



## Physiopathologie

### Impact d'une hyperhomocystéinémie sur l'histo-morphométrie et l'histochimie du pancréas chez le rat des sables, *Psammomys obesus*

Impact of hyperhomocysteinemia on histo-morphometry and histochemistry of pancreas in sand rat, *Psammomys obesus*

Billel CHAOUAD<sup>1,2</sup>, Adel GHOUL<sup>1</sup>, Fouzia ZERROUK<sup>1</sup>, Anissa MOULAHOUM<sup>1</sup>, Leila KHEDIS<sup>1</sup>, Khira OTHMANI-MECIF<sup>1</sup>, Yasmina BENZAOUZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene. Faculté des Sciences Biologiques. Biochimie et Remodelage de la Matrice Extracellulaire. Laboratoire Biologie Cellulaire et Moléculaire. USTHB. BP 32 Bab Ezzouar. El Alia. 16111. Alger. Algérie.

<sup>2</sup>Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre. Route de Theniet El Had. 44225, Khemis Miliana, Algérie.

Auteur correspondant : ybenaz01@hotmail.com

Reçu le 18 avril 2018, Révisé le 10 juin 2018, Accepté le 30 juin 2018

**Résumé Introduction.** Le rat des sables, *Psammomys obesus*, rongeur diurne qui vit dans le sud-est du Sahara algérien est un excellent modèle animal pour l'étude du diabète, de l'athérosclérose et du syndrome métabolique. L'hyperhomocystéinémie (Hhcy), définie par l'augmentation plasmatique de l'homocystéine, est associée à plusieurs maladies qui touchent différents organes (cœur, vaisseaux sanguins, foie,...).

**Objectif.** L'objectif de ce travail est de déterminer l'effet d'une Hhcy sur la matrice extracellulaire pancréatique de rat des sables. **Matériel et méthodes.** Les Rats sont répartis en 2 lots, un lot témoin soumis à un régime naturel de plantes halophiles de la famille des Chenopodiaceae (*Suaeda mollis*) et un lot traité recevant le même régime associé à une administration de méthionine (150mg/kg de poids corporel/jour) pendant 6 mois par voie intrapéritonéale. Des analyses histologiques et histochimiques du pancréas des *Psammomys* ont été réalisées et complétées par une étude morphométrique. **Résultats.** L'excès de méthionine provoque une hyperhomocystéinémie chez *Psammomys obesus*. Plusieurs altérations matricielles sont observées au niveau pancréatique, marquées par l'accumulation des collagènes fibrillaires et des glycoprotéines signalant une fibrose. Cette accumulation est notée dans les îlots de Langerhans et dans le pancréas exocrine (tissu interstitiel, autour des vaisseaux sanguins

et des canaux excréteurs). Une désorganisation de la paroi vasculaire et une stéatose micro- et macro-vacuolaires sont également observées dans le pancréas des rats hyperhomocystéinémiques. **Conclusion.** L'hyperhomocystéinémie, générée par un excès de méthionine, conduit à un remodelage de la matrice extracellulaire pancréatique chez *Psammomys obesus*.

