

Modèle animal d'ischémie reperfusion hépatique : évaluation biochimique et histologique

Animal model of liver ischemia reperfusion: biochemical and histological evaluation

Henda Ferchichi¹, Sarra Bacha¹, Nadia Kourda³, Emna Gaies¹, salma Melaouhia¹, Mohamed Lakhel¹, Anis Klouz^{1,2}, Sameh Trabelsi¹, Issam Salouage^{1,2}.

1Centre National de Pharmacovigilance, Tunis, Tunisia

2Unité d'Expérimentation Animale, Faculté de Médecine de Tunis, Université de Tunis El Manar, Tunisia

3Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Hôpital Charles Nicolle, Tunis, Tunisia

R É S U M É

Prérequis: Au cours des dix dernières années, des progrès significatifs ont été faits dans la compréhension des lésions hépatiques après l'épisode d'ischémie-Reperfusion.

But : Afin d'éviter ou de réduire ces dommages pour améliorer les résultats dans la pratique clinique, nous avons développé dans le cadre de ce travail un modèle d'ischémie-Reperfusion hépatique.

Méthodes : Notre étude a porté sur des rats Wistar mâles. Six différents groupes ont été étudiés : un 1er groupe témoin (sans ischémie, sans reperfusion), un 2ème groupe avec ischémie de 90 min et sans reperfusion et les 3ème, 4ème, 5ème, 6ème groupes en plus de l'ischémie, ont subi une reperfusion de 30 min, 2 h, 6 h et 24 h respectivement. Les lésions de l'ischémie-Reperfusion hépatique ont été évaluées par un test biochimique basé sur le dosage des transaminases et une étude anatomopathologique par microscopie optique pour la détermination de l'atteinte hépatique a été également réalisée.

Résultats : Nous avons noté une aggravation des lésions histologiques et une augmentation des taux plasmatiques des ASAT et des ALAT en rapport avec la durée de la reperfusion. En effet, le maximum de dégâts a été observé après 2 heures de reperfusion avec une diminution des lésions après 6h et 24h de reperfusion.

Conclusion : Notre travail nous a permis de décrire un modèle simple d'ischémie-Reperfusion hépatique avec des tests biochimique et anatomopathologique.

M o t s - c l é s

Ischémie, reperfusion, apoptose, nécrose, transaminases.

S U M M A R Y

Background: During last years, significant progress was made in the comprehension of the hepatic lesions after Ischemia-Reperfusion episode in order to improve the results in practice clinical.

Aim: To avoid or reduce the damage induced by Ischemia-Reperfusion, we developed a model of hepatic Ischemia-Reperfusion with variable periods of reperfusion from 0 to 24 hours.

Methods: Our study related to rats Wistar males. Six various groups were studied: the first reference group (without neither ischemia and reperfusion), the second group with ischemia of 90 min and without reperfusion and the 3end, 4end, 5end and 6end groups in addition to ischemia, underwent a reperfusion of 30 min, 2h, 6h and 24h respectively. The damage of hepatic Ischemia-Reperfusion was evaluated by a biochemical test based on the proportioning of transaminases and an anatomopathologic study by optical microscopy for the determination of the degree of hepatic attack.

Results: The results obtained seem to show an aggravation of the liver lesions and an increase in the plasmatic rates of AST and ALT in relation with the duration of the reperfusion. Indeed, the maximum of damage was observed after 2 hours of reperfusion. We observed a reduction in the lesions after 6h and 24h of reperfusion.

Conclusion: Our work enabled us to describe a simple model of hepatic Ischemia-Reperfusion with functional, biochemical and anatomopathologic tests.

Key - words

Ischemia, reperfusion, apoptosis, necrosis, transaminases.

La gravité des lésions de l'ischémie-Reperfusion (I/R) demeure une cause importante des dommages hépatiques obtenus durant les processus pathologiques, lors des actes chirurgicaux et lors de la transplantation. (1, 2). Au cours de l'ischémie, il se produit une cascade d'événements dont l'enchaînement conduit à la mort cellulaire. La première conséquence est la déplétion énergétique avec l'arrêt de la production des composés riches en énergie : Phosphocréatine et Adénosine Triphosphate (ATP) (3).

Suite à la phase d'ischémie, la phase de reperfusion normothermique correspond à une période d'intense activité mitochondriale pour assurer la régénération du pool d'ATP indispensable à l'homéostasie cellulaire et une accumulation de calcium intracytoplasmique. Toute modification mitochondriale sera à l'origine d'une altération fonctionnelle de l'organe. (4)

En effet, l'ischémie suivie d'une reperfusion est à l'origine des principaux effets néfastes pour les cellules. Des événements biochimiques et métaboliques, des perturbations fonctionnelles et des atteintes morphologiques ont été associés aux altérations fonctionnelles observées lors de l'I/R.

Lorsque les dégâts constatés sont trop importants ou que le signal de mort est impératif, il y aura soit un processus de suicide cellulaire programmé appelé apoptose qui est un phénomène actif dépendant de l'expression de gènes particuliers, soit une mort accidentelle appelée nécrose qui se traduit par une désintégration passive de la cellule qui libère ses constituants dans le milieu environnant. (5, 6). Les conséquences caractéristiques de ces lésions d'I/R ou, encore nommés « syndrome d'ischémie-Reperfusion », sont bien une atteinte des cellules endothéliales et des cellules parenchymateuses. (7, 8)

C'est pourquoi la physiopathologie des lésions d'I/R hépatiques est devenue évidente, et une compréhension des mécanismes complexes impliqués dans ces dommages est exigée pour améliorer la protection et rechercher les moyens de prévention et de traitement de ces lésions. (9, 10, 11)

Nous nous proposons dans ce travail d'étudier la vulnérabilité de la cellule hépatique suite à la diminution de l'apport sanguin (ischémie) et de rechercher les preuves qui relient la mort cellulaire et les autres phénomènes à la reperfusion.

