



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene
(U.S.T.H.B.)

Faculté des Sciences Biologiques
(F.S.B.)

Thèse de Magister

Biologie et Physiologie Animale

Option : Contrôle des fonctions de l'organisme

Présenté par : **Fouzia ZERROUK**

**Modulation de la composition de la matrice
extracellulaire vasculaire par une
hyperhomocystéinémie chez *Psammomys obesus***

Soutenu publiquement le : 09/05/2007 devant le jury

Mme **Th. Gernigon-Spychalowicz**, Professeur à l'U.S.T.H.B.

Mlle **Y. Benazzoug**, Professeur à l'U.S.T.H.B.

Mlle **Z. Amirat**, Professeur à l'U.S.T.H.B.

Mme **S. Aouichat-Bouguerra**, Maître de conférence à l'U.S.T.H.B.

Mme **C. Touil-Boukoffa**, Professeur à l'U.S.T.H.B.

Président

Directeur de thèse

Examineur

Examineur

Examineur

A mes chers parents

A mes frères et sœurs

REMERCIEMENTS

J'exprime ma profonde gratitude en premier lieu à Mme Benazzoug, à qui je dois d'avoir pu réaliser ce travail. Après m'avoir accueillie au sein du Laboratoire Matrice extracellulaire, et inspiré le sujet de cette thèse. Je vous remercie pour votre disponibilité, votre bonté, votre cordialité et vos conseils toujours enrichissants qui m'ont soutenue efficacement et m'ont permis de mener à bien la tâche entreprise. Que Dieu vous garde pour nous.

Je prie Mme Gernigon professeur à la FSB, USTHB qui me fait le grand honneur de présider mon jury d'examen, de croire à ma vive gratitude et à l'assurance de ma haute considération.

A Mme Amirat professeur à la FSB, USTHB, pour avoir accepté de se pencher sur ce travail et de le juger.

Je tiens à dire toute ma reconnaissance à Mme Aouichat. Je vous remercie pour votre accueil chaleureux dans votre laboratoire ainsi que votre équipe. Je n'oublierai jamais vos encouragements et les moyens que vous avez mis largement à ma disposition, vos conseils, sans compter le temps précieux que vous m'a consacré et pour pouvoir accepter d'examiner ce travail.

Je remercie Mme Touil professeur à la FSB, USTHB, d'avoir aimablement acceptée d'examiner ce travail.

Je suis très heureuse que l'occasion soit offerte pour moi afin de témoigner ma profonde reconnaissance à Mme Othmani. Je vous remercie pour votre rigueur scientifique, vos qualités humaines ainsi que votre bienveillante sympathie que vous m'a toujours témoignée.

J'adresse ma vive reconnaissance à M Cherifi du laboratoire biochimie de l'hôpital Parnet (CHU) qui a bien voulu m'accueillir avec sa bienveillante compréhension permettant ainsi la réalisation d'une partie importante de l'expérimentation.

La technique d'électrophorèse des lipoprotéines a pu être réalisé grâce à Pr Kacimi du laboratoire de biochimie de l'hôpital central de l'armée (HCA). Je ne saurai jamais trop le remercier pour l'intérêt manifeste qu'il a accordé à ces recherches, qu'il soit infiniment remercié.

Je ne saurai oublier de remercier Mme Zarouali du laboratoire halieutique, Mme Djerdjouri du laboratoire de signalisation et M Amirouche du laboratoire biologie végétale, FSB, USTHB. Leur aide technique pour la prise des photos.

Je tiens à remercier également Mme Khadesse ingénieur du laboratoire matrice extracellulaire, pour son aide, sa sympathie et ses encouragements.

Que tous les collègues et amis (e) qui m'ont aidé et encouragé trouve ici mes chaleureux remerciements. Les moments que j'ai partagés surtout avec mon amie Rezkallah Nabila me seront toujours gravés dans ma mémoire.

Je dirai toute ma reconnaissance et ma tendresse à mes parents, mes frères et sœurs pour leur présence si importante pour moi.

A	Adventice
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BHMT	Bétaine homocystéine méthyl-transférase
CβS	Cystathionine β synthétase
CML	Cellule musculaire lisse
DMEM	Milieu essentiel de Eagle modifié par Dubelco
DTT	Dithiothreitol
E.I.L.	Espace interlamellaire.
EDRF	Endothelium-derived releasing factor
FPIA	Fluorescence polarization immunoassay
GNMT	Glycine-N-méthyl-transférase
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
Hcy	Homocystéine
HDL	High density lipoprotein
Hhcy	Hyperhomocystéinémie
I	Intima
ICAM	Intracellular adhesion molecule
IDL	Intermediar density lipoprotein
L	Lumière
L.E.	Lames élastiques
l.e.e.	limitante élastique externe
l.e.i.	limitante élastique interne
I.N.	Petit axe nucléaire
LDL	Low density lipoprotein
LN.	Grand axe nucléaire.
LOX-1	Lectin-like oxidized LDL receptor-1
Lp (a)	Lipoprotéine (a)
M	Média
MAT	Méthionine-adénosyl transférase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MET	Méthionine
MeTHF	Méthylène tétrahydrofolate.
MMP	Matrix metalloprotease
MS	Méthionine synthase
MTHF	Méthyl tétrahydrofolate.
MTHFR	N ^{5,10} méthylénetétrahydrofolate réductase
NF-KB	Nuclear factor κB
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Monoxyde d'azote synthase

PKC	Protéine kinase C
PLP	5' phosphate pyridoxal.
PO	<i>Psammomys obesus</i>
R	Récepteur.
SAH	S adénosyl homocystéine
SAM	S adénosyl méthionine
SRF	Serum response factor
SVF	Sérum de veau fœtal
THF	Tétrahydrofolate
TIMP	Tissular metalloprotease inhibitor
TNF α	Tumor necrosis factor α
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLDL	Very low density lipoprotein

SOMMAIRE

INTRODUCTION	2
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	
I. Métabolisme de l'homocystéine	7
II. Régulation du métabolisme de l'homocystéine	9
III. Variations physiopathologiques de l'homocystéinémie	
1. Influence de l'âge et du sexe	11
2. Facteurs génétiques et nutritionnels	11
2.1. Déficits en MTHFR et carences en folates	12
2.2. Les mutations de la cobalamine et carences en vitamine B12	13
2.3. Déficits en C β S et carences en vitamine B6	14
3. Insuffisance rénale	15
4. Hypothyroïdisme	16
IV. Hyperhomocystéinémie et facteurs de risque	
1. Hyperhomocystéinémie – Diabète	17
2. Hyperhomocystéinémie – Hypertension artérielle	17
3. Hyperhomocystéinémie – Troubles lipidiques	17
V. Mécanismes de la pathogénéicité de l'hyperhomocystéinémie	
1. Effets biochimiques de l'hyperhomocystéinémie	18
1.1. Production d'un stress oxydant	18
1.2. Production et métabolisme du NO	18
1.3. Action sur les protéines	19
1.4. Effet sur les facteurs de transcription et la transduction des signaux	19
1.5. Diminution de métabolites utiles	20
2. Actions physiopathologiques de l'homocystéine	20
2.1. Formation d'athérome et thrombose	20
2.2. Carcinogénèse	22
2.3. Prolifération cellulaire	22
2.4. Matrice extracellulaire	22
MATERIELS ET METHODES	
I. MATERIEL BIOLOGIQUE	
1. Généralités sur <i>Psammomys obesus</i> (Po)	24
2. Conditions d'élevage en captivité (animalerie)	25
3. Protocole expérimental	25

II. TECHNIQUES	
1. Technique histologique	26
1.1. Coloration topographique	26
1.2. Colorations histochimiques	27
-Réaction à l'acide périodique schiff	
-Coloration au bleu alcian	
2. Etude morphométrique	27
3. Technique de Zymographie	28
4. Technique d'extraction des lipides totaux du foie	28
5. Technique d'électrophorèse des lipoprotéines	28
Principe	
Procédure	
6. Technique analytique	32
7. Analyse statistique	32
RESULTATS	
I. Evolution du poids corporel	34
II. Evolution des paramètres biochimiques plasmatiques	
1. La glycémie	35
2. La cholestérolémie	36
3. La triglycéridémie	37
4. La protéinémie	38
5. L'homocystéinémie	39
6. L'acide urique plasmatique	40
III. Les lipoprotéines plasmatiques	41
IV. Etude histo-morphométrique de l'aorte	
1. Aorte de <i>Psammomys obesus</i> normal	43
2. Effet de la méthionine sur la structure histo-morphométrique de la paroi artérielle	44
2.1. Etude histologique	44
2.2. Etude morphométrique	56
DISCUSSION	60
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	68
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	70
RESUME	
ANNEXES	
INDEX	

INTRODUCTION

De nombreuses études expérimentales, cliniques et épidémiologiques indiquent qu'une augmentation de la teneur plasmatique en homocystéine est considérée comme un facteur de risque indépendant d'accidents cardiovasculaires d'origine ischémique (**Welch et Loscalzo, 1998 ; Brattström et Wilcken, 2000 ; Ueland et al., 2000 ; Abecassis et al., 2004 ; Yang et al., 2005**).

Au plan clinique, l'homocystinurie, maladie congénitale rare, caractérisée par une homocystéinémie très élevée ($> 100 \mu\text{mol/l}$; normes $< 15 \mu\text{mol/l}$), peut être considérée comme un modèle naturel de pathogenèse. Les patients atteints développent dès l'enfance, durant l'adolescence ou avec le vieillissement, des troubles ophtalmologiques (**Hu et al., 2005**), squelettiques, nerveux (**Fallon et al., 2003 ; Martinelli et al., 2003**) et vasculaires (**Cacciari et Salardi, 1989**). L'homocystinurie fut décrite pour la première fois en 1962 chez des enfants présentant un retard mental (**Carson et Neill, 1962**). Les associations entre cette maladie neurologique congénitale et les pathologies vasculaires ont été rapportées par la suite (**Mudd et al., 1964**). Dès 1969, **McCully** propose que l'athérosclérose peut résulter de l'accumulation d'homocystéine dans le sang au contact de la paroi des vaisseaux. Cependant, récemment, **Brattstrom et Wilcken (2000)** ont souligné que la pathologie vasculaire développée dans l'homocystinurie diffère beaucoup de celle observée dans la population générale. L'athérosclérose est caractérisée par un épaississement de la paroi artérielle consécutive à la prolifération exagérée des cellules musculaires lisses, par un dépôt de lipides et par une fibrose.

Or, l'homocystinurie est plutôt associée à une thrombose qui affecte plus les veines que les artères (**Mudd et al., 1985**), et les attaques cérébrales liées à une homocystinurie sont fréquemment dues à une thrombose, une cause rare d'attaque dans la population générale (**Hopkins et al., 1969**).

Les études expérimentales ont cependant plusieurs limites : elles utilisent des concentrations très élevées d'homocystéine supposées mimer l'effet de concentrations plus modestes sur une durée d'exposition de plusieurs décennies ; les résultats ont été obtenus soit *in vitro* à l'aide de modèles cellulaires (**Fu et al., 2003 ; Akasaka et al., 2005**) soit *in vivo* chez les animaux de laboratoire (**Rolland et al., 1997 ; Dayal et al., 2002 ; Zhou et al., 2001 ; 2003 ; Hidirolou et al., 2004 ; Fu et al., 2005**).

Sur le plan épidémiologique, de nombreuses études de cas-témoins montrent qu'il existe une association entre hyperhomocystéinémie modérée et risque de cardiopathie ischémique (**Eikelboom et al., 1999 ; Soinio et al., 2004 ; Splaver et al., 2004**) et de pathologies cérébrovasculaire et vasculaire périphérique (**Boushey et al., 1995 ; Eikelboom et al., 1999 ; Splaver et al., 2004**). Dans des populations à risque cardiovasculaire élevé, plusieurs études prospectives mettent en évidence une forte association entre hyperhomocystéinémie modérée d'une part et le risque cardio-vasculaire ou morbidité et mortalité cardiovasculaire d'autre part (**Brattström et Wilcken, 2000 ; Ueland et al., 2000 ; Yang et al., 2005**).

Certaines études ont repris, depuis quelques années seulement, la théorie protéique de l'athérosclérose émise par **McCully** en 1962 et ont montré que l'homocystéine pourrait constituer un facteur de risque indépendant, de nombreuses pathologies vasculaires (**Yang et al., 2005**) dont l'athérosclérose. Dans le cadre de notre thème de recherche, nous avons montré dans un précédent travail (**Raaf, 2003**) qu'une hyperhomocystéinémie expérimentale engendre chez le Rat Wistar des altérations de la paroi vasculaire de type athéroscléreuse, sans variations significatives de certains paramètres biochimiques plasmatiques considérés comme facteurs de risque classiques de l'athérosclérose.

Dans ce travail, nous nous proposons de confirmer cette hypothèse en utilisant un modèle animal athéro-sensible à savoir *Psammomys obesus*., constitue un modèle idéal pour l'étude de certains désordres métaboliques et tissulaires survenus lors du passage de son biotope naturel où son alimentation est limitée à une espèce de plante très riche surtout en eau et en sels minéraux en une vie de laboratoire où l'alimentation est très riche en hydrates de carbone. Ceci provoque chez lui la surexpression de certains gènes appelés économiques « thrifty gene ». Ce concept de gène d'épargne a été d'ailleurs défini chez l'homme, passant d'un mode de vie restrictif à une abondance alimentaire hypercalorique (**Shafir, 2001**).

L'hyperhomocystéinémie serait installée par administration chronique de méthionine pendant 6 mois.

Afin de déterminer l'impact de l'hyperhomocystéinémie sur le plan biochimique et tissulaire, nous allons effectuer :

- une étude de l'évolution pondérale,
- une étude biochimique plasmatique (glycémie, triglycéridémie, cholestérolémie, protéinémie, homocystéinémie, acide urique),
- une électrophorèse des lipoprotéines plasmatiques,
- une étude histologique et histochimique de l'aorte,
- une étude morphométrique permettant la détermination de certains paramètres morphologiques de la paroi aortique.

RAPPELS
BIBLIOGRAPHIQUES

L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé endogène soufré découvert en 1932 par **De Vigneaud**, qui n'est pas retrouvé dans la structure des protéines, mais qui constitue un intermédiaire important dans la fonction de donneur de méthyle de la méthionine et dans le métabolisme de celle-ci vers les autres acides aminés soufrés comme la cystéine.

Les études épidémiologiques et expérimentales ont montré que, l'ingestion de méthionine conduit à une synthèse accrue d'homocystéine et permet ainsi d'étudier le catabolisme de cette dernière. Chez les sujets normaux, l'élévation de l'homocystéine plasmatique est très modérée et la valeur de base est retrouvée en quelques heures (**Sardharwalla et al., 1974**). Chez les rats, une hyperhomocystéinémie est observée 5 à 120 minutes après l'administration de méthionine à raison de 0,34 mmol/Kg de poids corporel (**Yagisawa et al., 2004**).

Dans des conditions physiologiques normales, les concentrations plasmatiques d'homocystéine chez des sujets sains à jeun sont comprises entre 5 et 15 $\mu\text{mol/l}$ (**Ueland et al., 1993 ; Demuth et al., 2000 ; Mudd et al., 2000**), entre 6 et 12 $\mu\text{mol/l}$ (**Bostom et al., 2000**).

Dans le plasma humain, l'homocystéine est retrouvée sous trois formes différentes (figure 1) :

- En très petite quantité (1 à 2 %) sous forme réduite libre (**Ueland et al., 1995 ; Brosnan et al., 2004**).
- En plus grande quantité (25-30%) sous la forme oxydée d'homocystine (Hcy-Hcy), de disulfure mixte avec la cystéine, et cyclisée en thiolactone (**Demuth et al., 2000 ; Mudd et al., 2000**).
- Et majoritairement (70 à 75 %) sous forme de disulfures conjugués aux groupes thiols des protéines (**Refsum et al., 1985 ; Mansoor et al., 1992 ; Miner et al., 1997**); principalement (65 %) l'albumine (**Refsum et al., 1985**), et à un degré moindre (25 %) les γ globulines (**Jakubowski, 2002 ; Hortin et al., 2006**). Les liaisons aux protéines sont saturées chez les sujets hyperhomocystéinémiques, dès que la concentration d'homocystéine dépasse 150 $\mu\text{mol/l}$ (**Wiley et al., 1988**).

Le terme d'homocystéine est habituellement utilisé pour désigner l'ensemble de ces composants (**Mudd et al., 1989 ; Falcon et al., 1994**). En raison de cette répartition, seulement 20 % de l'homocystéine plasmatique totale peuvent être filtrés par le rein. Par ailleurs, la majorité de ces 20 % étant catabolisée par les cellules tubulaires, l'excrétion urinaire d'homocystéine est très faible (3,5 à 10 $\mu\text{mol} / 24$ heures) (**Demuth et al., 2000**). Selon **House et al. (1998)**, le rapport Hcy non liée aux protéines / Hcy liée aux protéines change selon les espèces; contrairement à l'homme, approximativement 65 à 75% l'Hcy est sous la forme libre chez le rat.

L'homocystéine réduite produite à l'intérieur de la cellule, est oxydée une fois libérée dans le milieu extracellulaire. Afin de maintenir des niveaux intracellulaires bas de cette substance cytotoxique, l'homocystéine métabolisée dans la cellule, est exportée vers le plasma (**Christensen et al., 1991 ; Selhub, 1999**). Des résultats basés sur une étude cinétique chez des sujets adultes sains rapportent que 1,2 mmol d'Hcy, ou approximativement 5 à 10% de la production cellulaire quotidienne totale, est livrée quotidiennement dans le compartiment extracellulaire (**Mudd et al., 1975 ; Refsum et al., 1998**).

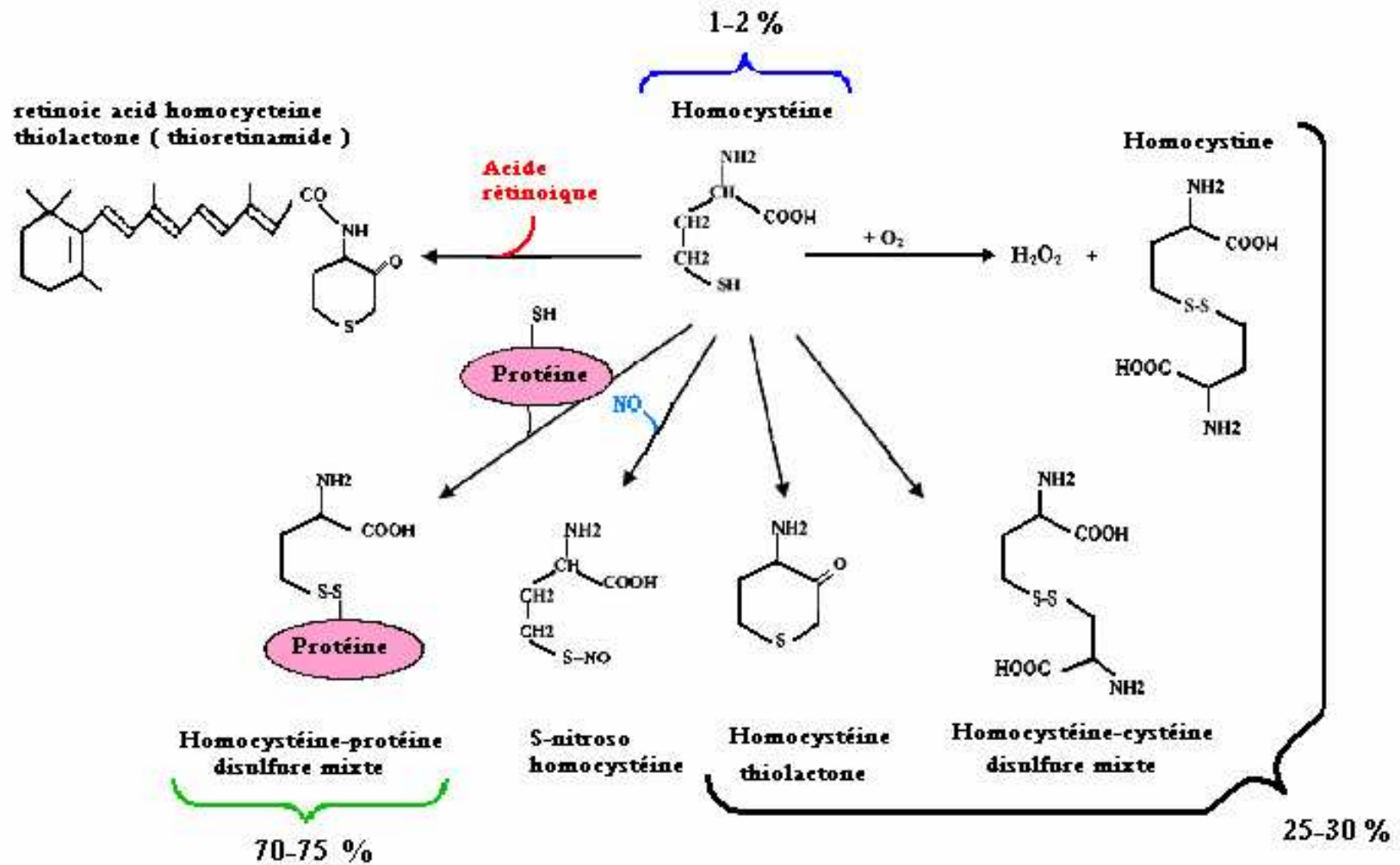


Figure 1 : Formules chimiques de l'homocystéine, de ses formes circulantes et de ses dérivés.
 (D'après Miner *et al.*, 1997 ; Guillard *et al.*, 2003 ; Brosnan *et al.*, 2004)

I. Métabolisme de l'homocystéine (Figure 2)

Sur le plan physiologique, l'homocystéine occupe une place centrale dans le métabolisme des acides aminés soufrés. Elle est produite par la déméthylation de la méthionine (**Finkelstein et Martin, 2000**).