**Mots clés :** *Histologie, Hyperhomocystéinémie, Méthionine, Pancréas, Psammomys obesus*

**Abstract Introduction.** The sand rat, *Psammomys obesus*, a diurnal rodent, which lives in the south-east of the Algerian Sahara, is an excellent animal model for the study of diabetes, atherosclerosis, and metabolic syndrome. Hyperhomocysteinemia (Hhcy), defined by high plasma homocysteine level, is associated with many diseases affecting various organs (heart, blood vessels, liver...). **Objectives.** The objective of this study was to determine the effect of Hhcy on the sand rats pancreas. **Material and methods.** The rats were divided into two groups: a control group received its natural diet with halophile plant of the Chenopodiaceae family (*Suaedamollis*), and an experimental group received the same diet associated with an intraperitoneal administration of methionine (150 mg/kg body weight/day) during 6 months. Histological and histochemical analysis of *Psammomys* pancreas were realized and completed by a morphometric study. **Results.** The methionine excess led to a hyperhomocysteinemia in *Psammomys obesus*. Several alterations were observed in pancreas extracellular matrix of hyperhomocysteinemic rats, marked by an accumulation of fibrillar collagens, and glycoproteins leading to a fibrosis. This accumulation was observed in the Langerhans islets, and in the exocrine pancreas (interstitial tissue, around blood vessels, and excretory channels). A disorganization of the vascular wall, and a micro- and macrovesicular steatosis were also observed in the pancreas of hyperhomocysteinemic rats. **Conclusion.** The hyperhomocysteinemia, generated by the methionine excess, leads to a pancreatic extracellular matrix remodeling in *Psammomys obesus*.

**Key words:** *Methionine, Hyperhomocysteinemia, Pancreas, Histology, Psammomys obesus*

## Introduction

L'hyperhomocystéinémie (Hhcy), une augmentation du taux plasmatique en homocystéine, est associée à plusieurs pathologies telles que les maladies cardiovasculaires [1], l'hypothyroïdie [2], l'ostéo-porose [3], la maladie d'Alzheimer et de Parkinson [4], et le diabète de type 2 [5]. Des facteurs nutritionnels, génétiques et environnementaux sont responsables d'une augmentation de la concentration plasmatique en homocystéine. En effet, une déficience en acide folique, en vitamine B6 ou en vitamine B12 [6], ainsi que des mutations touchant le gène de la méthylène tétra hydro folate réductase (MTHFR), une enzyme impliquée dans le métabolisme de l'homocystéine sont responsables d'une hyperhomocystéinémie [7]. Outre ces facteurs, plusieurs études ont montré

l'incrimination d'un régime riche en méthionine dans cette hyperhomocystéinémie [8,9,1].

L'homocystéine est considérée comme un facteur pro-oxydant, potentiellement impliqué dans la genèse d'un stress oxydatif [10-11]. Ce facteur favorise la peroxydation lipidique qui induit une réponse inflammatoire [12]. L'homocystéine produit, également, une dysfonction endothéliale et stimule l'agrégation plaquettaire dont le risque de thrombose [13]. Par ailleurs, l'implication de l'homocystéine dans la prolifération cellulaire et dans la synthèse des collagènes peut attribuer à cette molécule un rôle dans l'expression génique et dans la transduction de signal. Différentes cellules sont impliquées dans cette signalisation, en particulier les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les cardiomyocytes [14].

Dans ce travail, la répercussion d'une Hhcy, induite par l'administration de la méthionine, est analysée sur l'histo-morphométrie et l'histochimie du pancréas de rat des sables, *Psammomys obesus*.

## Matériel et méthodes

### Matériel biologique

Cette étude est réalisée sur un modèle expérimental de la classe des gerbillidés, *Psammomys obesus*, rongeur déserticole capturé dans la région de M'Sila, Algérie. Après une période d'adaptation de 15 jours au laboratoire, les rats sont divisés en deux lots, un lot témoin (n=6) de poids corporel moyen de 84,53±22,08g reçoit quotidiennement 50g de plante halophile et un lot expérimental (n=9) de poids corporel moyen de 86,97±14,99g, reçoit également chaque jour 50g de plantes halophiles et injecté, par voie intra péritonéale, de 150mg de méthionine/kg/jour, pendant 6 mois. La méthionine est préalablement dissoute dans l'eau physiologique (0,9%).