Donc pour savoir protéger un organe, il faut tout d'abord évaluer l'importance des dégâts engendrés. C'est pourquoi nous avons développé dans le cadre de ce travail un modèle d'I/R hépatique avec des périodes de reperfusion variables de 0 à 24 heures.

METHODES

1- Animaux utilisés :

Notre étude a porté sur rats Wistar mâles fournis par l'animalerie de l'Institut Pasteur de Tunis puis élevés et

alimentés dans l'unité d'expérimentation animale de la Faculté de Médecine de Tunis. Le poids moyen des rats était de $319,5 \pm 37$ g.

Durant la période de l'expérimentation, les rats sont maintenus et nourris selon les recommandations de l'ICLAS (International Council for Laboratory Animal Science).

Ethique :

Toutes les procédures sur les animaux utilisés dans cette étude sont en stricte conformité avec European Community Council Directive of 24 November 1986 (86-609/EEC) and Decree of 20 October 1987 (87-848/EEC).

2- Ischémie-Reperfusion hépatique :

48 rats Wistar mâles étaient répartis au hasard en six groupes (8 rats par groupe) :

Un groupe témoin (T) dont les rats n'ont subi ni ischémie ni reperfusion ; le 2^{ème} Groupe (I 90) a subi une ischémie hépatique pendant 90 min mais sans reperfusion ; les groupes 3 (I90/R30), 4 (I90/R2h) , 5 (I90/R6h) et 6 (I90/R24h) dont les rats ont subi une ischémie de 90 min suivi d'une reperfusion de 30 min, 2h, 6h et 24h respectivement.

3- Procédures expérimentales :

Après une ouverture médiane longitudinale de l'abdomen, repérer le tronc hépatique et couper tous les ligaments hépatiques.

Clampage de la veine qui draine pour les segments I à V du foie pendant une période de 90 min. La vascularisation des segments VI et VII n'est pas interrompue pour éviter la congestion intestinale.

Le foie sera soit immédiatement prélevé, soit perfusé pendant 30 min, 2 heures, 6 heures et 24 heures et ensuite prélevé en fonction du protocole suivi.

En cas de reperfusion de 6 et 24 heures, après lavage de l'abdomen, on réalise une suture de la plaie.

A savoir que nous avons injecté 20 mg/kg de Néfopam (Analgésique) sous cutané pour le 5^{ème} et le 6^{ème} groupes. Pour ce dernier, nous avons injecté en plus un antibiotique, la Gentamicine (1 mg/kg), en intrapéritonéale. Le foie prélevé est conservé pendant 12 heures dans le formol pour réaliser l'étude histologique. Le sang prélevé sera utilisé pour le dosage des transaminases.

4- Dosage biochimique : dosage des transaminases :

Nous avons réalisé une surveillance biologique des enzymes hépatiques : Alanine aminotransférases (ALAT) et Aspartate aminotransférases (ASAT) qui témoigne du degré de la cytolysé hépatique.

Le dosage des transaminases a été effectué avec un automate le COBAS INTEGRA₈₀₀® moyennant une technique enzymatique l'EMIT (Enzyme Multiplied Immuno-Assay Technique).

5- Etude anatomopathologique :

Une reconnaissance des lésions hépatiques par une étude anatomopathologique révélée par microscope photonique en utilisant l'hématéine-éosine (HE) comme coloration.

Cette étude se basera sur la qualification de l'infiltrat inflammatoire et la quantification de la nécrose et de l'apoptose.

Evaluation semi quantitative de la nécrose :

Dans notre travail, nous avons quantifié les lésions élémentaires secondaires à l'ischémie-Reperfusion : Dégénérescence ballonisante (absente, légère, modérée et sévère) en pourcentage par rapport aux lobules totaux et topographique (absente, diffuse et focale). (Tableau 1) Les zones de foyers de nécrose par rapport au lobule hépatique. (Tableaux 2)

Tableau 1: Phase réversible de la nécrose

Dégénérescence ballonisante limitée au pourcentage des lobules				
Pourcentage de la dégénérescence	Absente	Légère ≤ 5%	Modérée ≤ 50%	Sévère ≤ 100%
Score	0	1	2	3
Topographie	absente	focale	diffuse	

Tableau 2: Phase irréversible de la nécrose

L'étendue des lésions de nécrose			
Zones touchées	CL	CL+ML	Tout le lobule
Score	4	5	6
Topographie	Régions les + sensibles (zone 3)		diffuse

CL : Centrolobulaire ; CL+ML : Centrolobulaire et médiolobulaire

Quantification de l'apoptose :

Le nombre des corps apoptotiques est estimé sur 10 champs consécutifs par la méthode HPF (High Power Fields).

Nous avons estimé que le nombre de cellules totales (hépatocytes) par champ est de 250 cellules. Nous avons quantifié les cellules apoptotiques sur 10 champs consécutifs.

Pourcentage de cellules apoptotiques (%) = nombres des cellules apoptotiques X 100 / Nombre de cellules totales par champ X 10

6- Etude statistique :

Nous avons utilisé dans notre étude le test de Mann-Whitney qui permet de tester si les deux groupes indépendants sont extraits de la même population parente (Homogénéité des échantillons indépendants).

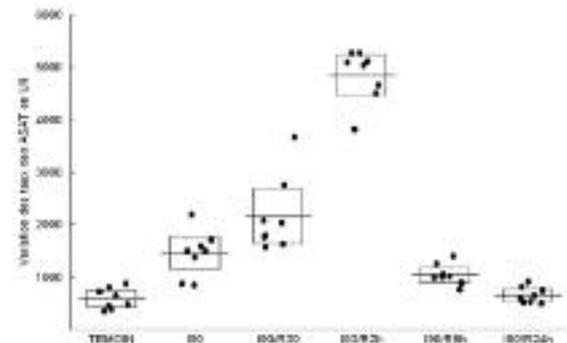
L'hypothèse nulle n'est pas rejetée à p = 0,05 (ni a fortiori à p = 0,01). En revanche, elle est rejetée à partir d'un seuil supérieur à p = 0,056 (comme par exemple p = 0,10).

