



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Contribution à l'étude des effets de la 4-aminopyrazolopyrimidine sur le foie

Hoscheit, Isabelle

*Award date:*  
1994

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

## CONTRIBUTION A L'ETUDE DES EFFETS DE LA 4-AMINOPYRAZOLOPYRIMIDINE SUR LE FOIE

Isabelle Hoscheit

### Résumé

Des études ont montré que la 4-aminopyrazolopyrimidine provoque une hypocholestérolémie et une hyperlipémie hépatique.

Un blocage dans la sécrétion des lipoprotéines du foie en serait responsable mais le mécanisme reste encore inconnu.

Nous avons, dans un premier temps, reproduit pour les lipides les résultats décrits dans la littérature.

Des analyses morphologiques ont montré que le réticulum endoplasmique (R.E.) et l'appareil de Golgi sont dilatés et seraient les seules structures subcellulaires touchées.

Par centrifugation différentielle, nous avons observé un changement de distribution pour la galactosyltransférase (Golgi) et la glucose-6-phosphatase (R.E.) : ces résultats montrent que ces deux structures après traitement, ont une taille plus élevée puisque elles sédimentent plus vite. Ces observations confirment les modifications morphologiques.

Par dosages des enzymes de référence des structures subcellulaires, nous avons montré qu'une série d'enzymes subit une diminution d'activité : glucose-6-phosphatase (R.E), cytochrome oxydase (mitochondries), cathepsine C et phosphatase acide (lysosomes), catalase (péroxyosomes), phosphodiesterase alcaline (membrane plasmique) par contre la galactosyltransférase (Golgi) et l'arylsulfatase (lysosome) voient leur activité augmentée.

Ces résultats semblent montrer un blocage de la sécrétion des lipoprotéines au niveau du Golgi et une augmentation importante de la synthèse des triglycérides; le métabolisme des lipoprotéines et des lipides serait touché.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Décembre 1994

Promoteur : Professeur R. Wattiaux

## AVANT-PROPOS

Je tiens à remercier les personnes qui ont contribué à la réalisation et à la rédaction de ce travail.

Merci au Professeur R. Wattiaux d'avoir, avant tout, proposé un mémoire sur ce sujet, qui s'est avéré très enrichissant et très intéressant. Merci de m'avoir guidée dans mes recherches et de m'avoir encouragée.

Merci au Professeur S. Wattiaux-De Coninck pour l'intérêt et pour l'aide qu'elle m'a apportée en diverses occasions.

Merci aux Docteurs J. Hustin et M. Heimann d'avoir accepté d'examiner mes prélèvements.

Merci à Monsieur F. Dubois pour son aide, sa disponibilité, ses conseils ...sans oublier sa bonne humeur.

Merci à Madame M.J. Vertez pour sa collaboration lors des expériences de morphologie et lors de la mise en page des photos présentées dans ce mémoire.

Merci à Yves Poumay et Rose Thibaut pour leur avis et conseil en microscopie.

Merci à Zhi-Duan d'avoir consacré ces derniers jours en Belgique à m'aider pour les expériences de séparation des cellules du foie.

Merci à Elena, Christine et Adj, pour leur amitié, leur conseil et l'intérêt porté à mon travail.

Merci à toutes les personnes qui m'ont aidées à un moment ou un autre .

# TABLE DES MATIERES

## I. Introduction

5

1) Rôle du foie dans le métabolisme des lipides 6

2) Le cholestérol et les lipides sanguins 7

3) Pathologie résultant d'un trouble du métabolisme des lipides 8

3.1. La maladie de Tangier 8

3.2. L'absence de l'apolipoprotéine A-1 9

3.3. L'abetalipoprotéïnémie 9

3.4. L'hypobetalipoprotéïnémie 9

3.5. Maladie d'Anderson 9

3.6. Cancer et hypocholestérolémie! 10

4) Effets de la 4-aminopyrazolopyrimidine 11

4.1. Effets sur les lipides sanguins 11

4.2. Effets sur le foie 11

4.3. Effets sur les glandes endocrines 11

4.3.1. la glande surrénale 11

4.3.2. les ovaires 12

4.3.3. les testicules 13

4.4. Effets sur les reins 13

## II. Matériel et méthodes

15

1) Fractionnement subcellulaire 16

1.1. Préparation de l'homogénat 16

1.2. Centrifugation différentielle 16

2) Dosages des enzymes de référence 17

<u>3) Extraction des lipides du foie</u>	18
<u>4) Dosages des lipides sanguins et hépatiques</u>	18
4.1. Les lipides sanguins	18
4.2. Dosage du cholestérol total	19
4.3. Dosage des HDL cholestérol	19
4.4. Dosage des triglycérides	19
<u>5) Séparation des cellules parenchymateuses et non parenchymateuses du foie</u>	20
<u>6) Techniques de morphologie :</u>	20
6.1. Microscopie optique	20
6.2. Microscopie électronique	21

III. Résultats	22
----------------	----

<u>1) Effet de la 4-APP sur la lipémie et les lipides hépatiques</u>	23
1.1. Cholestérolémie et triglycéridémie	23
1.2. Cholestérol et triglycérides hépatiques	24
1.3. Reversibilité du phénomène	24
<u>2) Morphologie</u>	25
2.1. microscopie sur le foie	25
2.1.1. microscopie optique	25
2.1.2. microscopie électronique	26
2.2. microscopie optique sur hépatocytes isolés	28
<u>3) Effet de l'injection de la 4-APP sur les activités d'enzymes de référence des structures subcellulaires</u>	29
3.1. Activités après deux injections	29
3.2. Activités en fonction du temps suivant l'injection	30
3.3. Reversibilité des modifications enzymatiques	30

3.4. Mesures enzymatiques sur cellules isolées	31
3.5. Effet "in vitro" de la 4-APP sur les activités enzymatiques.	31

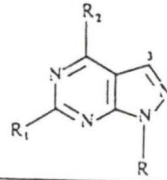
<b><u>4) Effet de la 4-APP sur la distribution des enzymes de référence en centrifugation différentielle</u></b>	<b>33</b>
4.1. Rappel sur la centrifugation différentielle	33
4.2. Distribution chez les rats contrôles	33
4.3. Distribution chez les rats traités	34

<b>IV. Discussion et conclusion générale</b>	<b>36</b>
--	-----------

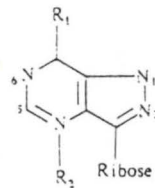
<b>V. Bibliographie</b>	<b>41</b>
-------------------------	-----------

# I. INTRODUCTION





Compound no.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R
1	H	H	H
2	H	Hydroxyl	H
3	H	Hydroxyl	H
4	H	Hydroxyl	β-D-ribofuranosyl
5	H	Hydroxyl	β-D-ribofuranosyl
6	H	Amino	β-D-ribofuranosyl
7	Hydroxyl	Amino	H
8	H	Amino	H
9	H	Amino	p-bromophenyl
10	Methylthio	Amino	o-chlorophenyl
11	H	Amino	H
12	H	Amino	H
13	H	Amino	β-D-ribofuranosyl
14	H	Amino	β-D-deoxyribofuranosyl
15	Cl	Amino	β-D-ribofuranosyl
16	H	Amino	β-D-ribofuranosyl
17	H	Isopropylamino	H
18	H	Dimethylamino	H
19	H	Methylamino	H
20	H	Dimethylamino	H
21	H	β-diethylaminoethylamino	Phenyl
22	H	Diethylamino	H
23	H	Anilino	H
24	H	m-bromoanilino	H
25	H	Benzylamino	H
26	H	3,4-dichlorobenzylamino	H
27	H	3,4-dichlorobenzylamino	β-D-ribofuranosyl
28	H	2,4-dichlorobenzylamino	H
29	H	2,4-dichlorobenzylamino	β-D-ribofuranosyl
30	H	o-fluorobenzylamino	β-D-ribofuranosyl
31	H	p-fluorobenzylamino	β-D-ribofuranosyl
32	Benzylamino	Benzylamino	H
33	H	o-chlorobenzylamino	Methyl
34	H	p-chlorobenzylamino	Methyl
35	H	2-ethylhexylamino	Methyl
36	H	Allylamino	Methyl
37	Cl	Phenylethylamino	Methyl
38	H	Amino	Methyl
39	H	n-butylamino	Methyl
40	H	Thio	Methyl
41	H	Dimethylamino	Methyl
42	H	Hydrazino	H
		β-morpholinopropylamino	p-chlorophenyl



Compound no.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Other substitutions
43	Amino	—	—
44	Methylamino	—	—
45	Hydroxy	—	—
46	Hydroxy	—	N-1-methyl
47	Hydroxy	—	N-2-methyl
48	Hydroxy	Methyl	—
49	Hydroxy	—	N-6-methyl
50	Hydroxy	—	5-Amino
51	Methyl	—	—
52	Selenoxo	—	—
53	Methylseleno	—	—
54	Thio	—	—

Tableaux 1.1 et 1.2 :  
Structure et classification des pyazolopyrimidine  
(Avila, J., L. et al, 1987)

Les pyrazolopyrimidines comprennent 54 dérivés dont la 4-aminopyrazolopyrimidine (4-APP) (*tableaux 1.1 et 1.2*), un analogue de l'adénine. Cette substance possède de nombreux effets, notamment sur les lipides sanguins et hépatiques. Il s'agirait d'un blocage de la sécrétion des lipoprotéines au niveau du foie conduisant à une hypocholestérolémie extrêmement marquée. Mais le mécanisme d'action n'est pas encore connu.

Nous rappellerons tout d'abord quelques éléments concernant le rôle du foie dans le métabolisme des lipides, les lipides sanguins et la pathologie liée à l'hypocholestérolémie. Nous nous étendrons ensuite sur certains aspects plus ou moins connus, des effets " *in vivo*" de l'APP.

### 1) Rôle du foie dans le métabolisme des lipides :

Le foie joue un rôle capital dans le métabolisme lipidique. Il reçoit les acides gras des triglycérides des chylomicrons par voie artérielle, les acides gras libérés sans cesse par le tissu adipeux par voie artérielle et les acides gras à chaîne courte ou moyenne par la veine porte.

Il dégrade les lipides, c'est-à-dire qu'il dissocie les lipides captés en leurs principaux éléments constitutifs (acide gras, glycérol, cholestérol.....). Il catabolise les acides gras à proprement parler jusqu'au terme ultime : l'acétyl-coenzyme A.

Il synthétise les triglycérides et les phospholipides.

Il synthétise le cholestérol à partir de l'acétyl-coenzyme A.

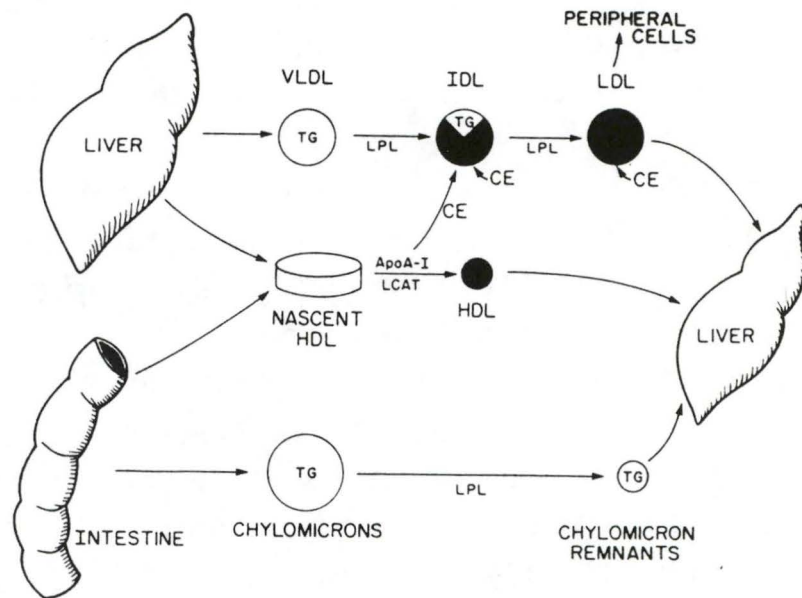
Le foie assure l'estérification du cholestérol grâce à la synthèse au niveau de l'hépatocyte d'une enzyme particulière, la LCAT (lécithine-cholestérol-acyl-transférase), mais l'estérification proprement dite est extra-hépatique et se fait au sein des HDL. Il édifie de nouvelles lipoprotéines : les VLDL grâce à l'union des apoprotéines synthétisées au niveau de l'hépatocyte et des différentes fractions lipidiques.

Il synthétise pratiquement toutes les apolipoprotéines majeures.

	Densité g/ml	Coef. Svedberg	Mobilité Electrophoret (sur papier)	Poids moléculaire	Taille (Å)	Protéines	Trigly- cérides	Cholest. non esterifié	Cholest. esterifié	Phospho- lipides	Glucides
Chylomicrons	≤ 0.960	> 400	origine	10 <sup>5</sup> à 10 <sup>6</sup> x 10 <sup>6</sup>	750 à 10000	1-2	80-95	1-3	2-4	3-6	?
VLDL	0.960 à 1.006	20-400	pré-bêta	5 à 27 x 10 <sup>6</sup>	300 à 800	10	55-65	10	5	15-20	≤ 1
LDL	1.006 à 1.063	0-20	bêta	2.2 à 3.5 x 10 <sup>6</sup>	200 à 220	25	10	8	37	22	= 1
HDL	1.063 à 1.21	—	alpha	1.5 à 2.6 x 10 <sup>6</sup>	70 à 95	45-55	8	14	3	22	3-4

Unités de flottation Svedberg = 10<sup>6</sup> cm/sec/dyne/g dans une solution de Cl Na de densité 1.063 g/ml (26° C)

**Tableau 1.3 :**  
Composition et caractères physiques des principales lipoprotéines ( Turpin, G., 1991).

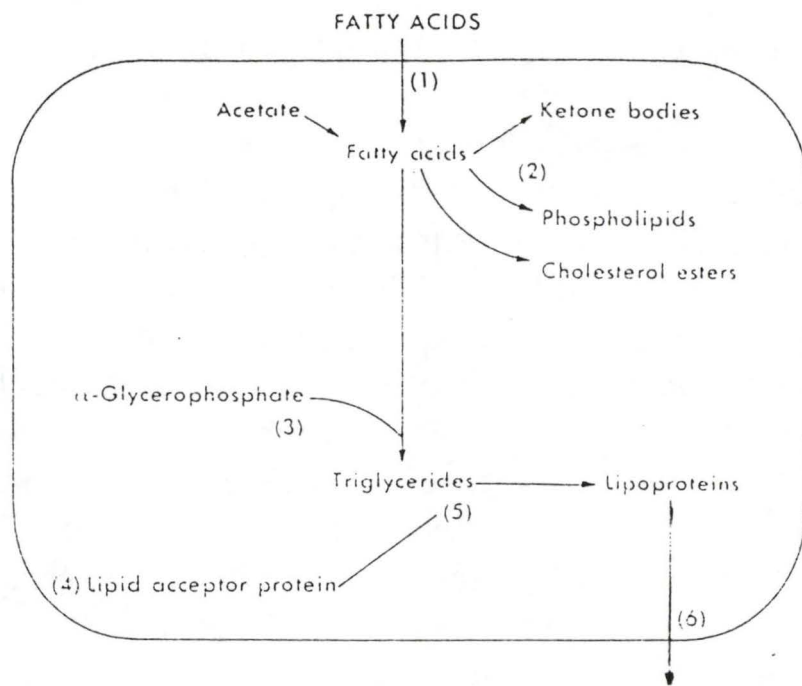


**Figure 1.1 :**  
Métabolisme des lipoprotéines (Glickman et Subersin, 1992)

## 2) Le cholestérol et les lipides sanguins :

Les lipides ne sont pas solubles dans le plasma. Ils sont rendus solubles parce qu'ils sont liés à une fraction protéique : l'apoprotéine. Les lipoprotéines sont composées d'un noyau central formé de cholestérol estérifié et de triglycérides et d'une couronne périphérique faite de l'assemblage d'apoprotéines, de phospholipides et de cholestérol libre. Il existe 4 lipoprotéines principales, toutes constituées d'une portion protéique et d'une portion lipidique mais dans des proportions différentes. Elles sont classées suivant leurs densités en : High Density Lipoprotéines (HDL), Low Density Lipoprotéines (LDL), Very Low Density Lipoprotéines (VLDL) et Chylomicrons. Les HDL sont riches en apoprotéines (50 %), contiennent assez bien de cholestérol (17 %) et de phospholipides (22 %) et un peu de triglycérides (8 %) . Les LDL sont les lipoprotéines qui contiennent le plus de cholestérol (45 %), assez bien d' apoprotéines (25 %) et des phospholipides (22 %) mais elles sont pauvres en triglycérides (10 %). Les VLDL et les chylomicrons sont constitués principalement de triglycérides (60 et 90 % respectivement). Les VLDL contiennent 10 % d'apoprotéines, 15 % de phospholipides et 15 % de cholestérol. Les chylomicrons par contre, possèdent 2 % d'apoprotéines, 3 % de phospholipides et 5 % de cholestérol.( *tableau 1.3*). Il existe plusieurs types d'apoprotéines. La portion protéique est constituée pour les HDL de l'apoprotéine-A, pour les LDL de l'apoprotéine-B100, pour les VLDL et les chylomicrons des apoprotéines-C et -E.

Les VLDL et les chylomicrons transfèrent respectivement les lipides hépatiques et intestinaux vers les tissus périphériques. Les LDL transportent le cholestérol aux tissus périphériques. Le métabolisme des LDL, dérivées des VLDL, joue un rôle crucial dans le métabolisme du cholestérol. Les HDL transfèrent le cholestérol des tissus périphériques au foie, qui le catabolise et excrète ses dérivés dans la bile. (*figure 1.1.*)



**Figure 1.2 :**  
**Métabolisme des lipides dans le foie (Isselbacher et Greenberger, 1964)**

### 3) Pathologie résultant d'un trouble du métabolisme des lipides :

Un mécanisme aussi compliqué peut se bloquer à des niveaux différents et entraîner une accumulation de triglycérides :

- 1) une entrée excessive d'acides gras dans le foie
- 2) une interférence avec la conversion des acides gras pour donner les phospholipides (cela nécessite une estérification des acides gras en triglycérides)
- 3) une augmentation de l'estérification des acides gras en triglycérides, parfois cela peut être du à une augmentation en  $\alpha$  - glycérophosphate
- 4) une diminution de synthèse des apoprotéines
- 5) un problème de couplage entre les lipides et les apoprotéines
- 6) un blocage au niveau de la sécrétion des lipoprotéines du foie. (figure 1.2.)

Nous dirons ici quelques mots de la pathologie des hypocholestérolémies puisque un des effets majeur de la 4-APP est de provoquer une hypocholestérolémie.

#### 3.1. la maladie de Tangier :

c'est une maladie autosomique récessive qui ferait intervenir le gène de l'apolipoprotéine A-1 du chromosome 11. L'apolipoprotéine A-1 est synthétisée au niveau du foie et de l'intestin et se retrouve principalement dans les HDL (67%). L'apo A-1 est sécrétée par les hépatocytes comme une phospho-apolipoprotéine. L'absence de déphosphorylation due à une déficience dans la phosphatase pourrait justifier une interaction entre l'apo A-1 phosphorylée et les sites de liaison à l'héparine de l'apo B. Des modifications post-translacionnelles de l'apo A-1 pourraient être responsables puisque aucune mutation dans la séquence de la protéine et aucune délétion ou insertion n'a été trouvée au niveau du gène. Le taux de cholestérol est de 20 à 45 mg/dl. (Dumon et al, 1990).

### 3.2. l'absence de l'apolipoprotéine A-1 :

elle ferait intervenir une délétion sur le chromosome 11. Le taux de cholestérol est de 111 mg/dl. Elle fait partie des maladies liées à des anomalies dans la biosynthèse des apoprotéines des HDL

### 3.3. l'abetalipoprotéinémie :

le taux de cholestérol est très bas ; 26 mg/dl. Les triglycérides sont bas également. Les LDL sont absents et les HDL sont présents à 50 %. C'est une maladie génétique rare caractérisée par l'absence de lipoprotéines contenant l'apoprotéine B dans le plasma. Ce désordre est autosomal récessif. Il existe plusieurs hypothèses pour expliquer ce désordre : des défauts dans la biosynthèse de l'apoprotéine B, dans l'assemblage cellulaire des chylomicrons, ou dans la sécrétion de lipoprotéines contenant l'apo B. (Granot et al, 1989).

### 3.4. l'hypobetalipoprotéinémie :

le taux de cholestérol reste aux alentours de 100 mg/dl. La chute dans les LDL est contrecarrée par une augmentation dans les HDL. Cette chute est expliquée par une diminution de la fraction de VLDL-apoB convertie en LDL-apo B. Cette diminution de conversion provoque une augmentation du turnover des VLDL. Le haut niveau de HDL et l'accumulation du cholestérol dans les HDL2 doit être expliqué par un défaut du transfert des esters de cholestérol en présence d'un manque de particules accepteurs.

