psammomys obesus.

**2007-2008 :** Encadrement d'étudiants en génie biologique (2 binômes) et en biotechnologie (monôme) sur les thèmes suivants :

- Etude de l'effet du jeûne intermittent prolongé sur le métabolisme lipidique chez des gerbilles de sable ; Psammomys obesus.
- Etude de l'effet du jeûne intermittent prolongé sur la stéatose hépatique non alcoolique chez des gerbilles de sable ; Psammomys obesus diabétiques et /ou obèses.

**2008-2009 :** Encadrement d'étudiants en biotechnologie (binôme) sur le thème : Etude comparative de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de trois écotypes de Thymus vulgaris issus de la région de Béchar, Mostaganem et Oum El Bouaghi.

## **Compétences.**

---

- 1- Microbiologie (culture et identification bactérienne, chromatogramme)
- 2- Développement du diabète de type 2 (Psammomys obesus et n5-stz rats néonataux) et du diabète de type 1 par streptozotocine.
- 3- Technique d'histologie et d'immunohistochimie.
- 4- Quelques techniques de biologie moléculaire (extraction d'acides nucléiques, PCR, RT-PCR)
- 5- Isolation d'îlots pancréatiques de rat et sécrétion statique d'insuline.

6- Dosage biochimiques.

**Informatique:** Word, Excel, Power Point.

**Langues maîtrisées :** Français : lu et parlé.

Anglais : lu et parlé.