RÉSULTATS

Dosage biochimique : dosage des transaminases : Dosage des ASAT :

Le taux moyen trouvé des ASAT chez les rats témoins « T » (sans ischémie et sans reperfusion) était de 538 U/l, ce taux augmente progressivement pour atteindre 1445, 2156 et 4844 U/l chez le deuxième groupe « I 90 », le troisième groupe « I90/R30 » et le 4^{ème} groupe (I90/R2h) respectivement. Puis ce taux d'ASAT diminue pour atteindre 1052 et 654 U/l chez le 5^{ème} groupe (I90/R6h) et le 6^{ème} groupe « I90/R24h ». (Figure 1)

Figure 1 : Variation du taux de l'ASAT chez les différents groupes



Nous avons trouvé des différences significatives entre les différents groupes sauf pour les différences T versus I90/R24h et I90 versus I90/R6h avec des probabilités égales p = 0,84 et p = 0,31 respectivement. (Tableau 3)

Tableau 3 : Taux moyens des ASAT et des ALAT chez les différents groupes

	ASAT (U/l)	ALAT(U/l)
T	538 ± 200	314 ± 134
I90	1445 ± 438 **	1127 ± 420 **
I90R30min	2156 ± 713 **	1364 ± 536 **
I90R2h	4844 ± 499 **	3718 ± 1291 **
I90R6h	1052 ± 208 **	749 ± 128 **
I90R24h	654 ± 149	202 ± 54

Témoin (T) : sans ischémie / sans reperfusion ; I 90 : ischémie hépatique = 90 min / sans reperfusion ; I90/R30 : ischémie = 90 min / reperfusion = 30 min ; I90/R2h : ischémie = 90 min / reperfusion = 2 heures ; I90/R6h : ischémie = 90 min / reperfusion = 6 heures ; I90/R24h : ischémie = 90 min / reperfusion = 24 heures ; ALAT : Alanine aminotransférase ; ASAT : Aspartate aminotransférase.

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type (n=8).

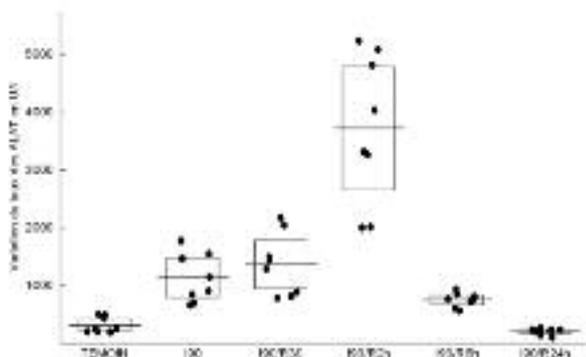
**différence significative Témoin versus les autres groupes avec p < 0.01;

* différence significative Témoin versus les autres groupes avec p < 0.05.

Dosage des ALAT :

Le taux moyen trouvé des ALAT chez les rats témoins T est de 314 U/l, ce taux augmente pour atteindre respectivement 1127 U/l, 1364 U/l, 3718 U/l pour le 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} groupes puis diminue jusqu'à 749 U/l et 202 U/l après 6 heures et 24 heures de reperfusion respectivement. (Figure 2)

Figure 20 : Variation du taux de l'ALAT chez les différents groupes



Témoin (T) : sans ischémie / sans reperfusion ; I 90 : ischémie hépatique = 90 min / sans reperfusion ; I90/R30 : ischémie = 90 min / reperfusion = 30 min ; I90/R2h : ischémie = 90 min / reperfusion = 2 heures ; I90/R6h : ischémie = 90 min / reperfusion = 6 heures ; I90/R24h : ischémie = 90 min / reperfusion = 24 heures ; ASAT : Aspartate aminotransférase. (n = 8)

Toutes les différences sont significatives sauf pour T versus I90/R24h, I90 versus I90/R30 et I90 versus I90/R6h avec des probabilités égales respectivement à $p = 0,16$, $p = 0,47$ et $p = 0,09$. (Tableau 3)

Qualification des lésions cellulaires et de l'infiltrat inflammatoire :

Pour le groupe témoin, nous observons quelques foyers comprenant une dégénérescence ballonisante discrète qui est une étape réversible de la nécrose (vacuolisation du cytoplasme et ballonnisation des organites), cette dégénérescence est surtout localisée au niveau de la zone 3 (Figure 3A).

La vacuolisation s'étend dans les zones 1 et 2 en plus de la zone 3 pour le groupe qui a subi une ischémie de 90 minutes. (Figure 3B)

Pour le 3^{ème} groupe, cette lésion disparaît après apport sanguin dans les zones 1 et 2, mais persiste dans la zone 3. Dans ces zones, le cytoplasme paraît en partie vacuolisé et d'aspect mité ce qui peut être expliqué par une digestion des organites intracytoplasmiques par les enzymes.

Nous avons observé aussi l'existence des cellules isolées ou des petits amas cellulaires de couleur rose foncée (après coloration à l'HE), apparaissant comme une masse ronde ou ovale avec un petit noyau dense de couleur noirâtre et de cytoplasme intensément éosinophile qui est dû en partie à la perte de la basophilie

normale liée à la présence d'ARN dans le cytoplasme et en partie à l'augmentation de la liaison de l'éosine aux protéines intracytoplasmiques dénaturées, cet aspect morphologique de la lésion cellulaire s'observe dans le cas de l'apoptose. Et bien qu'observée chez le témoin et le 2^{ème} groupe, l'apoptose était rare. (Figure 3C)

Après 2h de reperfusion, au faible grossissement (x 40), nous avons observé des zones claires témoignant de l'existence de foyers de nécrose (figure 3D) et nous avons pu distinguer l'abondance des corps apoptotiques au grossissement moyen (x 400). (Figure 3H)

Nous avons aussi observé, pour ce groupe, un infiltrat important des lymphocytes au niveau de l'espace porte et qui ont migré vers les hépatocytes. (Figure 3F)

En plus de cet infiltrat lymphocytaire, nous avons aussi observé après 6h de Reperfusion un infiltrat des polynucléaires neutrophiles très important. (Figure 3G)

Pour ce groupe, au faible grossissement, nous avons observé des zones dégénérées (Figure 3H) témoignant d'une phagocytose des cellules nécrotiques apparues après les 2 heures de reperfusion.