### 3.5. maladie d'Anderson (rétention de chylomicron)

le taux de cholestérol est réduit à 65 mg/dl à cause d'une diminution à la fois dans les LDL et les HDL. Le taux de triglycérides est normal (75 mg/dl) mais ne change pas après un repas (malabsorption). Cette maladie est autosomique récessive. (Granot et al, 1989).

### 3.6. Cancer et hypocholestérolémie

Beaucoup d'études épidémiologiques (Kritchevsky, 1992) sont faites pour voir s'il existe une relation entre le cancer et l'hypocholestérolémie.

Les cancers les plus souvent associés à des taux de cholestérol plus bas que normalement sont les cancers du colon et du poumon chez les hommes et du col utérin et du sein chez les femmes (mais seulement chez les femmes en dessous de 50 ans), les leucémies dans les deux sexes.

Il est difficile de supporter l'idée que le cholestérol cause le cancer de manière directe car dans ce cas, les populations avec des taux de cholestérol plus bas, sont plus sujettes à des taux élevés de cancer. Or en Chine, pays avec les taux de cholestérol les plus bas, les taux de cancer sont les plus faibles.

Dans des études sur les leucémies myéloïdes aiguës (AML), une relation entre l'hypocholestérolémie et l'évolution de ces leucémies a été observée (Zyada et al, 1990). Cela devrait être dû à une augmentation de l'utilisation du cholestérol pour la synthèse des membranes lors de la prolifération cellulaire. L'hypocholestérolémie devrait être un facteur prédisposant à, ou secondaire aux tumeurs malignes. (Muller et al, 1989).

L'hypocholestérolémie observée dans les leucémies est expliquée par les exigences élevées des cellules leucémiques en cholestérol (Ginsberg et al, 1982). Les taux de LDL dans le sang est faible, ceci serait dû à un taux de transport et de dégradation des LDL plus élevé. Des études récentes montrent que des récepteurs spécifiques de l'apoprotéine-E existe dans le foie et d'autres tissus, suggérant que la présence en grande quantité de cette apoprotéine dans les LDL devrait altérer son transport et sa dégradation. Les taux de production de VLDL restent les mêmes, cela voulant dire que la réduction des LDL ne proviendrait pas de problèmes au niveau de la synthèse et de la sécrétion des VLDL.



## 4) Effets de la 4-aminopyrazolopyrimidine :

### 4.1. Effets sur les lipides sanguins :

Après 24 heures de traitement avec la 4-APP, on peut observer :

- une diminution de 3 à 4 fois du taux de cholestérol
- une diminution de 3 fois des triglycérides ( c'est un effet rapide puisque après 1 heure d'injection à une souris, on passe de 1100 µg/ml à 455 µg/ml.)
- pas de changement pour les phospholipides et les acides gras libres (Henderson, 1963).

### 4.2. Effets sur le foie :

Après 24 heures,

- les lipides augmentent de 3 à 4 fois
- le cholestérol et les phospholipides ne changent pas
- la synthèse des ARN est identique au contrôle. La synthèse des protéines ne semble pas touchée. (Henderson et al, 1963, Andersen et Dietschy, 1976).

### 4.3. Effets sur les glandes endocrines :

Le cholestérol peut servir de matière première à la synthèse des stéroïdes hormonaux : la progestérone, le cortisol, la corticostérone, l'aldostérone, les androgènes et les oestrogènes. Une diminution du cholestérol apporté par les lipoprotéines va donc avoir des effets sur la glande surrénale, les ovaires et les testicules.

#### 4.3.1. la glande surrénale :

En général, le cholestérol est stocké sous la forme d'ester de cholestérol. La réduction d'apport de cholestérol exogène augmente l'activité des hydrolases des esters de cholestérol. Ceux-ci diminuent de 90 %.

Cette diminution est associée à une augmentation de l'activité de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMG-CoA) et de la synthèse de cholestérol à partir d'acétate.

La synthèse des stéroïdes augmente 16 fois . (Balasubramaniam et al, 1977, Andersen et Dietschy, 1976)).

Lors d'un traitement avec la 4-APP, l'action de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) est nécessaire pour obtenir les effets cités ci-dessus. Cela a été mis en évidence par l'administration de dexaméthasone, une substance qui bloque la sécrétion de l'ACTH.

Suite à une stimulation à l'ACTH pour des rats traités, une diminution importante dans la synthèse de corticostérone dans la zona fasciculata a été remarquée. Aucune différence n'a été observée dans la zona glomérulosa : la synthèse de l'aldostérone est la même dans les rats traité et contrôle.

La microscopie à polarisation a montré que la zone corticale des glandes surrénales de rat contrôle était riche en gouttelettes lipidiques tandis qu'une diminution significative a lieu dans la zona fasciculata des rats traités. Les lipides dans la zona glomérulosa ne subissent pas de diminution. (Szabo et al, 1984)

#### 4.3.2. les ovaires :

Une réduction des esters de cholestérol et une augmentation de deux fois de la synthèse des stéroïdes sont observées. Ces deux effets sont augmentés par l'administration simultanée de 4-APP et de la "human chorionic gonadotropin" (hCG). La 4-APP réduit la capacité des cellules lutéales de synthétiser de la progestérone.

Les rats traités reçoivent une infusion continue de cholestérol (HDL) et leur synthèse de stéroïdes diminue tandis que les esters de cholestérol augmentent. Les rats recevant des HDL ont des taux de progestérone dans le plasma de 6 à 12 fois plus importants que des rats recevant des LDL. Cela signifie que le cholestérol des lipoprotéines plutôt que le cholestérol nouvellement synthétisé dans la glande, est le substrat majeur pour la production des stéroïdes. Aussi bien les glandes surrénales, les ovaires et les

testicules utilisent préférentiellement les HDL aux LDL. (Andersen et Dietschy, 1978, Bruot et al, 1982)

#### 4.3.3. les testicules :

La synthèse des stéroïdes et la présence des esters de cholestérol ne subissent pas de changement dans les testicules contrairement aux ovaires et à la glande surrénale. L'HMG-CoA réductase ne montre pas d'augmentation, il n'y a donc pas de changement dans la synthèse du cholestérol de novo.

La synthèse de testostérone diminue. La réduction de testostérone dans le plasma serait associée à une diminution de LH (luteinizing Hormone) et serait secondaire à cette diminution de sécrétion de gonadotropines plutôt qu'à la réduction des lipoprotéines sécrétées dans le plasma. Bien que le contenu hypothalamique en GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) est non altéré par la 4-APP, la diminution des récepteurs pituitaires au GnRH est observée in vivo accompagnée d'une diminution des LH et FSH (Follicule stimulating Hormone) circulants. La rétention des réponses des gonadotropines aux stimulations de GnRH suggère que l'effet primaire de la 4-APP est l'inhibition de la synthèse ou de la sécrétion du GnRH au niveau de l'hypothalamus. (Andersen et Dietschy, 1978, Blank et al, 1993)

#### 4.4. Effets sur les reins :

Après 96 heures de traitement, la synthèse des stéroïdes augmentent de 7,2 fois. La synthèse de l'HMG-CoA réductase et la synthèse de cholestérol augmentent également.

Les reins sont les sites principaux du métabolisme du mévalonate servant à la synthèse des stéroïdes. Les travaux de Feingold et al (1981) ont montré une augmentation du métabolisme du mévalonate suite à un traitement à la 4-APP. (Balasubramaniam et al, 1977, Goodrum et al, 1993, Feingold et al, 1981))

Pour rappel, le mévalonate est un intermédiaire dans la synthèse du cholestérol. Il est synthétisé à partir de l'HMG-CoA ( 3-hydroxy-3-méthylglutaryl CoA) grâce à l'HMG-CoA réductase.

Le but du travail au laboratoire sur la 4-APP est de déterminer si l'administration de cette substance a un effet sur les territoires membranaires du foie. En effet, pratiquement toutes les membranes subcellulaires ont besoin de cholestérol, celui-ci provient essentiellement du cholestérol plasmatique. Dans ce mémoire, nous nous sommes attachés principalement à rechercher si le traitement sur les enzymes marqueurs des structures subcellulaires : lysosomes, peroxyosomes, mitochondries, réticulum endoplasmique, golgi, membrane plasmique. Nous avons aussi abordé l'étude du comportement en centrifugation des principales structures membranaires cytoplasmiques.

Nous avons toutefois commencé notre travail par une étude de la morphologie et de certains paramètres lipidiques du foie des rats traités à la 4-APP.

## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les principales techniques que nous avons utilisées sont : la centrifugation différentielle, les dosages des enzymes de référence, l'extraction des lipides du foie, les dosages du cholestérol et des triglycérides sur les lipides sanguins et hépatiques, la séparation des cellules parenchymateuses et non parenchymateuses du foie.

## 1. Fractionnement subcellulaire :

### 1.1. Préparation de l'homogénat :

Toutes les expériences décrites ont été réalisées sur des rats mâles Wistar pesant 200-300 gr, mis à jeun la veille du sacrifice.

La 4-aminopyrazolopyrimidine (Sigma) dont nous étudions les effets sur le foie est injectée intrapéritonéalement à une concentration de 50 mg/kg (Andersen J.M, Dietschy J.M., 1976). Par la suite, nous reprendrons les résultats obtenus après 2 injections mais des expériences après 1 injection et 3 injections ont été réalisées. Les animaux contrôles ont reçus le solvant.

Le jour de l'expérience, l'animal est repesé, un échantillon de sang est récolté dans un tube hépariné. Le foie est prélevé, pesé, coupé et homogénéisé par un seul passage dans un Potter-Elvehjem grand modèle. L'homogénat en suspension dans du saccharose 0.25 M glacé est prêt à être fractionné.

### 1.2. Centrifugation différentielle :

#### Principe :

le fractionnement se réalise par centrifugation différentielle. Cette centrifugation va permettre une séparation des particules en fonction de leurs différents coefficients de sédimentation. Si nous prenons l'expression de ce coefficient pour des particules de référence c.à.d. des particules sphériques :  $S = \frac{2r^2(\rho_p - \rho_m)}{9\eta}$ ,

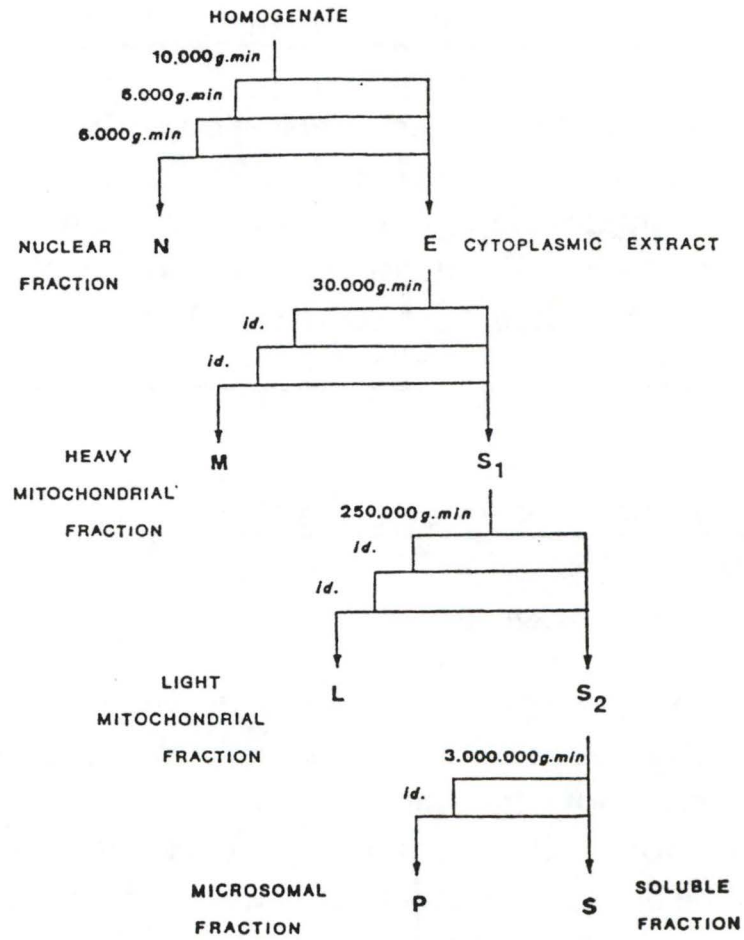


Figure 2.1  
Centrifugation différentielle ( de Duve et al, 1955)

nous voyons que la séparation va dépendre principalement du rayon de la particule et donc de sa taille.

Ce fractionnement est réalisé suivant le schéma (*figure 2.1.*) décrit par de Duve et al (1955) permettant l'obtention de cinq fractions successives. L'homogénat subit ainsi une série de centrifugations de vitesse et de temps croissants dans du saccharose 0.25 M glacé. Les cinq fractions obtenues sont successivement :

- la fraction N, contenant essentiellement des noyaux, des débris cellulaires et quelques cellules intactes ayant résisté à l'homogénéisation
- la fraction M ou mitochondriale lourde, contenant principalement des mitochondries, des lysosomes et des peroxysomes
- la fraction L ou mitochondriale légère qui est enrichie en lysosomes et en peroxysomes
- la fraction P ou microsomale contenant les éléments du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi ainsi que des fragments de la membrane plasmique
- la fraction S ou fraction soluble contenant tous les éléments non sédimentés lors des étapes précédentes.

## 2. Dosages des enzymes de référence :

Le contenu en différents types de granules des fractions obtenues est estimé en mesurant l'activité des enzymes marqueurs spécifiquement associés à un type de granule déterminé, selon le postulat de de Duve et al (1955). Ces auteurs stipulent en effet que les enzymes retenues comme enzymes de références doivent avoir une localisation intracellulaire unique; mais également, que les mêmes granules d'une classe subcellulaire déterminée doivent avoir une même concentration en enzyme.

Les dosages des enzymes de référence sont effectués sur des homogénats et sur des fractions obtenues après centrifugation.

Dans ce travail, nous avons choisi de mesurer l'activité enzymatique de la cathepsine C, de l'arylsulfatase et de la phosphatase acide pour repérer les lysosomes. La phosphodiesterase alcaline est



ORGANITE SUBCELLULAIRE	NOM	SUBSTRAT CONCENTRATION	TAMPON	PH	ADDITION	COMPOSÉ MESURÉ	RÉFÉRENCE
LYSOSOMES	cathepsine C	glycyl-L-arginine-2-naphtylamide 0.25 mM	acétate de sodium 0.06 M	5	mercapto éthanol 5 mM Triton X-100 0.05 %	β-naphtylamide en colorimétrie à 580 nm	Jadot et al, (1984)
	arylsulfatase	paranitrocathé cholsulfate 100 mM	acétate 0.2 M	5	Triton X-100 0.1 %	paranitrocathéchol en colorimétrie à 510 nm	Bowers et al, (1967)
	phosphatase acide	4-méthylumbelliféryl phosphate 0.2 mM	sodium citrate 0.16 M	5	Triton X-100 0.66 %	4-méthylumbelliférone en fluorimétrie λ émission : 450 nm λ excitation : 365 nm	Peters et al, (1972)
MEMBRANE PLASMIQUE	phosphodiesterase alcaline	thimidine 5' monophosphate-p-nitrophényl 1.2 mM	glycine/NaOH 0.5 M	9.6	acétate de zinc 0.01 M NaOH 1 N	paranitrophénol en colorimétrie à 400 nm	Beaufay et al, (1974)
PEROXYSONES	catalase		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	7		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en colorimétrie à 420 nm	Baudhuin et al, (1964)
MITOCHONDRIES	cytochrome C oxydase	cytochrome C réduit à 80-90 % 1.7 10 <sup>-5</sup> M	phosphate 0.03 M EDTA 1 mM	7.4	Triton X-100 0.02 %	cytochrome C réduit en colorimétrie à 550 nm	de Duve et al, (1955)
RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE	glucose-6-phosphatase	glucose-6-phosphate 0.04 M	cacodylate 100 mM	6.5	Tartrate Na-K 0.01 M	phosphate inorganique en colorimétrie à 650 nm	Beaufay et al, (1974)
GOLGI	galactosyl transférase	uridine diphospho-galactose-14 C 1.04 mM	cacodylate 100 mM ATP 10 mM	6.2	ovalbumine 4 % mercaptoéthanol 25 mM MnCl <sub>2</sub> 10 mM Triton X-100 0.4 %	comptage radioactif de l'ovalbumine-galactose (14 C)	Beaufay et al, (1974)

Tableau 2.1

utilisée comme marqueur des membranes plasmiques, la catalase pour les peroxysomes, la cytochrome oxydase pour les mitochondries, la glucose-6-phosphatase pour le réticulum endoplasmique et la galactosyltransférane pour le Golgi.

Le *tableau 2.1* résume les diverses conditions expérimentales des dosages enzymatiques réalisés ainsi que les références correspondantes. Chaque dosage est réalisé en présence de Triton X-100, qui a la propriété de rompre la membrane des organites (Wattiaux et de Duve, 1956). Ce détergent permet donc de mesurer l'activité totale puisque les enzymes sont mises en contact direct avec leurs substrats.

Le dosage des protéines est réalisé comme décrit par Lowry et al (1951).

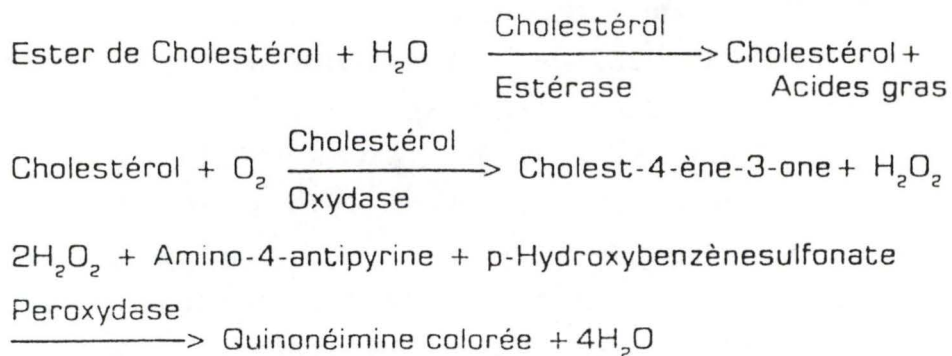
### 3. Extraction des lipides du foie :

A partir d'homogénat, nous extrayons les lipides avec de l'hydroxyde de potassium (KOH) et de l'éthanol à 100 °. Ensuite nous refroidissons les tubes et nous ajoutons de l'éther de pétrole et du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, nous vortexons afin de bien mélanger l'éther de pétrole qui reste au-dessus et nous centrifugeons. Nous décantons en récupérant la phase supérieure contenant les lipides. Nous resuspendons le reste à nouveau dans de l'ether de pétrole et nous recentrifugeons (3 fois). Les différents surnageants récoltés sont ensuite séchés sous flux d'azote avant d'être resuspendus dans de l'éthanol. (Feingold et al, 1981)

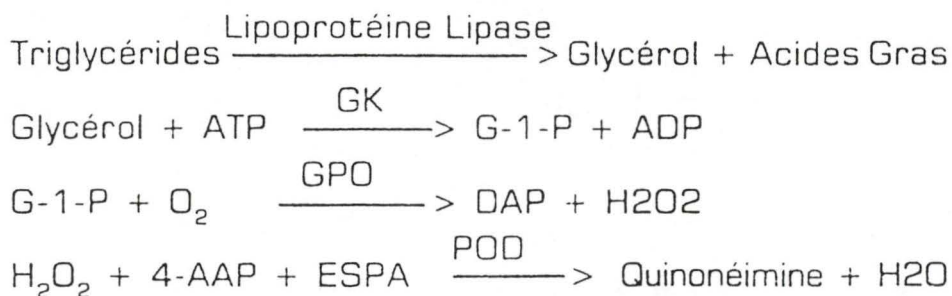
### 4. Dosages des lipides sanguins et hépatiques :

#### 4.1. Les lipides sanguins :

Nous récoltons dans un tube hépariné du sang (1 à 2 ml) lorsque l'animal est sacrifié. Nous centrifugeons pendant 15 minutes à 2000 rpm ( centrifugeuse : Sorvall) afin de récupérer le surnageant c.à.d. le plasma sur lequel les dosages sont réalisés



**Figure 2.2**  
**Réactions enzymatiques impliquées dans le dosage**  
**du cholestérol total ( Allain et al, 1974)**



**Figure 2.3**  
**Réactions enzymatiques impliquées dans le dosage**  
**des triglycérides ( McGowan et al, 1983)**

#### 4.2. Dosage du cholestérol total :

Nous réalisons sur l'extrait lipidique et sur le plasma un dosage du cholestérol total par une méthode enzymatique à l'aide du Kit Sigma n°352 (méthode décrite par Allain et al, 1974). Ce dosage se base sur la transformation du cholestérol en cholestone par la cholestérol oxydase.(*figure 2.2.*) Cette réaction libère de l' $H_2O_2$  qui est à son tour réduit par la peroxydase en présence d'aminopyrine et d'hydroxybenzène-sulfonate. Cette réaction conduit à la formation d'un composé coloré en rouge : la quinéimine dont le maximum d'absorption se situe à 500 nm. Le système contient également une cholestérol estérase qui hydrolyse les esters du cholestérol en cholestérol. Le taux de cholestérol déterminé par cette méthode prend donc en compte à la fois le cholestérol et ses esters.

