

## **Impact d'une hyperhomocystéinémie sur les lipoprotéines plasmatiques et sur la structure hépatique du Rat des sables, *Psammomys obesus***

Fouzia Zerrouk<sup>1</sup>, Khira Othmani-Mecif<sup>1</sup>, Lila Khedis<sup>1</sup>, Billel Chaouad<sup>1</sup>, Adel Ghoul<sup>1</sup>,  
Nabila Rezkallah<sup>2</sup>, Samia Neggazi<sup>2</sup>, Souhila Aouichat-Bouguerra<sup>2</sup>, Mohamed El Hadi  
Cherifi<sup>3</sup> et Yasmina Benazzoug<sup>1</sup>

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

<sup>2)</sup> *Laboratoire Biologie et Physiologie des Organismes, Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire, Faculté des Sciences Biologiques, USTHB, BP 32 Bab Ezzouar, El Alia 16111, Alger, Algérie.*

<sup>3)</sup> *Laboratoire de Biochimie, CHU Parnet, Alger, Algérie.*

Accepté le 28/07/2010

### **ملخص**

أثبتت الدراسات خلال العقود الماضية بأن ارتفاع بروتين الهوموسيستين يرتبط بأمراض قلبية. وأثبتنا نحن أيضا هذه النظرية لدى جردان الرمل. قمنا باستحداث ارتفاع الهوموسيستين لدى جردان الرمل بحقن الميثونين بمقدار 70 ملغ في كلغ الواحد من إجمالي الوزن في اليوم و لمدة ستة أيام. الهدف من عملنا هو دراسة اثر ارتفاع الهوموسيستين على نسبة البروتينات الشحمية للبلازما من جهة ، و على بنية النسيجية للكبد لهذا الحيوان من جهة أخرى. إن المعالجة بواسطة نسبة عالية من الميثونين لدى جردان الرمل أدى إلى: ظهور البروتين الشحمي (a) ، ارتفاع نسبة البروتينات الشحمية شديدة انخفاض الكثافة (LDLV) و منخفضة الكثافة (LDL) ، وانخفاضا محسوسا للبروتينات الشحمية عالية الكثافة (LHD). يعد الكبد لجرذان الرمل المصابة بارتفاع مستوى الهوموسيستين مقرا لعدة تغيرات مركزة متمثلة في تضخم الألياف ما بين الخلايا و المحيطة بالشرابين، تغير شكل النواة للخلايا الكبدية و تضخم الدسم في الأنسجة الكبدية.

**الكلمات الأساسية:** الميثونين؛ الهوموسيستين؛ جردان الرمل؛ تصلب الشرايين.

### **Résumé**

Durant les dernières décennies, plusieurs études ont montré que l'hyperhomocystéinémie est associée aux maladies cardiovasculaires. Nous avons également mis en évidence, cette association chez le Rat des sables, *Psammomys obesus*. Un état d'hyperhomocystéinémie est installé par une administration chronique d'un excès de méthionine à raison de 70 mg/kg de poids corporel/jour durant 6 mois sur un modèle athéro-sensible à savoir *Psammomys obesus*. L'objectif de ce travail est d'analyser d'une part, l'impact de cette hyperhomocystéinémie sur les lipoprotéines plasmatiques et, d'autre part, sur la structure histologique et histochimique du foie de ce modèle. L'administration d'un excès de méthionine a provoqué chez *Psammomys*, l'apparition de la lipoprotéine (a), une augmentation des VLDL-LDL (Very Low Density Lipoprotein et Low Density Lipoprotein), molécules athérogènes et une diminution spectaculaire des HDL (High density lipoprotein), molécules cardioprotectrices. Le foie de *Psammomys obesus* hyperhomocystéinémique est le siège de plusieurs altérations focalisées représentées essentiellement par une fibrose interstitielle et périvasculaire, un changement de forme des noyaux des hépatocytes et une stéatose hépatique.

**Mots clés :** Méthionine ; Hyperhomocystéinémie ; Foie ; *Psammomys obesus* ; Athérosclérose.

### **Abstract**

During the last decades, several studies showed that the hyperhomocysteinemia is associated with the cardiovascular diseases. Our study allowed to install a state hyperhomocysteinemia, resulting from a chronic administration of an excess of methionine (70 mg/kg corporal weight/day) for 6 months on an athero-sensitive model *Psammomys obesus*, and to determine the effects of this state on plasma lipoproteins and on histochemic structure of the liver of this animal. The administration of an excess of methionine to

Auteur correspondant: fouzia.zerrouk@gmail.com (Fouzia Zerrouk)

*Psammomys*, provoked the appearance of lipoprotein (a), an increase of VLDL-LDL (Very low density lipoprotein and Low density lipoprotein) and a spectacular decrease of cardio-protective molecules (High density lipoprotein). The liver of hyperhomocysteinemic *Psammomys obesus* revealed many focused deteriorations represented essentially by an interstitial and perivascular fibrosis, a change of shape of hepatocyte nuclei and a liver steatosis.

**Key-words:** Methionine ; Hyperhomocysteinemia ; Liver; *Psammomys obesus* ; Atherosclerosis.

## 1. INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires sont aujourd'hui dans le monde, la première cause de morbidité et de mortalité [1, 2]. L'hypertension, l'hypercholestérolémie, le diabète et le tabagisme sont des facteurs de risque reconnus [2-4]. Les données épidémiologiques recueillies au cours de ces trente dernières années laissent suggérer que d'autres facteurs biologiques pouvaient être associés à l'augmentation du risque de développer une pathologie cardiovasculaire [5-7]. Parmi ceux-ci, un intérêt croissant a été porté à l'hyperhomocystéinémie. Les premières observations cliniques ayant permis d'évoquer un lien entre hyperhomocystéinémie et maladies cardiovasculaires furent celles de jeunes adultes présentant une hyperhomocystinurie héréditaire [8, 9].

Rolland *et al.* [10] ainsi que d'autres travaux [11-14], ont rapporté que l'administration chronique d'un excès de méthionine provoque chez différents modèles animaux (porc, rat, gerbille, lapin et souris respectivement) un état d'hyperhomocystéinémie plus ou moins prononcé, ce qui ouvre la possibilité d'étudier les répercussions d'une hyperhomocystéinémie expérimentale sur les paramètres biochimiques plasmatiques et sur l'histologie des différents tissus.