Après 24h de reperfusion, les foyers nécrotiques et les corps apoptotiques ont disparus au niveau de la zone 1 (phagocytose) mais persistent au niveau des zones 2 et 3 avec infiltrat important des lymphocytes et des polynucléaires neutrophiles. (Figure 3I) (Tableau 4)

Tableau 4 : Qualification de l'infiltrat inflammatoire chez les différents groupes

	T	I90	I90/R30	I90/R2h	I90/R6h	I90/R24h
Infiltrat lymphocytes	-	-	+	+	+	+
Inflammatoire PNN	-	-	-	-	+	+

(-) : Absent

(+) : Présent

Témoin (T) : sans ischémie / sans reperfusion ; I 90 : ischémie hépatique = 90 min / sans reperfusion ; I90/R30 : ischémie = 90 min / reperfusion = 30 min ; I90/R2h : ischémie = 90 min / reperfusion = 2 heures ; I90/R6h : ischémie = 90 min / reperfusion = 6 heures ; I90/R24h : ischémie = 90 min / reperfusion = 24 heures ; PNN: polynucléaires neutrophiles

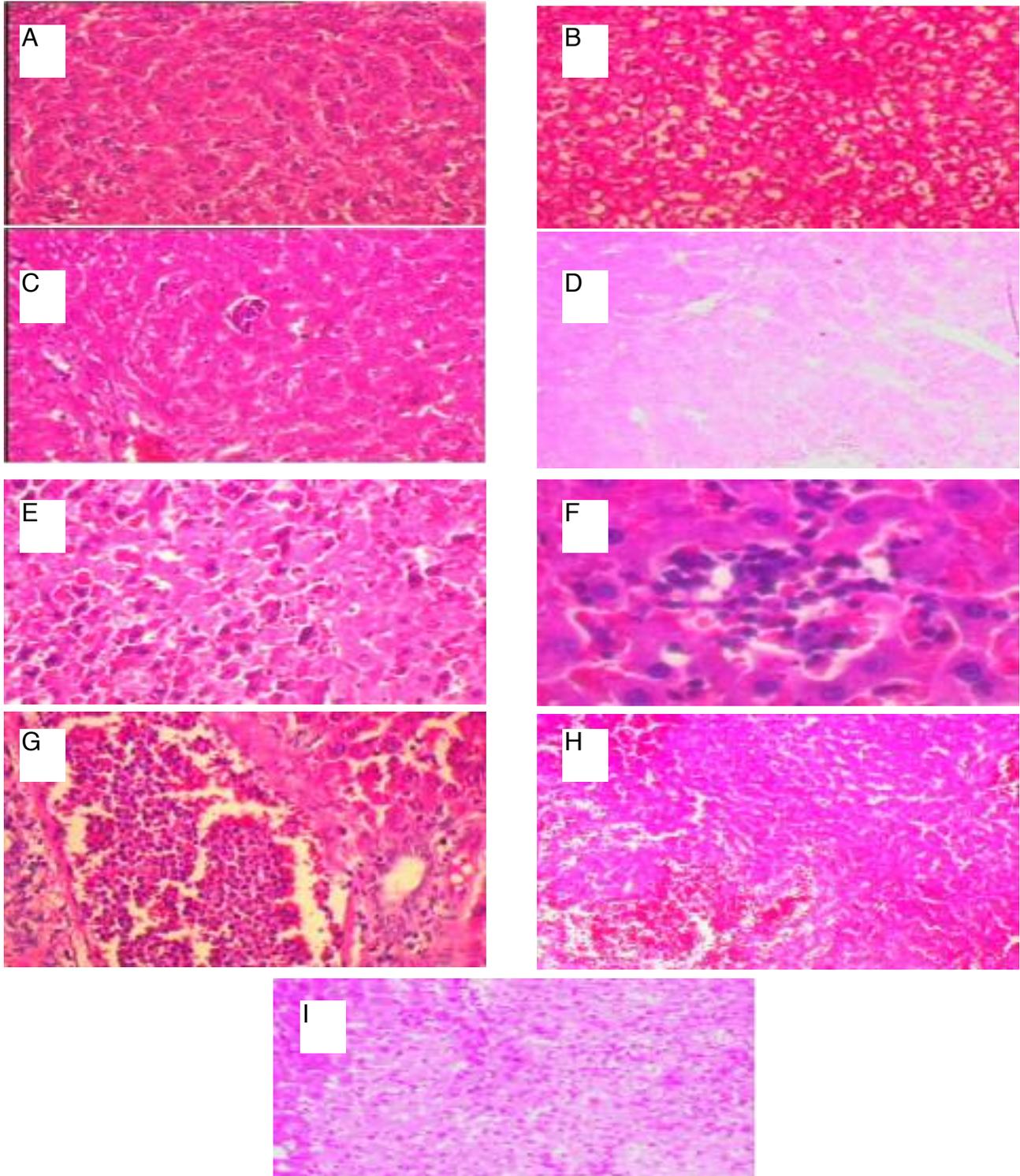
Evaluation semi quantitative de la nécrose :

En se référant à notre étude histologique, nous avons pu évaluer semi quantitativement l'étendue de la nécrose et la dégénérescence ballonisante en utilisant un score arbitraire de 0 à 6 selon le stade et la topographie de la lésion. (Tableaux 1, 2)

Nous avons donc attribué pour le groupe témoin T un score de 0,63 (une dégénérescence ballonisante focale absente à légère) puis 2,75 et 2,25 (une dégénérescence ballonisante diffuse modérée à sévère) chez les groupes I90 et I90/R30 respectivement.