#### 4.3. Dosage des HDL cholestérol :

Le réactif HDL Cholestérol (Sigma N°352-4) contient de l'acide phosphotungstique et du chlorure de magnésium. L'acide phosphotungstique, en présence de  $MgCl_2$ , précipite les fractions LDL et VLDL, en laissant la fraction HDL en solution. La concentration du cholestérol dans la fraction HDL est mesurée par la méthode enzymatique utilisée pour le cholestérol total. (Assmann et al, 1983) (März et al, 1986).

#### 4.4. Dosage des triglycérides :

Les triglycérides sont dosés à l'aide d'un kit Sigma (N°337) suivant la méthode de Mac Gowan et al, (1983).

Les triglycérides sont d'abord hydrolysés par la lipoprotéine lipase en glycérol et en acides gras libres.(*figure 2.3*) Le glycérol est ensuite phosphorylé en présence d'adénosine triphosphate pour former du glycérol-1-phosphate (G-1-P) et de l'adénosine-5'-diphosphate au cours d'une réaction catalysée par la glycérokinase (GK). Le G-1-P est alors oxydé par la glycérophosphate oxydase (GPO) en dihydroxyacétone phosphate (DAP) avec formation de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Une quinonéimine colorée, présentant une absorption maximale à 540 nm est produite lors du couplage de l'amino-4-antipyrine (4-AAP) et du sel sodique du N-éthyl-N-(3-sulfopropyl) m-anisidine (ESPA) avec  $H_2O_2$ , catalysé par la peroxydase.

## 5. Séparation des cellules parenchymateuses et non parenchymateuses du foie :

La méthode de séparation des cellules du foie est basée sur deux étapes : la première est la perfusion du foie avec de la collagénase et la deuxième est la centrifugation à basse vitesse permettant la séparation des cellules parenchymateuses et non parenchymateuses. (Seglen, 1976).

La perfusion du foie consiste dans un premier temps à injecter par la veine porte du tampon ne contenant pas de calcium afin de causer des séparations irréversibles au niveau des desmosomes (NaCl 137 mM, KCl 5.4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 3.4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.5 mM, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 8.1mM et du NaHCO<sub>3</sub> 24.4 mM à PH de 7.4).

Ensuite le foie est perfusé avec de la collagénase de type IV dissoute dans du tampon de lavage (même composition que décrite ci-dessus sauf que nous avons ajouté du CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (2 mM)). La collagénase va permettre de dissoudre la matrice extracellulaire tandis que le calcium est ajouté pour augmenter l'activité de cette enzyme. Après 6-7 minutes les cellules sont séparés à l'aide d'un peigne et la suspension est filtrée sur un gaze en nylon.

Vient ensuite la centrifugation. Après 4 centrifugations à basse vitesse (Centrifugeuse : Sorvall ;1 min 35 sec à 500 rpm), nous pouvons séparer les deux types de cellules en sachant que le culot représente les cellules parenchymateuses et le surnageant les cellules non parenchymateuses. Les cellules parenchymateuses sont diluées dans du milieu de culture (RPMI) afin d'obtenir 1.5 millions de cellules par boîte ( 2 ml de milieu). Les boîtes ont reçu préalablement de la fibronectine (0.05 %). Les cellules sont incubées pendant 2 heures à 37 °.

## 6) Techniques de morphologie :

### 6.1. Microscopie optique :

Les morceaux de foie sont fixés avec du Bouin, déhydratés dans des mélanges d'alcool éthylique / eau de concentration croissante, passés dans du toluène et enrobés dans de la paraffine. Les lames sont colorées au trichrome.

## 6.2. Microscopie électronique :

Les échantillons de foie sont fixés à la glutaraldéhyde dans du cacodylate. Ils sont postfixés avec de l'acide osmique, enrobés dans de l'épon et colorés à l'acétate d'uranyl et au citrate de plomb.

### III. RÉSULTATS

## CHAPITRE 1 : EFFET DE LA 4-APP SUR LA LIPÉMIE ET LES LIPIDES HÉPATIQUES

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier que l'injection de la 4-APP aux rats que nous utilisons produisait bien les modifications de la lipémie et des lipides hépatiques décrites dans la littérature.

### 1.1. Cholestérolémie et triglycéridémie :

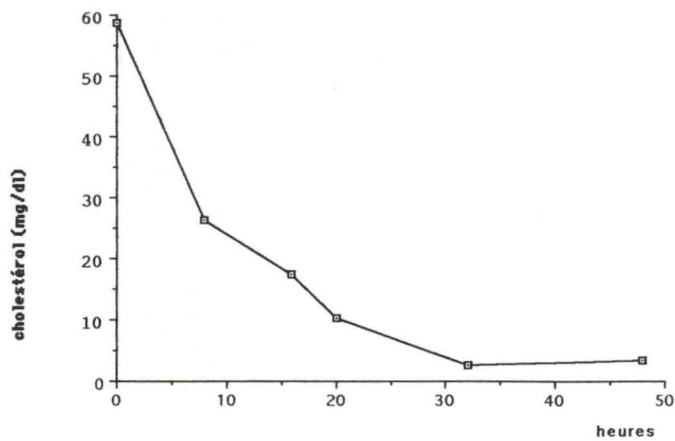
La *figure 3.1* illustre comment évolue la cholestérolémie et la triglycéridémie en fonction du temps suivant l'injection de 4-APP. Nous constatons une chute rapide et considérable du cholestérol sanguin. Après environ 24 heures, la cholestérolémie ne vaut plus que quelques pourcents de la valeur normale. Une diminution des triglycérides plus modeste s'observe également mais elle est moins marquée.

L'effet de la quantité de 4-APP administrée est rapporté au *tableau 3.1*. Une certaine proportionnalité est apparente dans la limite des quelques résultats que nous avons obtenus.

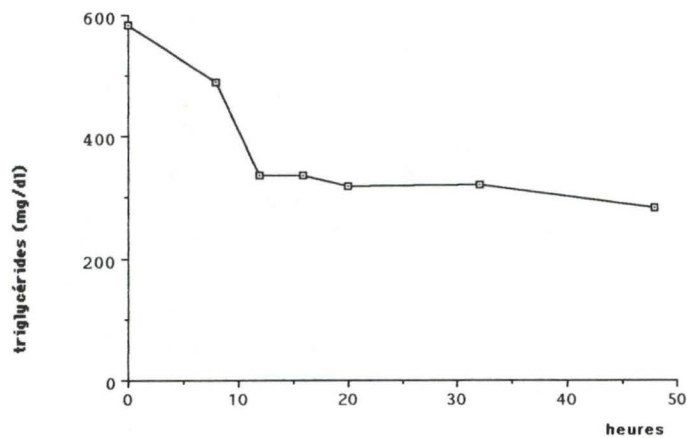
Pour préciser d'avantage le degré de chute de la cholestérolémie et de la triglycéridémie, nous les avons déterminés sur des animaux dans une condition précise d'administration de 4-APP correspondant à une situation expérimentale à laquelle nous nous référerons à plusieurs reprises dans la suite : 2 injections, sacrifié 24 h après la 2ème injection.

De plus dans le cas du cholestérol, nous avons déterminé les modifications concernant le cholestérol des LDL/VLDL et des HDL. Les résultats sont présentés au *tableau 3.2*. Ils confirment les observations indiquées à la *figure 3.1*, principalement la chute





**Figure 3.1.a**  
**Cholestérol plasmatique en fonction du temps.** Les échantillons de sang sont récoltés après 8, 16, 20, 32 et 48 heures. Après centrifugation (centrifugeuse : Sorvall; 2000 rpm pendant 15 minutes), le surnageant est récupéré. 10  $\mu$ l de plasma sont utilisés pour doser le cholestérol (Kit Sigma n°352). Le cholestérol est exprimé en mg/dl.



**Figure 3.1.b**  
**Triglycérides plasmatiques en fonction du temps.** Lorsque l'animal est sacrifié, 1-2 ml de sang sont récoltés dans un tube hépariné. Après centrifugation (2000 rpm pendant 15 minutes), le plasma est récupéré et 10  $\mu$ l sont utilisés pour le dosage (Kit Sigma n°337). Les triglycérides sont exprimés en mg/dl.

heures	rat 1 dose	rat 1/2 dose	rat 1/4 dose
0	64.74	64.71	64.71
23	6.92	10.49	28.81
47	1.89	2.36	3.78
97	0.85		1.71

**Tableau 3.1 :**

**Effet de la quantité de 4-APP sur le cholestérol plasmatique en fonction du temps.** Une série de rats a reçu 50 mg/kg (1 dose) de 4-APP. Chaque résultat représente un rat. Le rat traité pendant 23 heures, a reçu 1 injection, le rat 47 heures, deux injections et le rat 97 heures, 4 injections de la substance. La série de rats ayant reçu 25 mg/kg (1/2 dose) et la série ayant reçu 12.5 mg/kg (1/4 dose) sont suivies aux mêmes temps que la série ayant reçu 50 mg/kg. Le cholestérol est exprimé en mg/dl.

	Cholestérol total	HDL	LDL/VLDL	triglycérides
traité	3.52 (+-1.16)	1.88 (+-1.30)	1.64	100.91 (+-55.75)
contrôle	58.78 (+-14.52)	41.24 (+-10.16)	17.54	429.70 (+-107.46)
témoin	62.86 (+-15.11)	49.79 (+-10.56)	13.07	291.50 (+-119.37)

**Tableau 3.2 :**

**Effet de la 4-APP sur la cholestérolémie et la triglycéridémie.** Les rats traités ont reçus deux injections de 4-APP (50 mg/kg), les rats contrôles, deux injections de solvant et les rats témoins sont des rats qui n'ont rien reçus. Quatre animaux sont utilisés dans chaque série. Ce tableau reprend la moyenne des valeurs obtenues et leur déviation standard. Le cholestérol des LDL et VLDL est obtenu par différence entre le cholestérol total et le cholestérol des HDL. Le cholestérol est exprimé en mg/dl.

dramatique de la cholestérolémie aussi bien pour le cholestérol des HDL que des LDL/VLDL.

## 1.2. Cholestérol et triglycérides hépatiques :

Comme l'indique le *tableau 3.3*, en accord avec la littérature (Henderson, 1963), les triglycérides du foie augmentent d'une façon très marquée alors que le taux de cholestérol hépatique reste pratiquement inchangé.

Il est à noter, comme le rapporte le *tableau 3.4* que le poids du foie augmente de façon significative après 2 injections de 4-APP. Si nous rapportons ce poids à 100 gr de poids d'animal pour tenir compte de celui-ci, nous constatons une augmentation de pratiquement 1 g. Nous référant aux données présentées ci-dessus concernant les triglycérides, nous pouvons constater que la moitié de l'augmentation de poids est due à l'augmentation de la quantité de triglycérides présents dans cet organe.

Remarquons également que le poids de l'animal diminue significativement à la suite au traitement.

## 1.3. Réversibilité du phénomène :

Nous avons estimé la réversibilité du phénomène en suivant la cholestérolémie pendant plusieurs jours après les injections. Les résultats sont représentés à la *figure 3.2*. Ils montrent que le processus est réversible et qu'une cholestérolémie normale est rétablie quelques jours après le traitement.

	cholestérol total	triglycérides
traité	609.6 (+-79.43)	15703.88 (+-5675.68)
control	572.6 (+-18.71)	3082.68 (+-816.82)
témoin	614.75 (+-49.83)	2091.21 (+-591.24)

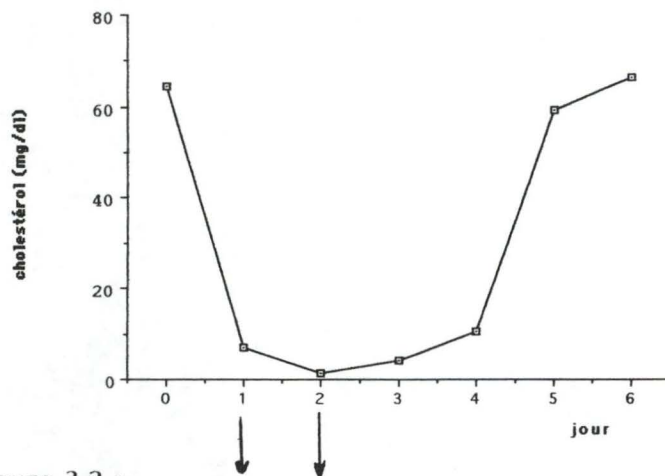
**Tableau 3.3 :**

**Cholestérol total et triglycérides hépatiques.** Les rats traités ont reçus deux injections de 4-APP (50 mg/kg), les rats contrôles, deux injections de solvant et les rats témoins n'ont rien reçus. Quatre animaux sont utilisés dans chaque série. Ce tableau reprend la moyenne des valeurs obtenues et leur déviation standard. Les valeurs sont exprimées en mg/100 gr.

traitement	poids des rats	poids des foies	perte de poids des rats
2 injections 4-APP	252 gr (+-26)	9.39 gr (+-2.3)	14.87 % (+-2.92)
2 injections solvant	272 gr (+-26)	7.48 gr (+-1.04)	6.59 % (+-2.12)

**Tableau 3.4 :**

**Effet de la 4-APP sur le poids des rat et sur le poids des foies.** Les valeurs reprises dans ce tableau, sont les moyennes et les déviations standards, des 6 rats traités et des 7 rats contrôles. Le poids des rats présenté dans la deuxième colonne est le poids initial des rats.



**Figure 3.2 :**  
**Cholestérol plasmatique en fonction du temps.** Les flèches indiquent une injection. Après avoir été traités avec deux injections, une série de rats est sacrifiée après 1 jour (3ème jour), 2 jours (4), 3 jours (5) et 4 jours (6).

## CHAPITRE 2 : MORPHOLOGIE

Nous avons réalisé des examens en microscopies optique et électronique sur des foies de rats contrôlés et traités après deux jours d'injection de 4-APP. Certaines observations de microscopie optique ont également été faites sur des hépatocytes isolés.

### 2.1. Observations sur le foie :

L'aspect d'un foie traité est caractéristique :

- l'organe est augmenté de poids et de volume
- il présente une coloration jaune-chamois et est anormalement friable

#### 2.1.1. microscopie optique :

Lorsque nous comparons une micrographie de foie témoin avec une micrographie de foie traité, la première chose qui ressort est l'apparition dans le cytoplasme des hépatocytes de gouttelettes lipidiques. Les méthodes de préparations pour l'observation au microscope extraient généralement les lipides ; les gouttelettes lipidiques apparaissent donc sous forme de vacuoles blanches. Mais pour être sûr qu'il s'agit bien de lipides, des colorations à l'osmium (colorant en noir les lipides) et à l'O-red-oil (colorant en rouge) sur coupes congelées ont été réalisées. Ces vacuoles se sont révélées positives à ces inclusions secondaires et caractérisent donc des vacuoles lipidiques.

Si nous regardons les modifications suivant les différents temps de traitement (8h, 12h, 16h, 20h, 32h, 48 h) (photos 1.1 : a, b, c, d, e, f, g) nous pouvons tirer les observations suivantes :

- nous voyons bien une accumulation de lipides de plus en plus marquée plus les traitements sont longs.

Effet de la 4-APP en fonction du temps :

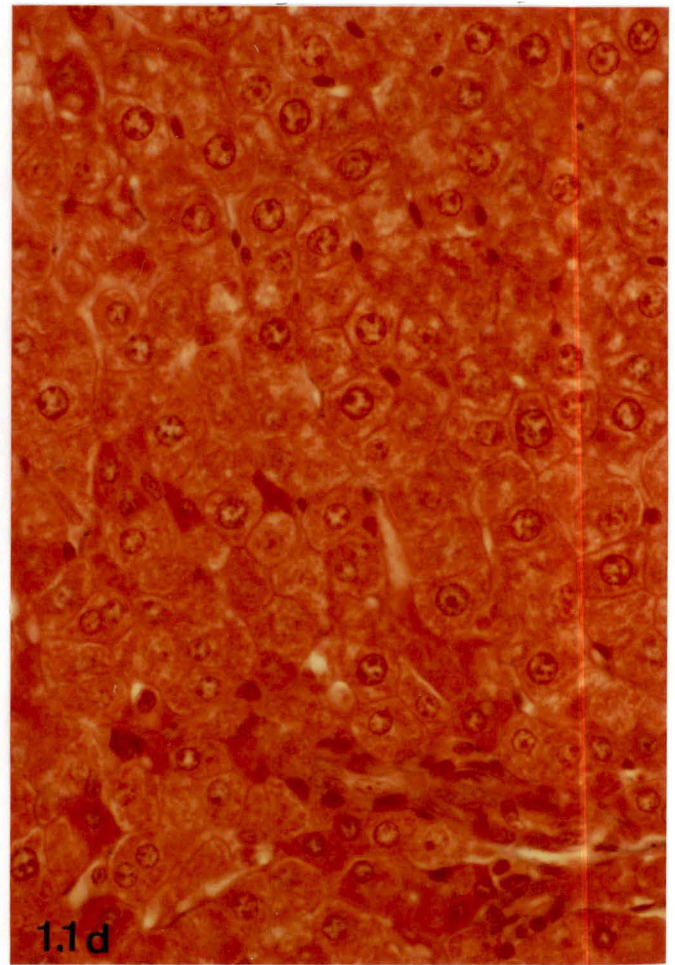
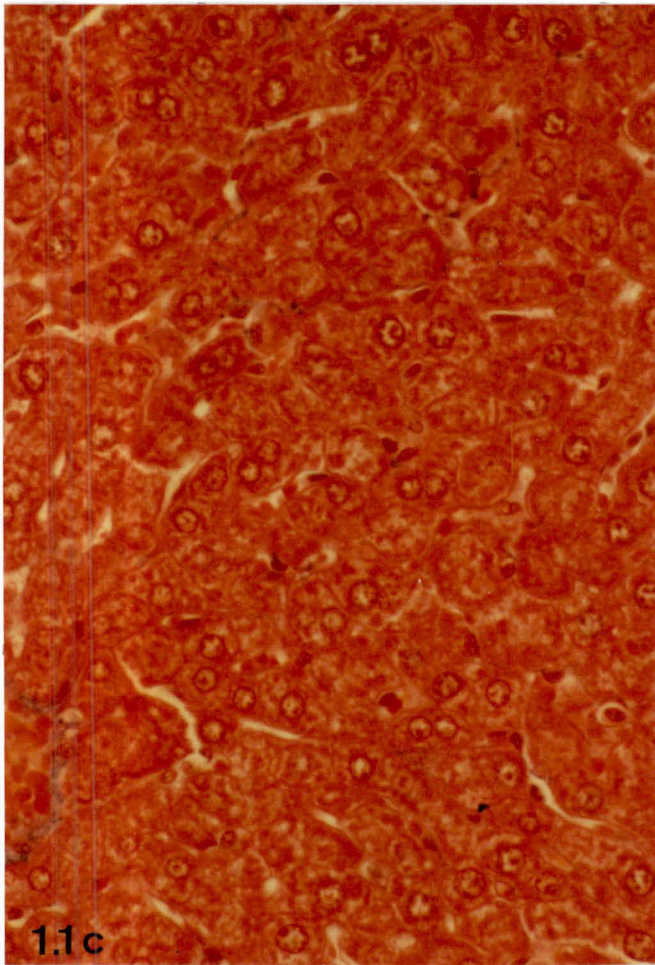
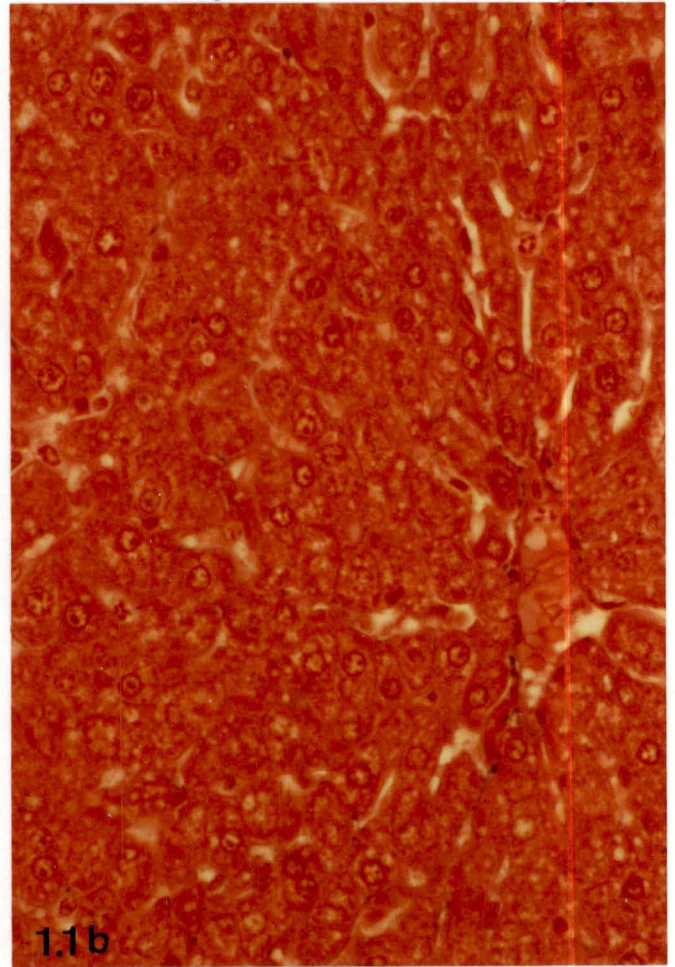
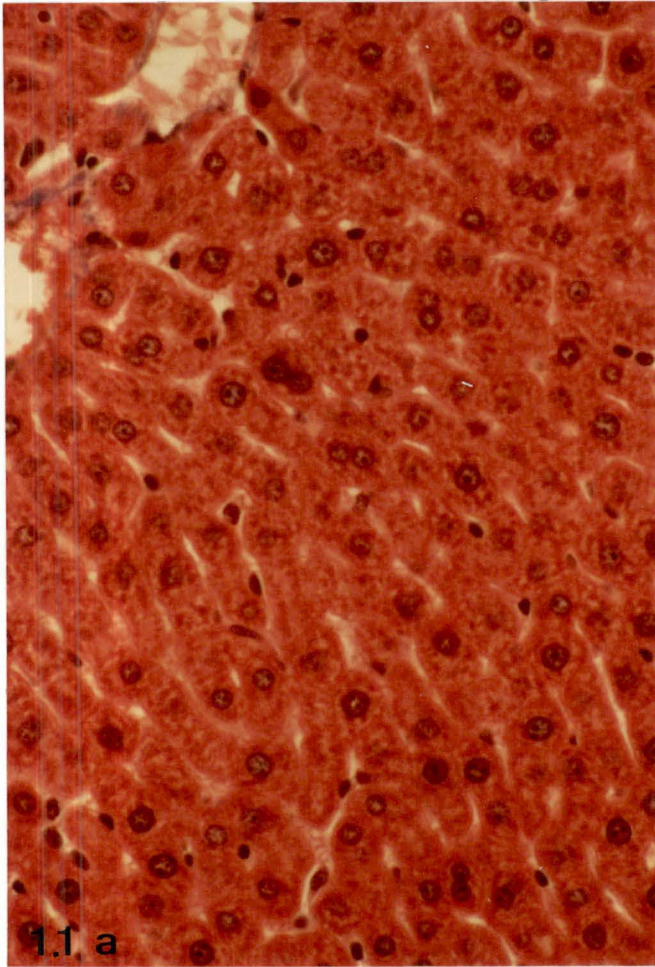
Photo 1.1.a : foie témoin