L'activation de la méthionine en S-adenosyl-méthionine (SAM) se fait sous l'influence de la méthionine-adenosyl transférase (MAT). La SAM est un très important donneur de méthyle (**Chiang et al., 1996 ; Stead et al., 2001**) aux différents accepteurs importants comme les acides nucléiques, les neurotransmetteurs, les hormones et les phosphatidylcholines (**Selhub et Miller, 1992 ; Bailey et al., 2001**). D'après **Bodamer et al. (2005)**, la synthèse de créatine dépend en grande partie de SAM. Celle-ci, en donnant son méthyle, se transforme en S-adenosyl-homocystéine (SAH), qui est hydrolysée en homocystéine et en adénosine par la SAHH ou S-adenosyl-homocystéine hydrolase (**Welch et Loscalzo, 1998**).

L'homocystéine formée est soit catabolisée en cystathionine (voie de la transsulfuration) soit reméthylée en méthionine (voie de la reméthylation) (**Mudd et al., 1995 ; Guillard et al., 2003**).

La reméthylation de l'homocystéine est catalysée par la méthionine synthase (MS) qui requiert le 5-méthyltétrahydrofolate (5-MTHF) comme donneur de méthyle (**Yamada et al., 2006**) et la vitamine B₁₂ (méthylcobalamine forme active de la vitamine B₁₂) comme cofacteur (**Marsh, 1999**). La formation du 5-MTHF dépend de la N^{5,10} méthylénetétrahydrofolate réductase (MTHFR) qui catalyse la réduction du 5,10-MeTHF formé à partir du tétrahydrofolate (THF). Une voie parallèle de reméthylation indépendante des folates et de la cobalamine utilise la conversion de la bétaine en N, N-diméthylglycine sous l'action de la bétaine homocystéine méthyl-transférase (BHMT), principalement dans le foie (**Guillard et al., 2003 ; Kim et Kim, 2005**) et le rein (**Brosnan et al., 2004**). Cette voie permet de maintenir la concentration tissulaire en méthionine à un niveau suffisant pour assurer la synthèse de la SAM en cas de déficit en folates. La S-adenosyl-homocystéine formée dans les réactions de méthylation, est ensuite hydrolysée en homocystéine, qui devient disponible pour démarrer un nouveau cycle de transfert de méthyle. L'hydrolyse de la SAH est une réaction réversible, préférentiellement orientée vers la synthèse de SAH et des concentrations cellulaires élevées de SAH précèdent et accompagnent toutes les formes d'hyperhomocystéinémie.

Dans la voie de transsulfuration, l'homocystéine se condense avec la sérine pour donner la cystathionine sous l'action de la cystathionine β -synthase, dépendant du pyridoxal 5'-phosphate (PLP), la forme active de la vitamine B₆. La cystathionine est ensuite hydrolysée en cystéine et α -cétobutyrate par une enzyme dépendant du PLP, la γ -cystathionase (**Miller et al., 1992 ; Guillard et al., 2003**). Cette voie est très importante puisque la cystéine est à l'origine d'un acide aminé soufré anti-oxydant majeur le glutathion (**Anderson, 1998**) ; et d'autres acides aminés utiles, notamment la taurine ; ou elle est convertie en sulfates qui sont excrétés dans les urines. Les carbones restants de l'Hcy rejoindront le cycle de Krebs (**Wolters et al., 2004**).

MAT	Méthionine adénosyl transférase,
MeTHF	Méthylène tétrahydrofolate,
MTHF	Méthyl tétrahydrofolate,
PLP	5' phosphate pirydoxal,
R	Récepteur,
SAH	S adénosyl homocystéine,
SAM	S adénosyl méthionine,
THF	Tétrahydrofolate,

- 1* : S-Adenosylméthionine Synthase ou SAS,
- 2* : Méthyle Transférase ou MT,
- 3* : S-Adenosyl Homocystéine Hydrolase ou SAHH,
- 4* : Méthionine Synthase ou MS,
- 5* : MeTHF Reductase ou MeTHFR,
- 6* : Cystathionine β -Synthase ou CBS,
- 7* : γ Cystathionase,
- 8* : Bétaïne Homocystéine Méthyle Transférase ou BHMT,
- 9* : Glycine N-Méthyl Transférase ou GNMT,
- 10* : Sérine Hydroxyméthyl Transférase ou SHT,
- 11* : γ Glutamylcystéine Synthétase ou γ GS,
- 12* : Glutathione Synthétase ou GS,
- 13* : Cystéine Dioxygénase ou CD.

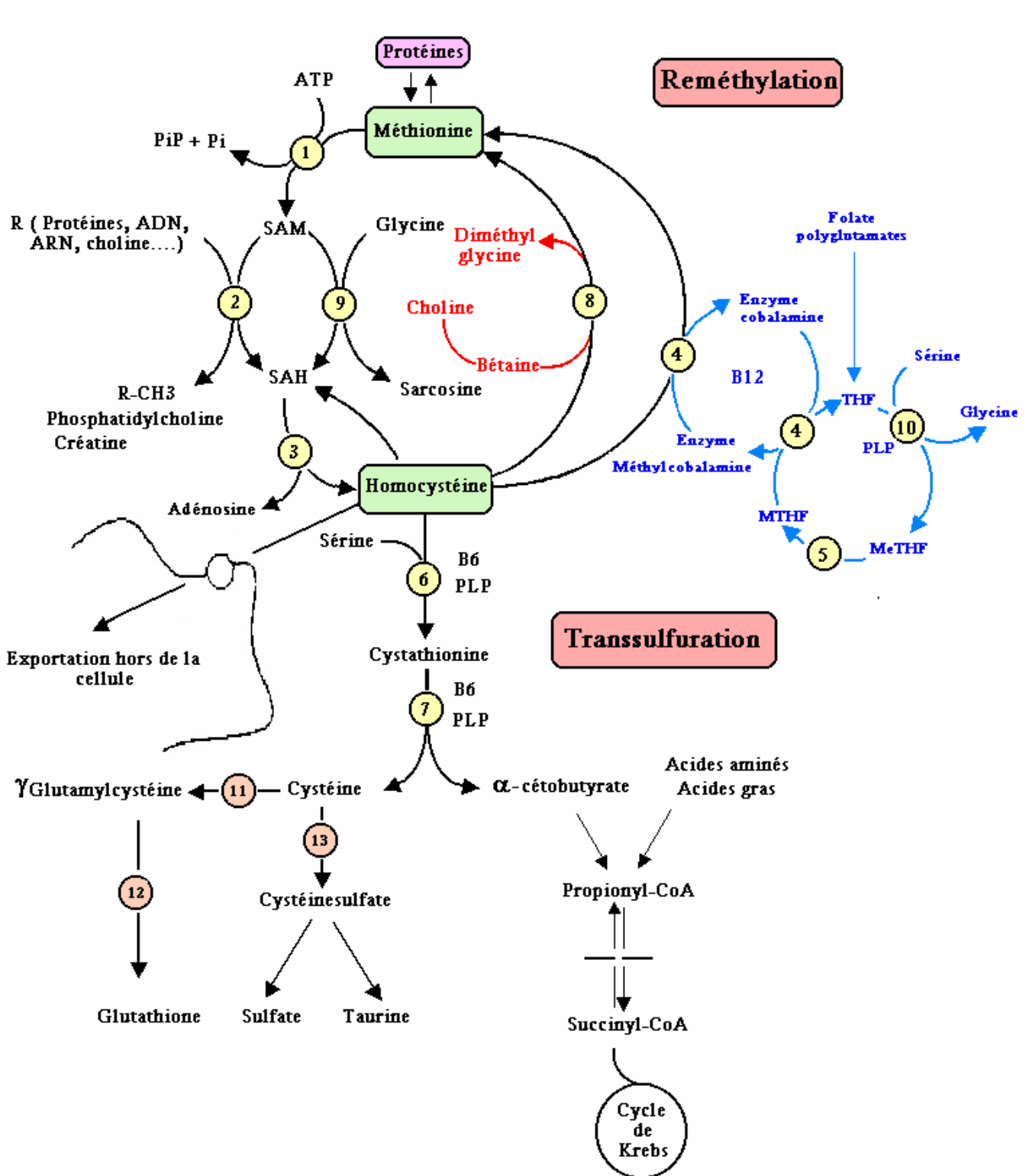


Figure 2 : Métabolisme de l'homocystéine.

(d'après Uthus *et al.*, 2002 ; Guillaud *et al.*, 2003 ; Wolters *et al.*, 2004).

I. Régulation du métabolisme de l'homocystéine (Figure 3)

Les études sur la régulation du métabolisme de l'homocystéine ont montré que l'orientation de l'homocystéine vers la voie de la reméthylation ou de la transsulfuration est sous le contrôle de la disponibilité en méthionine et SAM. La synthèse "de novo" de la méthionine dépend de la teneur en groupements méthyle labiles (méthionine, choline) (**Mudd et Poole, 1975 ; Mudd *et al.*, 1980**). Lorsque l'apport en méthionine est normal, la molécule d'homocystéine est recyclée environ deux fois par la voie de reméthylation avant d'être catabolisée par la voie de transsulfuration. Lorsque l'apport en méthionine diminue de moitié, le nombre de cycles par molécule d'homocystéine augmente d'un facteur 2. À l'inverse, lorsque l'apport en méthionine augmente, l'homocystéine utilise principalement la voie de la transsulfuration.

La capacité de l'organisme à adapter l'utilisation de l'homocystéine en fonction de l'apport en méthionine implique l'existence d'une régulation commune aux deux voies. Les données expérimentales obtenues principalement par la mesure *in vitro* de l'activité des enzymes suggèrent que cette coordination est réalisée par au moins deux mécanismes :

- ❖ Le premier mécanisme dépend de la capacité de la SAM à inhiber la MTHFR (**Jencks et Matthews, 1987 ; Guillard *et al.*, 2003**) et à activer la cystathionine- β -synthase (**Finkelstein *et al.*, 1975 ; Guillard *et al.*, 2003**). La SAM bloque donc la synthèse du N-5-MTHF nécessaire à la reméthylation de l'homocystéine et favorise la réaction initiale de la transsulfuration. La concentration intracellulaire de la SAM détermine de ce fait le destin métabolique des molécules d'homocystéine,
- ❖ Le second mécanisme dépend de la régulation de la concentration intracellulaire de SAM. Les deux enzymes qui catalysent la synthèse de la SAM présentent une affinité différente pour la méthionine. La première, de poids moléculaire élevé, présente une affinité importante pour la méthionine et fonctionne dans les conditions physiologiques; la seconde, de poids moléculaire plus bas, a une faible affinité pour la méthionine et ne fonctionne de ce fait qu'en présence d'apports élevés en méthionine.

Toute variation de la teneur intracellulaire en méthionine modifie donc le taux de synthèse de la SAM. L'utilisation de la SAM est régulée spécifiquement par une réaction dans laquelle son groupement méthyle est transféré sur le groupement aminé de la glycine pour former la méthylglycine ou sarcosine. Cette réaction est catalysée par la glycine-N-méthyltransférase (GNMT) très abondante dans le foie et inhibée par le N-5-méthyltétrahydrofolate (**Cook et Wagner, 1984**), de telle sorte que les folates régulent la teneur intracellulaire de la SAM. Lorsque l'apport en méthionine est élevé, l'enzyme de faible poids moléculaire va catalyser rapidement la transformation de la méthionine en SAM. L'augmentation de la concentration intracellulaire de la SAM va résulter en :

- une inhibition de la MTHFR et de ce fait en un blocage de la synthèse du N-5-MTHF qui entraîne l'activation de la GNMT,
- l'activation de la cystathionine- β -synthase.

À l'opposé, lorsque l'apport de méthionine est faible, la concentration intracellulaire de SAM n'est pas suffisante pour inhiber la MTHFR et la concentration du N-5-MTHF augmente de telle sorte que la GNMT est inhibée. La voie de reméthylation est donc favorisée d'autant plus que la concentration de la SAM est trop basse pour stimuler la cystathionine- β -synthase.

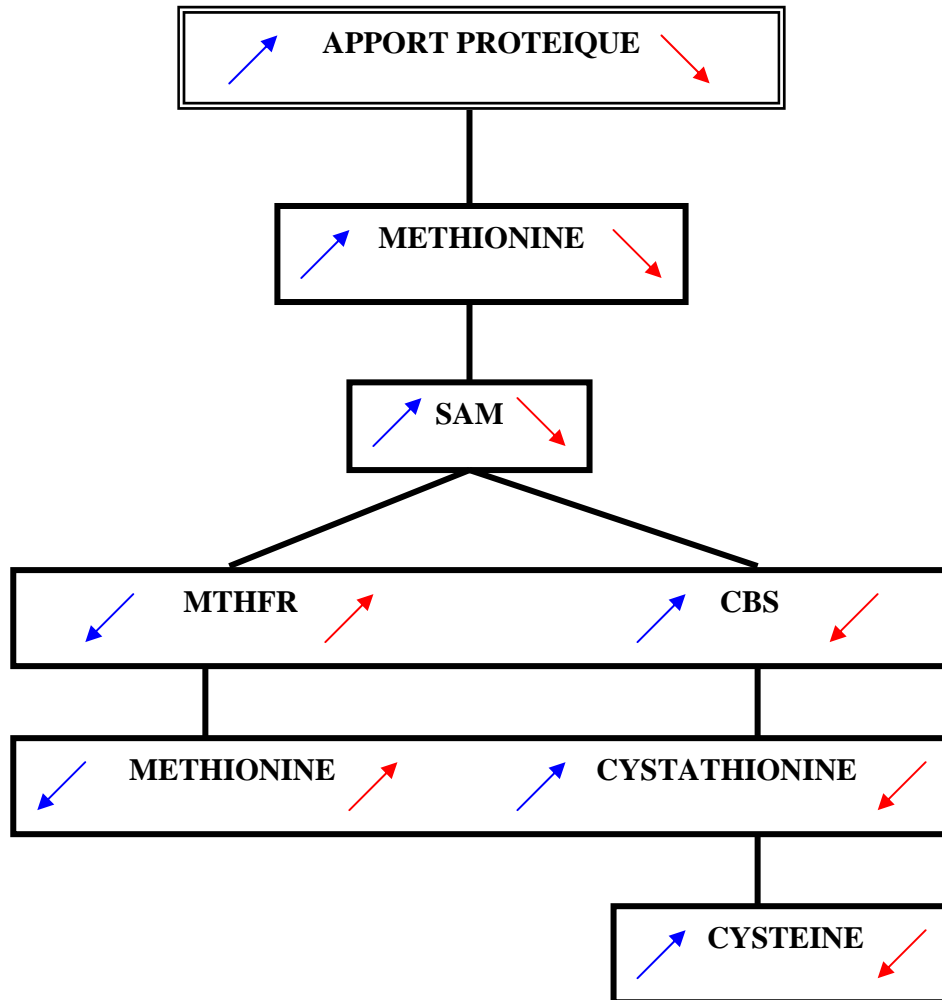


Figure 3 : Régulation du métabolisme de l'homocystéine.
(d'après Fonseca, 2003).

II. Variations physiopathologiques de l'homocystéinémie

L'hyperhomocystéinémie caractérisée par un taux élevé d'homocystéine plasmatique (supérieur à 15 μM), peut avoir pour origine des troubles d'ordre génétique, nutritionnel et thérapeutique (Mudd *et al.*, 2001 ; Smith et Bodamer, 2002 ; Wald *et al.*, 2002). Elle peut également être associée à différents états pathologiques. L'homocystéinémie est aussi influencée par des facteurs physiologiques, comme l'âge et le sexe (Ueland *et al.*, 1993).

1. Influence de l'âge et du sexe

Plusieurs influences biologiques, telles l'âge et le sexe, agissent sur les taux d'homocystéine. Chez les enfants dont l'âge est compris entre 3 et 14 ans, les concentrations normales d'homocystéinémie sont de l'ordre de 6 $\mu\text{mol/l}$ (Ueland *et al.*, 1993). Les concentrations plasmatiques d'Hcy enregistrées chez les femmes sont plus faibles que celles rapportées chez les hommes, d'environ 21% (Lussier-Cacan *et al.*, 1996 ; Ganji et Kafai, 2003). Panagiotakos *et al.* (2005) ont également montré que les valeurs d'Hcy chez les hommes sont supérieures (d'environ 25%) à celles des femmes ($14,5 \pm 6 \mu\text{mol/l}$ vs $10,8 \pm 3,5 \mu\text{mol/l}$).

Les influences des hormones sexuelles sur le taux sanguin d'homocystéine ont été rapportées par plusieurs auteurs dont Marchesoni *et al.* (2003). Leurs effets sur le métabolisme de l'Hcy ne sont pas entièrement élucidés selon Cagnacci *et al.* (2004), bien que Giltay *et al.* (1998) mentionnent une augmentation du taux d'homocystéine par les androgènes et une corrélation négative de l'homocystéinémie et les oestrogènes.

Selon Ueland *et al.* (1993), l'homocystéinémie notée chez les femmes post-ménopausées se rapproche de celles des hommes. Harma *et al.* (2005) ont montré qu'une administration intranasale du 17 β -oestradiol pendant 6 mois à des femmes post-ménopausées, a permis de diminuer le taux d'homocystéinémie. Celle-ci présente une corrélation négative avec le taux plasmatique de folates et de vitamine B₁₂.

Ces différences ont été attribuées à divers facteurs dont le taux de formation d'homocystéine, la masse musculaire importante et la synthèse accrue de créatine phosphatée chez les hommes.

Par ailleurs, Jacobsen (1996) a montré l'existence d'une relation positive entre la créatinine sérique, l'acide urique et le taux d'homocystéine en présence d'une fonction rénale normale.

2. Facteurs génétiques et nutritionnels

Une hyperhomocystéinémie peut résulter d'un défaut génétique touchant l'une des enzymes ou d'une déficience en une ou plusieurs vitamines qui participent au métabolisme de l'homocystéine.

En 1962, Carson et Neill mettent en évidence une augmentation de l'Hcy urinaire chez deux sœurs souffrant d'un retard mental, et décrivent ainsi les premiers cas d'homocystinurie.

Selon Guillard *et al.* (2003), l'hyperhomocystéinémie peut être classée en fonction de sa cause, de sa prévalence et de sa sévérité en :

- Hyperhomocystéinémie modérée : c'est la forme la plus fréquente caractérisée par des concentrations variant de 12 à 30 $\mu\text{mol/l}$.

- Hyperhomocystéinémie intermédiaire lorsque les concentrations en homocystéine varient de 31 à 100 $\mu\text{mol/l}$.
- Hyperhomocystéinémie sévère lorsque la concentration est supérieure à 100 $\mu\text{mol/l}$

Les deux premières catégories sont liées à une mutation du gène codant pour les enzymes clés du métabolisme de l'homocystéine et/ou à un statut inadéquat en folates, vitamines B₆ et B₁₂. Les cas les plus sévères (3^{ème} catégorie) sont dus à un déficit en gène codant pour la cystathionine β -synthase ou à des mutations homozygotes de gènes codant pour d'autres enzymes.