Nous avons aussi observé une nécrose qui touche les zones centrolobulaires et médiolobulaires et parfois tout le lobule après 2 heures de reperfusion avec un score de 5,25. Ces scores diminuent pour des valeurs de 4,63 et 4,25, après 6 et 24 heures de reperfusion

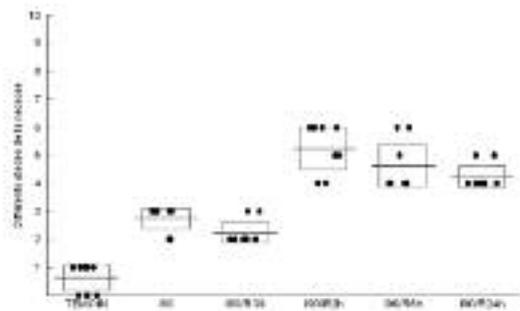
Figure 3: Qualification de la nécrose, de l'apoptose et de l'infiltrat inflammatoire par microscopie optique



A : Témoin (x 400) aspect normal des hépatocytes ; B : I90 (x 400) Dégénérescence ballonisante sévère ; C : I90/R30 (x 400) ; D : I90/R2h (x40) ; E : I90/R2h (x 400) ; F : I90/R2h (x 1000) infiltrat inflammatoire ; G : I90/R6h (x 400) des polynucléaires au niveau de la veine porte ; H : I90/R6h (x 40) disparition des foyers de nécrose ; I : I90/R24h (x 400) Région conservée avec un foyer de nécrose et des polynucléaires de préservation. (Coloration à l'hémateine-éosine (HE)) Toute l'évaluation histologique est en double aveugle.

respectivement ; une nécrose qui touche les zones centrolobulaires et médiolobulaires. (Figure 4)

Figure 4 : Evaluation de la nécrose chez les différents groupes.



Témoin (T) : sans ischémie / sans reperfusion ; I 90 : ischémie hépatique = 90 min / sans reperfusion ; I90/R30 : ischémie = 90 min / reperfusion = 30 min ; I90/R2h : ischémie = 90 min / reperfusion = 2 heures ; I90/R6h : ischémie = 90 min / reperfusion = 6 heures ; I90/R24h : ischémie = 90 min / reperfusion = 24 heures (n=8).

Les différences I90 versus I90/R30, I90/R2h versus I90/R6h, I90/R6h versus I90/R24h et I90/R2h versus I90/R24h ne sont pas significatives, par contre les différences entre les autres groupes sont significatives. (Tableau 5)

Tableau 5 : Quantification de la nécrose et de l'apoptose

	Nécrose	Apoptose
T	0,63 ± 0,52	0,025 ± 0,04
I90	2,75 ± 0,46 *	0,62 ± 0,16 **
I90R30min	2,25 ± 0,46 *	0,74 ± 0,21 **
I90R2h	5,25 ± 0,98 *	6,47 ± 2,98 **
I90R6h	4,63 ± 0,92 *	4,03 ± 0,86 **
I90R24h	4,25 ± 0,46 *	1,73 ± 0,5 *

Témoin (T) : sans ischémie / sans reperfusion ; I 90 : ischémie hépatique = 90 min / sans reperfusion ; I90/R30 : ischémie = 90 min / reperfusion = 30 min ; I90/R2h : ischémie = 90 min / reperfusion = 2 heures ; I90/R6h : ischémie = 90 min / reperfusion = 6 heures ; I90/R24h : ischémie = 90 min / reperfusion = 24 heures.

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type (n=8).

**différence significative Témoin versus les autres groupes avec p < 0.01;

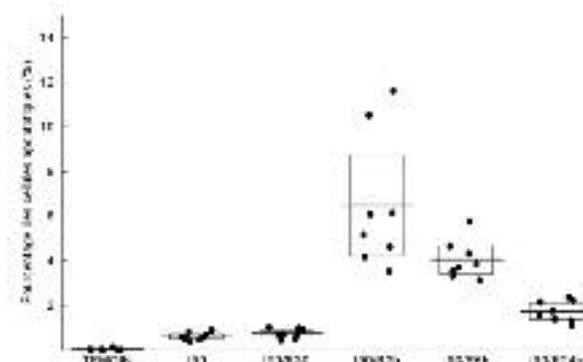
* différence significative Témoin versus les autres groupes avec p < 0.05.

Quantification de l'apoptose

Les corps apoptotiques ont été observés dans tous les groupes même pour le groupe témoin, et pour pouvoir faire la comparaison entre les différents groupes, nous avons eu recours à la méthode HPF (High Power Fields) (1) pour quantifier l'apoptose et évaluer ainsi le degré de l'atteinte hépatique selon le groupe.

Chez les rats témoins T, le pourcentage est de 0,025 %, cette valeur a augmenté progressivement pour atteindre 0,62 %, 0,74 % et 6,47 % respectivement chez les groupes I90, I90/R30 et I90/R2h. Ce pourcentage diminue jusqu'à 4,03 % et 1,73 % respectivement chez 5^{ème} et 6^{ème} groupes. (Figure 5)

Figure 5 : Variation du pourcentage des cellules apoptotiques chez les différents groupes



Témoin (T) : sans ischémie / sans reperfusion ; I 90 : ischémie hépatique = 90 min / sans reperfusion ; I90/R30 : ischémie = 90 min / reperfusion = 30 min ; I90/R2h : ischémie = 90 min / reperfusion = 2 heures ; I90/R6h : ischémie = 90 min / reperfusion = 6 heures ; I90/R24h : ischémie = 90 min / reperfusion = 24 heures (n=8).

Les différences I90 versus I90/R30 et I90/R30 versus I90/R6h ne sont pas significatives. (Tableau 5)

DISCUSSION

Au cours des dix dernières années, des progrès significatifs ont été réalisés dans la compréhension des lésions hépatiques survenant suite à des épisodes d'I/R. De nouvelles stratégies visant à éviter ou à réduire les dommages engendrés par l'I/R ont été élaborées permettant ainsi l'amélioration des résultats dans la pratique clinique lors des situations pathologiques impliquant des processus d'I/R. (12, 13)

Un tel progrès a exigé la mise en place de différents modèles expérimentaux. Ces modèles peuvent varier en fonction de l'espèce animale, de l'organe utilisé et des durées respectives de l'ischémie et de la reperfusion.