Photo 1.1.b : foie traité après 8 heures

Photo 1.1.c : foie traité après 12 heures

Photo 1.1.d : foie traité après 16 heures

Grossissement : 600 fois





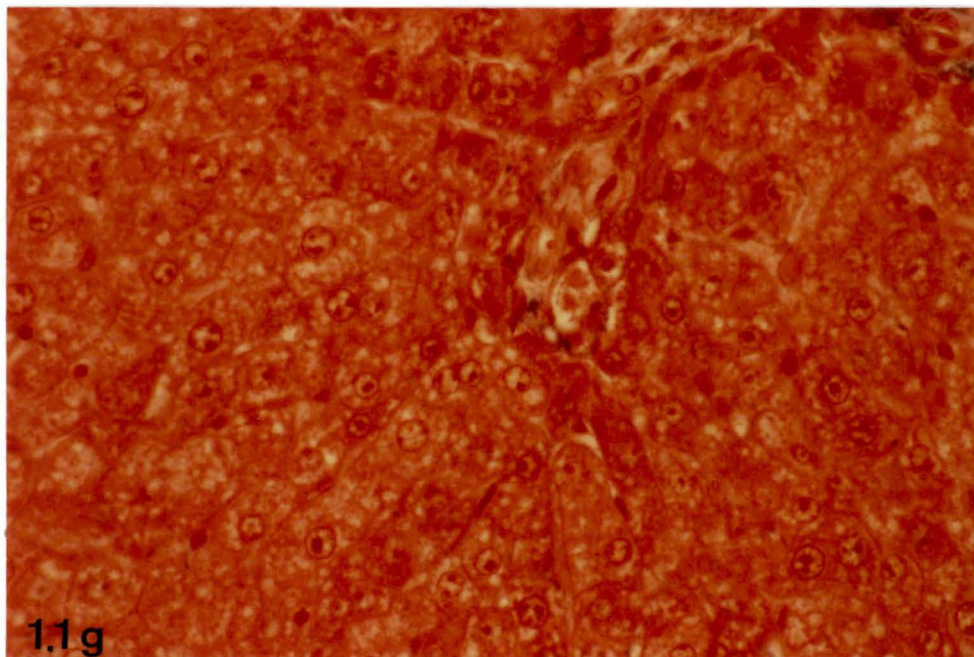
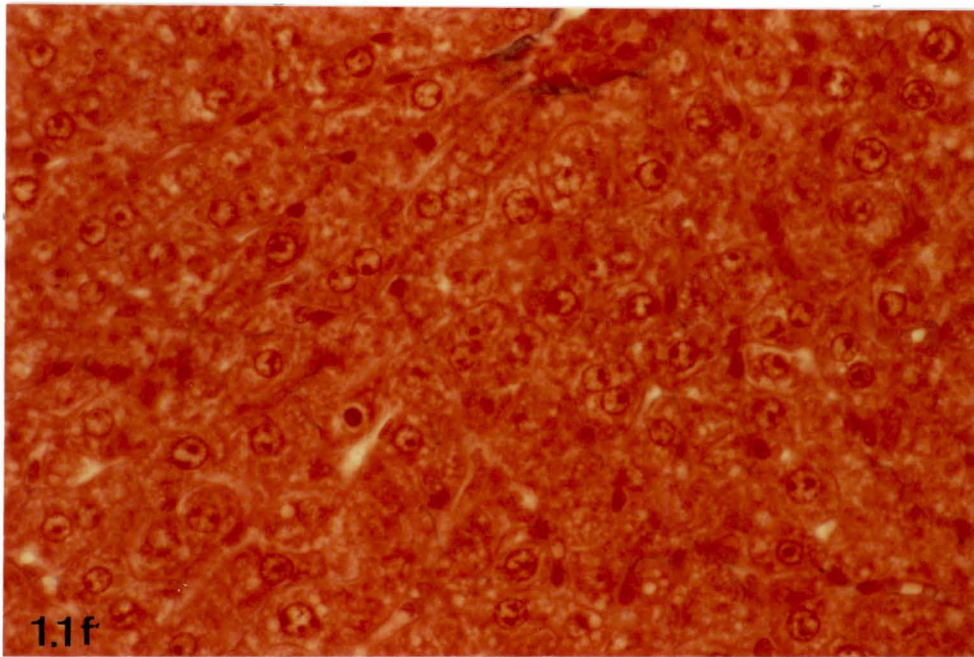
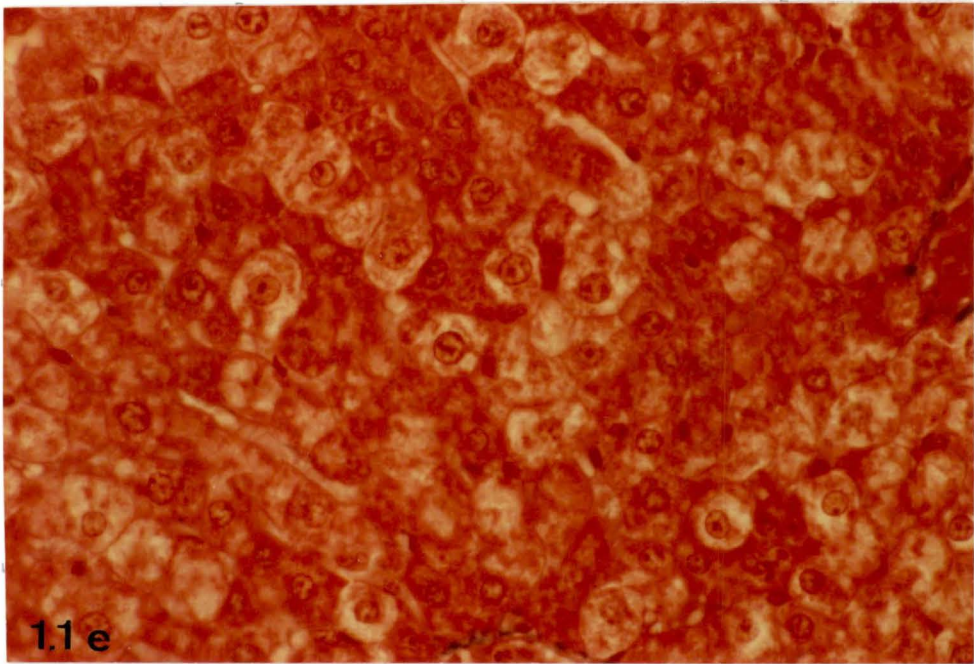
Effet de la 4-APP en fonction du temps :

Photo 1.1.e : foie traité après 20 heures

Photo 1.1.f : foie traité après 32 heures

Photo 1.1.g : foie traité après 48 heures

Grossissement : 600 fois



-nous pouvons remarquer déjà après 8 heures, la présence de quelques gouttelettes lipidiques. Ce phénomène est donc très rapide

-les hépatocytes changent de forme, ils s'arrondissent et sont un peu plus gros que des hépatocytes normaux

-nous devons aussi faire remarquer que ces effets sont locaux, certaines zones sont moins touchées. Mais après un traitement de 72 heures, tous les hépatocytes semblent atteints.

-l'architecture globale du foie reste tout à fait préservée

-les espaces portes sont également normaux

Mais nous pouvons nous poser la question de savoir si ce phénomène est réversible. (photos 1.1 : h, i, j, k)

Après un traitement de deux jours, des foies de rats ayant récupérés 1, 2, 3 et 4 jours ont été examinés :

-après un et deux jours de récupération, les hépatocytes sont toujours arrondis et remplis de gouttelettes lipidiques

-après 3 et 4 jours, nous pourrions confondre ces foies avec des foies de rat contrôle. L'aspect des hépatocytes est normal, le cytoplasme n'est plus envahi de vacuoles non colorées.

Nous pouvons donc dire à la suite des observations de microscopie optique que la 4-aminopyrazolopyrimidine provoque dans le foie une accumulation de gouttelettes lipidiques au niveau des hépatocytes et que ce phénomène est rapide et réversible.

### 2.1.2. microscopie électronique :

Nous avons examiné des foies de rat contrôle et de rat traité pendant 2 jours à la 4-APP en microscopie électronique (micrographies 1.2. a, b, c, d). L'objectif étant de nous donner des informations éventuelles sur les différentes structures subcellulaires impliquées dans le métabolisme des lipides et des lipoprotéines ( membrane plasmique, réticulum endoplasmique, appareil de golgi, vésicules de transport, lysosomes, peroxisomes et mitochondries). Une étude approfondie serait intéressante mais n'a pas été réalisée.

Effet de la 4-APP en fonction du temps :

Nous avons traité une série de rats pendant 2 jours, nous les avons laissés récupérer pendant un certain nombre de jours :

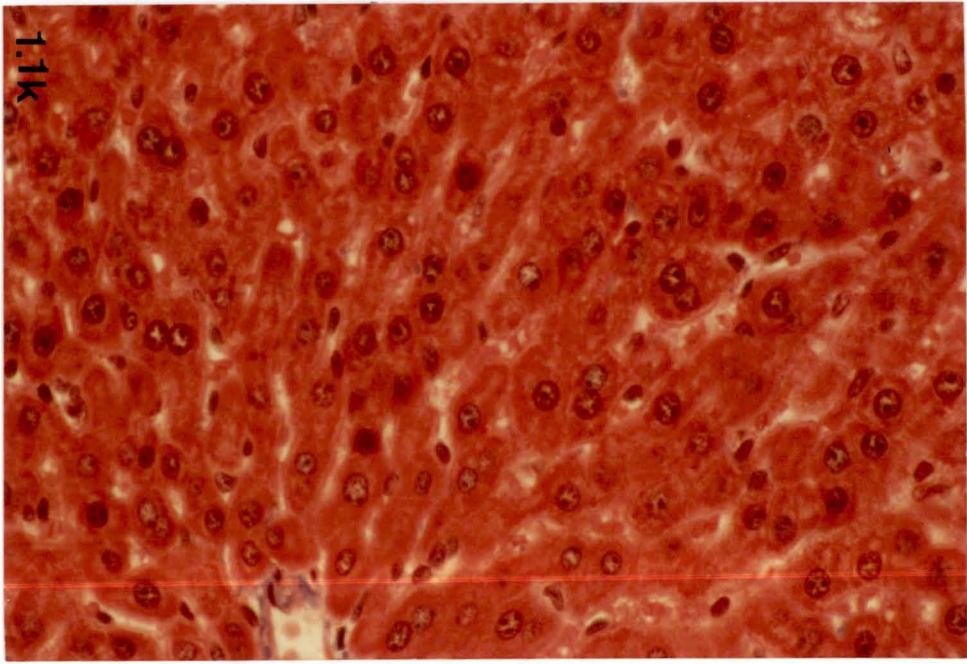
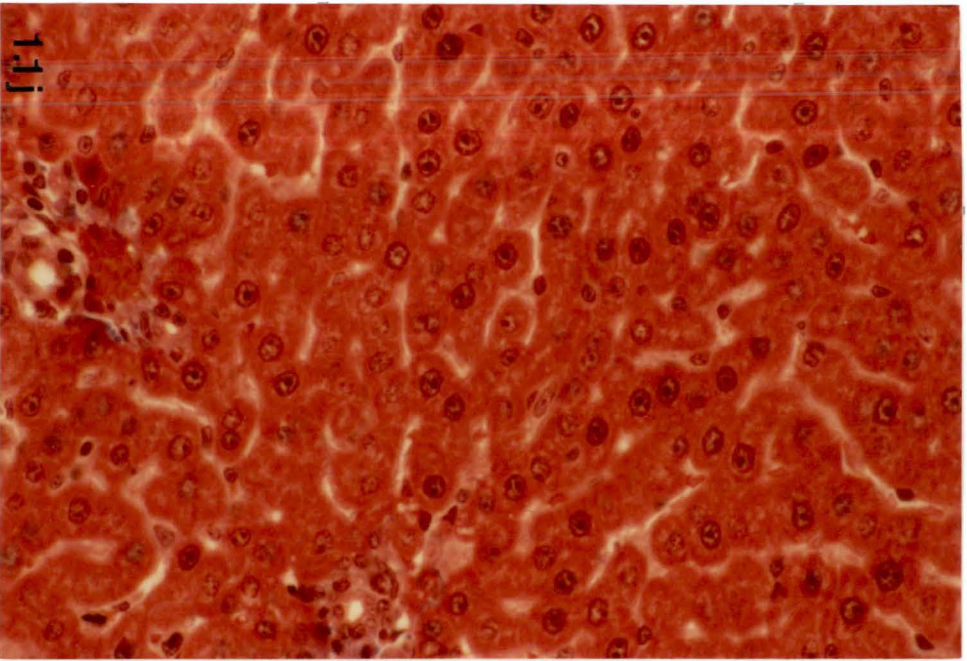
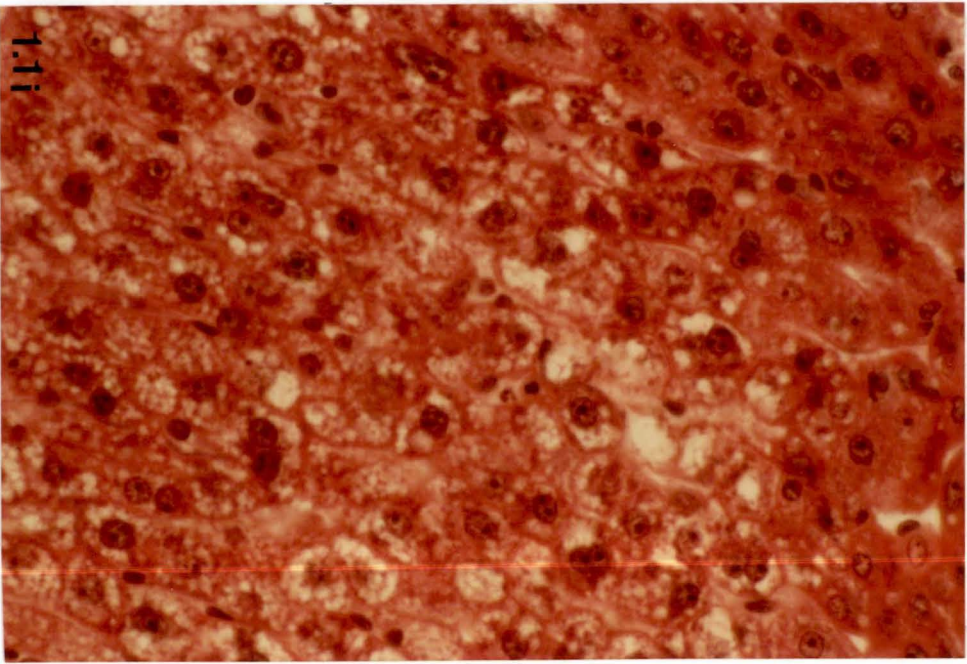
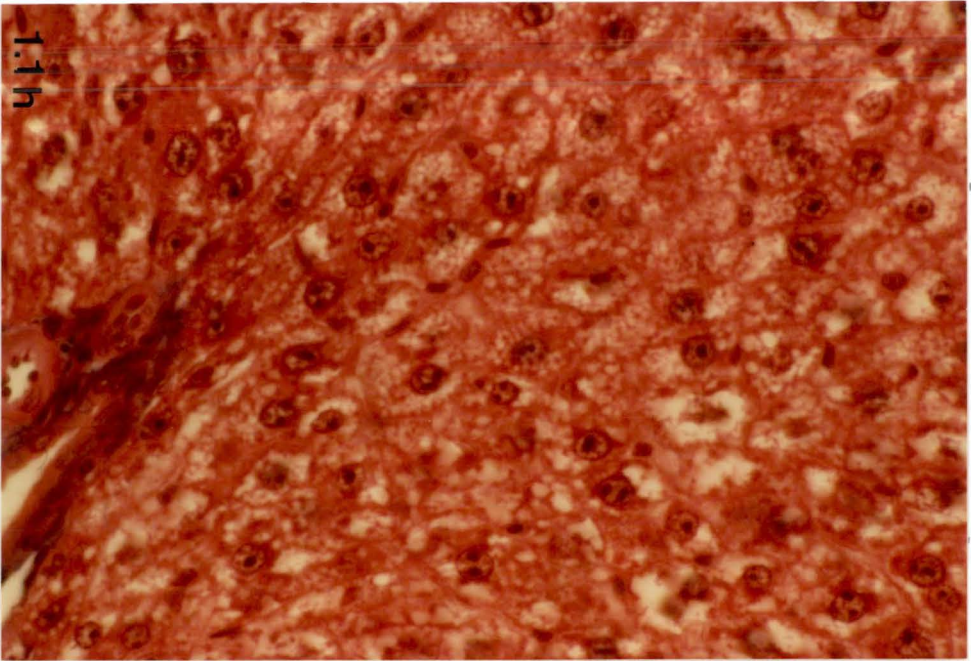
Photo 1.1.h : foie de rat ayant récupéré pendant 1 jour