L'hyperhomocystéinémie est un marqueur important pour la déficience de la vitamine B₁₂ et/ou d'insuffisance folique, elle peut également indiquer un taux bas de vitamine B₆. **Hung et al. (2003)**, ont rapporté qu'un groupe d'hommes avec des concentrations sériques en folates supérieures à 9 $\mu\text{g/l}$ présentent un double risque de mort par maladie cardiovasculaire. La concentration sérique normale de la cobalamine est d'environ 150 pmol/l (200 pg/ml), 10 à 15 % des personnes âgées sont déficientes. Selon **Wolters et al. (2004)**, un seuil de 220-258 pmol/l (300-350 pg/ml) serait souhaitable chez les personnes âgées.

D'autres auteurs ont montré l'efficacité d'une supplémentation vitaminique pour diminuer l'homocystéinémie. **Van Oort et al. (2003)**, ont estimé qu'une dose quotidienne d'acide folique d'environ 400 μg , est une dose minimum requise pour une réduction adéquate d'homocystéine. Une dose faible de la L-MTHF (113 μg) induit une diminution de la concentration d'Hcy totale chez les personnes saines (**Venn et al., 2003**). Chez les personnes dont l'âge est supérieur à 60 ans, une supplémentation en vitamine B₁₂ devrait être supérieure à 50 $\mu\text{g/jour}$ (**Wolters et al., 2003**). Une administration intraveineuse de la bétaine diminue l'hyperhomocystéinémie provoquée par une surcharge de la méthionine chez les rats (**Yagisawa et al., 2004**).

Tout défaut affectant l'expression des gènes codant pour les enzymes clés du métabolisme de l'homocystéine peut générer une augmentation de l'homocystéinémie. Les principales anomalies concernent le gène de la MTHFR (**Dedoussis et al., 2005**). Le polymorphisme de ce gène a été identifié, il s'agit d'une substitution C677T. Plus récemment, les mutations A2756G de la méthionine synthase et A66G de la méthionine synthase réductase ont été identifiées comme un facteur de risque d'hyperhomocystéinémie (**Jacques et al., 2003**). L'impact du polymorphisme de la MTHFR sur l'homocystéinémie dépend du statut en folates (**Rampersaud et al., 2003**). Lorsque la folatémie est élevée ($> 15,4 \mu\text{mol/l}$) aucune interaction entre la mutation de la MTHFR et l'homocystéinémie n'est observée. À l'inverse, chez les sujets dont la folatémie est basse, l'homocystéinémie est plus élevée chez les homozygotes que chez les sujets avec un génotype normal (**Jacques et al., 1996**).

2.1. Déficits en MTHFR et carences en folates (figure 4)

Le N5-méthyltétrahydrofolate est une vitamine indispensable pour la synthèse de la méthionine. Une altération de sa synthèse est due soit à un apport insuffisant de folates, soit à une diminution de l'activité de la MTHFR qui freine la synthèse de la méthionine. L'homocystéine qui devait être reméthylée, s'oriente vers la voie de la transsulfuration. Mais cette voie ne peut prendre en charge la totalité de l'homocystéine pour deux raisons : l'inhibition de la synthèse de la méthionine conduit à une chute de la concentration intracellulaire de la SAM ; le manque de N5-CH₃ THF permet à la GNMT d'être active de manière optimale de telle sorte que la concentration de la SAM diminue encore et que la synthèse de l'homocystéine est stimulée (Fig. 3). La voie de transsulfuration devient

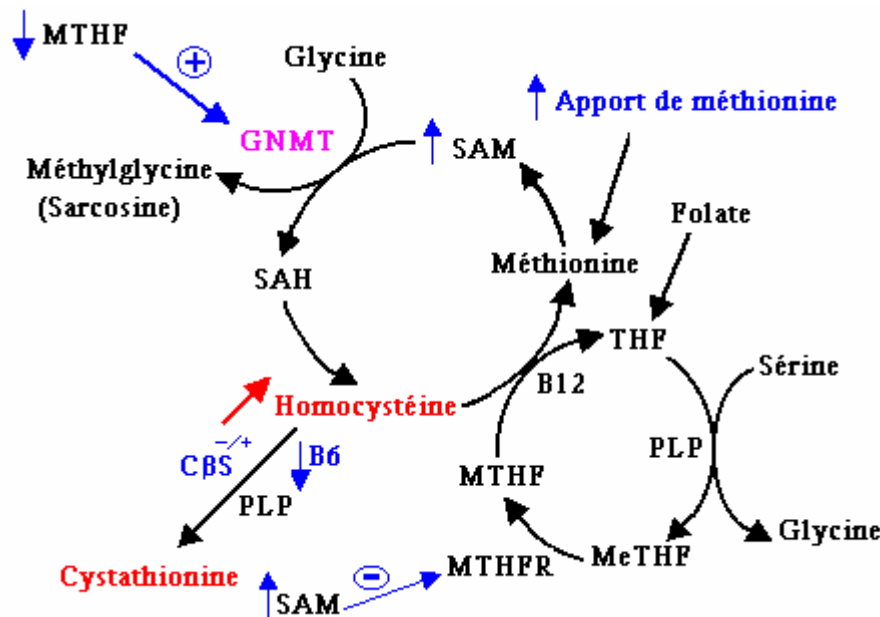


Figure 6-b : Déficit hétérozygote de la Cystathionine β -Synthase et carence en vitamine B6 (Guilland *et al.*, 2003 modifié).

3. Insuffisance rénale

Les augmentations modérées de la concentration d'homocystéine observées au cours de l'insuffisance rénale pourraient contribuer à l'excès de maladies vasculaires. La prévalence de l'hyperhomocystéinémie est d'environ 80 à 100 % chez des patients en insuffisance rénale terminale.

Chez les sujets non dialysés, l'augmentation de l'homocystéinémie est globalement inversement proportionnelle à la réduction de la filtration glomérulaire (Chauveau *et al.*, 1992 ; Arnadottir *et al.*, 1996). En transplantation rénale, dans une étude prospective, Van Guldener *et al.* (1995) notent une diminution significative de 33% de la concentration plasmatique d'homocystéine sans toutefois un retour aux valeurs normales. Deux études transversales (Massy *et al.*, 1994 ; Arnadottir *et al.*, 1996) retrouvent une concentration élevée d'homocystéine chez les patients transplantés rénaux.

Cependant, l'hyperhomocystéinémie de l'insuffisance rénale n'est pas liée à un défaut d'élimination rénale car celle-ci n'intervient normalement que pour 1 % de la clairance métabolique totale de l'homocystéine, et la clairance fractionnelle de l'homocystéine augmente lorsque la filtration glomérulaire diminue.

Guttormsen *et al.* (1997) arrivent à une conclusion similaire en comparant la cinétique d'élimination plasmatique après une charge orale en L-homocystéine chez des sujets à fonction rénale normale et chez des sujets insuffisants rénaux traités par hémodialyse. La demi-vie d'élimination est considérablement augmentée chez les insuffisants rénaux par rapport aux sujets à fonction rénale normale. Ces données correspondent à une réduction de 70 % de la clairance plasmatique de l'homocystéine en cas d'insuffisance rénale terminale. Ces auteurs calculent également que chez le sujet urémique, le débit urinaire d'homocystéine est significativement plus élevé que chez le sujet à fonction rénale normale. En effet 85 % de

l'homocystéine filtrée est réabsorbée dans le tubule rénal chez l'urémique contre 99 % dans les conditions normales (**Guttormsen et al., 1997**).

Chez 79 patients ayant une insuffisance rénale chronique mais non dialysés, **Chauveau et al. (1993)** retrouvent une concentration d'homocystéine significativement plus élevée chez les 20 patients ayant des antécédents de maladie artérielle occlusive par comparaison aux 59 patients qui n'avaient pas de tels antécédents (**Chauveau et al., 1993**).

Jungers et al. (1997) rapportent ainsi, dans une population de 147 sujets insuffisants rénaux non dialysés et suivis prospectivement pendant 6 ans en moyenne, l'augmentation progressive des concentrations plasmatiques d'homocystéine avec la dégradation de la fonction rénale (**Jungers et al., 1997**). De plus, les concentrations d'homocystéine sont significativement plus élevées chez les patients qui vont développer une complication cardiovasculaire.

Li et al. (2002), ont révélé un état d'hyperhomocystéinémie de $12,5 \pm 1,9$ $\mu\text{mole/L}$ (contre $6,1 \pm 2,6$ $\mu\text{mole/L}$ chez les rats témoins) après l'administration de la méthionine pendant 6 semaines ; et ils ont supposé que cet état pourrait être un facteur pathogène important pour des dommages glomérulaires ; l'excrétion urinaire des protéines atteint une valeur de 52 ± 2 mg/24 h contre 17 ± 2 mg/24 h chez témoins.

4. Hypothyroïdisme

L'hypothyroïdisme est l'un des facteurs qui augmente le risque des maladies cardiovasculaires (**Martinez-Triguero et al., 1998**). Les études récentes ont démontré que la concentration de l'homocystéine est plus élevée chez les patients avec hypothyroïdie comparée aux sujets sains (**Nedrebo et al., 1998 ; Catargi et al., 1999 ; Hussein et al., 1999 ; Lien et al., 2000**). **Parameswaran et al. (1994)** ont rapporté que, les changements des concentrations ou de l'activité biologique de la vitamine B₁₂ ou B₆ et/ou des folates peuvent altérer l'homéostasie de la thyroïde. Ainsi **Colleran et al. (2003)** ont noté que l'activité biologique de la vitamine B₁₂ modifiée pendant l'hyperthyroïdisme, peut entraîner l'hyperhomocystéinémie.

Une hyperhomocystéinémie est aussi associée à la créatininémie élevée (**Bodamer et al., 2005**), au tabagisme (**Fallon et al., 2003 ; Hu et al., 2005**), à la consommation de café (**Mursu et al., 2005**), à l'alcoolisme (**Barak et al., 2001 ; 2003 ; Kharbanda et al., 2005**) et à la prise de plusieurs médicaments (tels que les antifolates, la L-DOPA et l'oxyde nitreux) (**Refsum et al., 1998**).

III. Hyperhomocystéinémie et facteurs de risque

Les maladies cardiovasculaires sont aujourd'hui dans le monde, la première cause de morbidité et de mortalité. L'hypertension, l'hypercholestérolémie, le diabète, l'obésité et le tabagisme... sont des facteurs de risque reconnus. Les données épidémiologiques recueillies au cours de ces trente dernières années ont suggéré que d'autres facteurs biologiques pouvaient être associés à l'augmentation du risque de développer une pathologie cardiovasculaire. Parmi ceux-ci, un intérêt croissant a été porté à l'hyperhomocystéinémie modérée. Les premières observations cliniques ayant permis d'évoquer un lien entre hyperhomocystéinémie et maladies cardiovasculaires furent celles de jeunes adultes présentant une hyperhomocystinurie héréditaire (**McCully, 1969 ; Mudd et al., 1964**).

1. Hyperhomocystéinémie – Diabète

De Luis et al. (2005) ont rapporté que les complications diabétiques sont plus graves lorsque l'hyperhomocystéinémie se produit. Par conséquent, le facteur de risque des maladies cardiovasculaires est beaucoup plus important chez les sujets qui présentent une hyperhomocystéinémie et le diabète de type 2 par rapport aux sujets diabétiques. Ils ont également noté que chez ces sujets diabétiques, lorsque l'homocystéinémie est supérieure à 15 μM , l'artériopathie périphérique et la néphropathie sont plus prédominantes (16 % ; 93,3 % respectivement).

Herrmann et al. (2005) ont montré chez des patients présentant le diabète de type 2 que les concentrations plasmatiques de l'homocystéine et des intermédiaires du cycle de méthionine (SAM et SAH) augmentent avec le degré de dysfonctionnement rénal : l'homocystéinémie est de 27 μM , les concentrations plasmatiques de SAM et SAH sont respectivement 162 nmol/l et 112,7 nmol/l chez les patients avec un échec rénal par rapport aux patients avec les dommages rénaux de moindre degré (10,2 μM , 80 nmol/l et 10,5 nmol/l respectivement).

Concernant le diabète de type 1, **Gursu et al. (2002)** ont noté que ce dernier est associé à une hypohomocystéinémie. En effet, des rats rendus diabétiques par injection de streptozotocine, présentent une homocystéinémie plus faible que les témoins. Cette réduction a été normalisée par l'administration de l'insuline d'une façon dose-dépendante, ce qui a permis à ces auteurs de suggérer que l'insuline réduit les activités des enzymes de la transsulfuration et de la reméthylation.

Une hyperinsulinémie aiguë abaisse la concentration plasmatique de l'homocystéine chez les sujets normaux, mais pas chez les patients présentant le diabète de type 2 (**Fonseca et al., 1998 ; 2003**).

2. Hyperhomocystéinémie – Hypertension artérielle

Chez les individus hypertendus, le risque vasculaire lié à l'hyperhomocystéinémie a été observé en plus forte fréquence. Plus récemment, l'attention a été concentrée sur les relations directes de l'homocystéine plasmatique à la tension artérielle et à l'hypertension (**Sundström et al., 2003**). Chez ces patients, **Bortolotto et al. (1999)** ont révélé que l'homocystéinémie est fortement corrélée avec la rigidité artérielle. Cette dernière a été aussi observée expérimentalement chez des rats hypertendus et présentant une Hhcy ; parallèlement d'autres observations ont été rapportées tels que le développement de la glomérulosclérose et l'augmentation de l'excrétion urinaire de protéines (**Li et al., 2002**).

Certains médicaments antihypertensifs semblent avoir un effet sur l'homocystéinémie, ainsi **Atar et al. (2005)** ont montré que le traitement au métoprolol succinate diminue significativement le taux de l'Hcy plasmatique chez les patients hypertendus, particulièrement les femmes.

3. Hyperhomocystéinémie – Troubles lipidiques

Chez les enfants présentant une hypercholestérolémie familiale, l'homocystéinémie est associée à une histoire parentale de la maladie cardiovasculaire (**Tonstad et al., 1997**). Dans une population de 482 patients hyperlipidémiques et athérosclérotiques, 3,7% présentent une hyperhomocystéinémie (**Glueck et al., 1995**).

En outre, il est possible de réduire des concentrations de l'Hcy dans ces populations par l'administration de vitamines, de l'acide folique chez les patients en hémodialyse (**Bayés et al., 2001**) et par la prise de la protéine de soja (**Tonstad et al., 2002 ; Jenkins et al., 2002**).

Les données *in vitro* suggèrent que l'Hcy puisse interagir avec un taux élevé de cholestérol en augmentant l'oxydation des LDL. Ces dernières sont fixées sur des cellules sanguines mononucléées à l'aide des récepteurs LOX-1 (lectin-like oxidized LDL receptor-1). Chez les patients hyperhomocystéinémiques, l'expression du gène LOX-1 est augmentée dans ces cellules, ainsi que la libération de TNF α qui est élevée par la stimulation des LDL oxydées. Un traitement par l'acide folique a mené à la normalisation des taux d'Hcy accompagnée de la réduction d'expression du gène LOX-1 et de la libération de TNF α stimulée par les LDL-oxydées (**Holven et al., 2003**).

Chez l'homme *in vivo*, **Voutilainen et al. (1999)** ont mis en évidence une corrélation positive entre l'hyperhomocystéinémie et la peroxydation des lipides, et ceci par l'évaluation de la concentration plasmatique en isoprostanes F₂.

IV. Mécanismes de la pathogénéicité de l'hyperhomocystéinémie

Les désordres du métabolisme aboutissant à un excès d'homocystéine sont associés à de nombreux risques pathogènes tels l'athérogenèse, la néoplasie, le vieillissement,... Plusieurs mécanismes expliquent le danger présenté par une hyperhomocystéinémie dans l'organisme.

1. Effets biochimiques de l'hyperhomocystéinémie

1.1. Production d'un stress oxydant

L'homocystéine, bien que disposant d'un groupement thiol réducteur, possède paradoxalement des propriétés prooxydantes (**Olszewski et McCully, 1993**). L'oxydation de l'homocystéine en homocystine libère du peroxyde d'hydrogène, H₂O₂ (**Welch et al., 1997 ; McDowell et Lang, 2000**). Le groupe thiol de l'homocystéine se lie aussi aux ions ferreux (**Guillard et al., 2003**) ou cuivreux pour former un mélange oxydant générant H₂O₂ (**Sengupta et al., 2001**). Ce complexe participe à l'inactivation des systèmes enzymatiques (**Guillard et al., 2003**). La forme cyclique de l'homocystéine, l'homocystéine thiolactone, est oxydée en sulfate par un processus mettant en jeu l'ascorbate, le thiorétinamide (produit de conjugaison entre l'homocystéine et l'acide rétinoïque) et le superoxyde, sous contrôle de la thyroxine et de l'hormone de croissance (**McCully, 1975**). L'homocystéine entraîne une baisse des ARN messagers et de l'activité de la glutathion peroxydase des cellules endothéliales, augmentant ainsi la teneur intracellulaire en H₂O₂ mais aussi en peroxydes organiques et en peroxy-nitrites qui sont habituellement détruits par la glutathion peroxydase (**Upchurch et al., 1997**). Le stress oxydant induit par l'homocystéine peut être mis en évidence sur différents modèles cellulaires. Ainsi la potentialisation par l'homocystéine de la toxicité de la protéine amyloïde, qui induit l'apoptose de cellules de neuroblastome humain différencié, est entièrement supprimée par les antioxydants tels que la vitamine E et la N-acétyl-cystéine (**Ho et al., 2001**).

1.2. Production et métabolisme du NO

L'exposition à l'homocystéine de cellules endothéliales en culture a un effet biphasique sur la production de monoxyde d'azote (NO). Dans un premier temps, on observe une libération de NO, de S-nitrosothiols et de S-nitroso-homocystéine, puis la poursuite de l'exposition entraîne un stress oxydant prédominant qui diminue la production de NO

(Stamler *et al.*, 1993) ; cette diminution est aussi observée chez des sujets sains chargés de méthionine (Boger, 2005). C'est pourquoi l'exposition de cellules endothéliales à l'homocystéine durant 15 min augmente la sécrétion d'endothelium-derived releasing factor (EDRF) et de S-nitroso-homocystéine, alors qu'une exposition supérieure à trois heures diminue cette sécrétion (Stamler *et al.*, 1993). La S-nitroso-homocystéine, qui se forme lors d'expositions de courte durée, a une action très différente de l'homocystéine étant antiagrégante et ne générant pas H₂O₂ (Stamler *et al.*, 1993). Sa formation diminue réciproquement la toxicité du NO et de l'homocystéine qui ne peuvent plus produire de radicaux oxygénés par oxydation. L'homocystéine stimule l'expression des molécules d'adhésion, VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) et E-selectine *in vivo*, menant à l'adhérence accrue des monocytes à l'endothélium aortique (Wang *et al.*, 2002), et aboutissant à l'augmentation de la sécrétion des cytokines par ces monocytes (Wang *et al.*, 2005). Ces derniers vont induire la synthèse de NO par les cellules endothéliales (Sawle *et al.*, 2001 ; Fu *et al.*, 2002) et les cellules musculaires lisses des vaisseaux (Welch et Loscalzo, 1998), en activant le gène de iNOS par un mécanisme médié par H₂O₂ (Welch et Loscalzo, 1998 ; Fu *et al.*, 2002 ; 2005), probablement par activation du facteur de transcription NF- κ B (Welch et Loscalzo, 1998 ; Au-Yeung *et al.*, 2004 ; Postea *et al.*, 2006). Dans les conditions normales, l'endothélium vasculaire joue un rôle important dans la prévention de l'athérosclérose en produisant du NO (Upchurch *et al.*, 1996). Sur le plan expérimental, l'homocystéine provoque une atteinte des cellules endothéliales (Chambers *et al.*, 2001), freine la libération de NO (Zhang *et al.*, 2000), et affecte la vasotonie dépendant du flux sanguin (Tawakol *et al.*, 1997). L'effet des doses élevées et chroniques d'homocystéine s'expliquerait aussi par la formation de peroxy-nitrites très toxiques par réaction entre le NO et les superoxydes générés par l'oxydation de l'homocystéine.

L'homocystéine thiolactone se combine avec la lipoprotéine à basse densité (LDL) pour former les agrégats qui sont capturés par les macrophages intimaux et incorporés aux cellules spumeuses au niveau des plaques athéromateuses naissantes (Naruszewicz *et al.*, 1994).

1.3. Action sur les protéines

Des données très récentes suggèrent que l'Hcy interfère avec la structure et la fonction de diverses protéines en formant le complexe Hcy-N-proteine (N-homocysteinyltion) (Glowacki et Jakubowski, 2004).