### Dosage de l'homocystéine plasmatique

Le dosage de l'homocystéine plasmatique est réalisé par la méthode immuno-enzymatique par polarisation de fluorescence (FPIA). En effet, toutes les formes d'homocystéine, présentes dans l'échantillon, sont réduites en homocystéine libre sous l'action du dithiothréitol. L'Homocystéine libre totale est transformée en S-adénosyl-L-homocystéine (SAH) par la SAH-hydrolase, en présence d'un excès d'adénosine. L'échantillon qui ne contient finalement que le SAH est mélangé avec deux réactifs, l'un contient un anticorps monoclonal anti-SAH et l'autre contient un traceur S-adénosyl-L-cystéine marqué à la fluorescéine. La SAH et le traceur marqué entrent en compétition pour occuper les sites de liaison sur l'anticorps anti-SAH. L'intensité de la polarisation de fluorescence est mesurée par le système optique d'un analyseur (IMx Abbott).

### Technique histologique

A la fin de l'expérimentation, les animaux sont euthasiés puis disséqués. Les organes prélevés sont rapidement fixés dans le formol à 10% pendant 2 jours puis déshydratés dans des bains d'alcool de degré croissant (50°, 70°, 90° et 100°). Les organes sont ensuite éclaircis dans 2 bains de butanol puis imprégnés dans la paraffine fondue. Après la mise en blocs, les organes sont coupés à l'aide d'un microtome de type Lab-Kite. Les coupes obtenues sous forme de rubans de 5µm d'épaisseur sont étalées sur des lames histologiques à l'aide d'une solution aqueuse de gélatine à 0,4%. Après séchage de 24

heures à 37°, les lames sont colorées. Deux type de coloration ont été utilisés, topographique au trichrome de Masson et histochimique à l'acide périodique de Schiff.

### Etude morphométrique et quantification des collagènes

L'étude histologique du pancréas chez les animaux témoins et traités est complétée par une étude morphométrique. Cette étude est réalisée à l'aide de logiciel AxioVision 4.8 de CARL ZEISS, après étalonnage des photos par un micromètre. Plusieurs mesures ont été faites, à savoir la surface nucléaire des cellules  $\beta$ , des cellules séreuses et des cellules épithéliales des canaux excréteurs. Par ailleurs, la quantification des collagènes fibrillaires dans le parenchyme pancréatique est réalisée à l'aide de l'image J (1.47u de *National institutes of health*. USA). Ce logiciel permet de calculer le pourcentage de surface occupée par les collagènes fibrillaires par rapport à la surface totale du parenchyme pancréatique.

### Analyse statistique

Les résultats de l'étude morphométrique sont analysés par le logiciel STATISTICA 6.1 (StatSoft, Inc.). Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  écart type. Le test de Mann-Whitney est utilisé pour évaluer la différence entre les paramètres des animaux témoins et ceux des animaux expérimentés. La différence est considérée comme statistiquement significative à  $P < 0,05$ .

## Résultats

### Quantification de l'homocystéinémie

Au début de l'expérimentation, l'homocystéinémie moyenne est de 5,82±1,23µmol/L et à la fin de l'expérimentation, la valeur atteint 6,75±2,11 µmol/L chez les rats des sables témoins et 21,15±3,42 µmol/L chez les animaux du groupe soumis à l'excès de méthionine.

L'administration chronique de la méthionine, à raison de 150mg/kg poids corporel/jour, pendant 6 mois, a engendré une augmentation d'environ 263% ( $P < 0,0001$ ) de l'homocystéine plasmatique vs 15,9% environ chez le groupe témoin, caractérisant l'installation d'un état d'hyperhomocystéinémie modérée.

### Résultats histologiques

Pour rechercher et analyser des éventuelles altérations histopathologiques produites au niveau du pancréas des rats soumis à la méthionine, la coloration au trichrome de Masson a été utilisée pour

la mise en évidence des collagènes et la coloration à l'acide périodique-Schiff (APS) pour la mise en évidence des glycoprotéines.