Photo 1.1.i : foie de rat ayant récupéré pendant 2 jours

Photo 1.1.j : foie de rat ayant récupéré pendant 3 jours

Photo 1.1.k : foie de rat ayant récupéré pendant 4 jours

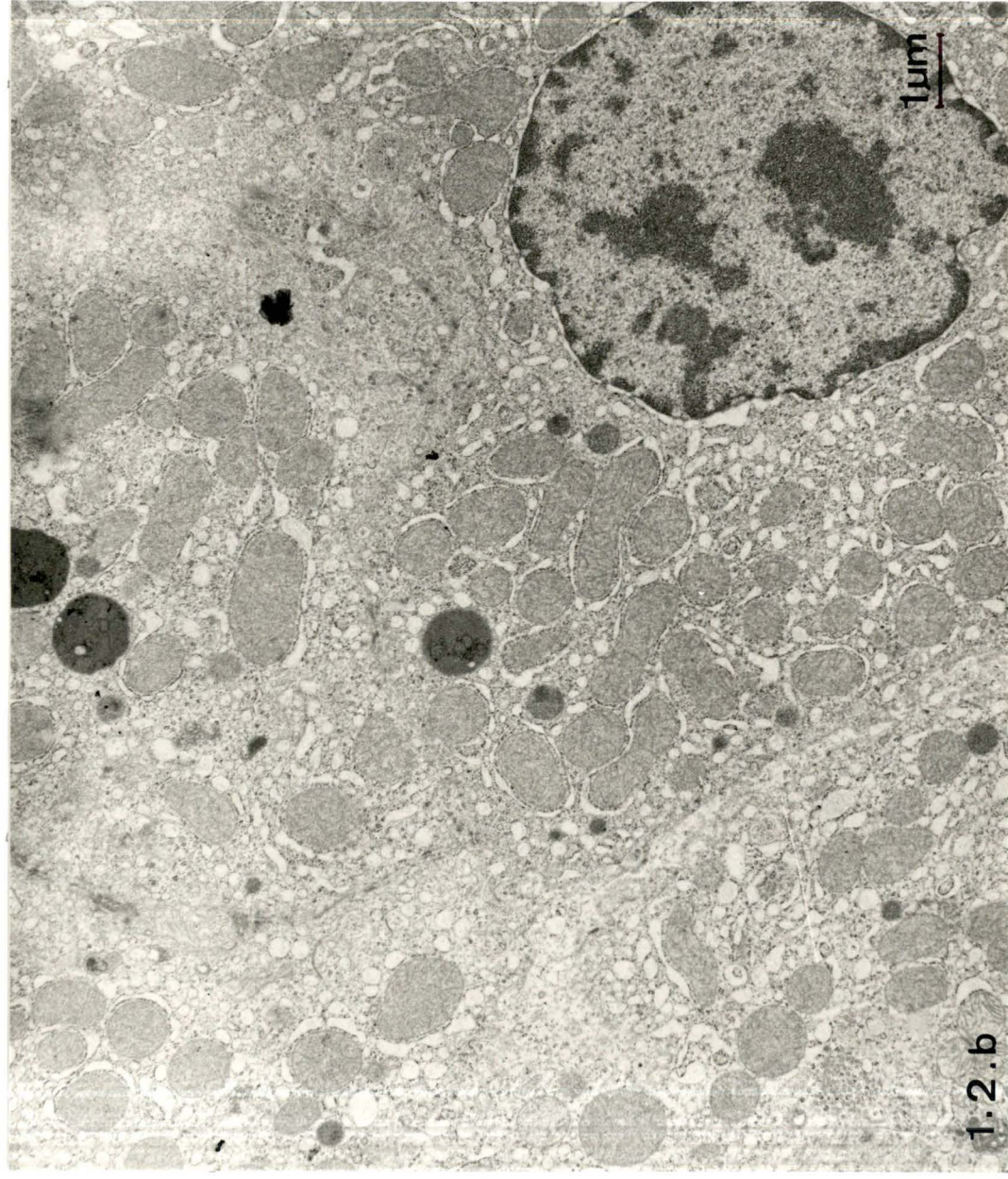
Grossissement : 600 fois



Effet de la 4-APP sur les structures  
subcellulaires :

Photo 1.2.a : hépatocytes de rat témoin

Photo 1.2.b : hépatocytes de rat traité pendant  
12 heures

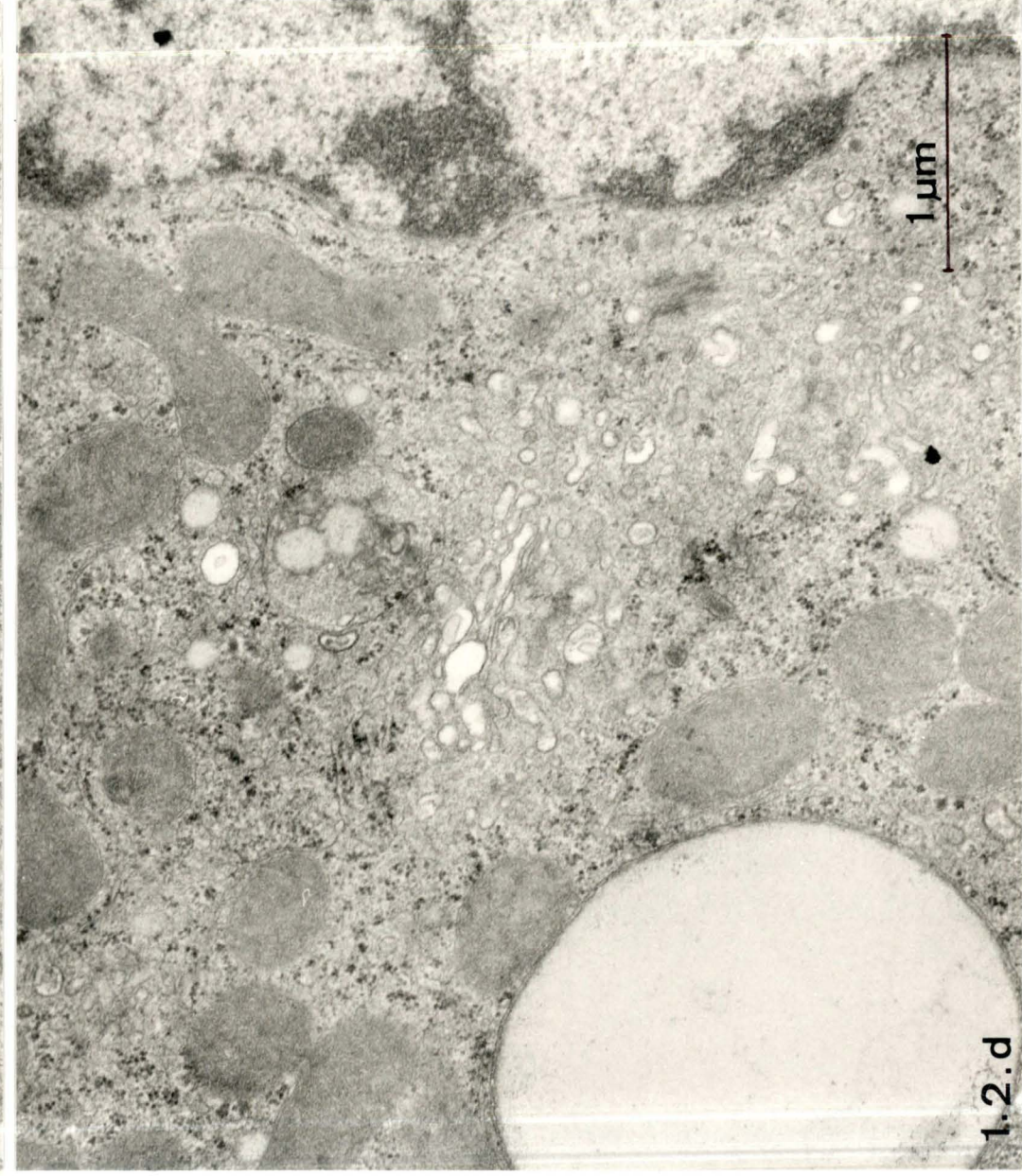
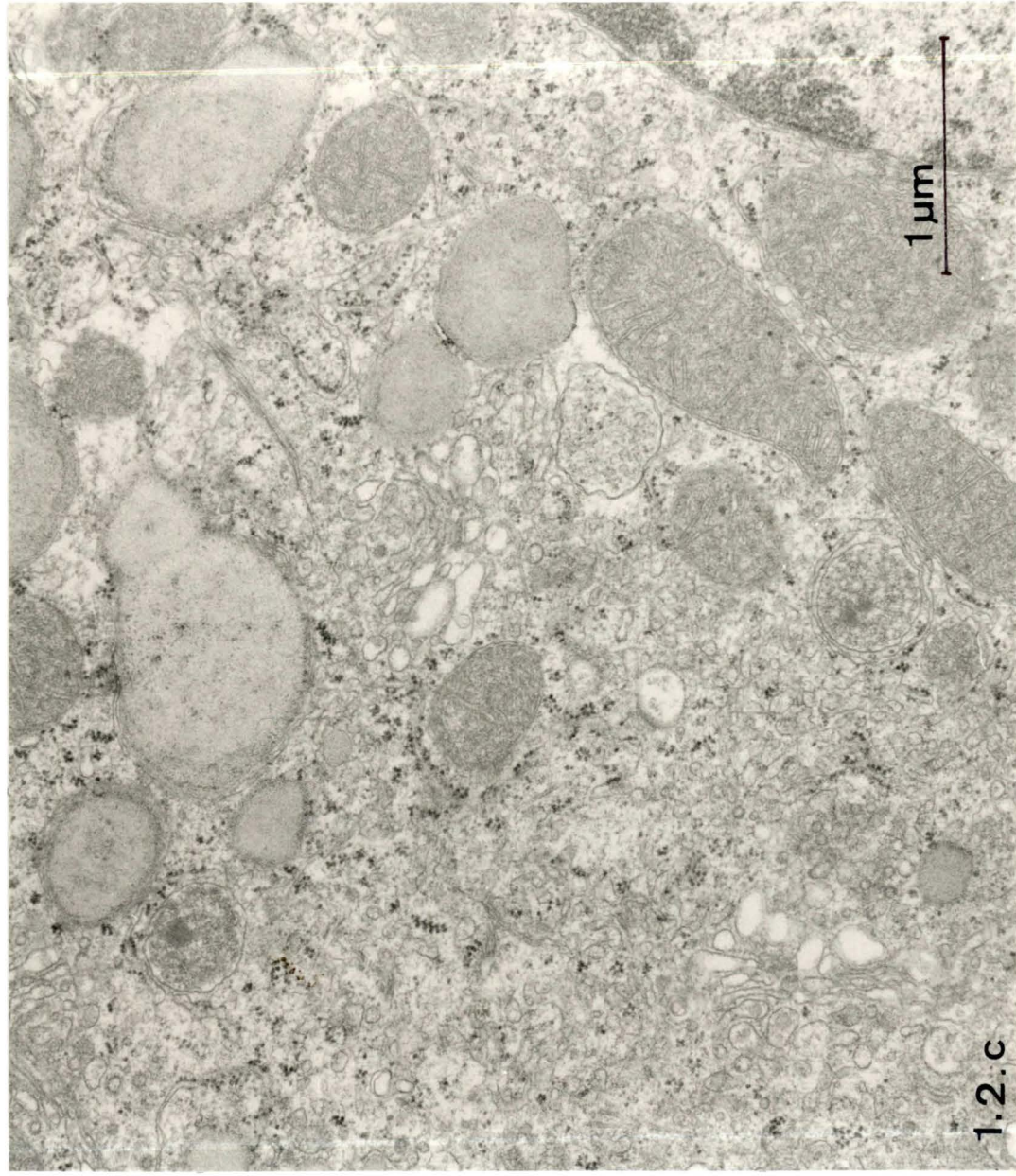


Effet de la 4-APP sur les structures  
subcellulaires :

Photo 1.2.c : hépatocytes de rat traité après 2 jours

Photo 1.2.d : hépatocytes de rat traité après 2 jours





La microscopie électronique permet de nous montrer qu'il existe différents types de gouttelettes lipidiques :

-des gouttelettes lipidiques à l'état libre : caractérisées par leur localisation dans le cytoplasme, leur aspect homogène, l'absence de membrane limitante

-des gouttelettes lipidiques limitées par une double membrane : en fait, il s'agit de gouttelettes lipidiques entourées de réticulum endoplasmique soit entièrement soit par endroit.

Ces gouttelettes lipidiques sont généralement dans le voisinage de mitochondries, de peroxisomes et de réticulum endoplasmique.

Le réticulum endoplasmique contribue beaucoup au métabolisme des lipides. Les enzymes synthétisant les triglycérides et les phospholipides sont localisées dans le R.E. rugueux alors que la synthèse du cholestérol se fait au niveau du R.E. lisse. La synthèse des apoprotéines des lipoprotéines et la glycosylation partielle des lipoprotéines a lieu dans le R.E.

Le réticulum endoplasmique des rats traités est présent, comme indiqué précédemment, autour ou près des gouttelettes lipidiques. Le R.E. ne semble pas dilaté sur ces micrographies après 48 heures de traitement. Mais sur des micrographies de 8, 12, 16 heures, le réticulum endoplasmique est dilaté.

L'appareil de Golgi reçoit à sa partie cis les éléments du R.E et libère à sa partie trans des vacuoles de sécrétion ou de transport. Les dernières étapes de la glycosylation des lipoprotéines ont lieu et les VLDL formées vont dans les vésicules de sécrétion. L'appareil de Golgi des rats traités est dilaté. Dans le Golgi et ses vésicules, nous pouvons voir des lipoprotéines. Cette observation nous indique que le transport du R.E au golgi a bien lieu.

Les lysosomes interviennent dans le catabolisme des lipides et des lipoprotéines. A part, la présence de vacuoles d'autophagie, nous n'observons pas beaucoup de modifications.

Les mitochondries sont le lieu d'oxidation des acides gras. C'est sans doute la raison pour laquelle les mitochondries sont associées aux gouttelettes lipidiques. L'aspect des mitochondries est normal.

Les peroxysomes sont aussi capables d'intervenir dans l'oxidation des acides gras et la biosynthèse des lipides par la présence d'oxidases et de ligases. C'est pourquoi nous pouvons les trouver près des lipides. Les peroxysomes sont normaux.

Nous pouvons résumer les observations de microscopie électronique en disant que apparemment, chez les rats traités, les lipoprotéines sont transportées du R.E au Golgi, que ces deux structures sont dilatées de manière significative et que les autres structures subcellulaires ne semblent pas touchées.

## 2.2. Observations sur hépatocytes isolés :

Ces photographies (2 : a, b, c) viennent confirmer les observations de la microscopie optique déjà citées.

Il s'agit d'une stéatose microvacuolaire très marquée. Nous entendons par stéatose toute accumulation excessive de triglycérides dans la cellule. Il s'agit d'une lésion d'ordre quantitatif, entraînant des modifications cellulaires. Il n'y a pas d'atrophie de la cellule qui conserve un bon état fonctionnel, ce qui explique que les lésions soient réversibles.

Des analyses plus poussées ont montrés que la stéatose est la seule lésion évidente, qu'il n'y avait pas de surcharge pigmentaire ni de cytolysse.

En résumé : les observations morphologiques nous montrent qu'il y a une accumulation de lipides au niveau des hépatocytes, que le passage des lipoprotéines du R.E au Golgi a lieu, que ce phénomène est rapide, quelques heures suffisent, et qu'il est réversible, qu'il s'agit d'une stéatose.

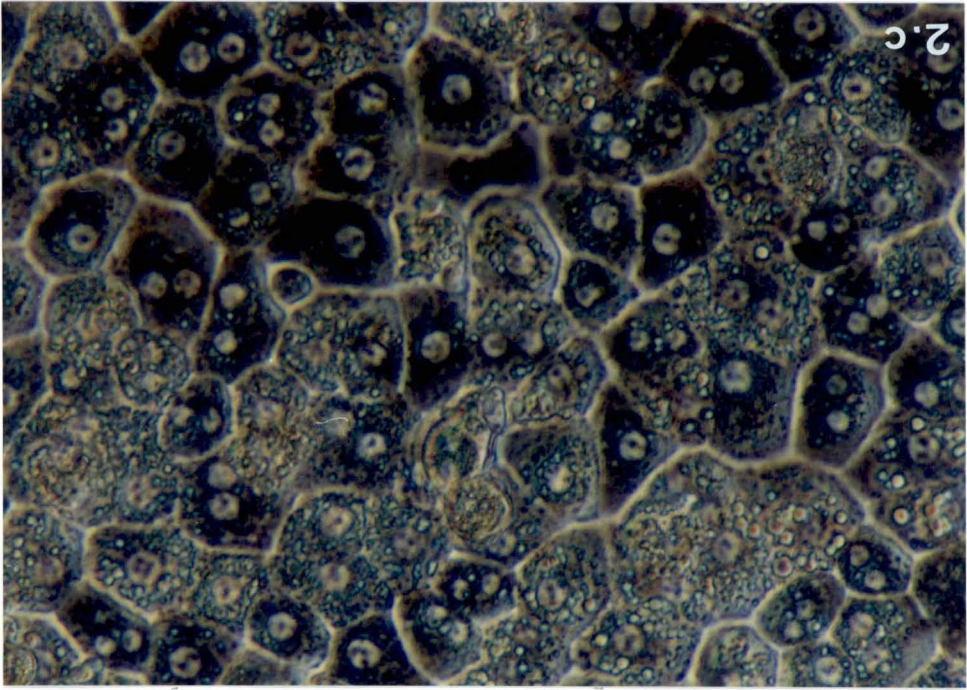
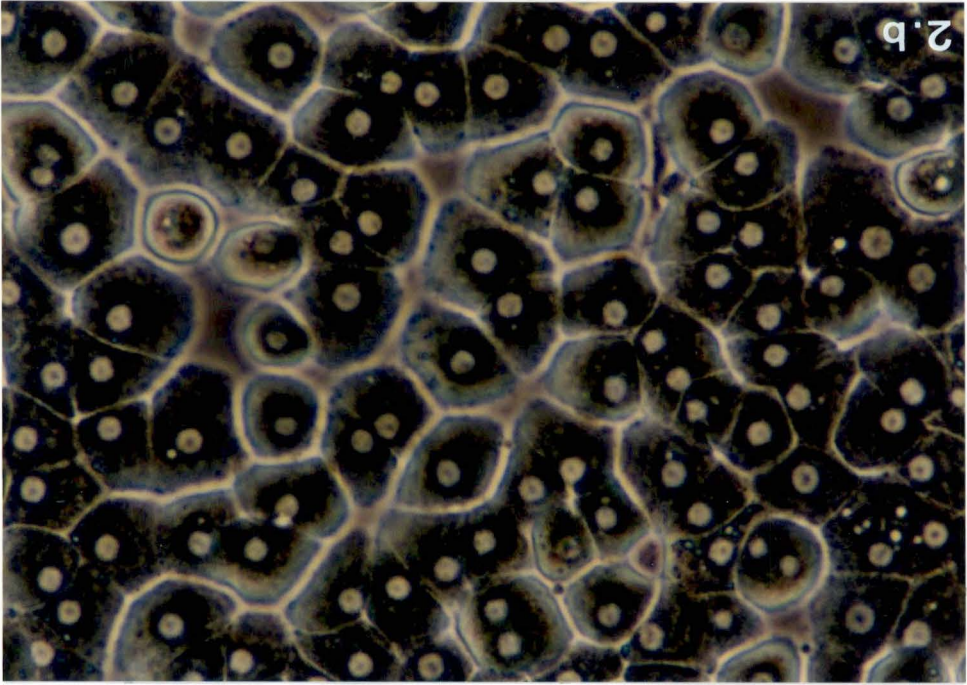
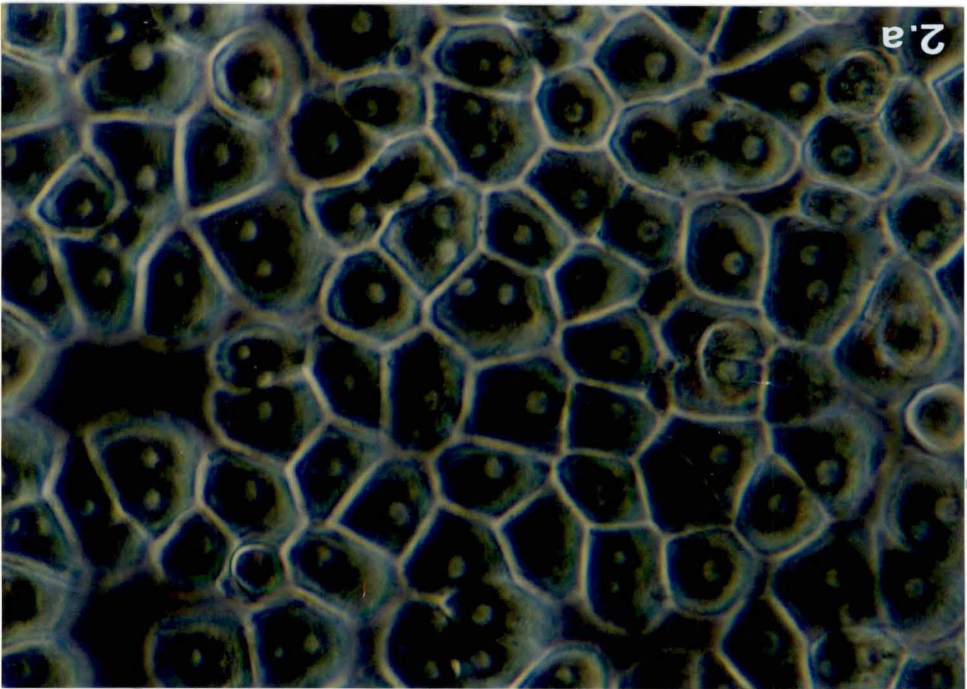
Effet de la 4-APP sur des hépatocytes isolés :

Photo 2.a : hépatocytes de rat témoin

Photo 2.b : hépatocytes de rat contrôle ( 2 injections de solvant)

Photo 2.c : hépatocytes de rat traité (avec 2 injections de 4-APP)

Grossissement : 480 fois



### CHAPITRE 3 : EFFET DE L'INJECTION DE LA 4-APP SUR LES ACTIVITÉS D'ENZYMES DE RÉFÉRENCE DES STRUCTURES SUBCELLULAIRES

Le but ultime des travaux de notre laboratoire sur la 4-APP, est de voir si l'administration de cette substance affecte certains territoires membranaires de la cellule. Une première démarche expérimentale est de rechercher si les enzymes de référence de ces systèmes membranaires ( mitochondrie, lysosomes,.....) n'ont pas leur activité modifiée par ce traitement. Les enzymes que nous avons choisies et leurs localisations subcellulaires sont indiquées au *Tableau 3.5*; en plus des enzymes, les protéines totales ont été mesurées. Les mesures ont été effectuées sur homogénat et ce dans deux conditions : 1) sur deux groupes d'animaux ayant reçus deux injections de 4-APP ou de solvant et sacrifiés 24 heures plus tard. 2) sur une série d'animaux mais sacrifiés à des temps différents après l'injection, pour déterminer la réversibilité des modifications éventuelles.