L'homocystéine peut réagir sur les cystéines des protéines pour former des disulfures mixtes (Sengupta *et al.*, 2001). En agissant ainsi, elle perturberait le métabolisme des fibrillines riches en groupes thiols et nécessaires à la bonne organisation des fibres de la matrice extracellulaire (Takagi et Umemoto, 2005). L'homocystéine se fixe aussi sur les LDL au niveau des lysines entraînant l'agrégation des LDL et facilitant leur internalisation par les récepteurs scavengers.

1.4. Effet sur les facteurs de transcription et la transduction des signaux

L'homocystéine induit l'activation de c-myc et c-fos, la synthèse d'ADN et la prolifération de cellules des crêtes neurales (Dalton *et al.*, 1997). Cet effet est relié à une stimulation de la translocation de la PKC vers la membrane et une production de diacylglycérol. Bien que l'homocystéine active les ras kinases (entraînant l'activation de SRF, le facteur de réponse au sérum) et l'expression des gènes de c-jun et c-fos (dont les promoteurs possèdent des éléments SRE de réponse à SRF), elle induit *in vivo* et non *in vitro* une inhibition de l'activité, mesurée par gel-shift et gène reporter, de leur produit commun

d'expression, le facteur de transcription AP1. Or, AP1 possède des cystéines qui sont efficaces à l'état réduit. L'effet de l'homocystéine n'est observé qu'avec la forme réduite et non avec la forme oxydée thiolactone suggérant une fixation sur les cystéines de AP1 (Suzuki *et al.*, 2000).

1.5. Diminution de métabolites utiles

L'hyperhomocystéinémie s'accompagne ou entraîne des changements dans la teneur de nombreux métabolites, par absence de méthylation ou de formation de dérivés soufrés. On observe ainsi une diminution de la S-adénylméthionine, la choline et acétylcholine, la phosphatidylcholine, la carnitine, la créatine, la méthylcobalamine, les coenzymes A, Q et Q10, la méthyl-nicotinamide, les polyamines, le chondroïtine sulfate et la taurine.

2. Actions physiopathologiques de l'homocystéine

2.1. Formation d'athérome et thrombose (figure 7)

L'homocystéine possède de nombreuses actions sur le système cardiovasculaire : dysfonctionnement endothélial et l'effet du NO (Loscalzo, 1996 ; Zhang *et al.*, 2000 ; Doshi *et al.*, 2005), prolifération des cellules musculaires lisses (van Guldener et Stehouwer, 2000 ; Murthy *et al.*, 2005), modification de la matrice extracellulaire (Chaussalet *et al.*, 2004), oxydation des lipoprotéines (Heinecke *et al.*, 1987 ; Heinecke, 1988 ; Bellamy *et al.*, 1997). L'homocystéine initie aussi la production de TNF- α et de nombreux signaux cellulaires impliqués dans le processus inflammatoire (Hofmann *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2005).

L'homocystéine se lie aux lipoprotéines et augmente ainsi leur capacité de liaison à la fibrine, potentialisant le risque athérogène (McCully *et al.*, 1990). Elle exerce son rôle pathogène par action sur plusieurs voies de la coagulation, notamment par une inhibition du système thrombomoduline–protéine C–protéine S et indirectement par une diminution de la capacité de liaison de l'antithrombine III à la surface des cellules endothéliales, cela par suppression de la synthèse de sulfates d'héparane (Abecassis *et al.*, 2004). L'homocystéine inhibe la relaxation vasculaire induite par le NO sur des aortes isolées de rat (Emsley *et al.*, 1999) et même *in vivo* (Fu *et al.*, 2005). Ainsi une charge en L-méthionine (100 mg/kg) chez des sujets normaux entraîne, dans l'heure suivante, une baisse de la dilatation artérielle médiée par le flux sanguin (Al-Shaer *et al.*, 2005). Cet effet est prévenu par une supplémentation en vitamine C pendant une semaine, sans que le taux d'homocystéine ne soit modifié, démontrant que l'effet de l'homocystéine est médié, au moins en partie, par le stress oxydant (Chambers *et al.*, 1999).

Murthy *et al.* (2005) ont noté au niveau des aortes de rats soumis à la méthionine, une élévation de l'homocystéinémie provoquant une prolifération des cellules musculaires lisses et une hyperplasie intimale qui sont respectivement augmentées d'un facteur 3 et 4. Ces augmentations ont été sensiblement réduites par un traitement à la rosiglitazone.

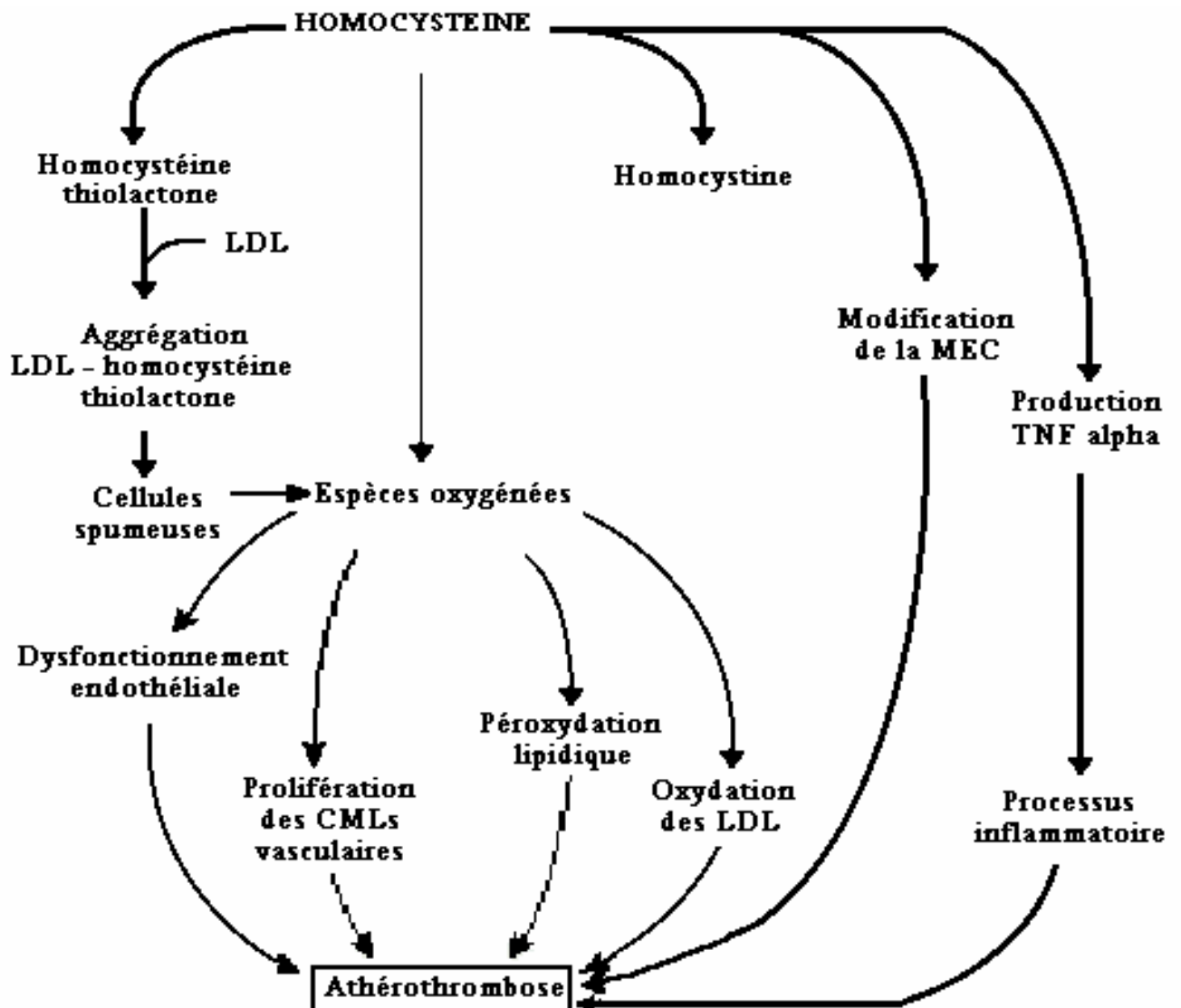


Figure 7 : Les effets vasculaires de l'homocystéine.

(d'après Welch et Loscalzo, 1998 ; Chausalet *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2005).

2.2. Carcinogénèse

Les cellules cancéreuses ont un défaut de métabolisation de l'homocystéine situé sur la voie de formation du thiorétinaco, un produit de la réaction entre cobalamine, homocystéine et acide rétinolique (McCully, 1994). La S- adénosyl-homocystéine inhibe le transfert des groupes méthyles de la S-adénosyl-méthionine aux cytosines de l'ADN, par les méthyl transférases (Ueland, 1982). Par ailleurs, la S-adénosyl-homocystéine inhibe aussi le transfert de méthyle aux œstrogènes réalisé par les catéchol-O-méthyl transférases (Chen *et al.*, 2005), diminuant la détoxification de ces hormones carcinogènes et augmentant ainsi le risque de cancer du sein (Mannisto *et al.*, 1992).

Une carence en thiorétinaco mitochondrial est associée à une formation excessive d'espèces radicalaires dans les cellules malignes et sénescents (Guiland *et al.*, 2003).

2.3. Prolifération cellulaire

En culture, l'exposition des cellules musculaires lisses vasculaires à l'homocystéine mène à une activation de la protéine kinase p38 qui va augmenter leur migration et prolifération (Akasaka *et al.*, 2005). Cet effet est dû en partie à une augmentation de l'expression de l'ARN messager des cyclines D1 et A (Tsai *et al.*, 1994 ;1996). *In vivo*, Murthy *et al.* (2005) ont également rapporté cette prolifération après traitement à la méthionine administrée à des rats.

2.4. Matrice extracellulaire

L'hyperhomocystéinémie perturbe, dans le syndrome de Marfan, l'organisation des tissus conjonctifs entraînant un déplacement du cristallin (luxation), une hyperlaxité ligamentaire et un développement anormal des cartilages. Elle agirait sur les fibrillines mais aussi sur les collagènes ; en se fixant sur les lysines de la tropoélastine, elle empêche la réticulation de cette molécule par formation de desmosines (Khan *et al.*, 2001).

L'Hcy induit directement l'expression des gènes codant pour le procollagène de type I et d'inhibiteur tissulaire de métalloprotéinase-1 (TIMP 1) dans les hépatocytes *in vitro* (Torres *et al.*, 1999), suggérant que l'Hcy puisse être un inducteur efficace de la fibrogenèse hépatique (Torres *et al.*, 1999 ; Garcia-Tevijano *et al.*, 2001).

Elle pourrait aussi perturber le métabolisme des protéoglycanes soufrés tels le dermatane et l'héparane sulfate (Khan *et al.*, 2001). Par ailleurs, un taux élevé d'héparane sulfate est révélé chez des patients présentant une homocystéinémie supérieure à 15 $\mu\text{mol/l}$ (Briani *et al.*, 2005).

Chausalet *et al.* (2004) ont noté que les niveaux pathologiques de l'homocystéine induisent une dégradation de la structure élastique de la paroi artérielle, et ceci en augmentant la sécrétion des métalloprotéinases élastolytiques de type 2 et 9 (MMP2 ; MMP9).

MATERIEL
ET
METHODES

I. MATERIEL BIOLOGIQUE

Pour notre expérimentation, nous avons utilisé comme modèle, une espèce de rongeur : le Rat des sables « *Psammomys obesus* ».

I. 1-Généralités sur *Psammomys obesus* (Po)

C'est un gerbillidé diurne adaptée à un environnement désertique, appartenant à la famille des *Muridés*, sous famille des *Gerbillidés*.



Les rats des sables creusent des systèmes souterrains avec 3 à 5 ouvertures, se composant de tunnels compliqués avec des chambres de stockage des aliments, des chambres pour le dépôt des excréments et enfin des chambres où des brindilles sèches forment un lit (**Harrison et Russell, 1972 ; Daly et Daly, 1973**).

Ces terriers sont généralement creusés sous des touffes de plantes halophiles dont ils se nourrissent. Ces plantes appartiennent à la famille des Chénopodiacées, les principales espèces végétales sont : *Traganum nudatum*, *Salsola foetida*, *Suaeda mollis*, *Salicornia fruticosa* et *Atriplex halimus* (**Daly et Daly, 1973**), elles sont très riches en eau et en sels minéraux (respectivement : 80,79 % ; 6,86 %) plus particulièrement en sel de sodium (**Schmidt-Nielsen, 1964**).

En général, le poids corporel moyen des *Psammomys* varie entre 80 et 200g avec une longueur de 130 à 160mm (âge moyen environ 4 mois) (**Petter, 1961**).

La saison de leur reproduction dépend de la disponibilité de la nourriture, elle se situe entre décembre et avril (**Petter, 1961;Murray, 2004**) ; la durée de la gestation est de 24 à 36 jours.

L'âge de maturité sexuelle pour les femelles est atteint à 3 – 3,5 mois tandis que pour les mâles, il est atteint à 4 mois (**Harrison et Russell, 1972**).

I. 2. -Conditions d'élevage en captivité (animalerie)

Les *Psammomys* capturés au niveau de la région de Abadla à 150 Km de Béni Abbes (30° 7 de l'attitude Nord et 2° 10 de longitude Ouest) au sud-ouest d'Alger, wilaya de Béchar sont répartis individuellement dans des cages en plastique équipées :

- ❖ d'une litière en sciure, renouvelée 3 à 4 fois par semaine,
- ❖ d'un couvercle métallique,
- ❖ d'une boîte métallique à surface lisse et arrondie déposée sur la litière et servant de terrier,
- ❖ et d'un morceau de bois pour aiguïser leur incisives .

La température de l'animalerie est maintenue constante au voisinage de 25°C, l'éclairage est réalisé par la lumière artificielle .

A leur arrivée, pendant la période d'adaptation (10 – 15 jours), les animaux continuent à recevoir *Suaeda mollis* (plante de leur biotope naturel) pendant quelques jours, puis cette nourriture est remplacée par des salicornes de la même famille que celle du désert poussant en bordure de mer (Anse de Kouali à Tipaza-Alger).

La valeur énergétique peut être estimée à moins de 450 Calories par Kg de plantes fraîches, la prise journalière de plante est de 50 g, l'animal reçoit donc 20 – 22 Cal / jour

I. 3-Protocole expérimental

Après une période d'adaptation (10 à 15 jours), les animaux de sexe féminin sont répartis en 2 lots :

- un lot témoin au nombre de 5, avec un poids corporel moyen de $93 \pm 9,8$ g.
- un lot traité de 7 rats des sables avec un poids corporel moyen 96 ± 24 g.

Dans le cadre de ce travail, un état d'hyperhomocysteinémie est induit expérimentalement par l'administration chronique d'un excès de méthionine durant 6 mois. La DL méthionine (Sigma) dissoute dans une solution stérile de NaCl 0,9 % (solution de méthionine est à 20 g/l) est injectée par voie intrapéritonéale (Fig. 8) à raison de 70 mg par Kg de poids corporel/jour. Parallèlement aux traités, les rats témoins reçoivent des injections similaires de NaCl (solution à 0,9 %).



Figure 8 : Injection intrapéritonéale au *Psammomys*

Nous notons quotidiennement la consommation de plantes halophiles chez *Psammomys* ainsi que leur évolution pondérale par une pesée hebdomadaire. En vue d'une étude de l'évolution métabolique, des prélèvements sanguins sont réalisés de façon mensuelle par des ponctions au niveau du sinus rétro-orbital de l'œil à l'aide d'une pipette pasteur préalablement héparinée ou citratée.

Le sang aussitôt prélevé sur tubes héparinés, secs et citratés est centrifugé (3000 trs/min pendant 10 minutes). Une partie du plasma fraîchement recueillie est utilisée directement pour les profils électrophorétiques des lipoprotéines, le reste est conservé à -80°C pour le dosage des paramètres biochimiques (glycémie, triglycéridémie, cholestérolémie, protéinémie, homocystéinémie acide urique et MMPs).

II. TECHNIQUES

Après six mois d'expérimentation, les animaux sont disséqués après anesthésie à l'uréthane 25 % à raison de 0,4 ml / 100 g de poids corporel. Le foie et l'aorte sont prélevés après dissection de l'animal :

- Le foie est immédiatement pesé totalement et partiellement afin de doser les lipides totaux,
- Un fragment d'aorte est fixé dans le Bouin aqueux pour l'étude morphologique, histochimique,
- Un fragment d'aorte est incubé pour la mise en évidence des MMPs.

Les autres organes prélevés sont fixés en vue de travaux ultérieurs.

II. 1-Technique histologique

Elle correspond à une des techniques les plus classiques qui permet d'obtenir des coupes histologiques minces (**Martoja et Martoja, 1967 ; Gabe, 1968**) portant l'objet à étudier et observable au microscope photonique après une coloration réalisée par des colorants spécifiques.

Des fragments d'aorte sont fixés dans le Bouin aqueux pendant 3 jours, puis lavés à l'eau courante pendant 48 heures. Afin de substituer l'eau contenue dans les cellules, ces fragments sont progressivement déshydratés dans des bains d'alcool à degré croissant (50° , 70° , 90° et 100°) à raison 30 minutes par bain.

L'éclaircissement dans du butanol (30 min / bain) et l'imprégnation permettent l'inclusion des fragments d'aorte dans de la paraffine d'un point de fusion de 58°C . Les fragments des autres organes peuvent être conservés dans le dernier bain de butanol (liquide d'attente).

Les blocs de paraffine obtenus sont débités en coupes de $5\ \mu\text{m}$ d'épaisseur à l'aide d'un microtome du type American Optical.

II. 1-1-Colorations topographiques

Ces colorations permettent d'établir le contraste naturel des coupes et de rendre plus évident les différents tissus, ainsi que la distinction des structures cellulaires et matricielles (Collagènes, Elastine) de la paroi artérielle.

Les colorations que nous avons utilisées pour la réalisation de notre travail sont :

- La coloration au trichrome de Masson (Variante Masson-Goldner) qui révèle le cytoplasme et les lames élastiques en rose, les fibres de collagènes en vert, et les noyaux en bruns.

- La coloration de Van Gieson : le cytoplasme et les lames élastiques apparaissent jaunes, les fibres de collagènes en rose, alors que les noyaux sont colorés en bruns.
- La coloration à l'Orceïne qui est spécifique aux lames élastiques ; elle permet la visualisation de la trame élastique (limitante et lames élastiques) de la paroi artérielle par une coloration rouge-violacée.

II. 1-2-Colorations histochimiques

Elles ont pour but de connaître la composition chimique des tissus et leurs constituants (Gabe, 1968).

-Réaction à l'acide périodique schiff

Elle permet la mise en évidence des chaînes glucidiques (polysaccharides, glycoprotéines et glycolipides) qui sont colorées en rose. Cette réaction comporte deux étapes :

- 1-Libération des groupements à fonction aldéhyde (transformation des groupements glycol en aldéhyde) par une oxydation à l'acide périodique,
- 2- Ces groupements réagissent avec la fuschine basique produisant une coloration rose.

-Coloration au bleu alcian

Sur coupes histologiques de fragments d'aorte fixés au Bouin aqueux, les protéoglycannes sont révélés par une coloration bleue. Cette coloration permet de montrer d'éventuelles variations de la composition de la matrice extracellulaire en protéoglycannes.

II. 2-Etude morphométrique

L'étude histologique est complétée par une étude morphométrique, à l'aide d'un micromètre de type Zeiss, qui permet la détermination :

- de l'épaisseur de la paroi artérielle,
- de l'épaisseur de l'intima, la média et l'adventice,
- de l'épaisseur des espaces interlamellaires,
- du nombre des lames élastiques,
- du nombre de noyaux des CMLs déterminé au niveau de la média sur une superficie de $5625 \mu\text{m}^2$,
- des caractéristiques nucléaires des CMLs (longueur de leur grand et petit axes).

Pour chacun des paramètres étudiés, nous avons effectué 50 mesures, réalisées sur différents champs de plusieurs coupes histologiques, correspondant aux différents animaux témoins et traités.

L'iconographie a été réalisée à l'aide d'un photomicroscope de type Olympus en utilisant une pellicule Agfa 100 asa.

II. 3-Technique de Zymographie

Une portion d'aorte est découpée en fragments de très petite taille qui sont incubés dans du DMEM (milieu minimum de Eagle modifié par Dubelco, Gibco) sans SVF (sérum de veau fœtal) à 37°C pendant 24 heures. Les fragments sont alors retirés du milieu d'incubation et pesés. Les milieux dans lesquels les MMPs ont diffusé (milieux conditionnés) sont congelés à -80°C en vue de leur utilisation. Après électrophorèse SDS PAGE en présence du substrat des enzymes, cette technique permet la caractérisation et la quantification des métalloprotéases diffusibles (MMP 2 et MMP 9).