Les études expérimentales ont montré que l'homocystéine et les lipides sont toxiques non seulement au niveau des cellules vasculaires mais aussi au niveau des hépatocytes qui pourraient indiquer des interactions entre les deux voies [15,16]. L'interaction entre le métabolisme des lipides et l'homocystéine a été examinée chez plusieurs modèles animaux

présentant une hyperhomocystéinémie et/ou une hypercholestérolémie [16-18]. Le modèle animal classique pour l'hyperhomocystéinémie est les souris déficientes en cystathionine bêta synthase homozygote (CBS<sup>-/-</sup>). Ces animaux ont développé une stéatose hépatique et des lésions athérosclérotiques [18, 19].

Les données *in vitro* suggèrent que l'homocystéine interagit avec un taux élevé de cholestérol en augmentant l'oxydation des LDL (low density lipoprotein) [20, 21]. Ces dernières sont fixées sur des cellules sanguines mononucléées *via* des récepteurs LOX-1 (lectin-like oxidized LDL receptor-1). Chez les patients hyperhomocystéinémiques, l'expression du gène LOX-1 est augmentée dans ces cellules, ainsi que la libération de TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha) qui est élevée par la stimulation des LDL oxydées [22]. Un traitement par l'acide folique a mené à la normalisation des taux d'homocystéine accompagnée de la réduction d'expression du gène LOX-1 et de la libération de TNF $\alpha$  stimulée par les LDL-oxydées [22].

Chez l'homme, *in vivo*, Voutilainen *et al.* [23] ont mis en évidence une corrélation positive entre l'hyperhomocystéinémie et la peroxydation des lipides, et ceci par l'évaluation de la concentration plasmatique en isoprostanes F2.

Dans le cadre de ce présent travail, nous nous sommes intéressés à étudier l'effet d'un état d'hyperhomocystéinémie expérimentale, induit chez le rat des sables à savoir, *Psammomys obesus*, et d'analyser d'une part l'impact de cet état

sur les lipoprotéines plasmatiques et d'autre part sur la structure histologique et histochimique du foie.

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1 Matériel biologique

Cette étude a été réalisée sur une espèce de rongeur : le Rat des sables « *Psammomys obesus* », gerbillidé déserticole provenant de la région d'Abadla à 150 km de Beni Abbas (30° 7 de latitude Nord et 2° 10 de longitude Ouest) au sud-ouest d'Alger, wilaya de Béchar. Ces rats sont répartis individuellement dans des cages en plastique équipées. La température de l'animalerie est maintenue constante à environ 25 °C, l'éclairage est réalisé par la lumière artificielle (12h/12h).

A leur arrivée, pendant la période d'adaptation (10 – 15 jours), les animaux continuent à recevoir *Suaeda mollis* (plante de leur biotope naturel) pendant quelques jours, puis cette nourriture est remplacée par des salicornes de la même famille que celle du désert poussant en bordure de mer (Anse de Kouali à Tipaza-Alger). La valeur énergétique est estimée à moins de 450 Calories par kg de plantes fraîches, la prise journalière de plante est de 50 g, l'animal reçoit donc 20 - 22 Cal/jour [24].

Après la période d'adaptation, les femelles d'un poids corporel moyen de  $94,75 \pm 18,58$  g sont réparties en un lot témoin (n= 5) et un lot traité (n= 7). Dans le cadre de ce travail, un état d'hyperhomocysteinémie est induit expérimentalement par l'administration chronique d'un excès de méthionine durant 6 mois. La DL méthionine (Sigma) dissoute dans une solution stérile de NaCl 0,9 % (la solution de méthionine est à 20 g/L) est injectée par voie intrapéritonéale à raison de 70 mg/kg de poids corporel/jour. Parallèlement aux expérimentés, les rats témoins reçoivent

des injections similaires de NaCl (solution à 0,9 %).

Pour l'ensemble des animaux, nous notons la consommation quotidienne et nous suivons l'évolution pondérale par une pesée hebdomadaire. En vue d'une étude de l'évolution biochimique plasmatique métabolique, des prélèvements sanguins sont réalisés mensuellement par des ponctions au niveau du sinus rétro-orbital de l'œil à l'aide d'une pipette pasteur préalablement citratée (23%).

Le sang aussitôt prélevé est centrifugé (800g pendant 10 minutes). Une partie du plasma fraîchement recueillie est utilisée directement pour les profils électrophorétiques des lipoprotéines (après 3 mois d'administration de méthionine), le reste est conservé à -80°C pour le dosage de l'homocystéine (dosage mensuel jusqu'au 6<sup>ème</sup> mois d'administration).

## 2.2 METHODES

### 2.2.1 Méthodes analytiques

L'étude biochimique réalisée dans le cadre de ce travail a porté sur le dosage plasmatique de l'homocystéine par la technique FPIA (Fluorescence Polarization Immuno Assay), et l'électrophorèse des lipoprotéines sur gel d'agarose par la méthode de Kalwakami [25].

Cette technique FPIA comporte deux étapes ; les différentes formes d'homocystéine plasmatiques seront réduites d'abord sous forme d'homocystéine réduite libre en utilisant le dithiothreitol (DTT). Puis cette forme sera convertie en S-adénosyl-homocystéine (SAH) par la présence de l'adénosine et l'enzyme SAH hydrolase bovine.

La SAH et le traceur marqué à la fluorescéine concourent pour les sites sur les anticorps monoclonaux. L'intensité de la lumière fluorescente polarisée est mesurée par la FPIA optique.

## 2.2.2 Technique histologique

Au terme de l'expérimentation, les animaux sont sacrifiés après anesthésie à l'uréthane 25 % à raison de 0,4 ml/ 100 g de poids corporel. Les foies prélevés sont soumis au protocole des techniques histologiques et histochimiques (fixation dans le Bouin aqueux et le formol à 10% pendant 4 jours, imprégnation et inclusion dans la paraffine, coupes de 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur [26]).

La structure histologique du foie a été analysée grâce à la coloration au Trichrome de Masson (Variante de Goldner). L'étude histochimique comporte l'analyse des protéoglycannes (Coloration au Bleu alcian), des glycoprotéines (coloration à l'acide périodique-Schiff) et des lipides tissulaires grâce à la coloration au noir soudan [27].

## 2.2.3 Analyse statistique

Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  l'écart-type. La comparaison des moyennes est effectuée par le test *t* de Student.

Les variations des paramètres plasmatiques sont rapportées à celles du

temps T0. La différence est jugée significative en seuil 1%.