#### 3.1. Activités après deux injections :

Les résultats sont rassemblés dans les *Tableaux 3.6 et 3.7* qui donnent les activités en unités par gr de foie et en unités par mg de protéines.

Deux types de variations opposées sont observés si nous nous référons aux activités par gr de foie. L'activité enzymatique augmente pour la galactosyltransférase (golgi) et pour l'arylsulfatase (lysosome); l'activité enzymatique diminue pour les autres enzymes.

L'augmentation des activités de la galactosyltransférase et de l'arylsulfatase est très importante et restent très significative si nous comparons cette fois, les activités par mg de protéines ( *Table*

enzymes	localisations subcellulaires
arylsulfatase	lysosome
cathepsine C	lysosome
phosphatase acide	lysosome
catalase	peroxysome
cytochrome oxydase	mitochondrie (membrane interne)
galactosyltransférase	appareil de Golgi
glucose-6-phosphatase	réticulum endoplasmique
phosphodiesterase alcaline	membrane plasmique

Tableau 3.5 :  
Localisations subcellulaires des différentes enzymes de référence.

	protéine.	aryl.	galact.	pdase	G-6-phos	phos.acid.	catheps C	cytox	catalase
solvant (2 inject.)	265.14 (+5.28)	28.84 (+0.93)	10.34 (+0.95)	46.44 (+0.87)	29.55 (+1.80)	16.81 (+1.33)	50.68 (+1.45)	39.39 (+4.22)	77.83 (+1.18)
traité (2 inject.)	166.83 (+16.48)	220.89 (+31.58)	31.63 (+1.70)	26.03 (+10.63)	15.52 (+2.80)	7.61 (+2.63)	12.56 (+2.89)	18.34 (+2.46)	16.06 (+5.08)

**Tableau 3.6 :**

**Activités enzymatiques après 2 injections.** Les activités sont exprimées en unité par gr de foie. Quatre rats ont été traités avec la 4-APP et quatre autres ont reçu le solvant. Ce tableau reprend les moyennes et les déviations standards.

	aryl.	galact.	pdase	G-6-phosp.	phosp.acid.	cathep.C	cytox	catalase
solvant (2 inject.)	0.111 (+0.002)	0.039 (+0.004)	0.180 (+0.006)	0.113 (+0.009)	0.064 (+0.003)	0.189 (+0.001)	0.143 (+0.019)	0.288 (+0.011)
traité (2 inject.)	1.293 (+0.248)	0.186 (+0.009)	0.153 (+0.079)	0.087 (+0.017)	0.046 (+0.017)	0.071 (+0.013)	0.110 (+0.021)	0.095 (+0.031)

**Tableau 3.7 :**

**Activités enzymatiques après deux injections.** Les activités sont présentées en unité par mg de protéines.



3.7) ; il est à noter que la quantité de protéine du foie diminue sous l'influence du traitement.

Quant aux diminutions d'activités, elles sont également marquées mais sont pour certaines enzymes sensiblement moins apparente (cytochrome oxydase, phosphodiesterase) si nous tenons compte de la diminution de la concentration en protéines.

### 3.2. Activités en fonction du temps suivant l'injection :

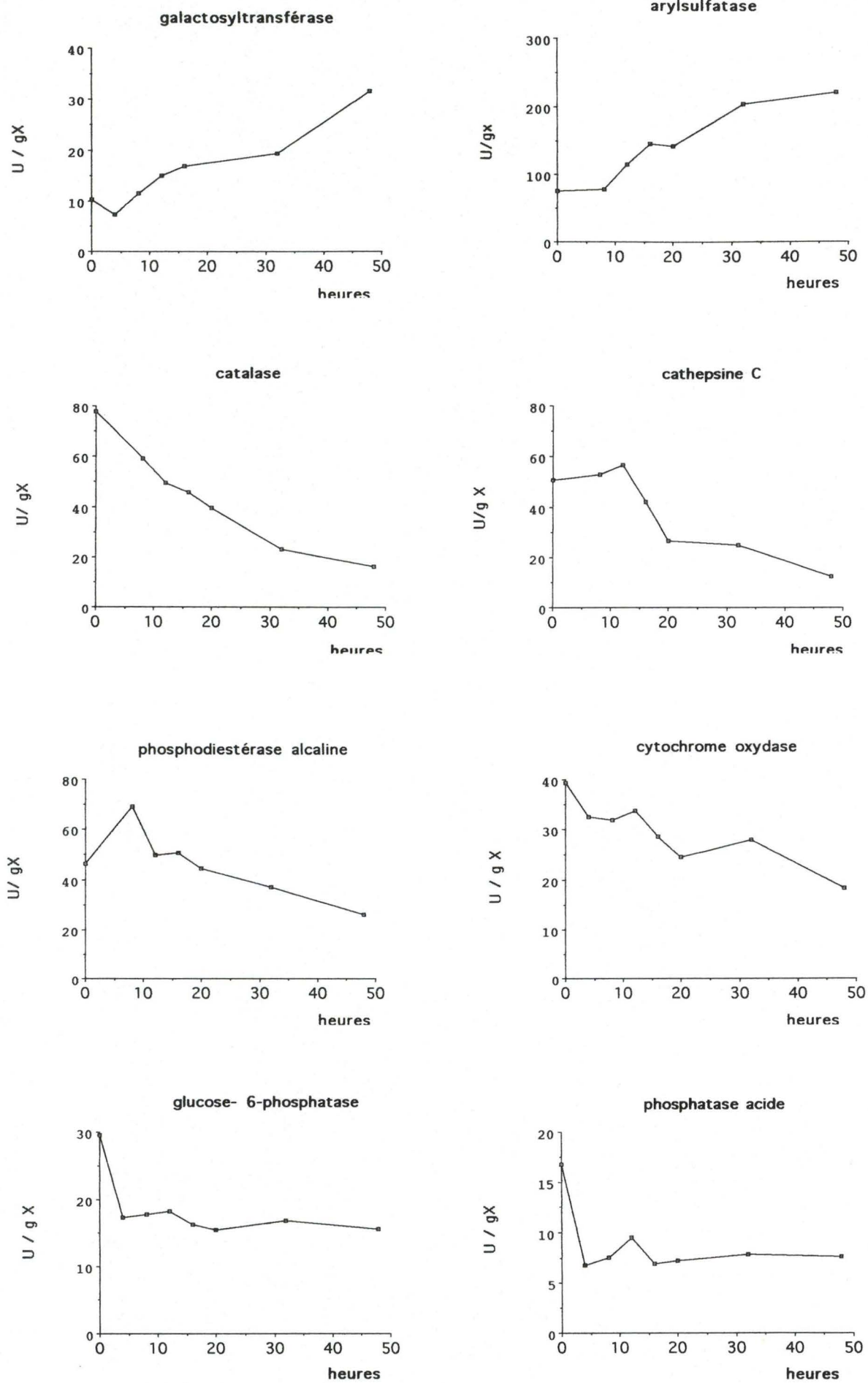
Rappelons que ici, les déterminations après les différents temps ont été prises sur un seul animal à chaque temps. Les résultats sont rassemblés aux *Figures 3.3 et 3.4* qui donnent respectivement les activités par g de foie et par mg de protéines.

Les augmentations d'activités de la galactosyltransférase et de l'arylsulfatase se font parallèlement et débutent une dizaine d'heures après l'injection.

C'est sensiblement ce que nous observons (mais dans le sens d'une diminution d'activité) pour la catalase et la cathepsine C et dans une moindre mesure pour la phosphodiesterase alcaline et la cytochrome oxydase. Quand à la phosphatase acide et la glucose-6-phosphatase, il est surprenant de voir qu'une chute initiale d'activité est apparente suivie d'un maintien quasi constant de cette activité pendant de nombreuses heures.

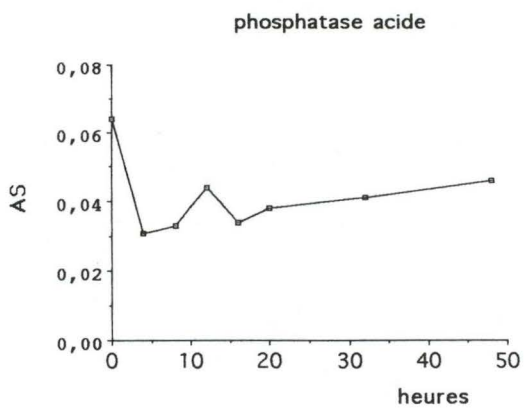
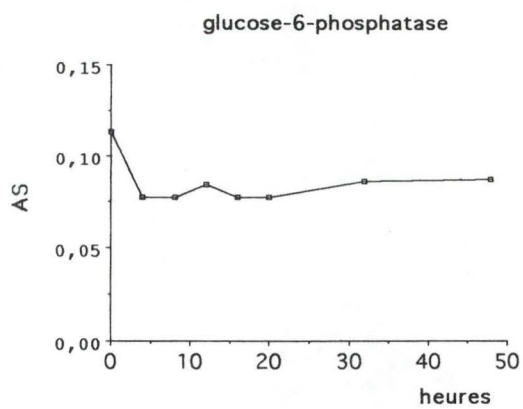
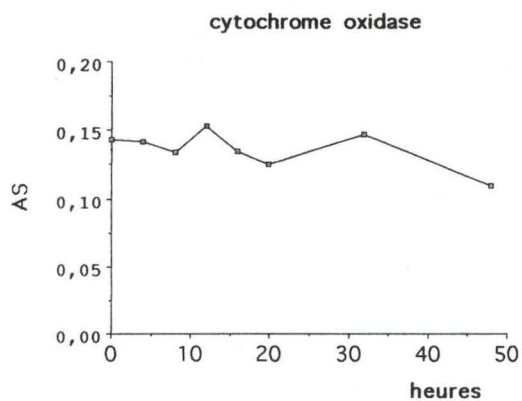
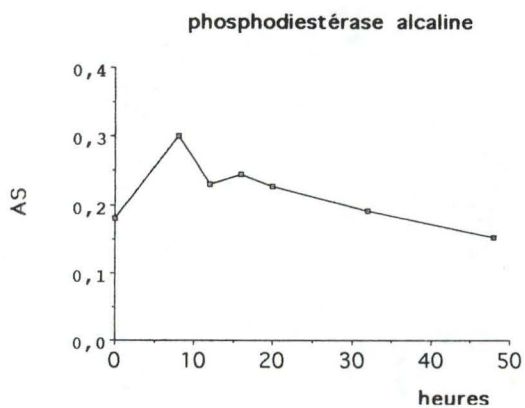
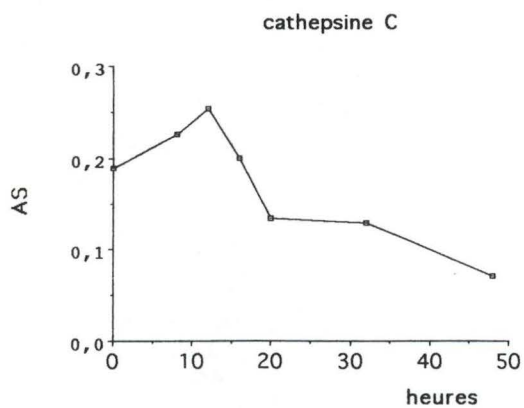
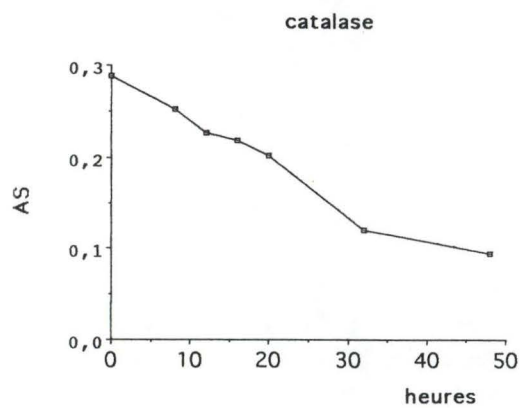
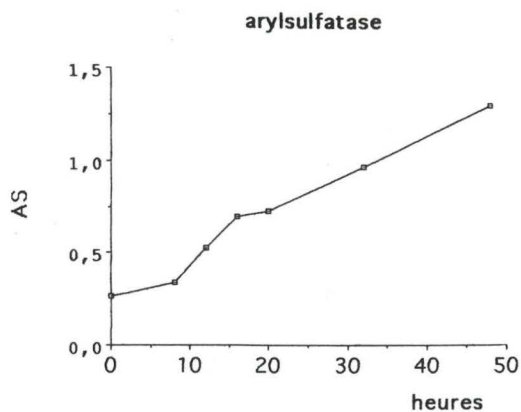
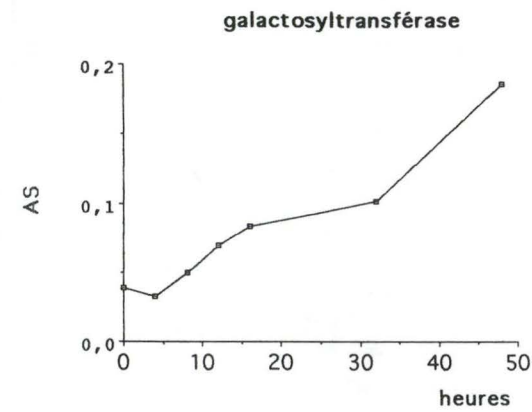
### 3.3. Reversibilité des modifications enzymatiques :

Les modifications enzymatiques que nous avons observées sont réversibles comme l'exemplifient les résultats présentés aux *Figures 3.5 et 3.6*. Ils nous montrent comment évoluent dans les jours qui suivent le traitement à la 4-APP, les enzymes qui subissent les plus frappantes modifications d'activité. La récupération d'une activité normale s'opère plus rapidement pour les activités enzymatiques de la galactosyltransférase et de l'arylsulfatase qui rappellent le augmentent suite à l'administration de 4-APP. En effet un jour après la fin du traitement, ces enzymes manifestent une activité normale, alors qu'il faut 3 jours pour la

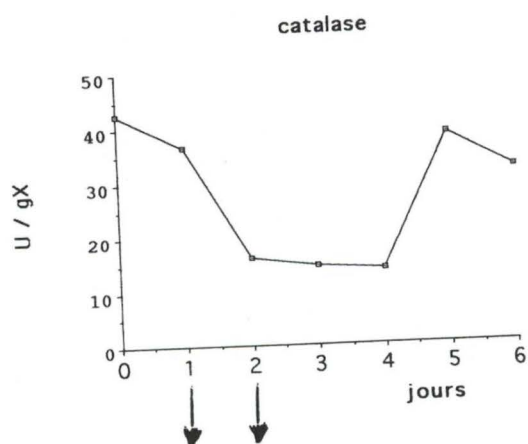
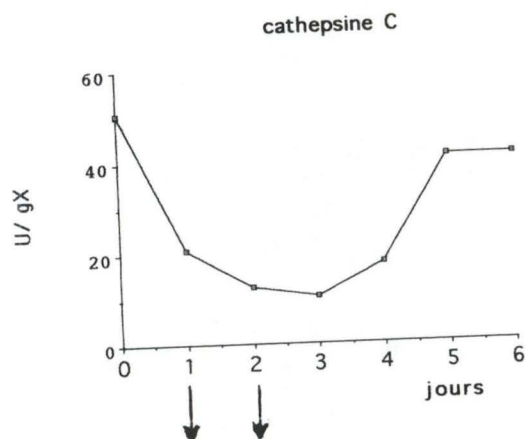
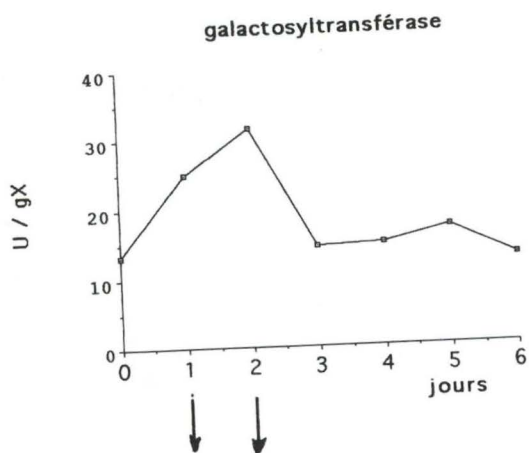
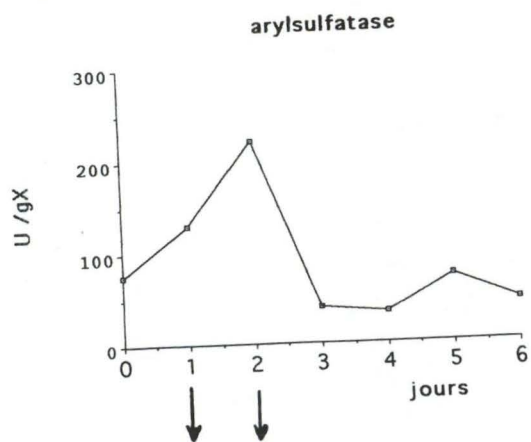


**Figure 3.3 :**

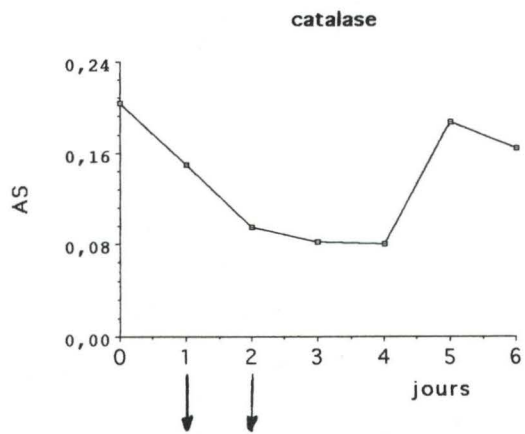
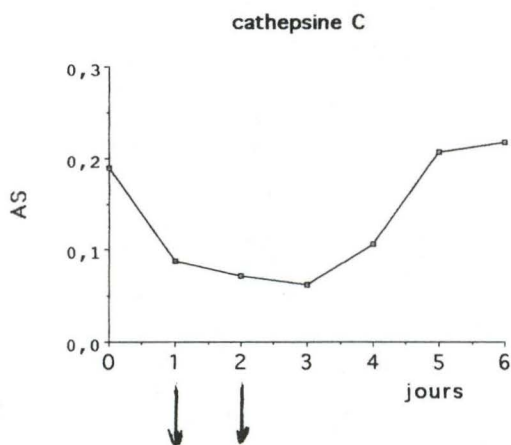
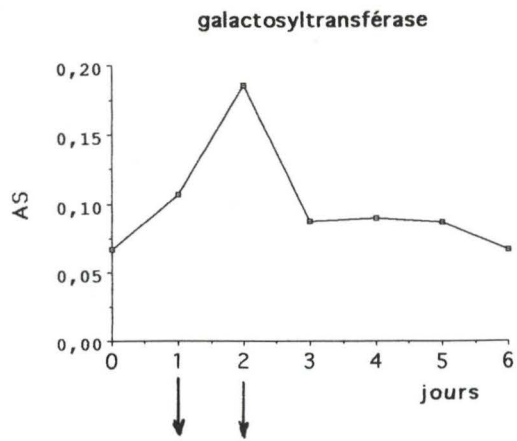
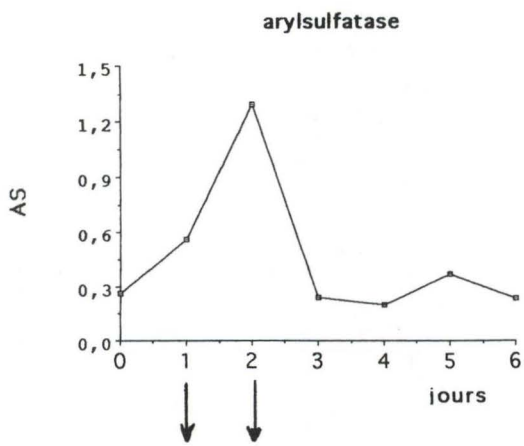
**Activité enzymatique en fonction du temps.** L'activité est exprimée en unité par gr de foie. Après le temps déterminé, l'animal est sacrifié, le foie est homogénéisé et filtré sur de la gaze. Les dosages enzymatiques se font à partir de cet homogénat.