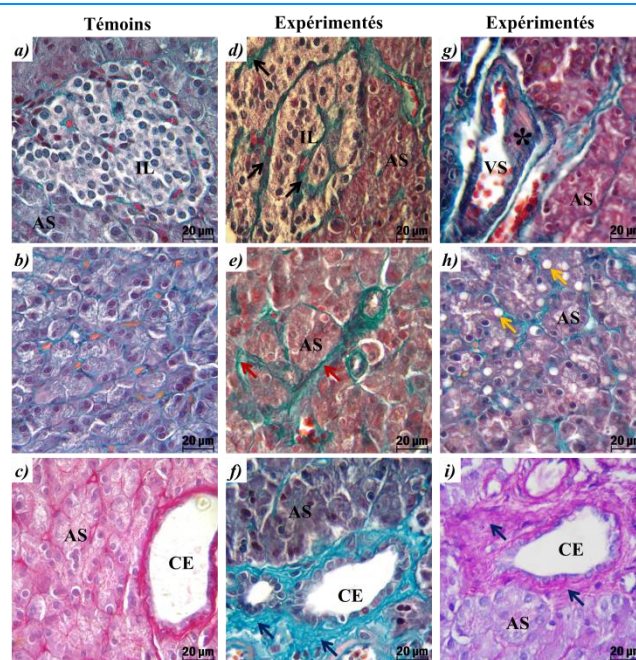
Le pancréas des rats témoins (**Fig.1a. b. c**) montre qu'il est formé de deux parties dispersées dans un parenchyme de consistance mésentérique, l'une prédominante composée d'acini exocrines synthétisant le suc pancréatique, l'autre endocrine correspondant aux îlots de Langerhans. Chaque acinus est formé de quelques cellules séreuses à noyau parabasal et à cytoplasme sombre riche en vésicules zymogènes. Les acini sont entourés par une lame basale et un tissu conjonctif réduit localisé entre ces acini. Les cellules épithéliales des canaux excréteurs sont plus ou moins cubiques à noyau central. Les îlots de Langerhans sont de petits nodules sphériques formés de cordons cellulaires anastomosés qui délimitent entre eux des espaces où circulent des capillaires sanguins. La majeure partie de ces cellules sont les cellules  $\beta$  localisées au milieu des îlots et responsables de la synthèse de l'insuline.

Le pancréas des animaux soumis à un excès de méthionine est le siège d'altérations, aussi bien matricielles que cellulaires. L'analyse histologique et histochimique met en évidence une accumulation interstitielle de collagènes et de glycoprotéines dans la partie exocrine du pancréas (**Fig. 1e**) et dans les îlots de Langerhans (**Fig. 1d**), un épaississement de la lame basale qui entoure les acini séreux (**Fig. 1e**), une accumulation péri-vasculaire et péri-canaulaire de collagènes indiquant l'installation d'une fibrose (**Fig. 1f, i**), une stéatose pancréatique macrovacuolaire (**Fig.1h**), une désorganisation de la paroi vasculaire associée à une modulation phénotypique des cellules endothéliales indiquant une dysfonction endothéliale (**Fig.1g**).

### Résultats morphométriques et quantification des collagènes

Les surfaces nucléaires des cellules séreuses, des cellules épithéliales et des cellules  $\beta$  pancréatiques ont été déterminées, chez les rats des sables Témoins et Expérimentés (**Tableau I**).

Les résultats de l'étude morphométrique ne montrent aucune différence significative de la surface nucléaire des cellules séreuses et celle des cellules épithéliales des canaux excréteurs des animaux expérimentés vs témoins. Cependant, une diminution de 2,6% de la surface nucléaire des cellules  $\beta$  est enregistrée chez les rats hyperhomocystéi-némiques par rapport aux rats témoins ( $P < 0,05$ ). Ces résultats suggèrent une légère diminution de l'activité des cellules  $\beta$  et, par voie de conséquence, une diminution de l'activité synthétique de l'insuline.