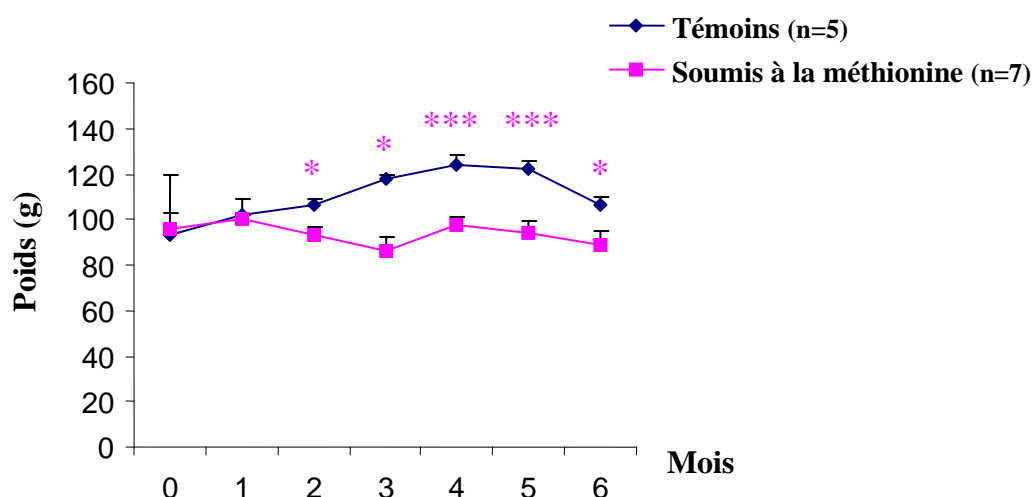
## 3. RESULTATS

### 3.1 Evolution du poids corporel

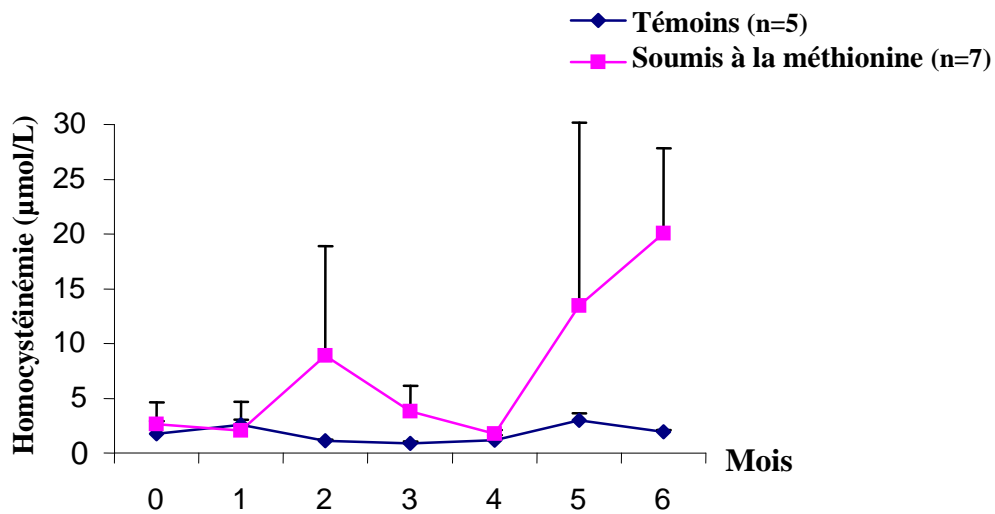
Les résultats obtenus montrent que l'évolution pondérale des animaux soumis à la méthionine est similaire à celle des animaux témoins pendant le 1er mois (Fig.1). En fin d'expérimentation, nous notons une augmentation d'environ 14% du poids corporel des animaux témoins et une diminution d'environ 7% chez les animaux soumis à la méthionine par rapport au T0.

### 3.2 Evolution de l'homocystéinémie

L'homocystéinémie des animaux témoins (Fig.2) varie avec une valeur maximale d'environ 3  $\mu\text{mol/L}$  (valeur moyenne 2,07  $\mu\text{mol/L}$ ). Chez les rats des sables soumis à un excès de méthionine, elle est 3, 5 et 7,6 fois plus importante au 2<sup>ème</sup>, 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> mois respectivement. En fin d'expérimentation, l'hyperhomocystéinémie atteint une valeur de 20,05  $\pm$  7,77  $\mu\text{mol/L}$  (vs de 2,63  $\pm$  2,01  $\mu\text{mol/L}$  au temps T0).



**Figure 1.** Evolution du poids corporel des rats témoins et des rats soumis à la méthionine (\* Moyenne du poids des *Psammomys* soumis à la méthionine vs des témoins. \*  $P < 0.05$  ; \*\*\*  $P < 0.001$ )



**Figure 2.** Evolution de l'homocystéinémie (µmol/L) chez *Psammomys obesus* témoins et des rats soumis à la méthionine

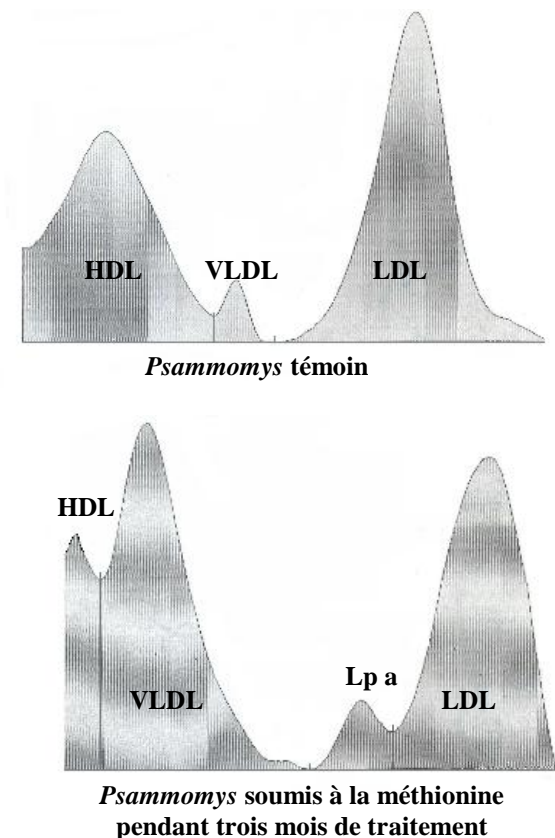
### 3.3 Les lipoprotéines plasmatiques

L'analyse des lipidogrammes concernant les animaux témoins et les rats des sables soumis à la méthionine pendant 3 mois (Tab.1, Fig.3) mettent en évidence une diminution significative de 70,4% des HDL (P< 0,01) et une augmentation de 35,1% du taux des VLDL-LDL. Chez les animaux soumis à l'injection de méthionine, nous avons noté l'apparition dès le 3<sup>ème</sup> mois d'expérimentation, de la lipoprotéine a.