**Figure 3.4 :**  
**Activité enzymatique en fonction du temps.** L'activité est exprimée en unité par mg de protéines.



**Figure 3.5 :**  
**Reversibilité des activités enzymatiques en fonction du temps.** Les flèches indiquent une injection. Après 2 injections, une série de rats récupère pendant 1 jour, 2 jours, 3 jours et 4 jours. Les dosages sont réalisés sur homogénat (cf figure 3). Les activités sont présentées en unité par gr de foie.



**Figure 3.6 :**  
**Reversibilité des activités enzymatiques en fonction du temps.** Les activités sont présentées en unité par mg de protéines (cf figure 5)

cathepsine C et la catalase qui avaient subi une diminution d'activité suite à l'injection de 4-APP.

### 3.4. Mesures enzymatiques sur cellules isolées :

La repartition des enzymes hépatiques entre hépatocytes et cellules sinusoidales est relativement bien connue pour certaines enzymes lysosomiales; c'est particulièrement le cas pour l'arylsulfatase. (Munthe-Kaas et al, 1976). Cette enzyme se retrouve en proportion importante dans les cellules sinusoidales. Dans un nombre très limité d'expériences, nous avons recherché si l'augmentation d'activité de l'arylsulfatase qui se produit sous l'effet de l'injection de 4-APP concernait l'enzyme hépatocytaire ou celle des cellules sinusoidales. Le *tableau 3.8* donnent les résultats obtenus; nous constatons tout d'abord que pour les témoins, l'activité spécifique de l'arylsulfatase dans les préparations de cellules sinusoidales est beaucoup plus élevée que dans les préparations d' hépatocytes; remarquons toutefois que la S.D (déviation standard) est très élevée pour les activités des cellules sinusoidales. Nous constatons pour l'animal traité une augmentation très significative de l'activité dans les hépatocytes; par contre l'activité des cellules sinusoidales est plus faible que la moyenne des contrôles, mais la différence est peu significative si nous tenons compte de la haute S.D de cette moyenne. Après récupération, nous constatons que l'arylsulfatase hépatocytaire est redevenue normale. De tels résultats suggèrent fortement que seule l'arylsulfatase lysosomiale des hépatocytes est affectée par l'injection de 4-APP.

### 3.5 . Effet " in vitro" de la 4-APP sur les activités enzymatiques :

Une possibilité pour expliquer les effets de la 4-APP sur les activités enzymatiques, comme nous venons de le décrire, est que cette substance agisse directement sur les enzymes. Il est en effet probable qu'une certaine quantité de 4-APP se trouve dans le foie et soit présent dans les tests enzymatiques réalisées sur les homogénats. C'est pourquoi nous avons déterminé si la 4-APP

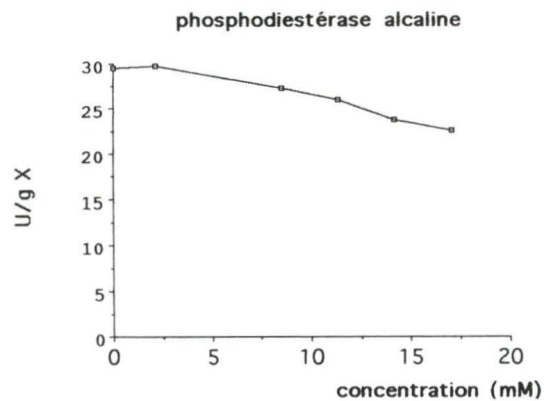
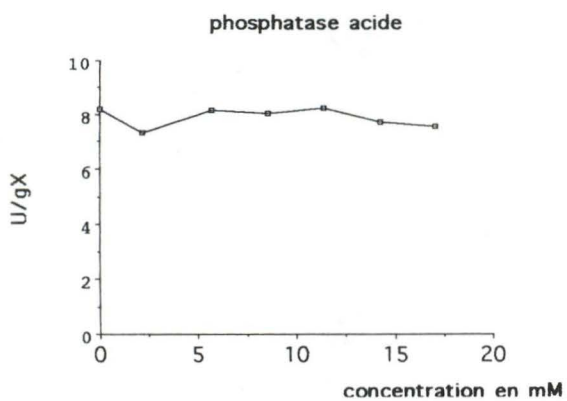
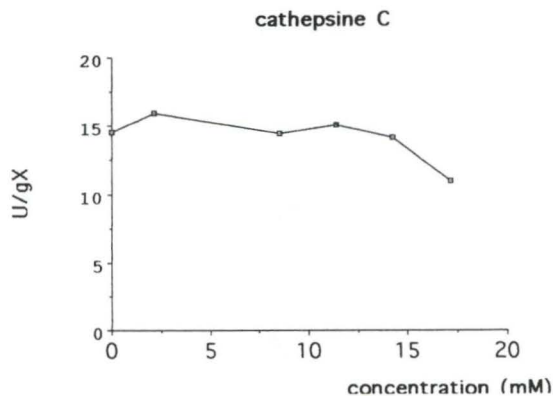
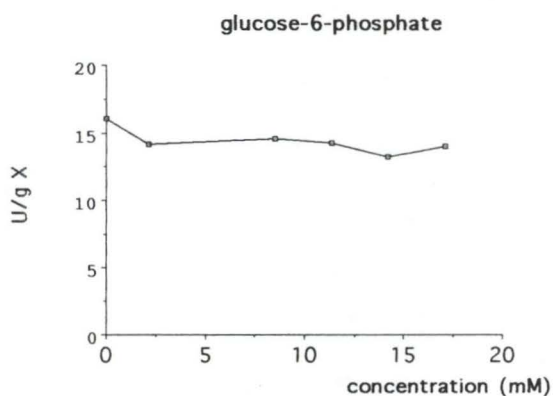
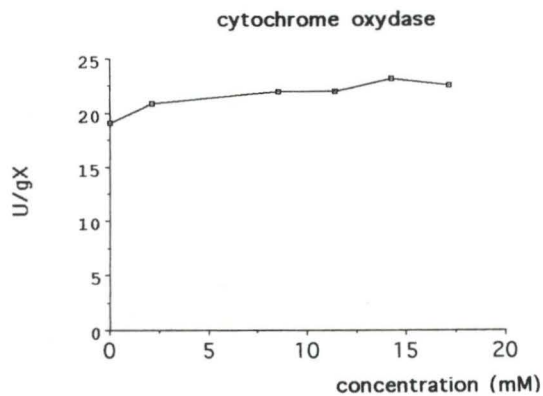
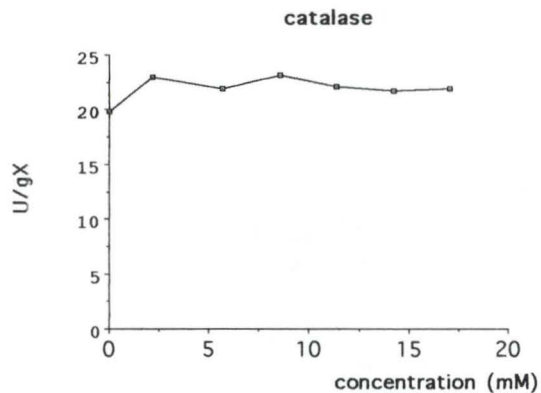
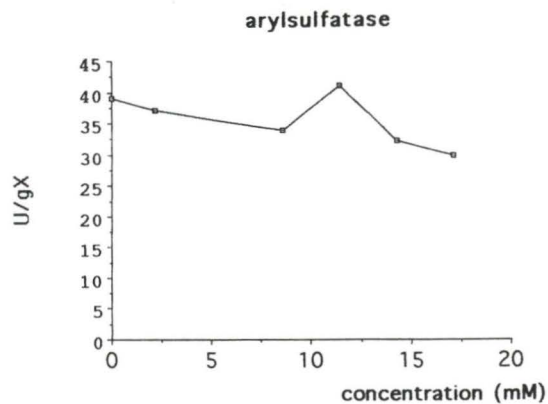
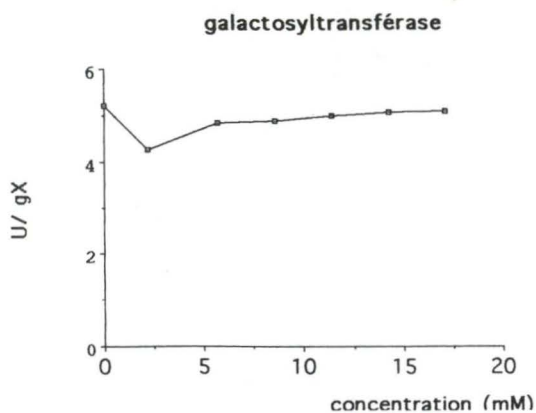
Traitement	cellules parenchymateuses	cellules non parenchymateuses
contrôle	22.4 (+9.6)	943 (+410)
traité	60	540
récupérant	20	838

**Tableau 3.8 :**

**Effet de la 4-APP sur des cellules de foie isolées.** Le dosage de l'arylsulfatase est réalisé sur les deux types de cellules du foie. Les activités enzymatiques sont exprimées en unité par mg de protéines. Le nombre de rats contrôles est 7.

ajoutée lors de la mesure de l'enzyme, dans une gamme relativement large de concentration, affectait l'activité enzymatiques. Les résultats sont présentés à la *figure 3.7*; ils montrent que d'une façon générale, les activités des enzymes de référence que nous avons mesurées sont peu touchées par la présence de 4-APP dans le milieu d'incubation.





**Figure 3.7 :**  
**Effet de la 4-APP sur les activités enzymatiques.** A un homogénat de rat témoin ( n'ayant rien reçu), nous avons ajouté des concentrations différentes de 4-APP avant de réaliser les dosages. Les activités sont exprimées en unité par gr de foie.

## CHAPITRE 4 : EFFET DE LA 4-APP SUR LA DISTRIBUTION DES ENZYMES DE RÉFÉRENCE EN CENTRIFUGATION DIFFÉRENTIELLE

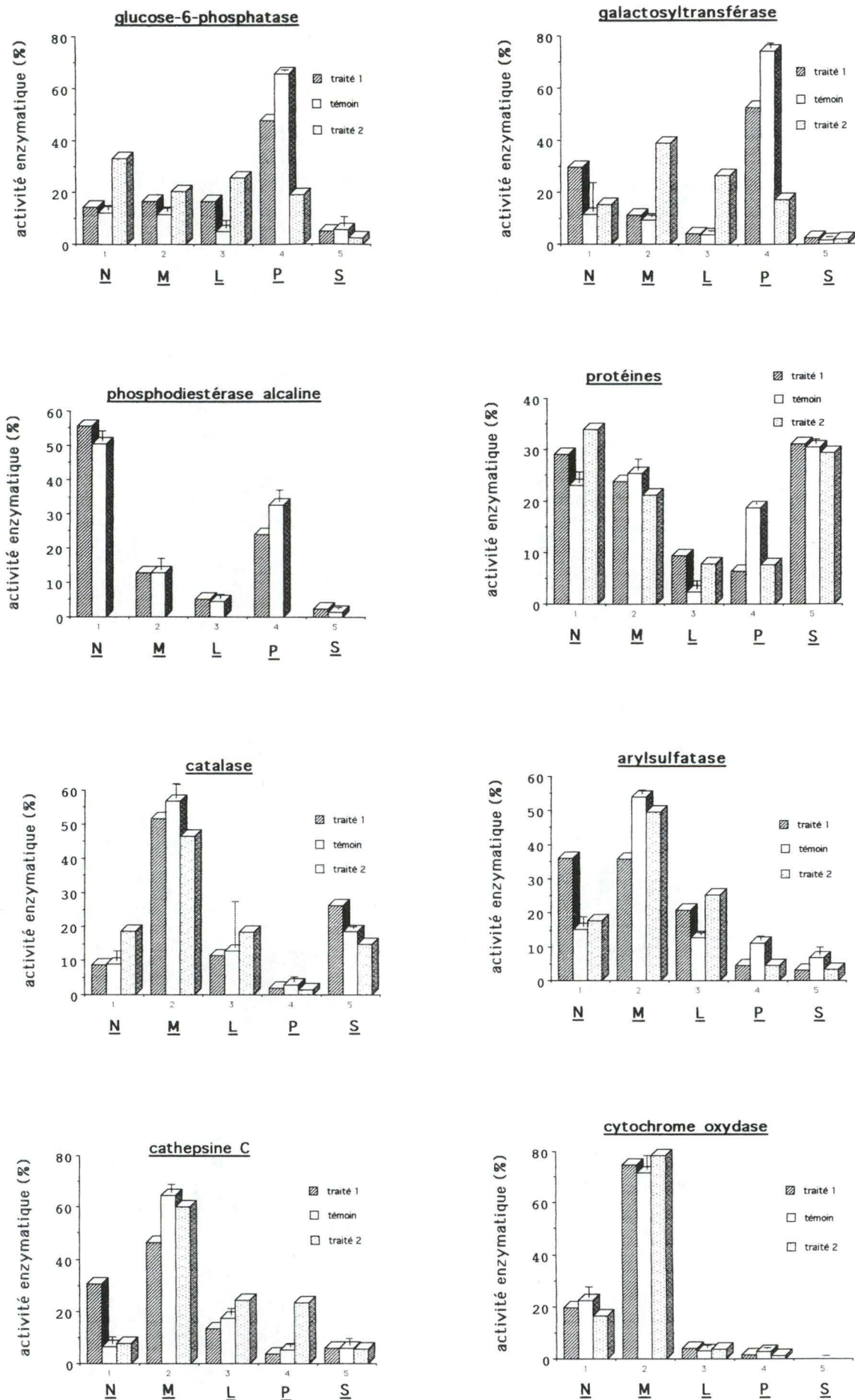
Ce chapitre est consacré à de premières recherches concernant les modifications éventuelles des systèmes membranaires du foie provoquées par l'injection de 4-APP. Nous avons analysé dans un premier temps, le comportement des structures subcellulaires en centrifugation différentielle en établissant les distributions de leurs enzymes de référence.

### 4.1. Rappel sur la centrifugation différentielle :

Dans ce système de centrifugation, le comportement des organites est conditionné par leur coefficient de sédimentation et donc par leur taille, et dans un degré moindre par leur densité. Dans le schéma de centrifugation que nous avons suivi ( de Duve et al, 1955), nous séparons successivement 5 fractions : la fraction nucléaire N, la fraction mitochondriale lourde M, la fraction mitochondriale légère L, la fraction microsomale P et la fraction S. Les distributions observées sont illustrées à la *figure 3.8*; deux rats contrôles et deux rats traités avec deux injections de 4-APP ont été utilisés.

### 4.2. Distribution chez les rats contrôles :

Dans le cas de contrôles les valeurs étaient très semblables pour les deux animaux, et les moyennes sont présentées; pour les animaux traités, des différences entre les deux animaux étaient suffisamment importantes que pour justifier la présentation des observations pour chaque animal. La *figure 3.8* rapporte les pourcentages de l'activité des enzymes de référence trouvés dans



**Figure 3.8 :**  
 Effet de la 4-APP sur la distribution des enzymes de référence en centrifugation différentielle. L'activité enzymatique en pourcentage est présentée dans les 5 fractions des 2 rats traités (avec 2 injections de 4-APP) et des rats témoins ( la moyenne et la déviation standard sont représentées).

chaque fraction. Les distribution des enzymes dans les foies contrôles correspondent à ce qui est observé normalement ( de Duve et al, 1955). La glucose-6-phosphatase (réticulum endoplasmique) est principalement localisée dans la fraction P, il en est de même pour la galactosyltransférase (appareil de Golgi). Les enzymes lysosomales : arylsulfatase et cathepsine C sont récupérées en majeure partie dans les fractions mitochondriales. La phosphodiesterase (membrane plasmique) est caractérisée par une distribution bimodale et se répartit entre la fraction N et la fraction P; la cytochrome oxydase (mitochondrie) est associée essentiellement à la fraction mitochondriale lourde; la catalase (peroxysomes), sédimente surtout dans les fractions mitochondriales tout en manifestant une activité non négligeable dans S.

### 4.3. Distribution chez les rats traités :

Malgré les différences en valeurs absolues observées entre les deux rats traités pour les pourcentages d'activité associée aux fractions, un phénomène est clairement apparent : une diminution importante des proportions de la glucose-6-phosphatase et de la galactosyltransférase récupérées dans la fraction microsomale P, ces enzymes étaient par contre retrouvées en plus grande proportion dans les fractions sédimentant à plus faible vitesse. Cela signifie que les éléments du réticulum endoplasmique et du Golgi associés à l'homogénat ont un coefficient de sédimentation, donc vraisemblablement une taille sensiblement plus élevée lorsqu'ils proviennent de rats traités à la 4-APP.

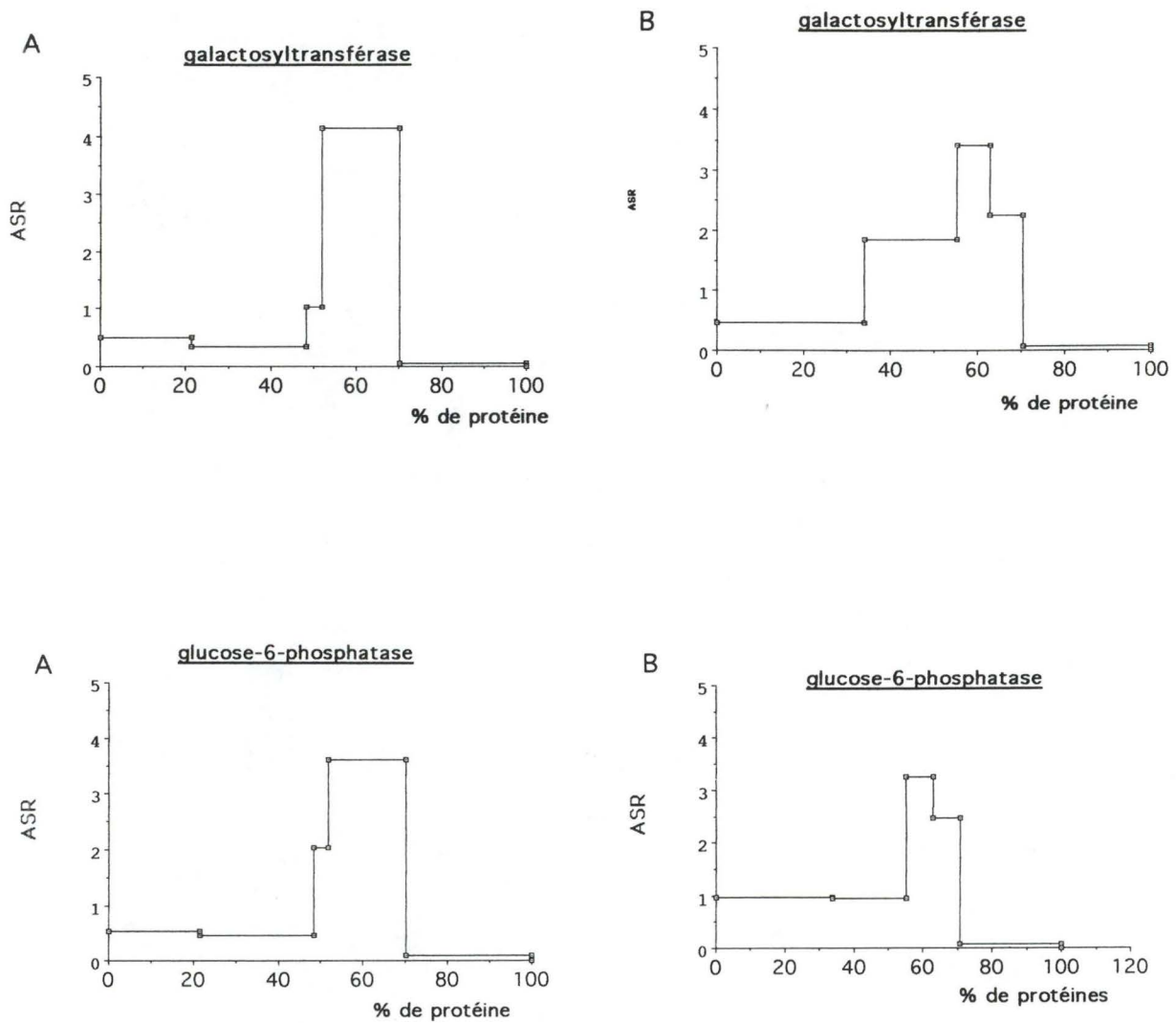
Il est à noter que la distribution de la phosphodiesterase alcaline, dont une proportion importante sédimente dans la fraction P, n'est pas affectée par le traitement, donc que les vésicules de membrane plasmique sont semblables chez les animaux contrôles et les traités.