**Fig. 1. Structure histologique du pancréas de *Psammomys obesus* Témoin (a, b, c) et Expérimentés (d-i).**

Chez les rats Expérimentés, nous observons une accumulation de collagènes fibrillaires et de glycoprotéines dans le tissu interstitiel (▲), les îlots de Langerhans (■) et autour des canaux excréteurs (▲), une stéatose macrovacuolaire (▲), ainsi qu'une altération de la paroi vasculaire (\*). AS : Acinus séreux, CE : canal excréteur, IL : Îlot de Langerhans, VS : Vaisseau sanguin. Fig. a, b, d, e, f, g, h : coloration au trichrome de Masson. Fig. c, i : coloration à l'acide périodique-Schiff. Grossissement x 1000.

**Tableau I. Mesures de la surface nucléaire de certains types cellulaires pancréatiques chez les *Psammomys* témoins et Expérimentés**

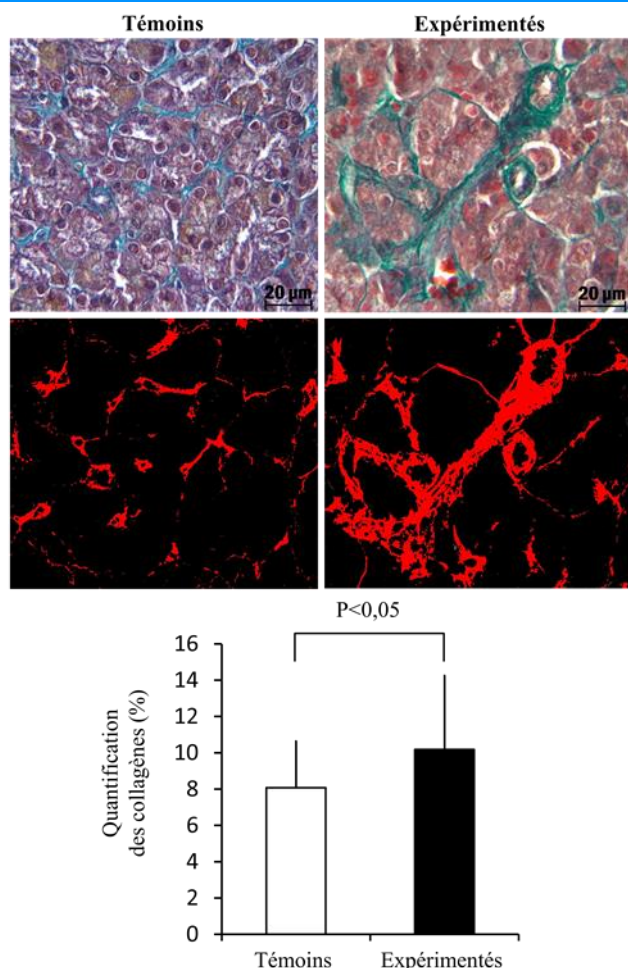
Surface nucléaire	Témoins	Expérimentés
Cellules séreuses ( $\mu\text{m}^2$ )	16,68 $\pm$ 3,69	16,78 $\pm$ 4,13
Cellules épithéliales( $\mu\text{m}^2$ )	15,38 $\pm$ 5,24	15,27 $\pm$ 3,87
Cellules $\beta$ ( $\mu\text{m}^2$ )	18,87 $\pm$ 3,93	18,38 $\pm$ 3,71*

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart type. L'analyse statistique est réalisée par le test de Mann-Whitney. \* $p < 0,05$ .

Les résultats de la quantification des collagènes pancréatiques sont illustrés dans la figure 2.

La quantification des collagènes interstitiels par le logiciel Image J met en évidence une augmentation de 26,15% ( $P < 0,05$ ), chez les rats expérimentés par rapport aux témoins (10,18 $\pm$ 4,07% vs 8,07 $\pm$ 2,56%). Ces résultats indiquent l'installation d'une fibrose interstitielle au niveau pancréatique, chez les rats soumis à un excès chronique de méthionine.