**Tableau 1.** Lipoprotéines plasmatiques (%) chez *Psammomys* soumis à la méthionine pendant 3 mois

Trois mois après le début de l'expérimentation (T3)			
	HDL (%)	VLDL-LDL (%)	Lp a (%)
<b>Témoins</b>	59,2 ± 7,2	50,27 ± 7,2	Absente
<b>+ méthionine 3 mois</b>	17,54 ± 19,45**	67,92 ± 31,33	14,58 ± 15,33

Les valeurs représentent les moyennes affectées de l'écart type. \* Lipoprotéines plasmatiques des rats soumis à la méthionine vs des rats témoins. \*\* P< 0,01.



**Figure 3.** Profils électrophorétiques des lipoprotéines plasmatiques chez *Psammomys obesus* témoins et ceux soumis à la méthionine pendant trois mois

### 3.4 Etude histologique, histochimique du foie de *Psammomys* témoins

L'analyse morphologique du foie de *Psammomys* témoins montre, qu'il est formé d'un grand nombre d'unités fonctionnelles, les lobules, de forme hexagonale avec à leur centre la veine centro-lobulaire entourée par du parenchyme hépatique (Fig. 4). A ce niveau, les cellules hépatiques se disposent en files radiaires, appelées travées de Remak. Entre ces lames cellulaires, anastomosées, se situent les capillaires sinusoides. Ils amènent le sang des espaces portes et débouchent dans la veine centro-lobulaire.

Aux angles de contact des lobules biliaires, se situent les espaces portes, petits amas conjonctifs qui contiennent les vaisseaux sanguins et les voies excrétrices biliaires (Fig.5).

Les hépatocytes sont des cellules polyédriques et parfois cubiques (Fig.6), avec un cytoplasme granuleux, et sont de deux types, mononuclés et binuclés. Les noyaux sont arrondis, plus ou moins volumineux.

### 3.5 Etude histologique, histochimique du foie de *Psammomys* soumis à la méthionine

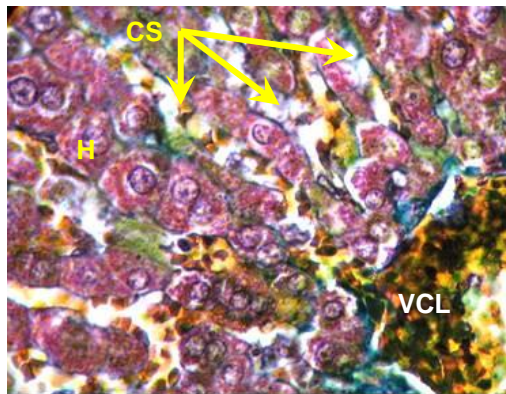
Comparées aux témoins, les coupes histologiques du foie de *Psammomys* soumis à la méthionine pendant 6 mois, ont permis de révéler plusieurs altérations structurales caractérisées par une accumulation autour des différentes structures vasculaires de matériel conjonctif, notamment les collagènes (Fig. 7a), les protéoglycannes (Fig. 7b), et

les glycoprotéines (Fig.7c et 7d). Cette accumulation est également observée entre les cellules (Fig. 8), provoquant ainsi une fibrose périvasculaire et interstitielle. Ces modifications se manifestent par une augmentation de l'intensité de la coloration au vert lumière, au bleu alcian et à l'acide périodique-Schiff (APS).

Nous avons également noté la présence d'amas cellulaires très modifiés envahis par un important dépôt de matériel conjonctif, essentiellement les collagènes colorés en vert par le trichrome de Masson (Fig. 9a et 9b), et les protéoglycannes colorés en bleu par le bleu alcian (Fig. 9c). Ces amas correspondent probablement à des hépatocytes ayant subi un phénomène de nécrose. Par ailleurs, les noyaux des hépatocytes subissent un changement de forme, ils deviennent très denses et irréguliers (Fig. 10a et 10b).

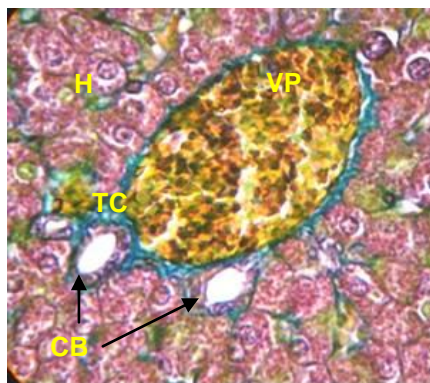
Nous avons observé une augmentation de la lumière des capillaires sinusoides chez ces animaux soumis à la méthionine (Fig. 11), qui apparaissent remarquablement dilatés, et semblent présenter des bifurcations.

Le foie de *Psammomys* soumis à la méthionine est le siège d'une véritable stéatose hépatique (Fig. 12), où la majorité des cellules hépatiques présentent un cytoplasme encombré de vacuoles lipidiques, donnant au tissu hépatique un aspect spongieux, de couleur claire par rapport à la teinte brune du foie normal. Ces vacuoles ont été mises en évidence par la coloration au noir soudan (Fig. 13). L'intensité des cellules possédant des vacuoles lipidiques est plus importante autour des veines centro-lobulaires et des espaces portes (Fig. 14).

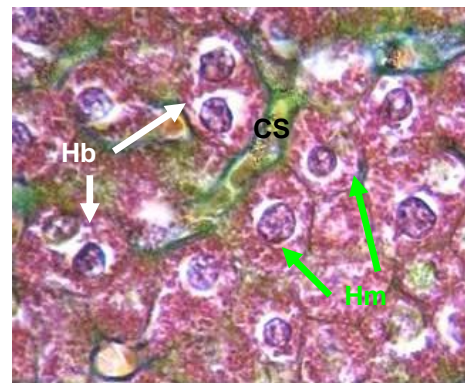


**Figure 4.** Coupe histologique de foie de *Psammomys* témoins montrant une veine centro-lobulaire entourée par les hépatocytes et les capillaires sinusoides (Trichrome de Masson G X100).