Cet appauvrissement de P en réticulum endoplasmique est confirmé par la distribution des protéines; nous constatons en effet une diminution marquée de la quantité de protéine associée à la fraction microsomale chez les animaux traités, où le réticulum

endoplasmique est de loin le système membranaire qui contribue le plus aux protéines de P, du moins en masse.

Les modifications de distribution résultant du déplacement du réticulum endoplasmique vers d'autres fractions est bien exemplifiée par la *figure 3.9* où nous représentons les distributions de la glucose-6-phosphatase et de la galactosyltransférase chez les contrôles et chez les rats traités en utilisant le mode de représentation de de Duve et al (1955), où l'activité spécifique relative des enzymes est donnée sous forme d'histogrammes en fonction des protéines totales : les profils de distribution pour l'animal traité sont tout à fait différents de celui des contrôles.

En ce qui concerne les enzymes de références des autres structures subcellulaires : mitochondries, lysosomes et peroxysomes, nous n'observons pas de modification particulière chez les animaux traités, du moins dans les limites de nos déterminations.



**Figure 3.9 :**  
**Effet de la 4-APP sur la distribution des enzymes de référence en centrifugation différentielle.** La galactosyltransférase et la glucose-6-phosphatase sont représentées sous forme d'histogramme : l'activité spécifique relative (ASR) en fonction du % de protéine pour les rats témoins (A) et le rat traité (B).

## IV. DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

Nous examinerons les différents résultats que nous avons obtenus suivant l'ordre présenté dans les chapitres précédents : les lipides sanguins et hépatiques, les modifications morphologiques, l'effet sur les enzymes marqueurs des structures subcellulaires et la distribution de ces enzymes en centrifugation différentielle.

### Lipémie et lipides hépatiques :

Nous avons montré en accord avec la littérature (Henderson, 1963; Andersen et Dietschy, 1976; Shiff et al, 1973), une diminution importante du cholestérol sanguin et une augmentation marquée des triglycérides hépatiques suite à l'injection de la 4-APP.

La baisse de la cholestérolémie peut être due à une capture anormale du cholestérol plasmatique par les tissus, en particulier le foie, non compensée par la sécrétion hépatique. A première vue, il est assez peu vraisemblable qu'il en soit ainsi, car l'organe jouant un rôle majeur dans la capture du cholestérol est le foie et on devrait s'attendre si une telle situation se produisait à une augmentation du cholestérol hépatique, ce qui n'est pas le cas. Toutefois, cette augmentation pourrait être difficilement décelable. En effet, en nous référant à la *figure 3.2.*, on peut calculer que en 24 heures, 5 mg de cholestérol ont disparus du plasma sous l'influence de l'injection de 4-APP en supposant un rat de 300 gr. La quantité de cholestérol hépatique est de  $\pm 60$  mg/ foie; ce qui signifie que si le cholestérol sanguin disparus, s'accumulerait dans le foie, il ne provoquerait qu'une augmentation de l'ordre de 10 % du cholestérol de cet organe. Nous ne pouvons donc décider en se basant sur ces chiffres si la capture du cholestérol par le foie est augmentée ou non sous l'influence de la 4-APP.

Quant aux triglycérides, la quantité qui s'accumule dans le foie est trop considérable pour qu'elle puisse provenir d'une capture exagérée du foie et du plasma. Il faut véritablement ici qu'une



rétenction très forte se produise ou un excès considérable de synthèse par rapport à la sécrétion. En nous référant au fait que le cholestérol hépatique ne change pas, il semble plausible d'admettre que la synthèse de triglycérides est augmentée. En effet, si uniquement la sécrétion était bloquée, on devrait s'attendre à une augmentation du cholestérol hépatique puisqu'il est sécrété associé aux mêmes VLDL que les triglycérides. L'augmentation des triglycérides dans le foie est de 1.3 gr par foie; si l'on suppose que les triglycérides qui s'accumulent, sont destinés à être sécrétés sous forme de VLDL, ils devraient être associés à 22 mg de cholestérol par foie (voir *tableau 2.1*), ce qui n'est absolument pas le cas, le cholestérol hépatique restant inchangé suite au traitement par la 4-APP. Evidemment, l'augmentation de la synthèse doit s'accompagner d'une diminution de la sécrétion puisque la triglycéridémie diminue.

#### Diminution de sécrétion des lipoprotéines :

Les analyses morphologiques ont montré qu'une accumulation de lipides était présente dans le foie. Il existerait un problème au niveau de la sécrétion des lipoprotéines. Les micrographies nous permettent de dire que le transfert des lipoprotéines du réticulum endoplasmique au Golgi est réalisé. Apparemment, puisque nous pouvons voir des lipoprotéines dans les citernes du Golgi, le problème ne viendrait pas de la synthèse et de la formation des lipoprotéines.

Glickman et Subersin (1982) rapportent aussi des modifications dans le Golgi et le réticulum endoplasmique, les citernes du Golgi deviennent distendues par la présence des VLDL, mais les vésicules de sécrétion ne sont pas formées. Le réticulum endoplasmique est également dilaté par une accumulation de lipides. Les VLDL s'accumuleraient dans le Golgi tandis que les triglycérides plasmatiques et les VLDL diminueraient fortement. Cela suggèrent que la sécrétion des VLDL bloquée par la 4-APP, a lieu dans le Golgi menant à une accumulation secondaire des triglycérides dans le R.E.

Il est intéressant de noter qu'un moyen classique de provoquer une stéatose hépatique est de donner au rat de l'acide orotique qui

présente certaine relation de structure (cycle pyrimique) avec la 4-APP. L'acide orotique provoque outre une augmentation des triglycérides hépatiques, une diminution des triglycérides et du cholestérol sanguin. La synthèse des apoprotéines n'est pas empêchée mais la sécrétion des lipoprotéines serait bloquée spécifiquement puisque le passage d'autres protéines est possible (albumine, par exemple). La présence de lipides au niveau du R.E. est observée. Le R.E. est fortement vésiculé et cette modification va entraîner des changements dans les structures reliées fonctionnellement ou structurellement avec lui. Les vésicules de transition ne sont pas formées et le Golgi est vide de VLDL et ne produit pas de vacuoles contenant des VLDL.

#### Effet sur les enzymes :

On pourrait imaginer que la 4-APP inhibe la synthèse ou accélère la dégradation des protéines par un mécanisme encore à décrire. Cela permettrait d'expliquer qu'une série d'enzymes voient leur taux baisser et que d'ailleurs la concentration des protéines dans le foie diminue même si l'on tient compte du facteur dilution résultant de l'augmentation du poids du foie due entre autres aux triglycérides. Evidemment cela pourrait concourir à la diminution de sécrétion de lipoprotéine puisque la partie apoprotéique de ces composés pourrait être fabriquée de façon insuffisante.

Ce qui est beaucoup plus difficile de comprendre est l'augmentation importante et rapide des activités de l'arylsulfatase et de la galactosyltransférase, enzymes qui n'ont rien en commun d'un point de vue fonctionnel et qui ont des localisations subcellulaires différentes; l'arylsulfatase est lysosomale et la galactosyltransférase est associée au Golgi. Ce qui est troublant c'est que la modification d'activité que l'on observe se voit parallèlement pour les deux enzymes et que le même retour à une activité normale se fait à une même vitesse pour les deux enzymes, nettement plus rapide que pour les autres enzymes. Dans le cas de l'arylsulfatase qui se trouve en quantité appréciable dans les cellules sinusoidales à l'inverse de la cathepsine C et à la phosphatase acide qui sont localisées essentiellement dans les hépatocytes, on aurait pu imaginer que son augmentation concernait l'enzyme présent dans

ces cellules sinusoidales suite, par exemple, à une stimulation du système réticulo endothélial. Mais les résultats quoique limités que nous avons obtenus sur cellules isolées suggèrent fortement que c'est l'enzyme hépatocytaire qui a subi une augmentation.

#### Effet sur la distribution des enzymes en centrifugation différentielle

Un seul phénomène est bien apparent : le glissement de distribution des structures du réticulum endoplasmique et du Golgi, de la fraction microsomale vers les fractions sédimentant plus rapidement. Cela doit résulter d'une augmentation de taille de ces structures qui rappelle, dans le cas du réticulum, des vésicules produites artificiellement en cours d'homogénéisation. Cette observation est à rapprocher des observations morphologiques qui montrent une dilatation des deux systèmes dans les cellules suite à l'administration de la 4-APP et les corrobore jusqu'à un certain point. Pourquoi cette dilatation s'établit-elle? Notons que ces deux systèmes membranaires sont très directement impliqués dans la synthèse des lipoprotéines plasmatiques. L'accumulation de celles-ci, suite à un blocage de la sécrétion pourrait conduire à un engorgement et une dilatation de ces systèmes. Mais on peut également utiliser l'observation en disant que la dilatation du R.E. et du Golgi est une sorte d'argument supplémentaire en faveur de l'hypothèse d'un blocage de la sécrétion en aval de ces systèmes.

## V. BIBLIOGRAPHIE

- Allain , C.A., Poon, L.S, Chan, C.S.G., Richmond, W., Fu, P.C.(1974) : Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clin. Chem, 20 , 470
- Andersen, J.M., Dietschy, J.M. (1976) Cholesterogenesis : Derepression in extrahepatic tissues with 4-aminopyrazolo (3,4-d)pyrimidine. Science., 193, 903-905.
- Andersen, J.M, Dietschy, J.M (1978) : Relative importance of high and low density lipoproteins in the regulation of cholesterol synthesis in the adrenal gland, ovary, and testis of the rat. J. biol.chem., 253 (24), 9024-9032.
- Assmann, G., Schriewer, H., Schmitz, G., Hägele , E.O. (1983) : Quantification of high-density-lipoprotein cholesterol by precipitation with phosphotungstic acid/ MgCl<sub>2</sub>. Clin. Chem., 29, 2026
- Balasubramaniam, S., Goldstein, J.L., Faust, J.R., Brunschede, G.Y., Brown, M.S. (1977) : Lipoprotein-mediated regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and cholesteryl ester metabolism in the adrenal gland of the rat. J. biol. Chem., 252(5), 1771-1779.
- Baudhui, P., Beaufay, H., Rahman-Li, Y., Sellinger, O.Z., Wattiaux, R., Jacques, P. et de Duve, C. (1964) : Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, D-amino acid oxidase and catalase in rat-liver tissue. Biochem. J., 92, 179-184.
- Baumgart, E., Stegmeier, K., Schmidt ,F.H , Fahimi, H.D (1987) : Proliferation of peroxisomes in pericentral hepatocytes of rat liver after administration of a new hypocholesterolemic agent ( BM 15766 ). Sex-dependent ultrastructural differences. Lab. Invest., 56(5), 554-564.
- Beaufay, H, Amar-Costesec, A., Feytmans, E., Thines-Sempoux, D., Wibo, M., Robbi, M., Berthet, J. (1974) : Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. I. Biochemical Methods. J. Cell Biol., 61,188-200.

-Berg, T., Boman, D. :(1973) Distribution of lysosomal enzymes between parenchymal and kupffer cells of rat liver. B.B.A., 585-594.

-Berry, M.N., Friend, D.S. (1967) : High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. J.Cell.Biol., 43, 506-520.

-Blank, M.S., Loumaye, E., Sgoutas, D.S., Catt , K.J., Dufau, M.L. (1983) : Inhibition of pituitary gonadotropin secretion by 4-aminopyrazolo (3,4-d) pyrimidine. Endocrinology., 112(6), 1973-1979.

-Bowers, W.E., Finkenstaedt, J.T., de Duve, C. (1967) : Lysosomes in lymphoid tissue 1. The measurement of hydrolytic activities in whole homogenates. J.Cell Biol., 32, 325-337.

-Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1986) : A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science., 232, 34-47.

-Bruot, B.C., Wiest, W.G., Collins, D.C. (1982) : Effect of low density and high density lipoproteins on progesterone secretion by dispersed corpora luteal cells from rats treated with aminopyrazolo-(3,4-d)pyrimidine. Endocrinology., 110(5), 1572-1578.

-Creasey, W.A., Hankin, L., Handschumacher, R.E. (1961) : Fatty livers induced by orotic acid. I. Accumulation and metabolism of lipids. J. Biol. Chem., 236(7), 2064-2069.

-de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R., Appelmans, F. (1955) : Tissue fractionation studies.6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. Biochem. J, 60, 604-617.

-Dumont, M-F, Freneix-Clerc, M, Mavie,l M-J, Clerc, M. (1991) : Familial hypocholesterolemia and HDL deficiency. Adv.exp.med.bio, 285, 161-171.

-Feingold, K.R.,Wiley, M.H., Mac Rae, G., Siperstein, M.D. (1981) : The effect of decreased plasma cholesterol concentration on circulating mevalonate metabolism in rats. J. Lipid Res. , 22, 990-997.

-Ginsberg, H., Gilbert, H.S., Gibson, J.C., Le, N-A., Brown, W.V. (1982) : Increased low-density-lipoprotein catabolism in myeloproliferative disorders. *An.Inter.med.*, 96(3), 312-316.

-Glickman, R.M. et Sabesin S.M. (1982) : Lipoprotein metabolism. In : *The liver : Biology and pathobiology*, edited by I. Arias., H. Popper., D. Schachter., D.A. Shafritz, pp 123-142, Raven Press, New York.

-Goodrum, J.F. (1993) : Cholesterol synthesis in regenerating periferal nerve is not influenced by serum cholesterol levels. *J. Neurochem.*, 60, 1564-1566.

-Granot, E., Deckelbaum, R.J. (1989) : Hypocholesterolemia in childhood. *J. Pediatr.*, 115(2), 171-85.

-Henderson, J.F. (1963) : Studies on fatty liver induction by 4-aminopyrazolopyrimidine. *J. Lipid. Res.*, 4(1), 68-74.

-Howard, R.B., Pesch, L.A. (1968) : Respiratory activity of intact, isolated parenchymal cells from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 243(11), 3105-3109.

-Isselbacher, K.L. et Greenberger, N.J. (1964) : Metabolic effects of alcohol on the liver. *New. Eng. J. Med.*, 270 : 351.

-Jäckle, S., Levkau, B, Lorenzen, T, Rinninger, F., Daerr, W., Greten, H., Windler, E. (1991) : The endocytosis of lipoproteins by the liver and their intracellular pathway in comparaison to other ligands. *Adv.exp.med.biol.*, 285, 319-324.

-Jadot, M., Colmant, C., Wattiaux-De Coninck, S., Wattiaux, R. (1984) : Intralysosomal hydrolysis of glycyl-L-phenylalanine 2-naphthylamide. *Biochem. J.*, 219, 965-970.

-Kritchevsky, S.B. (1992) : Serum cholesterol and cancer risk : an epidemiologic perspective. *Rev. Nutr.*, 12, 391-416.

-Lehoux, J.G., Lefebvre, A., Bélisle, S., Bellabarba, D. (1989) : Hormonal regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase mRNA in the rat adrenal gland. *J.Steroid.Biochem.*, 34(1-6), 379-384.

-Lévesque, H., Gancel, A., Pertuet, S., Czernichow, P., Courtois, H. (1991) : Hypocholestérolémie : prévalence, intérêt diagnostique et pronostique. *Presse Méd.*, 20, pp. 1935-1938.

-Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J, Farr, A.L, Randall, R.J. (1951) : Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

-McGowan, M.W., Artiss, J.D., Strandbergh, D.R., Zak, B. (1983) : A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin. Chem.*, 29, 538.

-Malendowicz, L.K., Nowak, M., Paluszak, J. (1987) : Adrenocortical function in 4-APP treated rats : a coupled stereological and biochemical study. *J.Steroid Biochem.*, 26(4), 487-492.

-Malmendier, C.L, Lontie, J-F, Dubois, D.Y. (1991) : Mecanisms of hypocholesterolemia. *Adv.exp.med.biol.*, 285, 173-182.

-Marini, A., Carulli, G., Grassi, A.A., Ambrogi, F. (1989) : Serum cholesterol and triglycerides in hematological malignancies. *Acta.Haematol.*, 81, 75-79.

-März, W., Gross, W.(1986) : Evaluation of a phosphotungstic acid/  $MgCl_2$  precipitation and quantitative lipoprotein electrophoresis assay. *Clin. Chim. Acta.*, 160, 1

-Minami, T., Natsui, K., Nakagawa, H., Okazaki, Y. (1993) : The effect of 4-aminopyrazolo(3,4-d)pyrimidine on mouse plasma  $\alpha$  - amylase activity. *Int. J . Pancreatol.*, 13, 169-174.

-Mikami, K., Nishikawa, T., Saito ,Y., Tamura ,Y., Matsuoka, N., Kumagai, A., Yoshida, S. (1984) : Regulation of cholesterol metabolism in rat adrenal glands : effect of adrenocorticotropin, cholesterol, and corticosteroids on acyl-coenzyme A synthetase and cholesterol ester hydrolases. *Endocrinology.*, 114(1), 136-140.

-Muller, C.P., Wagner, A.U., Maucher, C., Steinke, B. (1989) : Hypocholesterolemia, an unfavorable feature of pronostic value in chronic myeloid leukemia. *Eur.J.Haematol.*, 43, 235-239.



-Munthe-Kaas, A.C., Berg, T., Seljelid, R. (1976) : Distribution of lysosomal enzymes in different types of rat liver cells. *Exp. Cell. Res.*, 99,146-154.

-Novikoff, P. M. (1982) : Intracellular organelles and lipoprotein metabolism in normal and fatty livers. In : *The liver : Biology and pathobiology*, edited by I. Arias, H. Popper, D. Schachter, D.A. Shafritz, pp 143-165, Raven Press, New York.

-Peters, J.J., Müller, M., de Duve, C. (1972) : Lysosomes of the arterial Wall. I Isolation and subcellular fractionation of cells from normal rabbit aorta. *J. Exp. Med.*, 136, 1117.

-Recknagel, R.O., Lombardi, B. (1961) : Studies of biological changes in subcellular particles of rat liver and their relationship to a new hypothesis regarding the pathogenesis of carbon tetrachloride fat accumulation. *J.Biol.chem.*, 236 (2), 564-569.

-Rinninger, F., Pittman, R.C. (1987) : Regulation of the selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesteryl esters. *J Lipid Res.*, 28, 1313-1325.

-Seglen, P.O.(1976) : Preparation of isolated rat liver cells. *Meth.In Cell.Biol.*, 13, 29-83.

-Shiff, T.S., Roheim, P.S., Eder, H.A. (1971) : Effects of high sucrose diets and 4-aminopyrazolopyrimidine on serum lipids and lipoproteins in the rat. *J. Lipid. res.*,12, 596-603.

-Szabö, D., Szalay, K.S.,Töth, I. (1984) : Correlation of lipid droplet content and steroidogenic capacity in zona glomerulosa and fasciculata cells from lipoprotein-deficient rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 34,59-66.

-Talavera, F., Menon, K.M.J. (1989) : Regulation of rat luteal cell high density lipoprotein receptors : up-regulation in response to changes in intracellular cholesterol concentration. *Endocrinology*, 125(4), 2015-2021.

-van't Hooft , F.M., van Tol, A. (1985) : In vivo catabolism of human low density lipoprotein in the rat is mediated by a nonsaturable, low-affinity mechanism. *FEBS*, 183(1), 138-142.

-van't Hooft, F.M., van Tol, A. (1986) : Effect of 4-aminopyrazolo(3,4-d)pyrimidine on the catabolism of high-density lipoprotein apolipoprotein A-1 in the rat. *B.B.A.*, 876, 333-339.

-Wattiaux, R., de Duve, C. (1956) : Tissue fractionation studies. 7. Release of bound hydrolases by means of Triton X-100. *Biochem. J.*, 63, 349-368.

-Vitols, S., Angelin, B., Ericsson, S., Gahrton, G., Juliusson, G., Masquelier, M., Paul, C., Peterson, C., Rudling, M., Söderberg-Reid, K., Tiddefelt, U. (1990) : Uptake of low-density-lipoproteins by human leukemic cells in vivo : relation to plasma lipoprotein levels and possible relevance for selective chemotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, 2598-2602.

-Zyada, L.E., Hassan, H.T., Rees, J.K.H., Ragab, M.H. (1990) : The relation between hypocholesterolemia and degree of maturation in acute myeloid leukemia. *Hematol. Oncol.*, 8, 65-69.