**Fig. 2. Quantification des collagènes fibrillaires dans le parenchyme pancréatique chez les rats témoins et expérimentés**

L'analyse statistique est réalisée par le test de Mann-Whitney.  $p < 0,05$  : différence significative.

## Discussion

Notre étude a pour but d'analyser l'impact d'une hyperhomocystéinémie engendrée, chez le rat des sables (*Psammomys obesus*), par une injection intrapéritonéale de méthionine, à raison de 150mg/kg/jour, pendant 6 mois sur l'histologie, l'histochimie et la morphométrie pancréatiques.

L'installation d'un état d'hyperhomocystéinémie, engendré par un régime alimentaire enrichi en méthionine est confirmée par de nombreuses études. En effet, l'administration chronique de méthionine à raison de 200mg/kg/j pendant 6 mois, chez des rats Wistar, provoque une augmentation de l'homocystéinémie de 50% [15]. De même, l'administration *per os* de 1g/kg/j de L-méthionine durant 4 semaines, chez des rats déficients en C $\gamma$ L, induit une élévation des taux plasmatiques en homocystéine [9]. Une hyperhomocystéinémie a été signalée par Yefsah-

Idres *et al.* (2016) chez le rat Wistar soumis à 500mg/kg/jour de méthionine pendant 3 mois [16]. Chez l'homme, Eleftheriadou *et al.* (2013) ont induit un état hyperhomocystéinémique chez 30 volontaires soumis à la méthionine à raison de 100 mg/kg, par voie orale [1].

Sur le plan histomorphométrique, les coupes histologiques du pancréas de *Psammomys obesus*, soumis à la méthionine pendant 6 mois, ont permis d'observer, au niveau matriciel, une accumulation focalisée de collagènes entre les acini et dans les îlots de Langerhans. La quantification de ces collagènes interstitiels par l'image J a confirmé leur augmentation par rapport aux témoins. L'excès de méthionine est à l'origine de l'installation d'une fibrose (interstitielle, péri-vasculaire et péri-canalair) composée de collagènes fibrillaires et de glycoprotéines. Dans la littérature, peu de travaux ont concerné la relation hyperhomocystéinémie-pancréas. En effet, Girish *et al.* (2010) ont signalé que la pancréatite chronique est associée à une hyperhomocystéinémie [17]. De même, Yuzbasioglu *et al.* (2008) ont noté que les patients souffrant de pancréatite chronique présentaient un taux sanguin d'homocystéine plus élevé que celui des sujets non atteints, avec une diminution du taux des folates [18]. Ces résultats montrent donc que l'hyperhomocystéinémie est considérée comme un facteur de risque de la pancréatite chronique. Une importante fibrose interstitielle au niveau du pancréas est également signalée par Bragonza *et al.* (2011) chez une patiente souffrant d'une pancréatite chronique [19]. Ce rôle fibrogénique de l'hyperhomocystéinémie ne touche pas uniquement le pancréas mais plusieurs autres organes. En effet, Raaf *et al.* (2007) l'ont observé au niveau cardiaque, chez des rats rendus hyperhomocystéinémiques [20]. Yefsah-Idres *et al.* (2016) ont noté une importante fibrose hépatique chez des rats wistar soumis à un excès de méthionine pendant 3 mois [16]. Des résultats similaires sont enregistrés par Ghoul *et al.* (2017) dans les vésicules séminales [15]. Othmani *et al.* (2017) ont également montré une importante accumulation des collagènes au niveau de l'aorte de lapines soumises à la méthionine (500mg/kg/jour) pendant 3 mois [21]. Cette augmentation des collagènes sous l'effet de l'Hhcy passe par la voie de TGF- $\beta$  (*Transforming Growth factor-beta*) au niveau cardiaque, selon Raaf *et al.*, (2007) [20]. Le TGF- $\beta$  supprime l'activité des protéases qui dégradent la matrice extracellulaire par inhibition de l'expression des métalloprotéases (MMPs) et induit la synthèse de leurs inhibiteurs tissulaires (TIMPs), provoquant ainsi l'accumulation des collagènes [22].