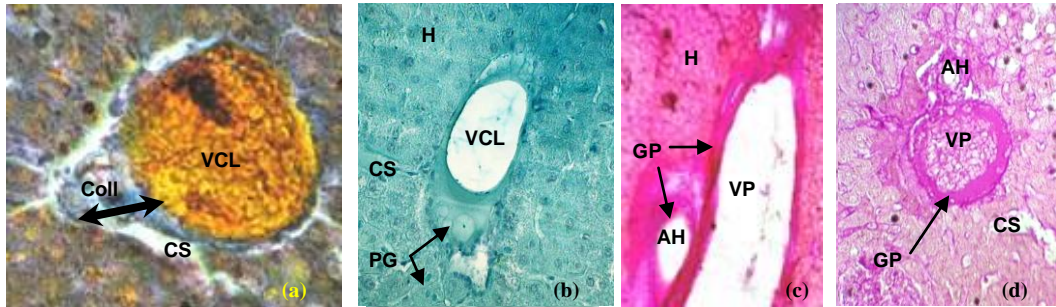
AH	artère hépatique
CB	canal biliaire
Coll	collagènes
CS	capillaire sinusoidé
FR	fibrose
GP	glycoprotéines
H	hépatocyte
Hb	hépatocyte binucléé
Hm	hépatocyte mononucléé
nH	noyau d'hépatocyte
PG	protéoglycannes
TC	tissu conjonctif
VCL	veine centrolobulaire
VP	veine porte



**Figure 5.** Coupe histologique de foie de *Psammomys* témoins montrant une veine porte de nature conjonctif et un canal biliaire, entourés par les hépatocytes (Trichrome de Masson G X100).

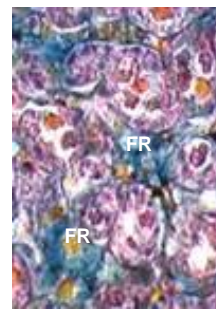


**Figure 6.** Coupe histologique de foie de *Psammomys* témoins montrant des hépatocytes mononuclées et binuclées (Trichrome de Masson G X140.)

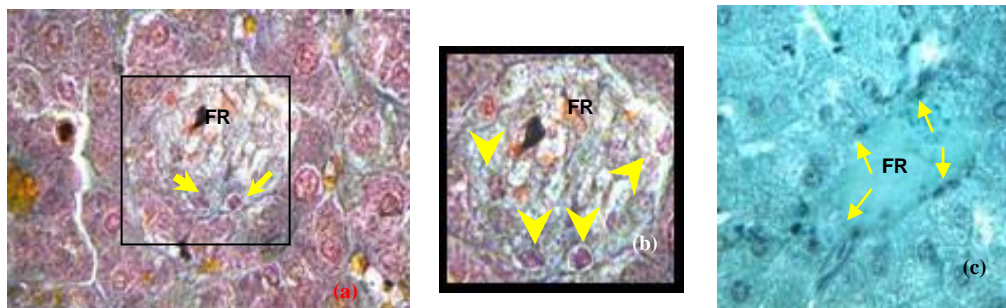


**Figure 7.** Coupes histologiques de foie de *Psammomys hyperhomocysteinémique* montrant l'augmentation du tissu conjonctif vasculaire notamment les collagènes (Trichrome de Masson G X100, 5a), des protéoglycannes (bleu alcian G X 40, 5b) et des glycoprotéines (APS X 40, 5c et 5d).

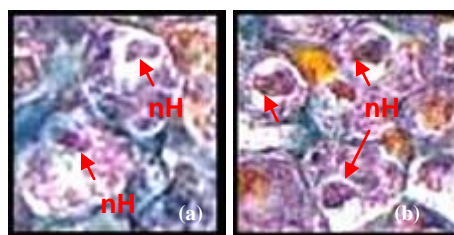
AH	artère hépatique
CB	canal biliaire
Coll	collagènes
CS	capillaire sinusoïde
FR	fibrose
GP	glycoprotéines
H	hépatocyte
Hb	hépatocyte binucléé
Hm	hépatocyte mononuclé
nH	noyau d'hépatocyte
PG	protéoglycannes
TC	tissu conjonctif
VCL	veine centrolobulaire
VP	veine porte



**Figure 8.** Coupe histologique de foie de *Psammomys* soumis à la méthionine montrant une fibrose interstitielle (Trichrome de Masson G X100).

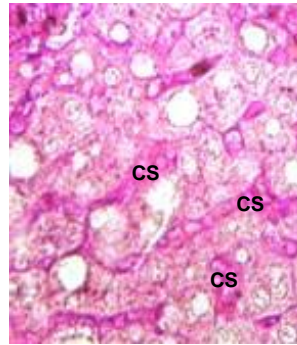


**Figure 9.** Coupes histologiques de foie de *Psammomys* soumis à la méthionine permettant d'observer un amas cellulaire envahis par les collagènes (Trichrome de Masson G X100, G X 120, 7a et 7b) respectivement, et les protéoglycannes (bleu alcian G X 100, 7c).

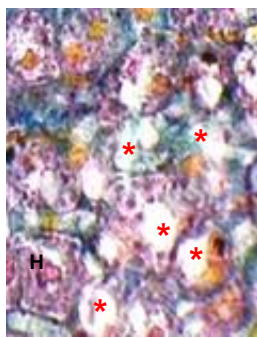


**Figure 10.** Coupe histologique de foie de *Psammomys* soumis à la méthionine : les noyaux des hépatocytes subissent un changement de forme, ils deviennent très denses et irréguliers (Trichrome de Masson G X120, G X 120, 8a et 8b.)

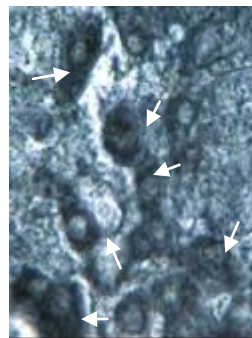




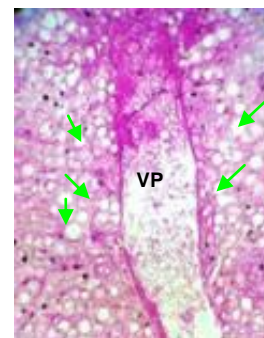
**Figure 11.** Coupe histologique de foie de *Psammomys* soumis à la méthionine montrant une dilatation des capillaires sinusoides (Acide périodique-Schiff, G X100).