Le foie représente un organe fréquemment utilisé dans les modèles expérimentaux d'I/R. La plupart de ces modèles réalisent une ischémie partielle ou segmentaire du foie pour éviter la congestion mésentérique, qui a comme conséquence les dommages de la muqueuse intestinale et de la translocation bactérienne. (14, 3)

Evaluation de la lyse cellulaire : dosage des transaminases :

Le test biochimique le plus simple et le plus performant est le dosage des transaminases.

L'ASAT et l'ALAT sont deux enzymes plasmatiques qui témoignent de la qualité du fonctionnement hépatique.

Dans notre étude, nous avons noté que le taux plasmatique des ASAT et des ALAT a augmenté après la phase ischémique et a augmenté encore plus après la reperfusion pour atteindre son maximum 2 heures après la reperfusion. Mais ce taux a chuté à partir de 6 heures

de reperfusion, et les 24 heures de revascularisation vont permettre d'avoir des taux normaux de ces 2 enzymes.

D'après ces résultats, nous pouvons constater que la phase de reperfusion se passe en deux temps :

Une phase critique dévastatrice qui aggrave les lésions engendrées par la phase ischémique. Cette phase est comprise entre 30 minutes et 2 heures de reperfusion.

Une phase de restauration et de régénération. Dans notre étude, cette phase démarre à partir de 6 heures et se prolonge jusqu'à 24 heures de reperfusion.

La chute des transaminases est en rapport d'une part avec l'arrêt des processus entraînant leur libération et leur catabolisme d'autre part. Ce dernier est assuré en particulier par les systèmes enzymatiques des phagocytes mononucléés et notamment les macrophages du foie. (15, 16, 17)

En se référant à la bibliographie, nous avons constaté que l'élévation des transaminases s'est manifestée après la phase d'ischémie et a varié selon la durée de la reperfusion. En effet, selon une étude réalisée par Caraceni et al. (18) le taux plasmatique de l'ALAT était sensiblement plus élevé chez les rats qui ont subi une ischémie hépatique isolée. Et ce taux des ALAT n'a augmenté de manière significative qu'après la revascularisation.

L'augmentation des transaminases après la phase ischémique est due à une souffrance cellulaire et surtout mitochondriale voire une cytolysse qui en fait se traduit par une fuite membranaire de ses enzymes.

Sachant que 80 % de l'activité hépatocytaire des ASAT est mitochondriale (15), le taux élevé des ASAT chez les rats qui ont subi une ischémie et/ou reperfusion refléterait une atteinte mitochondriale.

Le temps d'ischémie a une grande influence sur l'effet de la reperfusion au niveau cellulaire, en fait, tout ce passe comme si la reperfusion révélait brutalement les insuffisances accumulées lors de la phase d'ischémie qui apporte une panoplie de modifications métaboliques très souvent délétères, en particulier avec l'apparition du stress oxydant. (19)

L'étude de Devinder et al. a montré que l'effet oxydant induit par l'I/R hépatique a été associé à la fonction hépatique altérée menant à une augmentation marquée des transaminases dans le plasma. (20)

Certains études bibliographiques affirment que pour la compréhension de l'élévation des transaminases en hépatologie, il faut se rappeler que le terme de cytolysse ne doit pas être pris obligatoirement au pied de la lettre ; telle que la verrait l'anatomopathologiste mais peut réaliser simplement de troubles de perméabilité membranaire des cellules hépatiques sans réelle nécrose.

Il est par ailleurs évident que lorsque une réelle nécrose s'installe, elle s'accompagne d'une élévation des concentrations plasmatiques de ces enzymes.

Aspect anatomopathologique :

Quatre-vingt-dix minutes d'ischémie suivies de temps variables de reperfusion induisent des dommages étendus au parenchyme hépatique, comme certifié par la fuite d'aminotransférase, un bon indicateur des dommages structuraux membranaires. (21)

Ces changements sont associés à la suite de l'apparition de grands secteurs des cellules nécrotiques (22), mais il a été récemment démontré que l'apoptose des hépatocytes se produit également pendant l'I/R. (23, 6)

Ainsi, l'apoptose ou la nécrose peuvent simultanément se produire, probablement selon la sévérité de l'ischémie et selon la capacité de la cellule à maintenir la synthèse de l'adénosine triphosphate.

En effet, jusqu'à récemment, il a été assumé que l'ischémie cause la mort nécrotique des cellules. Cependant, les études récentes indiquent que la réduction d'approvisionnement de l'oxygène peut également mener à l'apoptose dans divers organes comprenant le foie. (24, 25)

L'apoptose a été suggéré pour être le premier engagement à la mort après ischémie. (25)

Pourquoi l'apoptose est le premier engagement à la mort après ischémie ?

Comme il a été mentionné par l'équipe de Benchoua A. (25), nous pensons que l'apparition de l'apoptose est la première conséquence de l'ischémie car la dégénérescence ballonisante, apparue pendant la phase ischémique, n'est pas une réelle lésion nécrotique.

Dans notre étude, l'apparition de la nécrose (à des stades irréversibles) a été observée après un temps plus ou moins important de la reperfusion (2 heures).

Pour pouvoir expliquer ce phénomène, il faut se rappeler qu'en anaérobiose, la régénération de l'ATP va être dépendante de la voie de la glycolyse, et la synthèse de nouveau de l'ATP va permettre, en présence des facteurs apoptogènes déclenchés pendant l'ischémie, la formation de l'apoptose à des stades précoces mais irréversibles.

La formation de la dégénérescence ballonisante, pendant la phase ischémique, est une étape réversible de la nécrose que nous ne pouvons pas considérer comme réelle nécrose.

Nous affirmons ainsi l'idée que l'apoptose est le premier engagement à la mort après ischémie.

En effet, de point de vu cellulaire, l'ischémie diminue la disponibilité de l'oxygène pour les mitochondries et de ce fait permet l'inhibition de la respiration mitochondriale, ayant pour résultat un épuisement rapide de la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP).