La technique de zymographie est également appliquée pour la caractérisation des MMP 2 et 9 plasmatiques (prélèvements sur tubes citratés).

La dernière étape de cette manipulation (l'électrophorèse en présence du substrat de l'enzyme) n'a pu être réalisée (problème technique) et sera effectuée ultérieurement.

II. 4-Technique d'extraction des lipides totaux du foie

L'extraction totale des lipides est réalisée selon la méthode de **Folch *et al.* (1957)**. Les étapes suivies sont :

- ❖ Prélèvement de 300 mg de foie dans 25 ml de Folch ; mélange Chloroforme-méthanol (2 :1 ; v / v). Le chloroforme a la propriété de dissoudre totalement les lipides fixés aux protéines, lesquelles sont précipitées par le méthanol.
- ❖ Après un séjour de 24 heures dans le Folch, le foie est broyé à froid à l'aide d'un homogénéisateur de type Potter.
- ❖ Le broyat obtenu est filtré sur papier filtre dégraissé et l'extrait obtenu est récupéré dans des fioles ajustées à 25 ml par le Folch. Ces dernières sont bouchées hermétiquement et placées à 4°C.
- ❖ Une prise aliquote du filtrat (5 ml) est lavée avec de l'eau distillée (0,2 fois son volume). Après agitation et centrifugation à 2000 trs / min, la phase supérieure est éliminée, la phase inférieure est recueillie dans des tubes préalablement pesés. Ces derniers sont mis à évaporer dans une étuve ventilée.

L'extraction des lipides totaux hépatiques réalisée ne nous a pas permis d'aboutir à des résultats exploitables.

II. 5-Technique d'électrophorèse des lipoprotéines

Le Kit REP LIPIDE-Lp (a), est utilisé pour la détection et la quantification des lipoprotéines par électrophorèse sur gel d'agarose selon la méthode de **Kalwakami (1989)**.

Principe

Les lipoprotéines sont séparées en fonction de leur point isoélectrique et leur poids moléculaire sur gel d'agarose dans un tampon Barbitol, par électrophorèse.

Sur un gel d'agarose normal, les lipoprotéines qui migrent de la cathode vers l'anode :

- Béta-Lipoprotéines,
- Pré-Bétalipoprotéines,
- Alpha-Lipoprotéines,

sont repérables après révélation par le Fat Red 7B.

Procédure

La réalisation de cette technique nécessite :

- la préparation des plaques :
 - La plaque de gel est sortie de son emballage, l'excès de tampon est essuyé sur l'arrière du gel,
 - Le film protecteur du gel est ôté et déposé sur l'embase spéciale prévue à cet effet,
 - La surface entière du gel est séchée à l'aide d'un buvard C.

- Le dépôt des échantillons
 - Les sérums doivent être fraîchement prélevés (les plasmas congelés ou prélevés sur héparine ne sont pas utilisés),
 - 40 µl de sérum sont distribués dans chaque puits de la barrette,
 - 3 ml de polyclean sont mis dans la rigole extérieure (lavage du porte échantillon) et 3 ml d'eau distillée dans la rigole intérieure (rinçage du porte échantillon), les deux rigoles ne doivent pas être mélangées,
 - Un buvard des puits (séchage du porte échantillon).

- La migration
 - Le tampon REP-PREP est étalé au centre de la chambre de migration en forme de « L » en partant de la gauche,
 - La plaque de gel est fixée dans la chambre de migration après orientation et étalement du tampon de migration. Pour cela, la plaque de gel est déplacée délicatement de gauche à droite, en évitant la formation de bulle d'air,

- La coloration et la décoloration
 - Immédiatement la migration terminée, la phase du gel est sortie et colorée pendant 2 minutes dans le colorant Fat Red 7B.
 - La décoloration est réalisée dans deux bains successifs du décolorant de Fat Red 7B 52, suivie d'un rinçage final dans l'eau distillée.
 - Le gel est séché à 60°C.

- La lecture des plaques : elle concerne :
 - L'évaluation qualitative de la plaque par la visualisation des différentes fractions,
 - L'évaluation quantitative de chaque fraction à l'aide d'un densitomètre à 525 nm.

Les résultats obtenus sont illustrés par les figures 9 et 10

- Les lipoprotéines migrent de la cathode (point d'application) vers l'anode.
- Les HDL constituent les fractions les plus légères, aussi sont elles les plus proches de l'anode, elles représentent la bande α -lipoprotéines.
- Les chylomicrons restent au point de dépôt .
- La bande des β -lipoprotéines (LDL) est souvent la fraction la plus importante, elle est proche du point d'origine.
- Les pré- β -lipoprotéines (VLDL) migrent entre les α -lipoprotéines (HDL) et les β -lipoprotéines.
- Les IDL n'apparaissent pas car elles se transforment rapidement en LDL.

Les dosages biochimiques plasmatiques sont effectués à l'aide de Kits Biosystem (glucose, protéines, triglycérides et cholestérol), Kit SPINREACT (acide urique) et la technique de FPIA (homocystéine).

La concentration plasmatique de chacun des 4 premiers paramètres est déterminée par techniques enzymatiques. Ces paramètres révèlent un composant colorimétrique à propriété d'absorbance à une longueur d'onde spécifique (selon le prospectus). Ainsi la concentration de la substance à doser est déduite par rapport à celle de l'étalon, à partir du rapport des densités optiques respectives à l'échantillon et à l'étalon.

	Glycémie	Triglycéridémie	Cholestérolémie	Protéïnémie	Acide urique
Kits	Biosystem	Biosystem	Biosystem	Biosystem	SPINREACT
Méthode de dosage	Trinder (1969)	Fossati et Prencipe (1982)	Allain <i>et al.</i> (1974)	Réaction de Biuret	Schultz (1984)
Longueur d'onde	500 nm	500 nm	500 nm	545 nm	520 nm

Le taux d'homocystéine plasmatique est révélé par la technique de FPIA (Fluorescence Polarization Immunoassay) qui comporte deux étapes :

- La réduction : l'homocystine, le disulfure mixte et l'homocystéine liée aux protéines sont réduits sous forme réduite libre d'homocystéine en utilisant le dithiothreitol (DTT).
- La conversion enzymatique : l'homocystéine libre totale est convertie en S-adenosyl-L-homocystéine (SAH) par la présence de l'adénosine et l'enzyme SAH hydrolase bovine.

La SAH est le traceur marqué de fluorescéine concurrent pour les sites sur la molécule monoclonale d'anticorps. L'intensité de la lumière fluorescente polarisée est mesurée par la FPIA optique.

II. 7- Analyse statistique

Les résultats biochimiques et morphométriques sont exprimés par la moyenne affectée de son écart type. Nous avons réalisé la comparaison entre ces dernières par le test de Student « t », relatif aux petits échantillons.

Les degrés de significativité précisés dans les résultats sont les suivants : * P< 0,05 ; ** P<0,01 ; *** P<0,001 ; **** P<0,0001.

RESULTATS

Afin d'analyser les effets d'une charge en méthionine chez *Psammomys obesus*, nous avons effectué un suivi hebdomadaire du poids corporel pendant toute la durée d'expérimentation et évalué certains paramètres biochimiques plasmatiques dont la glycémie, la triglycéridémie, la cholestérolémie, la protéinémie et l'acide urique.

Les résultats obtenus après injection intrapéritonéale de méthionine (70 mg/Kg poids corporel/jour) à des rats des sables pendant 6 mois peuvent être présentés en 4 parties :

1. Evolution du poids corporel.
2. Evolution de certains paramètres biochimiques plasmatiques (glucose, cholestérol, triglycérides, protéines, homocystéine, acide urique).
3. Analyse des lipidogrammes.
4. Etude histologique, histochimique et morphométrique de la paroi artérielle.

I. Evolution du poids corporel

Les pesées hebdomadaires ont permis le suivi de l'évolution pondérale des animaux traités et témoins. Les résultats concernant cette évolution sont consignés dans le Tableau I et la figure 11.

Tableau I : Evolution pondérale (g) des rats des sables témoins et traités à la méthionine.

Durée (Mois)	Poids des animaux témoins (g) (n = 5)	Poids des animaux traités (g) (n = 7)
0	93 ± 9,8	96 ± 24
1	102 ± 7,4	100 ± 2,4
2	106 ± 3	93 ± 3,9 *
3	118 ± 2	86 ± 6,1 *
4	124 ± 4,6	98 ± 3,4 ***
5	122 ± 4	94 ± 5,6 ***
6	106 ± 4	89 ± 5,7 *

Les valeurs notées correspondent aux moyennes affectées de l'écart type.

* Moyenne du poids des *Psammomys* traités vs des témoins. * P< 0.05 ; *** P< 0.001.

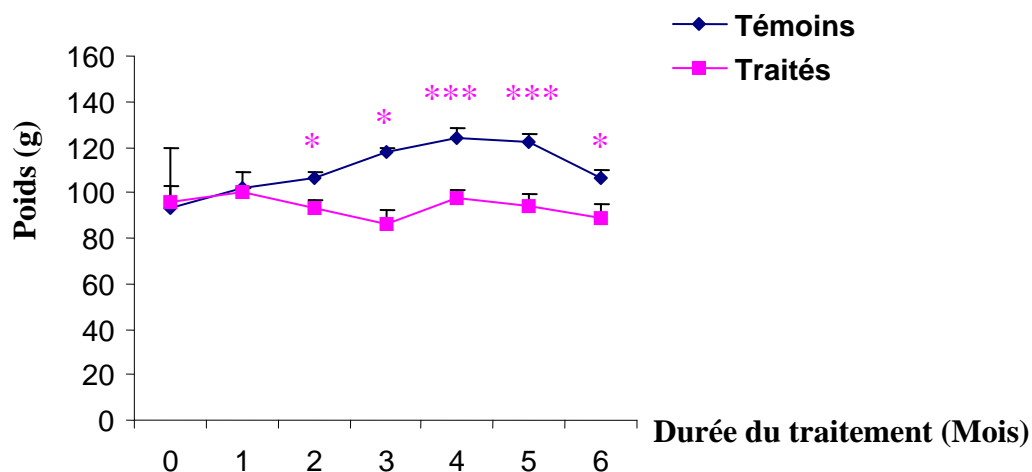


Figure 11 : Evolution du poids corporel des rats témoins et traités.

Les résultats obtenus montrent que l'évolution pondérale des animaux traités est similaire à celle des animaux témoins pendant le 1^{er} mois. Au delà du 1^{er} mois, nous avons noté une augmentation d'environ 14% du poids corporel des animaux témoins et une diminution d'environ 7% chez les animaux traités.

II. Evolution des paramètres biochimiques plasmatiques

1. La glycémie

La glycémie exprimée en mg/dl a été déterminée dans les 2 lots d'animaux (Tab. II ; Fig. 12).

Tableau II : Evolution de la glycémie (mg/dl) chez *Psammomys obesus* témoins et traités à la méthionine.

Durée (Mois)	Témoins (mg/dl) (n = 5)	Traités (mg/dl) (n = 7)
0	99,12 ± 63,18	110,2 ± 83,16
1	57,12 ± 22,2	67,62 ± 34,58
2	46,67 ± 2,31	94,05 ± 29,68 *
3	60,33 ± 2,09	119 ± 110,5
4	59 ± 6,24	54,52 ± 3,96
5	44,33 ± 7,76	105,7 ± 11,84 **
6	49,7 ± 11,27	123,2 ± 5,16 **

Les valeurs représentent les moyennes affectées de l'écart type.

* Glycémie des traités vs des témoins. * P< 0.05 ; ** P< 0.01.

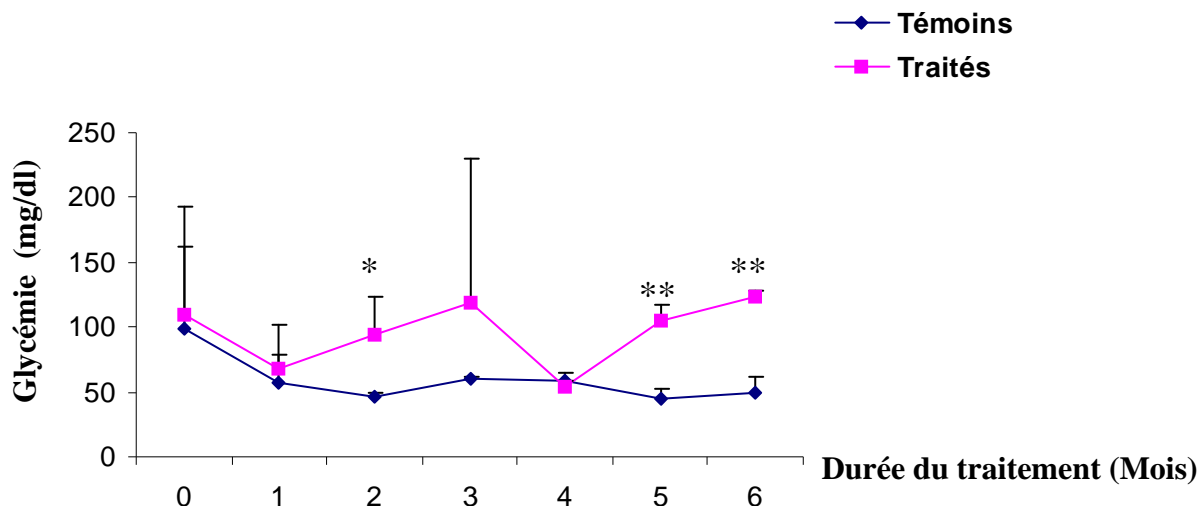


Figure 12 : Evolution de la glycémie (mg/dl) chez *Psammomys obesus* témoins et traités.

Des variations plus au moins importantes de la glycémie sont observées chez les témoins (diminution d'environ 50% en fin d'expérimentation) et chez les rats des sables soumis à un excès de méthionine (augmentation de 12% environ après 6 mois d'expérimentation).

1. 2. La cholestérolémie

L'évolution de la cholestérolémie durant l'expérimentation est rapportée dans le Tableau III et la figure 13.

Tableau III : Evolution de la cholestérolémie (mg/dl) chez *Psammomys obesus* témoins et traités à la méthionine.

Durée (Mois)	Témoins (mg/dl) (n = 5)	Traités (mg/dl) (n = 7)
0	59,09 ± 7,92	42,52 ± 11
1	59,07 ± 20,3	60,1 ± 25,91
2	77,67 ± 20,01	61,17 ± 31,9
3	61 ± 13,45	52,12 ± 22,57
4	41,17 ± 35,81	90,26 ± 12,88
5	41 ± 13,75	101,6 ± 63,66
6	57,67 ± 20,84	38,37 ± 26,35

Les valeurs représentent les moyennes affectées de l'écart type.

* Cholestérolémie des traités vs des témoins.

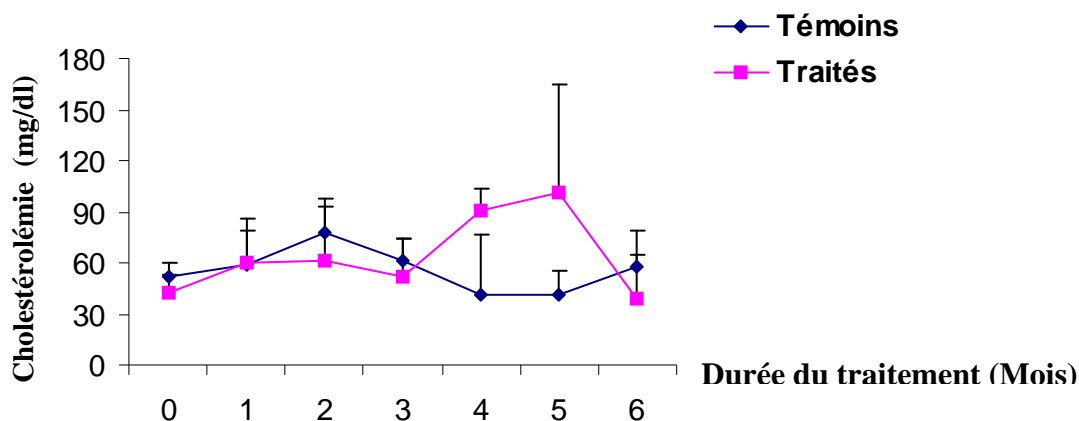


Figure 13 : Evolution de la cholestérolémie (mg/dl) chez *Psammomys obesus* témoins et traités.

Nous avons noté des fluctuations de la cholestérolémie dans les 2 groupes d’animaux avec cependant des valeurs plus élevées pendant les 3 derniers mois, chez les animaux soumis à la méthionine injectée.

2. 3. La triglycéridémie

La triglycéridémie a été déterminée (Tab. IV ; Fig. 14) chez les animaux témoins et chez les animaux soumis à des injections intrapéritonéales de méthionine (70 mg/Kg poids corporel/jour).

Tableau IV : Evolution de la triglycéridémie (mg/dl) chez *Psammomys obesus* témoins et traités à la méthionine.

Durée (Mois)	Témoins (mg/dl) (n = 5)	Traités (mg/dl) (n = 7)
0	45,54 ± 24,79	80,93 ± 53,96
1	57,1 ± 42,62	56,49 ± 51,6
2	60,33 ± 15,95	109,8 ± 64,74
3	41 ± 14,14	132,1 ± 101,1
4	42 ± 11	107,1 ± 113,2
5	24 ± 2,64	218,6 ± 108,9 *
6	75 ± 23,58	217,2 ± 106,3 *

Les valeurs représentent les moyennes affectées de l’écart type.

* Triglycéridémie des traités vs des témoins. * P< 0.05.

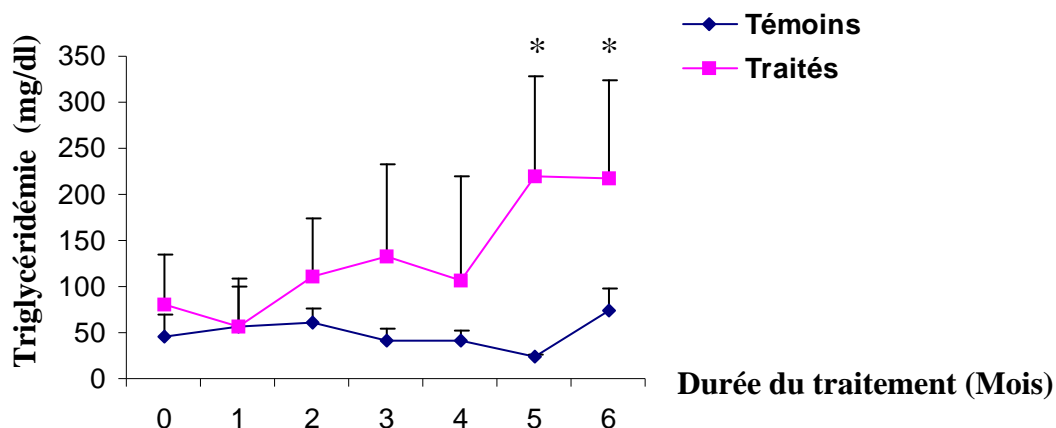


Figure 14 : Evolution de la triglycéridémie (mg/dl) chez *Psammomys obesus* témoins et traités.

La triglycéridémie varie pendant toute la durée de l'expérimentation. Ces variations sont, cependant, plus importantes chez les rats des sables traités à la méthionine. En effet, chez ces derniers, la triglycéridémie augmente d'un facteur 2,7 ($P < 0,05$) au 5^{ème} et 6^{ème} mois de l'expérimentation. Il faut cependant souligner, que des variations des valeurs individuelles sont importantes à partir du 3^{ème} mois de l'expérimentation.

3. 4. La protéinémie

Le taux de protéines plasmatiques ou protéinémie, déterminé par la méthode de Biuret est rapporté dans le Tableau V et la figure 15.

Tableau V : Evolution de la protéinémie (mg/dl) chez *Psammomys obesus* témoins et traités à la méthionine.

Durée (Mois)	Témoins (mg/dl) (n = 5)	Traités (mg/dl) (n = 7)
0	59,61 ± 24,36	65,26 ± 34,22
1	51,88 ± 16,24	72,09 ± 14,45 *
2	39 ± 7,55	91,99 ± 9,16 ***
3	45,5 ± 0,70	76,29 ± 22,78
4	53,33 ± 2,08	67,25 ± 12,21
5	49 ± 3,60	73,41
6	47,33 ± 2,08	79,54 ± 9,25 *

Les valeurs représentent les moyennes affectées de l'écart type.