Une stéatose pancréatique macro-vacuolaire est observée chez les rats des sables hyperhomocystéinémiques. Roblin *et al.* (2007) ont montré, chez des souris déficientes en certaines enzymes du métabolisme de l'homocystéine, la présence d'une stéatose hépatique sévère avec parfois une stéatohépatite [23]. L'homocystéine permet la surexpression de SREBP-1 (*Sterol Regulatory Element Binding Proteins*) qui favorise la stéatose [24].

L'étude histomorphométrique montre que l'hyperhomocystéinémie provoque une diminution significative de la surface nucléaire des cellules  $\beta$ , permettant de suggérer, ainsi, une diminution de la sécrétion de l'insuline. En effet, l'exposition des cellules  $\beta$  en culture à des concentrations croissantes d'Hcy (50, 250, 1000  $\mu$ M) induit une diminution dose-dépendante de la sécrétion de l'insuline par un mécanisme indépendant de la génération de  $H_2O_2$  [25].

## Conclusion

Cette étude montre que l'administration chronique de méthionine, chez le rat des sables, induit un remodelage matriciel pancréatique, caractérisé par une importante accumulation des collagènes fibrillaires et des glycoprotéines, une stéatose pancréatique et probablement, une perturbation de la sécrétion de l'insuline par les cellules  $\beta$ . Ces altérations sont similaires à celles observées en cas de pancréatite chronique.

## Remerciements

Les travaux ont été financés par le projet F00220130015.

## Conflits d'intérêt

Aucun

## Références

1. Eleftheriadou I., Grigoropoulou P., Moysakis I., Kokkinos A., Perrea D., Toutouzas K. *et al.* The effect of hyperhomocysteinemia on aortic distensibility in healthy individuals. *Nutrition* 2013;29(6):876-80.
2. Christ-Crain M., Meier C., Guglielmetti M., Guglielmetti M., Huber PR., Riesen W. *et al.* Elevated C-reactive protein and homocysteine values: Cardiovascular risk factors in hypothyroidism? A cross-sectional and a double-blind, placebo-controlled trial. *Atherosclerosis* 2003; 166(2):379-86.
3. Vijayan V., Khandelwal M., Manglani K., Singh RR., Gupta S., Surolia A. Homocysteine alters the osteoprotegerin/RANKL system in the osteoblast to promote bone loss: Pivotal role of the redox regulator forkhead O1. *Free Radic Biol Med* 2013;61:72-84.
4. Zou CG., Zhao YS., Gao SY., De Li S., Cao XZ., Zhang M., Zhang KQ. Homocysteine promotes proliferation and activation of microglia. *Neurobiol Aging* 2010;31(12):2069-79.
5. Huang EJ., Kuo WW., Chen YJ., Chen TH., Chang MH., Lu MC. *et al.* Homocysteine and other biochemical parameters in Type 2 diabetes mellitus with different diabetic duration or diabetic retinopathy. *Clin Chim Acta* 2006;366(1-2):293-8.
6. Mahalle N., Kulkarni MV., Garg MK., Naik SS. Vitamin B12 deficiency and hyperhomocysteinemia as correlates of cardiovascular risk factors in Indian subjects with coronary artery disease. *J Cardiol* 2013;61(4):289-94.
7. Ventura P., Venturelli G., Marcacci M., Fiorini M., Marchini S., Cuoghi C., Pietrangelo A. Hyperhomocysteinemia and MTHFR C677T polymorphism in patients with portal vein thrombosis complicating liver cirrhosis. *Thromb Res* 2016; 141 :189-95.
8. Xu Y., Tian Y., Wei HJ., Dong JF., Zhang JN. Methionine diet-induced hyperhomocysteinemia accelerates cerebral aneurysm formation in rats. *Neurosci Lett* 2011;494(2):139-44.
9. Kirac D., Negis Y., Ozer NK. Vitamin E attenuates homocysteine and cholesterol induced damage in rat aorta. *Cardiovasc Pathol* 2013;22(6):465-72.
10. Vitvitsky V., Dayal S., Stabler S., Zhou Y., Wang H., Lentz SR., Banerjee R. Perturbations in homocysteine-linked redox homeostasis in a murine model for hyperhomocysteinemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287(1): 39-46.
11. Hainsworth AH., Yeo NE., Weekman EM., Wilcock DM. Homocysteine, hyperhomocysteinemia and vascular contributions to cognitive impairment and dementia (VCID). *Biochim Biophys Acta* 2016;1862(5):1008-17.
12. Obeid R., Herrmann W.. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neuro-degenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Lett* 2006;580(13):2994-3005.
13. Signorello MG., Segantin A., Passalacqua M., Leoncini G. Homocysteine decreases platelet NO