**Figure 12.** Coupe histologique de foie de *Psammomys* soumis à la méthionine mettant en évidence une stéatose hépatique (\*) (trichrome de Masson, G X100).



**Figure 13.** Coupe histologique de foie de *Psammomys* soumis à la méthionine indiquant la présence de vacuoles lipidiques (noir soudan, G X100).



**Figure 14.** Coupe histologique de foie de *Psammomys* soumis à la méthionine montrant des vacuoles lipidiques autour la veine porte (Acide périodique-Schiff, G X40).

#### 4. DISCUSSION

L'étude réalisée a concerné l'influence d'une hyperhomocystéinémie expérimentale sur les lipoprotéines plasmatiques ainsi que sur la structure du foie chez le rat des sables, *Psammomys obesus*, reconnu comme modèle athérosensible.

Notre protocole expérimental repose sur l'induction d'un état d'hyperhomocystéinémie par administration en injection intrapéritonéale pendant 6 mois, de 70 mg de méthionine /kg de poids corporel /jour chez *Psammomys obesus*, est en accord

avec celle citée par différents auteurs [10, 28, 29].

Au terme de l'expérimentation, nos résultats mettent en évidence l'installation d'une hyperhomocystéinémie chez le rat des sables *Psammomys obesus*. En effet elle atteint la valeur de  $20,05 \pm 7,77 \mu\text{mol/L}$  vs  $1,95 \pm 0,15 \mu\text{mol/L}$  chez les rats des sables témoins. Notre résultat est en accord avec celui observé par divers auteurs [10-14] sur différents modèles animaux (porc, rat, gerbille, lapin et souris).

L'analyse par électrophorèse horizontale des lipoprotéines plasmatiques

chez *Psammomys* soumis à la méthionine pendant 3 mois, a révélé des profils affichant une augmentation des taux VLDL-LDL reconnus comme étant des lipoprotéines très hautement athérogènes, car elles véhiculent le cholestérol estérifié vers les cellules pariétales [30,16]. Cette augmentation des VLDL-LDL est associée à une diminution spectaculaire du taux des HDL, molécules cardioprotectrices puisqu'elles permettent l'efflux de cholestérol vers le foie [16,31]. Des résultats similaires ont été observés chez des souris ( $C\beta S^{-/-}$  / apo  $E^{-/-}$ ) hyperhomocystéinémiques [32]. En outre, certains travaux [23] ont rapporté que l'administration de la L-méthionine chez les gerbilles, a augmenté non seulement l'homocystéinémie, mais aussi la cholestérolémie et les LDL cholestérol plasmatiques. Velez-Carrasco *et al.* [33] ont rapporté qu'un régime enrichi en méthionine engendre chez des souris déficientes en apolipoprotéine E, une diminution du taux des HDL. Devlin et Lentz [15] ont confirmé l'existence d'une corrélation positive entre l'hyperhomocystéinémie et le métabolisme lipidique.

L'analyse de nos résultats permet de noter l'apparition de la lipoprotéine (a) après administration à la méthionine. La lipoprotéine (a) serait un marqueur additionnel à l'athérosclérose [34]. D'autres auteurs [35, 36] montrent qu'un taux élevé de Lp (a) est associé avec une augmentation du risque cardiovasculaire.

Ces altérations pourraient impliquer le stress oxydatif. En effet, les travaux réalisés sur le foie de rat ont montré qu'un régime enrichi en méthionine ou en homocystéine augmente la peroxydation lipidique hépatique [37, 38] et plasmatique et diminue l'activité antioxydante [38, 39].

Sur le plan histologique, plusieurs modifications sont enregistrées. Les préparations histologiques du foie mettent en évidence une accumulation du tissu conjonctif caractérisée essentiellement par

une accumulation de collagènes, de protéoglycannes et de glycoprotéines au niveau des espaces intercellulaires et périvasculaires. Cette accumulation est estimée par l'augmentation de l'intensité de la coloration au vert lumière, au bleu alcian et à l'acide périodique-Schiff respectivement. Par ailleurs, nous avons noté une augmentation de l'épaisseur des parois de l'ensemble de l'espace porte et la veine centro-lobulaire. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus chez le lapin [40], et le rat Wistar [41]. De même, Matté *et al.* [38] ont noté une importante fibrose au niveau des coupes histologiques du foie chez des rats soumis à des injections d'homocystéine pendant 28 jours. L'accumulation du matériel conjonctif peut être expliquée par une augmentation de la synthèse des macromolécules de la matrice extracellulaire ou une diminution de leur dégradation [42].

Chez les rats des sables hyperhomocystéinémiques, l'observation des coupes de foie, met en évidence un dépôt important de matériel conjonctif qui envahit des amas cellulaires très modifiés. Cette altération a été précédemment observée chez *Psammomys* soumis à un régime hypercholestérolémique [43]. Ces amas correspondent probablement à des hépatocytes ayant subi une nécrose (leurs noyaux ont une forme irrégulière et sont denses), ou à une infiltration cellulaire qui résulterait d'une augmentation de la perméabilité des parois vasculaires aux leucocytes [44].

Une augmentation de la lumière des capillaires sinusoides a été observée chez *Psammomys* soumis à la méthionine. Ces capillaires apparaissent remarquablement dilatés, et semblent présenter des bifurcations. Un résultat similaire a été noté chez le lapin [40] et le rat Wistar soumis à la méthionine [41].

Le foie de *Psammomys* soumis à la méthionine est le siège d'une véritable stéatose hépatique, où le cytoplasme de la majorité des cellules hépatiques est chargé

de vacuoles lipidiques, donnant au tissu hépatique un aspect vésiculeux et clair par rapport aux foies d'animaux témoins. L'intensité des cellules possédant des vacuoles lipidiques est plus marquée autour des veines centro-lobulaires et des espaces portes. Cette observation est en accord avec celle rapportée dans d'autres études [34, 37, 39].

## 5. CONCLUSION

Notre étude a permis d'une part, d'installer un état d'hyperhomocystéinémie, résultat d'une administration chronique d'un excès de méthionine à raison 70 mg/kg de poids corporel/jour durant 6 mois chez un modèle athéro-sensible à savoir *Psammomys obesus* ; et d'autre part, de déterminer les effets de cet état sur les lipoprotéines plasmatiques et sur la structure histochimique du foie de cet animal.

L'hyperhomocystéinémie a provoqué chez *Psammomys*, l'apparition de la lipoprotéine (a), une augmentation des molécules athérogènes VLDL et LDL et une diminution spectaculaire des molécules cardioprotectrices HDL. Ce résultat pourrait être complété par une étude détaillée des différentes sous fractions des lipoprotéines plasmatiques.