* Protéinémie des traités vs des témoins. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

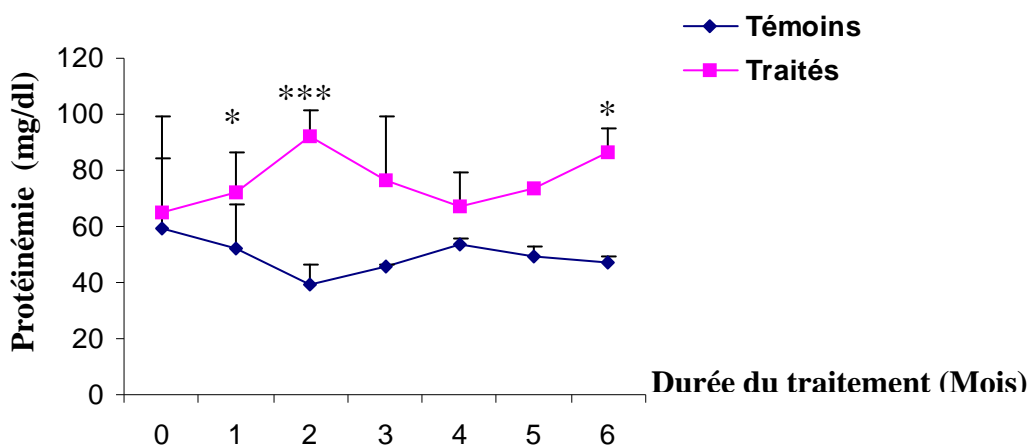


Figure 15 : Evolution de la protéinémie (mg/dl) chez *Psammomys obesus* témoins et traités.

Chez les animaux témoins, la protéinémie diminue de façon non significative pendant les 6 mois de l'expérimentation. Chez les animaux soumis à une injection intrapéritonéale de méthionine (70 mg/Kg poids corporel/jour), le taux de protéines plasmatiques augmente dès le 1^{er} mois ($P < 0,05$). Au 2^{ème} mois, la protéinémie augmente d'environ 41% ($P < 0,001$), et d'environ 22% en fin d'expérimentation par rapport à la protéinémie à T0.

4. 5. L'homocystéinémie

Nous avons déterminé le taux d'homocystéine plasmatique par la méthode de la FPIA (Fluorescence Polarization Immunoassay). Les résultats obtenus sont rapportés dans le Tableau VI et sont illustrés par la figure 16.

Tableau VI : Evolution de l'homocystéinémie ($\mu\text{mol/l}$) chez *Psammomys obesus* témoins et traités à la méthionine.

Durée (Mois)	Témoins ($\mu\text{mol/l}$) (n = 5)	Traités ($\mu\text{mol/l}$) (n = 7)
0	1,73 \pm 1,21	2,63 \pm 2,01
1	2,59 \pm 2,10	2,07 \pm 0,94
2	1,12 \pm 0,11	8,89 \pm 9,97
3	0,87 \pm 0,17	3,78 \pm 2,37
4	1,18 \pm 0,43	1,74 \pm 0,39
5	3,01 \pm 0,60	13,19 \pm 16,71
6	1,95 \pm 0,15	20,05 \pm 7,77

Les valeurs représentent les moyennes affectées de l'écart type.

* Homocystéinémie des traités vs des témoins.

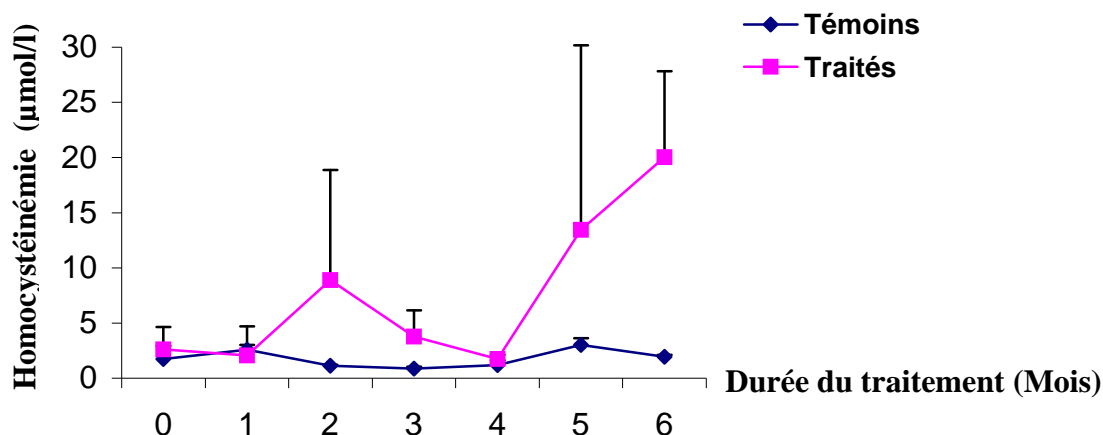


Figure 16 : Evolution de l’homocystéinémie (µmol/l) chez *Psammomys obesus* témoins et traités.

L’homocystéinémie des animaux témoins varie avec une valeur maximale d’environ 3 µmol/l (valeur moyenne 2,07 µmol/l). Chez les rats des sables soumis à un excès de méthionine, elle augmente d’un facteur 3 au 2^{ème} mois, d’un facteur 5 au 5^{ème} mois et d’un facteur 7,6 en fin d’expérimentation. Au 6^{ème} mois, l’hyperhomocystéinémie atteint une valeur de 20,05 ± 7,77 µmol/l (vs de 2,63 ± 2,01 µmol/l au temps T0).

5. 6. L’acide urique plasmatique

L’acide urique plasmatique a été déterminée (Tab. VII ; Fig. 17) chez les animaux témoins et chez les animaux soumis à une injection intrapéritonéale de méthionine (70 mg/Kg poids corporel/jour).

Tableau VII : Evolution de l’acide urique (mg/dl) chez *Psammomys obesus* témoins et traités à la méthionine.

Durée (Mois)	Témoins (mg/dl) (n = 5)	Traités (mg/dl) (n = 7)
0	5,75 ± 2,29	6,95 ± 3,60
1	6,6 ± 2,92	8,36 ± 1,22
2	6,38 ± 1,33	6,22 ± 4,49
3	4,36 ± 2,86	6,92 ± 4,25
4	4,89 ± 2,03	6,92 ± 0,75
5	5,67 ± 1,62	18,21 ± 1,36 **
6	5,65 ± 2,57	12,25 ± 0,14 *

Les valeurs représentent les moyennes affectées de l’écart type.

* Urémie des traités vs des témoins.

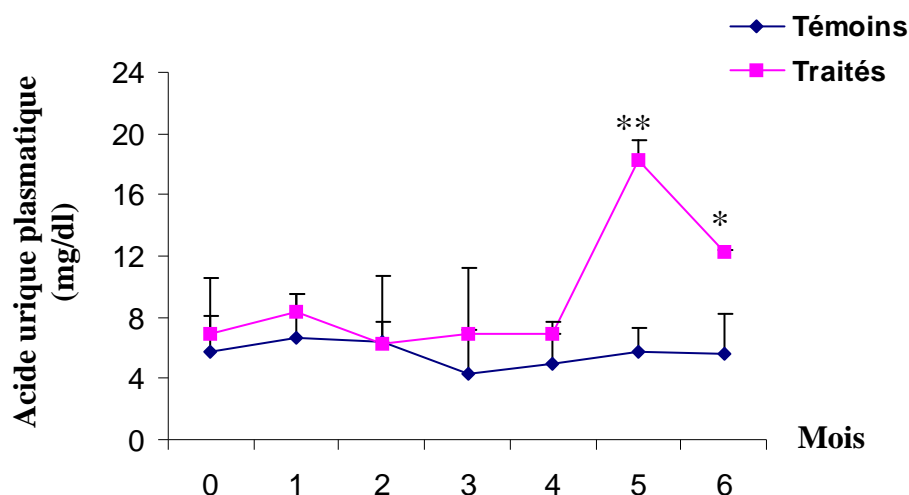


Figure 17 : Evolution de l'acide urique (mg/dl) chez *Psammomys obesus* témoins et traités.

Nous avons noté des fluctuations du taux d'acide urique plasmatique dans les 2 groupes d'animaux avec cependant des valeurs plus élevées pendant les 2 derniers mois (augmentation d'environ 162 % à T5 vs T0), chez les animaux soumis à la méthionine injectée.

III. Les lipoprotéines plasmatiques

Nous avons abordé l'étude des lipoprotéines plasmatiques grâce à l'électrophorèse horizontale sur gel d'agarose. La figure 18 montre les profils électrophorétiques obtenus chez les animaux témoins et traités à la méthionine.

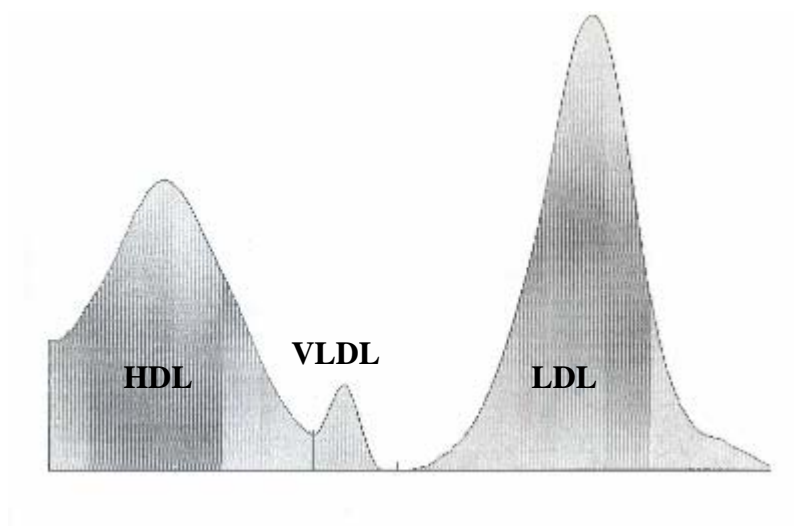
L'analyse des lipidogrammes concernant les animaux témoins et les rats des sables soumis à la méthionine pendant 3 mois est rapportée dans le Tableau VIII et la figure 18.

Tableau VIII : Lipoprotéines plasmatiques (%) chez *Psammomys* traités à la méthionine pendant 3 mois.

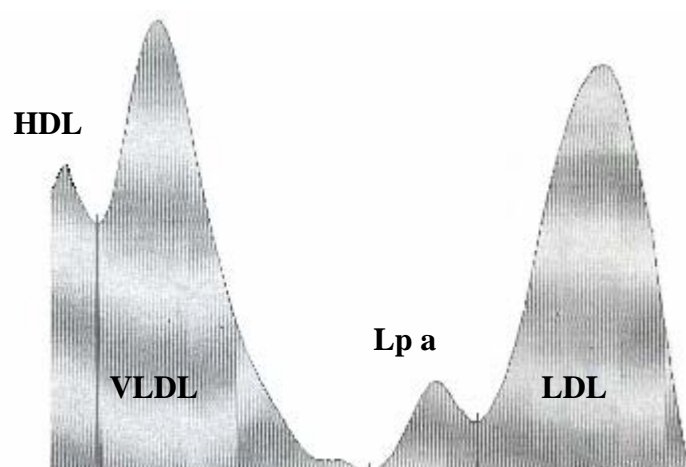
Trois mois après le début de l'expérimentation (T3)			
	HDL	VLDL - LDL	Lp a
Témoins	59,2 ± 7,2	50,27 ± 7,2	-
Traités 3 mois	17,54 ± 19,45**	67,92 ± 31,33	14,58 ± 15,33

Les valeurs représentent les moyennes affectées de l'écart type.

* Lipoprotéines plasmatiques des traités vs des témoins. ** P< 0.01.



Psammomys témoin



Psammomys soumis à la méthionine pendant trois mois de traitement

Figure 18 : Profils électrophorétiques des lipoprotéines plasmatiques chez *Psammomys obesus* témoin et traité à la méthionine pendant trois mois.

Les résultats obtenus mettent en évidence une diminution significative de 70,4% des HDL ($P < 0,01$) et une augmentation de 35,1% du taux des VLDL – LDL. Chez les animaux soumis à l'injection de méthionine, nous avons noté l'apparition dès le 3^{ème} mois d'expérimentation, de la lipoprotéine a.

Il est important de souligner, pour l'analyse de l'évolution de certains paramètres biochimiques plasmatiques (glucose, cholestérol, triglycérides), l'existence de variations individuelles et le faible échantillonnage à partir du 3^{ème} mois.

En conclusion, l'administration de la méthionine à la dose de 70 mg/Kg poids corporel/jour pendant 6 mois a provoqué chez le rat des sables, *Psammomys obesus* :

- Une diminution (7%) du poids corporel,
- Une variation de la glycémie et de la cholestérolémie au cours de l'expérimentation,
- Une augmentation de la triglycéridémie à partir du 5^{ème} mois,
- Une augmentation de la protéinémie,
- Une hyperhomocystéinémie,
- Une variation de l'acide urique plasmatique avec une augmentation marquée au 5^{ème} mois de l'expérimentation,
- Une importante diminution (70% environ) des HDL,
- Une augmentation du taux des VLDL – LDL,
- L'apparition de la lipoprotéine (a).

IV. Etude histo-morphométrique de l'aorte

1. Aorte de *Psammomys obesus* normal

Les coupes histologiques transversales d'aorte réalisées chez *Psammomys* témoins, ont permis de préciser la structure de cette paroi artérielle, et de distinguer de l'intérieur vers l'extérieur ses trois couches différentes, séparées par des lames plus au moins bien individualisées (Pl. I : Fig. 1 ; Pl. VIII : Fig. 1 ; Pl. IX : Fig. 1).

- une couche interne mince ($2,13 \pm 0,58 \mu\text{m}$), délimitant la lumière vasculaire : **l'intima**.
- une couche moyenne beaucoup plus épaisse ($87,75 \pm 8,43 \mu\text{m}$), **la média**.
- une couche externe ($30,25 \pm 16,14 \mu\text{m}$), **l'adventice**.

La limitante élastique interne séparant l'intima de la média est beaucoup plus nette et plus visible que la limitante élastique externe qui sépare la média de l'adventice.

L'intima : est formée de deux composants :

- l'endothélium dont les noyaux imprégnés d'hématoxyline et faisant saillie au niveau de la lumière vasculaire, semblent reposer directement sur la limitante élastique interne ;
- un espace sous endothélial très réduit, virtuel. Ses composants cellulaires et conjonctifs ne sont pas observés après la coloration au trichrome de Masson.

La limitante élastique interne, limitant l'intima, continue et très ondulée est nettement observée après coloration à l'orcéine (Pl. VII : Fig. 1) ou à l'APS (Pl. IX : Fig. 1 ; Pl. X : Fig. 1).

La média : est organisée en espaces interlamellaires délimités par des lames élastiques concentriques très ondulées. Ces espaces contiennent des cellules musculaires lisses dont les noyaux de forme ovale sont denses en chromatine. La coloration au trichrome de Masson et au Van Gieson font apparaître le cytoplasme en rouge violacé (Pl. I : Fig. 1) et en jaune (Pl. VIII : Fig. 1) respectivement.

Dans l'épaisseur de la média, on dénombre en moyenne 7 lames élastiques mises en évidence par la coloration spécifique à l'orcéine (Pl. VII : Fig. 1) et par la coloration histo-chimique à l'APS (Pl. IX : Fig. 1 ; Pl. X : Fig. 1). La coloration au vert lumière permet d'observer du collagène non seulement au niveau des espaces interlamellaires (Pl. I : Fig. 1) mais également sur le pourtour des lames élastiques (Pl. I : Fig. 1).

L'adventice : portion la plus externe de la paroi artérielle de nature conjonctive est constituée de faisceaux de fibres de collagène (Pl. I : Fig. 1) enserrant des fibroblastes.

2. Effet de la méthionine sur la structure histo-morphométrique de la paroi artérielle :

Administrée pendant 6 mois à la dose de 70 mg/Kg poids corporel/jour, la méthionine provoque des altérations touchant les trois couches de la paroi artérielle.

2.1. Etude histologique :

Sur l'ensemble des observations réalisées, nous avons noté la présence, sur la face luminale de l'endothélium, d'agré-gations sanguines ou microthrombus (Pl. I : Fig. 2, 3, 4).

L'intima présente des altérations focalisées touchant l'endothélium et le sous endothélium. En effet nous avons observé, en certains points, des noyaux de cellules endothéliales avec un aspect condensé (Pl. I : Fig. 3, 4, 5). Certains noyaux semblent avoir subi une légère hypertrophie. Par ailleurs, le sous-endothélium, non observé au niveau des aortes d'animaux témoins, apparaît nettement sur certaines préparations avec un aspect finement granuleux ou amorphe (Pl. VIII : Fig. 3, 4) ou épaissi par un dépôt de matériel conjonctif (Pl. IV : Fig. 1, 2).

L'observation de la limitante élastique interne permet de noter la présence de ruptures à certains endroits (Pl. II : Fig. 1, 2, 3 ; Pl. VII : Fig. 3) et de zones de dédoublement (Pl. II :

Fig. 4, 5). Au niveau de ces dernières, nous observons du matériel de nature conjonctive et des cellules.

La média est le siège de nombreuses altérations de tous ses constituants. Les colorations au trichrome de Masson, PAS et l'orcéine que nous avons réalisé, ont permis de mettre en évidence des amincissements (Pl. II : Fig. 6, 7 ; Pl. X : Fig. 7) et des ruptures des lames élastiques (Pl. II : Fig. 8 ; Pl. IV : Fig. 3, 4 ; Pl. VII : Fig. 4, 5). Ces dernières paraissent également beaucoup moins ondulées que celles observées dans une aorte normale (Pl. III : Fig. 1). Les colorations au trichrome de Masson et PAS également une accumulation de collagènes non seulement au niveau des espaces interlamellaires mais aussi à la périphérie des lames élastiques (Pl. III ; Fig. 3, 4 ; Pl. IV : Fig. 3, 4 ; Pl. X : Fig. 3, 5), prélude probable à l'installation d'une fibrose. Celle-ci devient évidente sur certaines de nos préparations (Pl. V : Fig. 3).

L'observation des CMLs de la média nous a permis de noter leur prolifération (Pl. III : Fig. 5) et surtout leur changement d'orientation (Pl. IV : Fig. 1, 2, 3, 4, 5 et 6). En effet, parallèles aux lames élastiques dans le cas normal, elles deviennent perpendiculaires aux lames élastiques dans les aortes de rats des sables hyperhomocystéinémiques. Cette orientation des CMLs est l'une des caractéristiques de l'athérosclérose. Certains espaces interlamellaires semblent "amorphes" (Pl. III : Fig. 1, 2), cet aspect laisse supposer une modification non seulement de la MEC mais également des interactions cellules-matrice extracellulaire.

Sur quelques préparations, nous avons observé au niveau de la média, une petite zone qui apparaît vide (Pl. III : Fig. 3). A un plus fort grossissement, cet espace pourrait correspondre à un dépôt calcique, car il semble comblé par des structures hyalines de forme polygonale ressemblant fortement à des cristaux (Pl. III ; Fig. 4).

Un aspect particulier a été observé chez un rat des sables présentant une hyperhomocystéinémie après 6 mois d'expérimentation. Au niveau de la média, une zone (Pl. V : Fig. 1) caractérisée par une accumulation de collagènes ou fibrose (Pl. V : Fig. 2) confère aux espaces interlamellaires un aspect très dense. De plus, nous avons observé, en son centre (Pl. V : Fig. 2, 3 ; Pl. IX : Fig. 4, 5) une importante agrégation sanguine (probablement un thrombus). Cette zone semble proliférer vers l'adventice qui a subi une déformation d'aspect protubérant vers l'extérieur (Pl. V : Fig. 1, 2, 3). L'intima limitant intérieurement cette zone semble être détruite. De plus, nous avons noté une infiltration cellulaire (Pl. V : Fig. 4).

Un second aspect particulier a été observé chez un rat des sables soumis à une injection intrapéritonéale de méthionine pendant 6 mois. La paroi aortique présente au même endroit, une altération de ses 3 couches marquée par une destruction de l'intima, une fibrose au niveau de la média et un épaississement de l'adventice sous forme de protubérance (Pl. VI : Fig. 1, 2). A ce niveau, nous avons noté la présence de nombreux fibroblastes, de nombreux faisceaux collagéniques et de macrophages (Pl. VI : Fig. 4) (fig). Une importante rupture de la paroi aortique (de longueur équivalente à la moitié de son épaisseur) a été observée chez cet animal (Pl. VI : Fig. 5, 6).