Les mitochondries jouent un rôle principal dans le processus apoptotique et la voie mitochondriale semble être impliquée dans les dommages d'I/R du foie.

Pourquoi l'invasion de la nécrose pendant la reperfusion ?

Dans notre étude, nous avons observé qu'après un certain temps de reperfusion (à partir de 2 heures dans notre travail), le nombre de cellules nécrotiques dépasse largement les cellules apoptotiques. A partir de ce temps, nous avons remarqué une invasion des foyers de nécrose.

Pour expliquer cette constatation, il faut se rappeler que l'ischémie provoque une baisse de la teneur intracellulaire en ATP, qui se transforme en hypoxanthine, et une accumulation de Ca^{2+} intracytoplasmique.

Le calcium activerait une protéase qui convertit des déshydrogénases intracellulaire en oxydase. Cette conversion intéresse tout particulièrement la xanthine déshydrogénase qui devient une xanthine oxydase.

Lors de la reperfusion, cette enzyme transforme normalement l'hypoxanthine, dérivée de l'ATP, en xanthine puis en acide urique. Puis elle va entraîner la formation des radicaux libres oxygénés (RLO).

Pendant la reperfusion, la reproduction de l'énergie va dépendre de la transformation de l'hypoxanthine dans le sens de synthèse de l'ATP (Reproduction d'ATP). Mais l'accumulation excessive du calcium pendant cette phase va favoriser la voie de synthèse de l'acide urique au dépend de la voie de formation de l'ATP (Déplétion en ATP).

De ce fait nous pouvons dire qu'après Reperfusion, un déséquilibre s'installe et la balance métabolique est en faveur de la déplétion et par conséquent en faveur de la nécrose vu qu'elle ne nécessite pas d'énergie. (26)

Infiltrat inflammatoire :

Les neutrophiles activés infiltrent le foie altéré, parallèlement, l'expression des molécules d'adhérence est augmentée dans les cellules endothéliales.

Dans notre étude, nous avons observé une infiltration massive aussi bien des lymphocytes que des polynucléaires neutrophiles dans le foie lésé avec un maximum observé après 6 heures et 24 heures de reperfusion

En effet, la génération de l'espèce réactive de l'oxygène suivante à la réoxygénation inflige des dommages de tissu et lance une cascade cellulaire menant à l'inflammation, à la mort de cellules, et à l'échec final de l'organe.

Les études récentes (12, 27, 28) ont démontré l'accumulation massive des neutrophiles dans le foie pendant les dommages d'I/R. D'ailleurs, des techniques expérimentales ont été conçues pour enlever des neutrophiles de la circulation ou pour empêcher leur fonction en essayant de réduire l'ampleur des dommages d'I/R hépatique. De telles investigations ont suggéré que ce recrutement des neutrophiles dans le foie est une étape critique dans la pathogénie de dommages de l'I/R. (27)

Rôle de la reperfusion :

D'après certaines études, la restauration de l'écoulement du sang après une période d'ischémie, est essentiel pour la survie du tissu ischémique ; mais il y a de bonne évidence que la reperfusion cause des dommages additionnels des cellules. (29)

C'est dans les années 70, qu'a été soulevée la possibilité que la reperfusion puisse endommager les cellules déjà lésées par l'ischémie. (30) Mais ce n'est qu'en 1983 que le concept de « lésions de reperfusion » a vu le jour. (31) En effet la reperfusion est associée avec une libération d'enzymes, un influx de calcium, des altérations de la fonction mitochondriale, des dommages aux membranes cellulaires et même de la nécrose.

Dans notre étude, après une ischémie de 90 minutes, nous avons constaté l'apparition de quelques corps apoptotiques et une dégénérescence ballonisante importante des hépatocytes.

Les 30 minutes de reperfusion ont entraîné la diminution de la dégénérescence vu que c'est une étape réversible de la nécrose. Dans ce cas (30 minutes), la reperfusion est considérée comme phase de restauration.

Mais le pourcentage des cellules apoptotiques va augmenter légèrement et ceci est en contradiction avec l'hypothèse qui décrit la reperfusion comme phase de restauration.

Après 2 heures de reperfusion, nous avons observé que les cellules vacuolisées évoluent vers des étapes irréversibles de la nécrose et l'atteinte augmente pour toucher la majorité des foyers hépatocytaires avec un pourcentage élevé des cellules apoptotiques.

Ces 2 heures de reperfusion ont aggravé les lésions observées pendant la phase d'ischémie, en faite nous pouvons considérer que ce temps de reperfusion est critique pour le foie.

Ceci peut être expliqué par la formation des radicaux libres lors de la reperfusion. En effet, les radicaux libres de l'oxygène (ROS) sont parmi les premiers et les plus importants composants responsables des dommages tissulaires après la reperfusion des organes ischémisés.

Les ROS ont comme conséquence la diminution de la fonction mitochondriale avec augmentation de l'infiltrat inflammatoire.

Les 2 heures de reperfusion étaient, dans notre étude, comme un délai critique où l'apparition des lésions cellulaires est maximale. Ces lésions diminuent de gravité à partir de 6 heures de reperfusion et atteignent des taux bas après 24 heures de reperfusion mais sans disparaître.

A partir de 6 heures, la reperfusion a été considérée une phase de restauration et de régénération. Mais les 24 heures de reperfusion n'ont pas suffi pour avoir un tissu hépatique similaire à celui trouvé chez le groupe témoin (notre référence).

CONCLUSION

Nous avons considéré que les deux temps les plus importants de la reperfusion étaient 2 heures et 24 heures. Car les deux heures de reperfusion nous ont permis d'observer une élévation accrue des transaminases et un maximum d'Apoptose et de Nécrose témoignant de ce fait d'une atteinte cellulaire et mitochondriale considérée comme des lésions hépatiques sévères.