Les changements structuraux révélés par les techniques histologiques et histochimiques appropriées montrent que l'administration de la méthionine altère fortement non seulement la structure histologique mais également la composition histochimique du foie mettant en exergue une modulation de la composition ou remodelage de la matrice extracellulaire hépatique. Ce remodelage peut être abordé par une analyse des métalloprotéinases matricielles impliquées.

## Références

[1] J.C. Guillard, A. Favier, G. Potier de Courcy, P. Galan et S. Hercberg, *L'hyperhomocystéinémie : Facteur de risque cardiovasculaire ou simple marqueur ? -1. Données fondamentales*, Path. Biol., Vol. 51, 2003, p. 101-110.

[2] B. Baudinb et A. Cohena, *Données épidémiologiques des maladies cardiovasculaires et prise en charge des accidents cardiovasculaires*, Revue Francophone des Laboratoires, Vol. 409, 2009, p. 27-39.

[3] Y. Zhang, E.T. Lee, R.B. Devereux, J. Yeh, L.G. Best, R.R. Fabsitz et B.V. Howard, *Prehypertension, diabetes, and cardiovascular disease risk in a population-based sample the strong heart study*, Hypertension, Vol. 47, 2006, p. 410-420.

[4] C. Vesin, M.H. Horellou, S. Mairesse, J. Conard, M. Safar et J. Blacher, *Homocystéine et risque cardiovasculaire*, Sang Thrombose Vaisseaux, Vol. 19, 2007, p. 143-149.

[5] K. Demuth, S. Drunat, J.L. Paul et N. Moati, *Hyperhomocystéinémie et athérosclérose*, Médecine/Science, Vol. 16, 2000, p. 1081-1090.

[6] F. Yang, H.M. Tan et H. Wang, *Hyperhomocysteinemia and atherosclerosis*, Acta Physiologica Sinica, Vol. 57, Issue 2, 2005, p. 103-114.

[7] C. de Jaeger, N. Fraoucene, E. Voronska et P. Cherin, *Role of homocysteine in pathology*, Médecine et Longévité, Vol. 2, Issue 2, 2010, p. 73-86

[8] K.S. McCully, *Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis*, Am. J. Pathol., Vol. 56, 1969, p. 111-128.

[9] S.H. Mudd, J.D. Finkelstein, F. Irreverre et L. Laster, *Homocystinuria : an*

*enzymatic defect*, Science, Vol. 143, 1964, p. 1443-1445.

[10] P.H. Rolland, A. Friggi, A. Barlatier, P. Piquet, V. Latrille, M.M. Faye, J. Guillou, P. Charpiot, H. Bodard, O. Ghiringhelli, R. Calaf, R. Luccioni et D. Garçon, *Hyperhomocysteinemia-Induced Vascular Damage in the Minipig. Captopril-Hydrochlorothiazide Combination Prevents Elastic Alterations*, Circulation, Vol. 91, 1995, p. 1161-1174.

[11] M. Yagisawa, N. Okawa, N. Shigematsu et R. Nakata, *Effects of intravenous betaine on methionine-loading-induced plasma homocysteine elevation in rats*, J. Nutr. Bio., Vol. 15, 2004, p. 666-671.

[12] N. Hidirolou, G.S. Giliani, L. Long, X. Zhao, R. Madere, K. Cockell, B. Belonge, W.M.N. Ratnayake et R. Peace, *The influence of dietary vitamin E, fat, and methionine on blood cholesterol profile, homocysteine levels, and oxidizability of low density lipoprotein in the gerbil*, J. Nutr. Bio., Vol. 15, 2004, p. 730-740.

[13] K. Othmani-Mecif, *Hyperhomocysteinémie et teneurs lipidiques aortiques chez le lapin adulte et nouveaux nés*, Congrès de la nouvelle Société Française d'athérosclérose (NSFA), Biarritz, France, 2007.

[14] G. Chwatko, G.H.J. Boers, K.A. Strauss, D.M. Shih et H. Jakubowski, *Mutations in methylenetetrahydrofolate reductase or cystathionine-synthase gene, or a high-methionine diet, increase homocysteine thiolactone levels in humans and mice*, F.A.S.E.B. J., Vol. 21, 2007, p. 1707-1713.

[15] A.M. Devlin et S.R. Lentz, *ApoA-I, A Missing Link Between Homocysteine and Lipid Metabolism?*, Circ. Res., Vol. 98, 2006, p. 431-433.

[16] R. Obeid et W. Herrmann, *Homocysteine and lipids: S-Adenosyl methionine as a key intermediate*, F.E.B.S., Vol. 583, 2009, p. 1215-1225

[17] N. Hidirolou, M.E. Camilo, H.C. Beckenhauer, D.J. Tuma, A.J. Barak, P.F. Nixon et J. Selhub, *Effect of chronic alcohol ingestion on hepatic folate distribution in the rat*, Biochem. Pharmacol., Vol. 47, 1994, p. 1561-1566.

[18] M. Watanabe, J. Osada, Y. Aratani, K. Kluckman, R. Reddick, M.R. Malinow et N. Maeda, *Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)inemia*, Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 92, 1995, p. 1585-1589.

[19] K. Namekata, Y. Enokido, I. Ishii, Y. Nagai, T. Harada et H. Kimura, *Abnormal lipid metabolism in cystathionine beta-synthase-deficient mice, an animal model for hyperhomocystéinémie*, J. Biol. Chem., Vol. 279, 2004, p. 52961-52969.

[20] M. Nagase, K. Ando, T. Nagase, S. Kaname, T. Sawamura et T. Fujita, *Redox-Sensitive Regulation of LOX-1 Gene Expression in Vascular Endothelium*, Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 281, 2001, p. 720-725.

[21] B. Pfanzagl, *Ascorbate is particularly effective against LDL oxidation in the presence of iron (III) and homocysteine/cysteine at acidic pH*, Bioch. Biophysica. Acta., Vol. 1736, Issue 3, 2005, p. 237-243.

[22] K.B. Holven, H. Scholz, B. Halvorsen, P. Aukrust, L. Ose et M.S. Nenseter, *Hyperhomocysteinemic Subjects Have Enhanced Expression of Lectin-Like Oxidized LDL Receptor-1 in Mononuclear Cells*, J. Nutr., Vol. 133, 2003, p. 3588-3591.