La coloration au bleu alcian permettant la mise en évidence des protéoglycannes n'a pas permis de montrer d'éventuelles variations de la composition de la matrice extracellulaire.

PLANCHE I : Structure de l'aorte chez *Psammomys* témoins et traités à la méthionine pendant 6 mois.
Coloration : trichrome de Masson.

Figure 1

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* témoin. Grossissement (x 100).

La coloration au trichrome de Masson, chez *Psammomys* témoin, permet de mettre en évidence les trois couches de l'aorte : intima, média et adventice. Nous observons quelques noyaux d'endothélium (flèche noire), des lames élastiques ondulées (flèches jaunes) au niveau de la média délimitant des espaces interlamellaires contenant les noyaux fusiformes des CML (tête de flèche noire) et les collagènes, cette couche est délimitée par les limitantes élastiques interne et externe. L'adventice, la couche la plus externe est constituée de faisceaux de collagènes.

Figure 2

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 40).

Dans cette figure, nous révélons des agrégations sanguines nommées microthombus (flèches noires), qui occupent presque la totalité de la lumière.

Figure 3

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 100).

A un plus fort grossissement que la figure précédente, nous observons une agrégation sanguine (flèche noire), une condensation des noyaux des cellules endothéliales (flèches rouges).

Figure 4

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 100).

Cette illustration montre une agrégation sanguine (flèche noire) au niveau de l'endothélium, un épaissement de l'endothélium et du sous endothélium (flèche rouge), une rupture d'une lame élastique (flèche rose). Nous observons également le dépôt important de collagènes autour des lames élastiques (étoiles jaunes).

Figure 5

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 40), (x 100).

Cette partie de la paroi d'aorte montre également l'épaississement de l'endothélium et du sous endothélium (G x 40) ; (encadré, G x 100).

A : Adventice ; I : Intima ; e.i. : espace interlamellaire ; L : Lumière ; l.e.e. : limitante élastique externe ; l.e.i. : limitante élastique interne ; M : Média.

PLANCHE II : Structure de l'aorte chez *Psammomys* traités à la méthionine pendant 6 mois.
Coloration : trichrome de Masson.

Figure 1, 2, 3

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 100).

Ces illustrations nous montrent les différentes ruptures de la limitante élastique interne (flèche bleue).

Figure 4, 5

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 40), (x 100).

Sur cette figure, nous observons une agrégation sanguine (étoile jaune), un dédoublement de la limitante élastique interne délimitant du matériel conjonctif (G x 40) ; (encadré, G x 100).

Figure 6

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 40).

Cette figure montre en plus de l'agrégation sanguine (flèche bleue), les amincissements des lames élastiques au niveau de la média (flèches noires).

Figure 7

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 100).

Le détails de la figure précédente révèle les amincissements des lames élastiques au niveau de la média (flèches jaunes).

Figure 8

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 100).

Au niveau de la média, nous observons des ruptures des lames élastiques (flèches noires).

PLANCHE III : Structure de l'aorte chez *Psammomys* traités à la méthionine pendant 6 mois.
Coloration : trichrome de Masson.

Figure 1

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 40).

Sur cette figure, nous observons entre les espaces interlamellaires des zones de migration de CML de la média vers l'intima (flèches noires). Les lames élastiques, présentent un dédoublement dans certaines zones (flèches jaunes) et perdent leur ondulation (têtes de flèches roses). Elles deviennent plus entourées de collagènes (têtes de flèches rouges).

Figure 2

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 100).

Le détail de la figure précédente révèle que la limitante élastique interne présente un dédoublement (flèche rouge). La migration des CML de la média vers l'intima s'accompagne de la destruction de la matrice extracellulaire environnante, traduite par un aspect clair entre les lames élastiques (têtes de flèches roses). Nous observons également que certains espaces interlamellaires sont occupés par du matériel conjonctif (flèche orange).

Figure 3

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 40).

Cette illustration présente un aspect spéciale au niveau de la média, cet aspect révèle probablement un dépôt de cristaux de calcium (encadré vert). Nous observons aussi un important dépôt de collagènes autour des lames élastiques et entre les espaces interlamellaires (étoiles blanches).

Figure 4

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 100).

Au plus fort grossissement de la figure précédente, révèle le dépôt calcique (flèche orange) délimité par des lames élastiques, ainsi nous observons le dépôt de collagènes autour des lames élastiques (étoile blanche).

Figure 5

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 100).

Cette figure révèle que les lames élastiques présentent des ruptures (têtes de flèches jaunes), entre ces lames, se trouve une zone de prolifération des CML ; 4 à 5 noyaux de CML (flèche rose) au niveau de la média, ces lames sont entourées de part et d'autres par du matériel conjonctif (étoiles blanches).

PLANCHE IV : Structure de l'aorte chez *Psammomys* traités à la méthionine pendant 6 mois.
Coloration : trichrome de Masson.

Figure 1, 2

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 100).

Ces illustrations montrent un microthrombus au niveau de l'endothélium (flèche noire). La limitante élastique interne présente une rupture (flèche jaune). Nous observons également un épaissement du sous endothélium rempli par du matériel conjonctif (tête de flèche noire), une désorganisation du matériel cellulaire (flèche rouge) et certaines CMLs en phase de migration (tête de flèche rouge).

Figure 3, 4

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 100).

Sur ces figures, nous révélons un important dépôt de collagènes dans les espaces interlamellaires (flèche noire) et autour des lames élastiques (têtes de flèches noires), ainsi que quelques noyaux de CML en phase de migration (flèche rouge).

Figure 5

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 100).

Cette partie de la paroi d'aorte montre une zone d'espaces interlamellaires élargis et clairs au niveau desquels les CMLs sont orientées perpendiculairement à l'axe de l'aorte et semblent migrent (flèche rose). Une importante masse de collagènes délimite de part et d'autre les lames élastiques (flèches jaunes).

Figure 6

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 100).

Nous observons sur cette figure, la destruction de l'intima (têtes de flèches bleues). Le noyau de la CML migrante change de forme et devient rond (flèche jaune). Nous notons également l'apparition de zones amorphes dans les espaces interlamellaires (étoiles rouges).

**PLANCHE VI : Structure de l'aorte chez *Psammomys* traités à la méthionine pendant 6 mois.
Coloration : trichrome de Masson.**

Figure 1, 2

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 10) et (x 40).

Ces deux figures présentent une lésion marquée par la destruction de l'intima (flèche bleue), une fibrose révélée au niveau de la média (flèche rouge) et un épaissement de l'adventice (flèche jaune).

Figure 3, 4

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 20) et (x 100).

Nous observons, un épaissement de l'adventice marqué par une synthèse accrue de collagènes formant une lésion (flèche noire). Des macrophages sont présentes au niveau de cette lésion (têtes de flèches jaunes) et les noyaux de fibrocytes (flèche verte).

Figure 5, 6

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 100).

Ces illustrations nous montrent les deux étapes de rupture aortique (flèches rouges).

**PLANCHE VII : Structure de l'aorte chez *Psammomys* témoins et traités à la méthionine pendant 6 mois.
Coloration : Orcéine.**

Figure 1

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* témoin. Grossissement (x 100).

La coloration à l'orcéine, chez *Psammomys* témoin, montre que la média (M) est caractérisée par des lames élastiques ondulées et des espaces interlamellaires colorés en jaune. L'adventice (A), couche la plus externe est également colorée en jaune.

Figure 2

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 100).

Nous observons sur cette figure, la destruction de l'intima (étoile blanche) ainsi qu'une désorganisation de la trame élastique.

Figure 3

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 100).

Sur cette illustration nous observons une rupture de la limitante élastique interne (flèche noire) et une destruction des 3 premières lames élastiques au niveau de la média (flèche blanche).

Figure 4, 5

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 100).

Ces illustrations montrent une rupture de lame élastique (étoile noire).

**PLANCHE VIII : Structure de l'aorte chez *Psammomys* témoins et traités à la méthionine pendant 6 mois.
Coloration : Van Gieson.**

Figure 1

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* témoin. Grossissement (x 100).

Cette coloration permet de mettre en évidence quelques noyaux d'endothélium (flèche noire), les lames élastiques ondulées (flèche bleue) au niveau de la média délimitant des espaces interlamellaires contenant les noyaux des CML (tête de flèche noire) et les collagènes, cette couche est délimitée par les limitantes élastiques interne et externe. L'adventice (A), la couche la plus externe est constituée de faisceaux de collagènes.

Figure 2

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 100).

Cette illustration montre une hypertrophie des cellules endothéliales (flèche bleue), un élargissement de certains espaces interlamellaires avec un dépôt de collagènes (étoile noire).

Figure 3, 4

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 100).

Nous observons sur ces deux figures, un épaissement de l'endothélium (flèche bleue) et du sous endothélium (flèche noire), une désorganisation des lames élastiques (flèche blanche) et un important dépôt de collagènes (étoiles rouges).

Figure 5, 6

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 100).

Sur ces deux illustrations, nous notons une désorganisation de la trame élastique (flèches bleues).

PLANCHE IX : Structure de l'aorte chez *Psammomys* témoins et traités à la méthionine pendant 6 mois.
Coloration : APS avec coloration nucléaire.

Figure 1

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* témoin. Grossissement (x 100).

Nous observons quelques noyaux d'endothélium (flèche noire), des lames élastiques ondulées colorées en rose (flèches jaunes) au niveau de la média délimitant des espaces interlamellaires colorés en rose clair contenant les noyaux fusiformes des CML (tête de flèche noire) et les collagènes, cette couche est délimitée par les limitantes élastiques interne et externe. L'adventice, la couche la plus externe est constituée de faisceaux de collagènes.

Figure 2

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 100).

Cette figure nous montre une désorganisation de la trame élastique.

Figure 3

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 100).

Cette figure nous montre une destruction de l'intima (flèche noire) ainsi qu'une désorganisation de la trame élastique. Un important matériel APS positif est marqué au niveau des espaces interlamellaires et autour de certaines lames élastiques (étoiles blanches).

Figure 4, 5

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 40).

Ces deux illustrations présentent une lésion de la paroi aortique (flèches noires), révélée par la destruction de la média avec une importante thrombose au milieu de celle-ci (étoiles rouges).

PLANCHE X : Structure de l'aorte chez *Psammomys* témoins et traités à la méthionine pendant 6 mois.
Coloration : APS .

Figure 1

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* témoin. Grossissement (x 100).

Cette coloration histochimique à l'acide périodique de Schiff, chez *Psammomys* témoin, montre que la média (M) est caractérisée par des lames élastiques ondulées et des espaces interlamellaires clairs. L'adventice (A), couche la plus externe est également colorée en rose claire.

Figure 2, 3, 4, 5

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* témoin. Grossissement (x 100).

Ces illustrations nous montrent une diminution d'ondulation et une désorganisation de la trame élastique, un dépôt important de collagènes dans les espaces interlamellaires et autour des lames élastiques (flèches noires).

Figure 6

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* témoin. Grossissement (x 100).

Sur cette figure, nous notons un important matériel APS positif non seulement au niveau de la désorganisation de la média (étoiles blanches) mais aussi au niveau de l'adventice (étoiles noires), à un moindre degré.

Figure 7

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (a, x 40), (b, x 100).

Cette figure comporte deux illustrations en faible et fort grossissement les qui montrent les amincissements et les pertes d'ondulation des lames élastiques au niveau de la média (flèches noires).

Figure 8, 9

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 40).

Ces deux figures nous montrent la désorganisation des lames élastiques au niveau de la média.

PLANCHE I

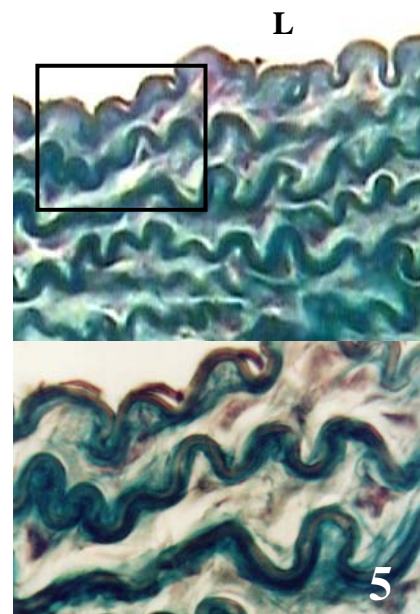
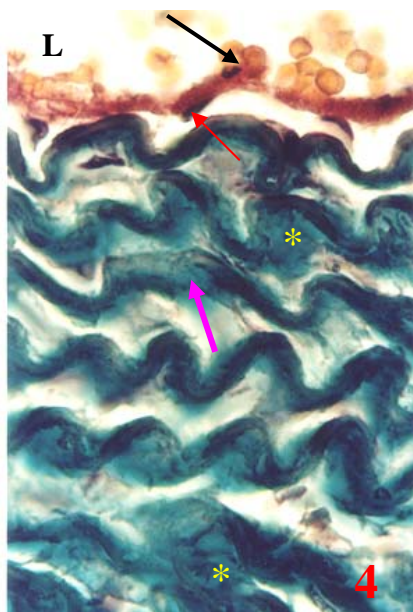
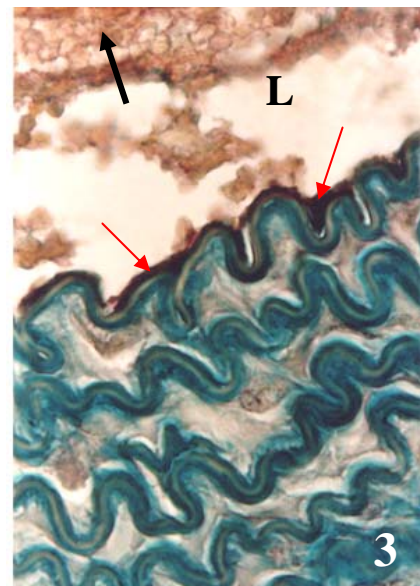
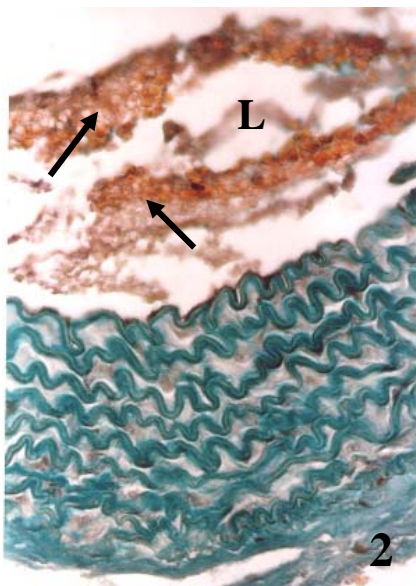
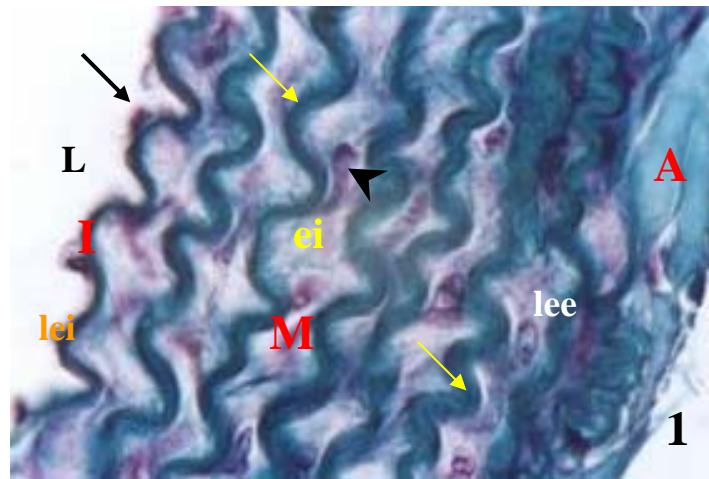


PLANCHE II

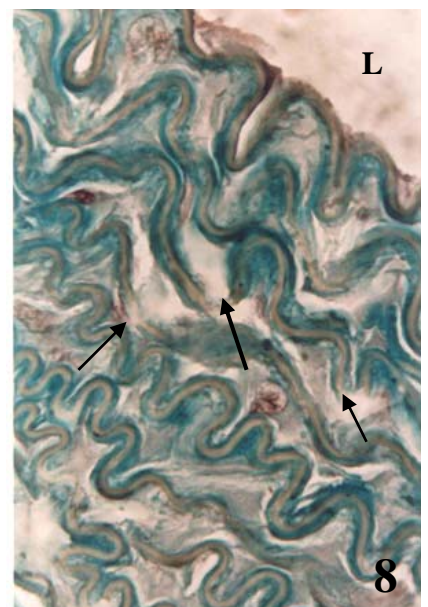
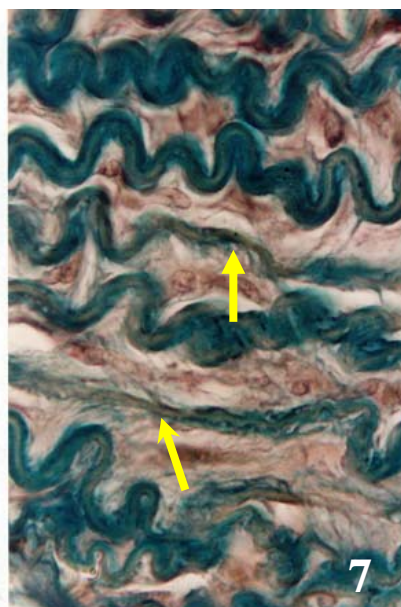
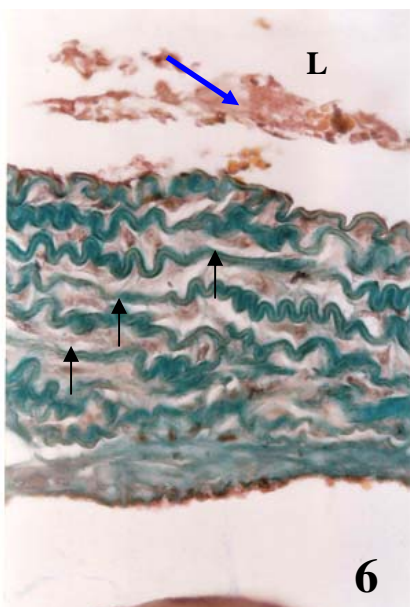
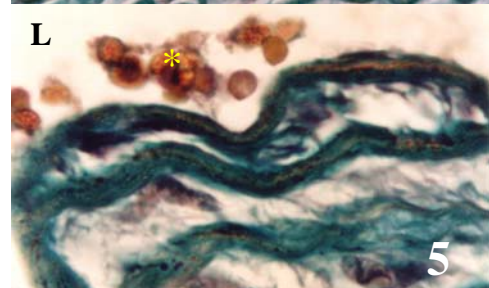
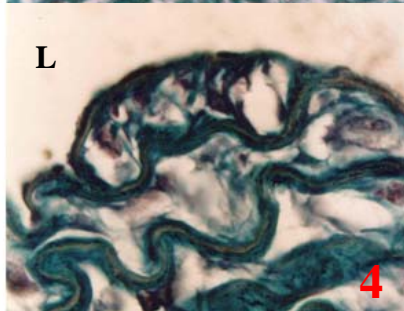
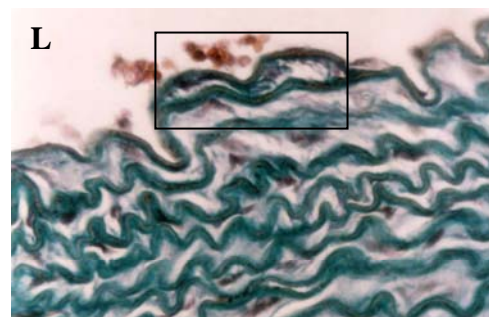
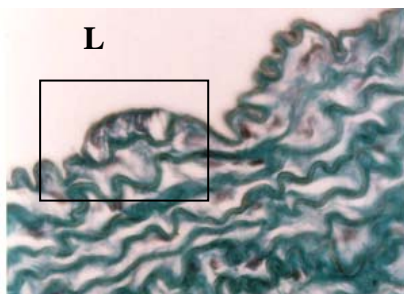
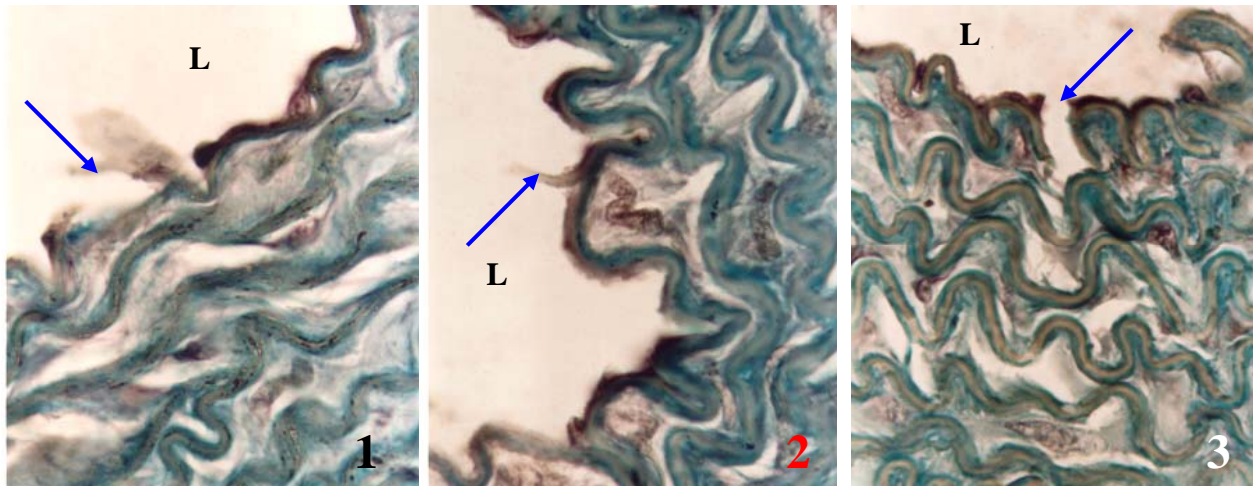