- level *via* protein kinase C activation. *Nitric Oxide Biol Chem* 2009;20(2):104-13.
14. Tyagi SC. Homocysteine redox receptor and regulation of extracellular matrix components in vascular cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 1998; 274:396-405.
  15. Ghoul A., Moudilou E., Cherifi MEH., Zerrouk F., Chaouad B., Moulahoum A. *et al.* The role of homocysteine in seminal vesicles remodeling in rat. *FOLIA Histochem Cytobiol* 2017;55(2):62-73.
  16. Yefsah-Idres A., Benazzoug Y., Otman A., Latour A., Middendorp S., Janel N. Hepatoprotective effects of lycopene on liver enzymes involved in methionine and xenobiotic metabolism in hyperhomocysteinemic rats. *Food Funct* 2016; 7:2862-9.
  17. Girish BN., Vaidvanathan K., Rao NA., Rajesh G., Reshmi S. Balakrishnan V. Chronic pancreatitis is associated with hyper-homocysteinemia and derangements in transsulfuration and transmethylation pathways. *Pancreas* 2010; 39:11-6.
  18. Yuzbasioglu MF., Ozkaya M., Cakal E., Goksu M. Changes in Plasma Levels of Homocysteine in Patients with Acute Pancreatitis. *J Pancreas* 2008; 9(3):357-61.
  19. Braganza JM., Lee SH., Mccloy RF., McMahan MJ. Chronic pancreatitis. *Lancet*. 2011;377:1184-97.
  20. Raaf L., Noll C., Cherifi MEH., Claude JS., Delabar DJ., Benazzoug Y., Janel N. Myocardial fibrosis and TGFB expression in hyperhomocysteinemic rats. *Mol Cell Biochem* 2011;347:63-70.
  21. Othmani Mecif K., Aouichat Bouguerra S., Benazzoug Y. Plasma and Aorta Biochemistry and MMPs Activities in Female Rabbit Fed Methionine Enriched Diet and Their Offspring. *J Nutr Metab* 2017:1-17.
  22. Bujak M., Frangogiannis NG. The role of TGF- $\beta$  Signaling in Myocardial Infarction and Cardiac Remodeling. *Cardiovasc Res* 2007;74: 184-95
  23. Roblin X., Pofelski J., Zarski J. Rôle de l'homocystéine au cours de la stéatose hépatique et de l'hépatite chronique C. *Gastroenterol Clin Biol* 2007;31:415-20.
  24. Ji C., Kaplowitz N. Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology* 2003;124(5):1488-99.
  25. Patterson S., Flatt PR., Mcclenaghan NH. Homocysteine-Induced Impairment of Insulin Secretion From Clonal Pancreatic BRIN-BD11 A-Cells Is Not Prevented by Catalase. *Pancreas* 2007;34(1):144-51.