Pour les 24 heures de reperfusion, nous avons observé une baisse importante des transaminases et une

diminution des cellules apoptotiques et nécrotiques. Mais, avec ce temps de reperfusion, la persistance des zones apoptotiques et nécrotiques et surtout une augmentation de l'infiltrat inflammatoire. Ceci nous prouve que la reperfusion seule ne restaure pas les dommages ischémiques ni ses propres dommages.

En conclusion, notre travail nous a permis de décrire un modèle simple d'I/R hépatique.

L'importance des lésions occasionnées par la période de reperfusion doivent axer la recherche au moyen de protection contre l'I/R sur les molécules permettant à la cellule de mieux supporter l'épreuve de la reperfusion (antioxydant, protecteurs mitochondriaux,...).

Références

- Kobayashi A., Imamura H, Isobe M et al. Mac-1 (CD11b/CD18) and intercellular adhesion molecule-1 in Ischemia-Reperfusion injury of rat liver. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: 577-585.
- Serfin A, Rosello-Catafau J, Prats N et al. Ischemic preconditioning increases the tolerance of fatty liver to hepatic ischemia-Reperfusion injury in the rat. *American Journal of Pathology* 2002; 161 : 587-601;
- Schoenberg MH, Berger HG. Reperfusion injury after intestinal Ischemia. *Crit. Care Med* 1993; 91; 1376-86.
- Tamion F, Clabault K, Bonmarchand G et al. Splanchnic Ischemia-Reperfusion in shock: pathophysiology. *Réanimation* (12) 2003; 441-448.
- Tizimas G.N, Afshar M, Emadali A et al. Correlation of cell Necrosis and tissue calcification with Ischemia/Reperfusion injury after liver transplantation. *Transplantation Proceedings* 2004; 36, 1766-1768.
- Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after Ischemia-Reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation* 1999; 67 : 1099-1105.
- Voigt Jean-Jacques. Anatomie pathologie Bases morphologiques et physiopathologiques des maladies. 3th Ed. Robbins : Tome I Cotran, Kumar, Collins, 2000.
- Voigt Jean-Jacques. Anatomie pathologie Bases morphologiques et physiopathologiques des maladies. 3th Ed. Robbins : Tome II Cotran, Kumar, Collins, 2000.
- Simon N, Albengres E, Barre J et al. L'intérêt de la protection des fonctions mitochondriales au cours d'un traitement par la cyclosporine A. *Thérapie* 1997; 52, 151-154.
- Starly WC, Marzelli M. Metabolic therapy in the treatment of Ischemia pharmacology of trimetazidine. Blackwell Publishing Fundamental and Clinical Pharmacology 2003; 17, 133-145.
- Tredger J. M. Ischemia-Reperfusion injury of the liver: treatment in theory and in practice. *Biofactors* 1998; 8 (1-2): 161-4.
- Kupiec-Weglinski J.W, Busuttill R.W. Ischemia and Reperfusion injury in liver transplantation. *Transplantation proceedings* 2005; 37, 1653-1656.
- Venkatachalam MA, Bernard DB, Donohoe JF, Levinsky NG. Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule: differences among the S1, S2, and S3 segments. *Kidney Int.* 1978;14 (1): 31-49.
- Kanoria S, Williams R, Davidson R. A model to study total hepatic Ischemia-Reperfusion injury. *Transplantation Proceedings* 2004; 36, 2586-2589.
- Gao L, Ramzan, Baker AB. Potential use of pharmacological markers to quantitatively assess liver function during liver transplantation surgery. *Anaesth. Intensive Care* 2000; 28 ; 375-85.
- Grinyo J: Reperfusion injury. *Transplant Proc* 1997; 29/59.
- Y. Kojima, S. Suzuki, Y. Tsuchiya, H. Konno, S. Nakamura. Regulation of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine responses by Kupffer cells in endotoxin-enhanced Reperfusion injury after total hepatic ischemia. *Transplantation International* 2003; 16: 231-240.
- Caraceni P, Domenicali M, Vendemiale G et al. The reduced tolerance of rat fatty liver to ischemia reperfusion is associated with mitochondrial oxidative injury. *J Surg Res* 2005; 124(2):160-8.
- Yokoyama M, Mizobuchi S, Nagano O, Fujii H, Yamashita M, Hirakawa M. The effects of epidural insertion site and surgical procedure on plasma Lidocaïne concentration. *Anesth. Analg.* 2001; 92 : 470-5.
- Singh D, Chopra K. Effect of trimetazidine on renal Ischemia/Reperfusion injury in rats. *Pharmacol Res.* 2004; 50(6): 623-9.
- Cassidy WM, Reynolds TB. Serum lactic dehydrogenase in the differential diagnosis of acute hepatocellular injury. *J Clin Gastroenterol* 1994; 19: 118-21.
- Camargo CA Jr, Madden JF, Gao W, Selvan RS, Clavien PA. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/Reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology* 1997; 26: 1513-20.
- Borghi-Scoazec G, Scoazec JY, Durand F et al. Apoptosis after ischemia-Reperfusion in human liver allografts. *Liver Transpl. Surg* 1993; 407-15.
- Choi DW. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6(5): 667-72.
- Benchoua A, Guegan C, Couriaud C et al. Specific Caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *J. Neurosci. J Neurosci* 2001 ; (18):7127-34.
- Qian T. Mitochondrial permeability transition in pH-dependent Reperfusion injury to rat's hepatocytes. *Am. J. Physiol* 1997; 273 : C1783.
- Jaeschke H and Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell induced oxidant stress and ischemia-Reperfusion injury in rat liver in vivo. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 1991; 260: G355-G362.
- Vollmar B, Menger MD, Glasz J, R, Leiderer, Messmer K. Impact of leukocyte-endothelial interaction in hepatic Ischemia-Reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 1994; 267: G783-G786.
- Maximilian Buja L. Myocardial ischemia and Reperfusion injury. *Cardiovascular Pathology* 14 2005; 170-175.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem.* 3 1984; 2W: 1-14.
- Rosenkranz E.R. Buckberg. G.D. Myocardial protection during surgical coronary Reperfusion. *J. Am. Coll. Cardiol* 1983; 1: 1235-1246.