- [23] S. Voutilainen, J.D. Morrow, L.J. Roberts, G. Alfthan, H. Alho, K. Nyyssonen et J.T. Salonen, *Enhanced in vivo lipid peroxidation at elevated plasma total homocysteine levels*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Vol.19, 1999, p. 1263-1266.
- [24] Petter F., *Repartition géographique et écologie des rongeurs désertiques de la région paléarctique*, *Mammalia*, Vol. 25, 1961, p. 222.
- [25] K. Kalwakami, *A rapid electrophoretic method for the detection of serum Lp (a) lipoprotein*, *Clin. Chem. Acta.*, Vol. 185, 1989, p. 147-156.
- [26] M. Gabe, *Techniques histologiques*, Ed. Masson et Cie, Paris, 1968, p. 42-53 ; 67-88 ; 110-122.
- [27] R. Martoja et M. Martoja, *Initiation aux techniques de l'histologie animale*, Ed. Masson et Cie, Paris, 1967, p. 68-85.
- [28] R. Griffiths, N. Tudball et J. Thomas, *Effect of induced elevated plasma levels of homocysteine and methionine in rats on collagen and elastin structures*, *Connect. Tissue Res.*, Vol. 4, 1976, p. 101-106.
- [29] L. Raaf, S. Aouichat-Bouguerra, G. Kacimi, M.P. Jacob et Y. Benazzoug, *Méthionine, artériosclérose et vieillissement*, Congrès de la nouvelle Société Française d'athérosclérose (NSFA), Biarritz, France, 2004.
- [30] H. Wieland, D. Seidel, V. Wiegand et H. Kreuzer, *Serum lipoproteins profile and coronary artery disease (CAD). Comparaison of the lipoprotein profile with the results of coronary angiography*, *Atherosclerosis*, Vol. 36, 1980, p. 269-280.
- [31] E.J. Schaefer, D.M. Foster, L.L. Jenkins, F.T. Lindgren, M. Berman, R.I. Levy et H.B. Brewer, *The composition and metabolism of high density lipoprotein subfractions*, *Lipids*, Vol. 14, 1979, p. 511-522.
- [32] D. Liao, H. Tan, R. Hui, Z. Li, X. Jiang, J. Gaubatz, F. Yang, W. Durante, L. Chan, A.I. Schafer, H.J. Pownall, X. Yang et H. Wang, *Hyperhomocysteinemia Decreases Circulating High-Density Lipoprotein by Inhibiting Apolipoprotein A-I Protein Synthesis and Enhancing HDL Cholesterol Clearance*, *Cir. Res.*, Vol. 99, 2006, p. 598-606.
- [33] W. Velez-Carrasco, M. Merkel, C.O. Twiss, J.D. Smith, *Dietary methionine effects on plasma homocysteine and HDL metabolism in mice*, *J. Nut. Biochem.*, Vol. 19, Issue 6, 2008, p. 362-370.
- [34] H. Mezdour, H.J. Parra, G. Aguié-Aguie et J.C. Fruchart, *La lipoprotéine (a) un marqueur additionnel de l'athérosclérose*, *Ann. Biol. Clin.*, Vol. 48, 1990, p. 139-153.
- [35] S.J. Suk Danik, N. Rifai, J.E. Buring et P.M. Ridker, *Lipoprotein (a), measured with an assay independent of apolipoprotein (a) isoform size, and risk of future cardiovascular events among initially healthy women*, *JAMA*, Vol. 296, 2006, p. 1363-1370.
- [36] K. Aasvee, M. Jauhiainen, E. Kurvinen, I. Tur, J. Sundvall, T. Roovere et A. Baburin, *Determinants of risks factors of atherosclerosis in the postinfarction period : The Tallinn MI Study Scand*, *J. Clin. Lab. Invest.*, Vol. 66, 2006, p. 191-199.
- [37] S.M. Lynch et J.J. Strain, *Increased hepatic lipid peroxidation with methionine toxicity in the rat*, *Free Rad. Res. Comm.*, Vol. 5, 1989, p. 221-226.
- [38] C. Matté, F.M. Stefanello, V. Mackedanz, C.D. Pederzolli, M.L. Lamers, C.S. Dutra-Filho, M.F. dos

Santos et A.T.S. Wyse, *Homocysteine induces oxidative stress, inflammatory infiltration, fibrosis and reduces glycogen/glycoprotein content in liver of rats*, Int. J. Dev. Neurosc., Vol. 27, Issue 4, 2009, p. 337-344.

[39] M. Toborek, E. Kopieczna-Grzebieniak, M. Drozd, M. Wieczorek, *Increased lipid peroxidation as a mechanism of methionine-induced atherosclerosis in rabbits*, Atherosclerosis, Vol. 115, 1995, p. 214 - 7.

[40] K. Othmani-Marabout Mecif, A. Messili, A. Boutebel, L. Raaf, M. Jacob et Y. Benazzoug, *Methionine et gestation chez la lapine *Oryctolagus cuniculus*. Impact sur l'aorte et le foie*, 1<sup>er</sup> Congrès de la nouvelle Société Française d'athérosclérose (NSFA), Biarritz, France, 2004.

[41] Y. Benazzoug, L. Raaf, N. Rezkallah, K. Othmani-Mecif, F. El Lemdani, S. Aouichat-Bouguerra et M.P. Jacob, *Méthionine et remodelage de la matrice*

*extracellulaire vasculaire chez *Rattus norvegicus**, 1<sup>er</sup> Congrès de la nouvelle Société Française d'athérosclérose (NSFA), Biarritz, France, 2004.

[42] A. Bescond, T. Augier, C. Chareyre, D. Garçon, W. Hornebeck et P. Charpiot, *Influence of homocysteine on matrix metalloproteinase-2: activation and activity*, Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 263, 1999, p. 498-503.

[43] N. Hamlat, S. Neggazi, Y. Benazzoug, G. Kacimi, M. Ardjoun, S. Aouichat Bouguerra, *Biochimie et morphohistochimie du foie chez *Psammomys obesus* suite à un régime athérogène*, 2<sup>èmes</sup> Journées Scientifiques du Laboratoire de Biologie et Physiologie des Organismes, USTHB, Alger, Algérie, 7 mars 2006.

[44] W.Y. Fu, N.P. Dudman, M.A. Perry et X.L. Wang, *Leukocytes extravation in acute homocysteinemic rats*, Atherosclerosis, Vol. 161, 2002, p. 177-183.