PLANCHE III

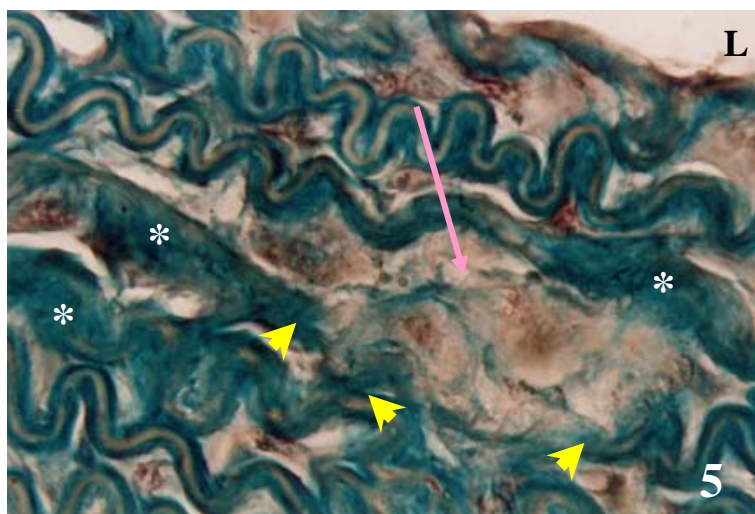
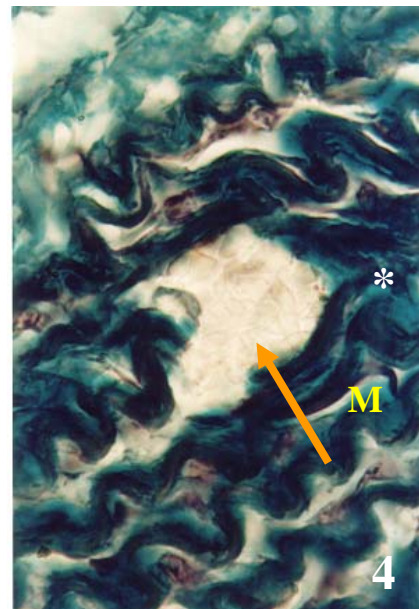
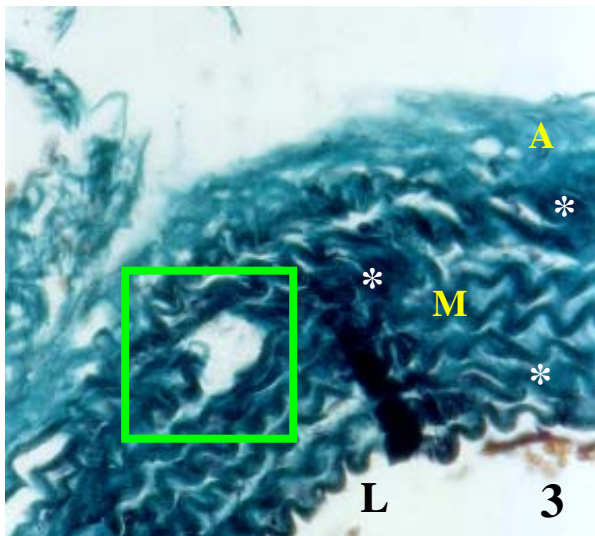
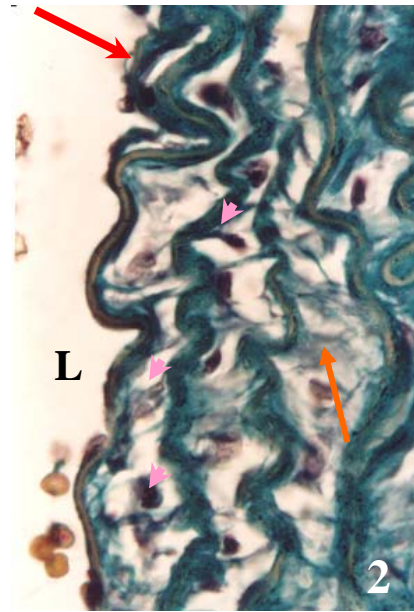
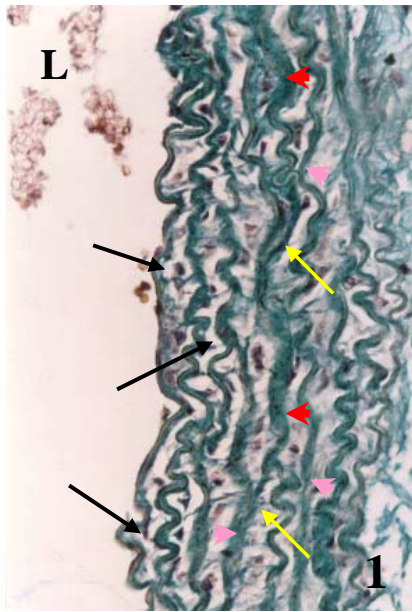


PLANCHE IV

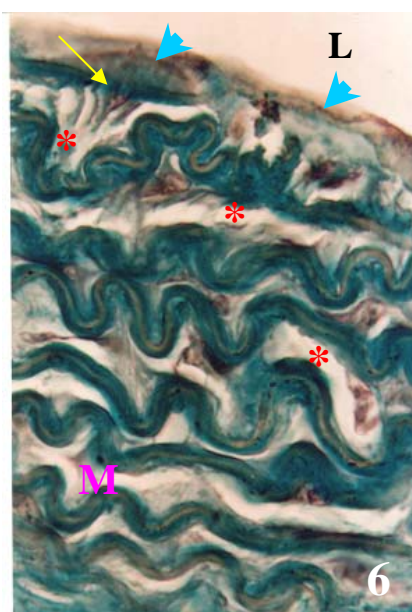
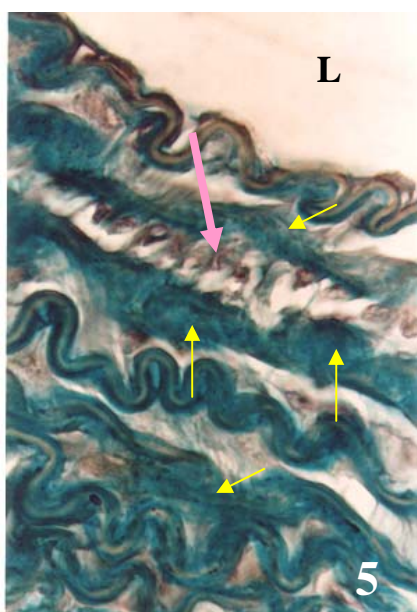
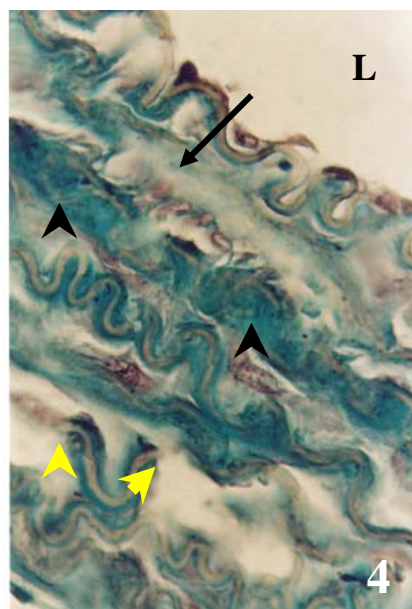
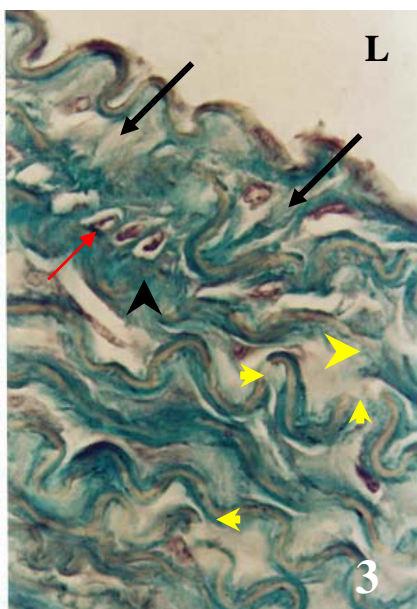
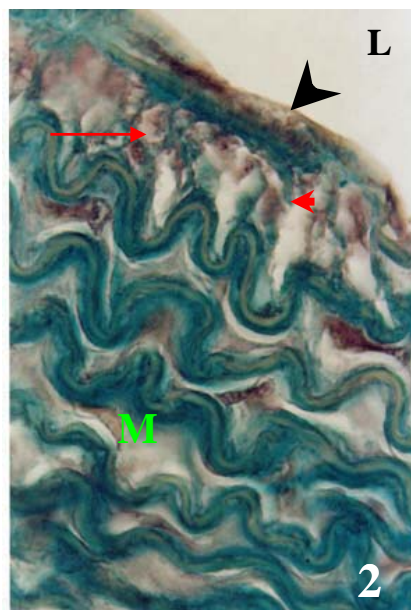


PLANCHE V : Structure de l'aorte chez *Psammomys* traités à la méthionine pendant 6 mois.

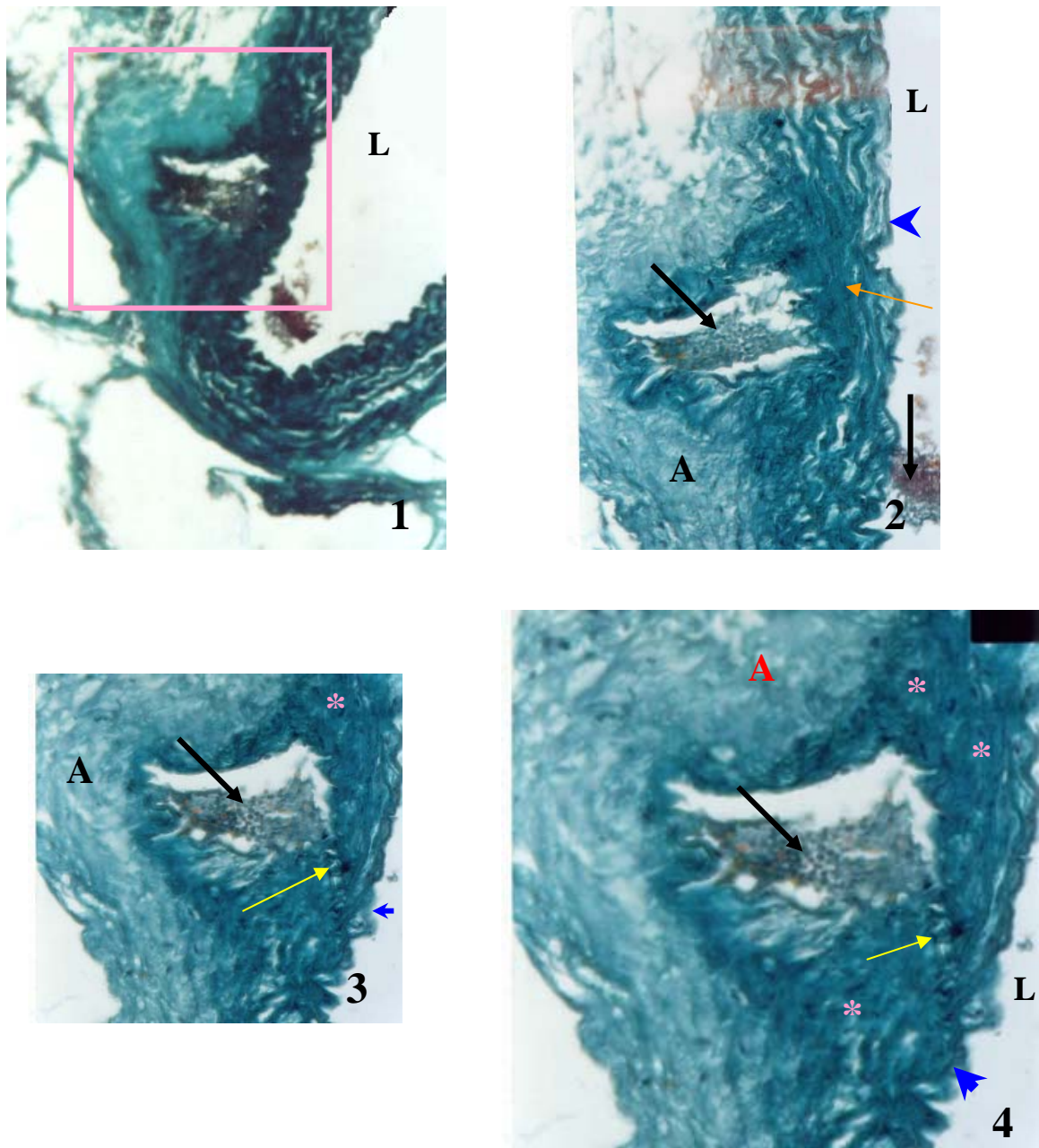


Figure 1, 2, 3, 4

Coupe transversale d'aorte de *Psammomys* traité à la méthionine pendant 6 mois. Grossissement (x 10) ; (x 40) et (x 100).

Ces illustrations présentent une lésion de la paroi d'aorte (cadrons rose) ; révélée par la destruction de l'intima (têtes de flèches bleues), l'absence d'espaces interlamellaires (flèche orange) et présence d'important dépôt de collagènes au niveau de la média (étoiles roses), un important épaissement de l'adventice. La média et l'adventice sont séparés par un espace interlamellaire très large occupé par une importante agrégation sanguine (flèche noire). Ainsi nous notons également une infiltration tout le long de la média (flèche jaune). Coloration : trichrome de Masson.

PLANCHE VI

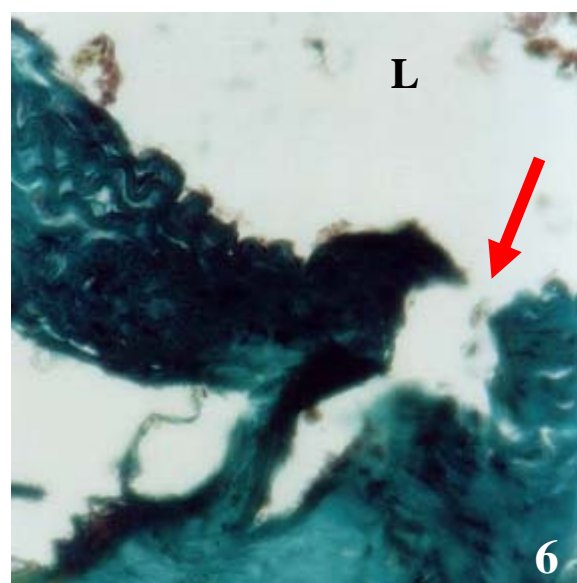
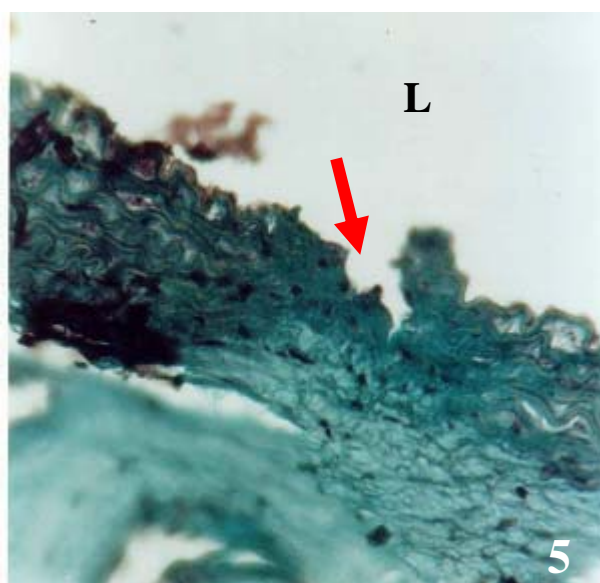
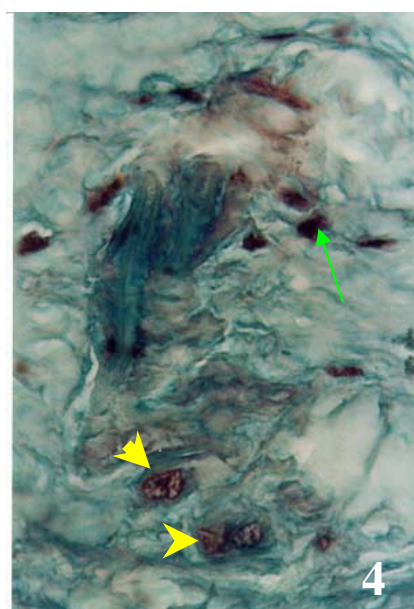
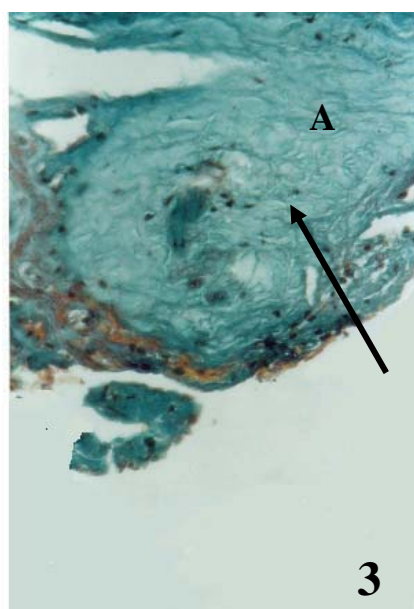
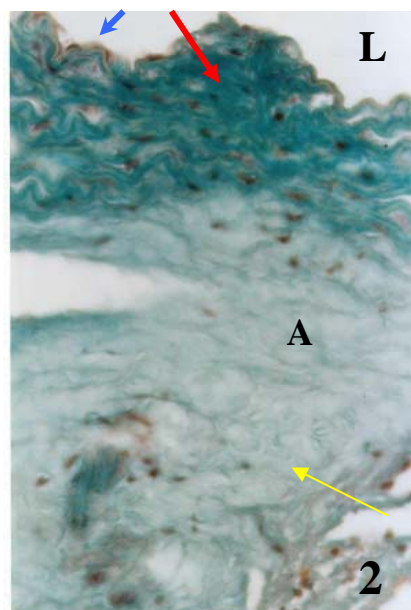
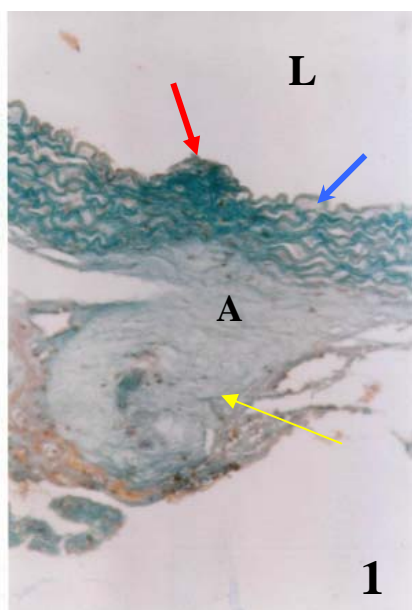


PLANCHE VII

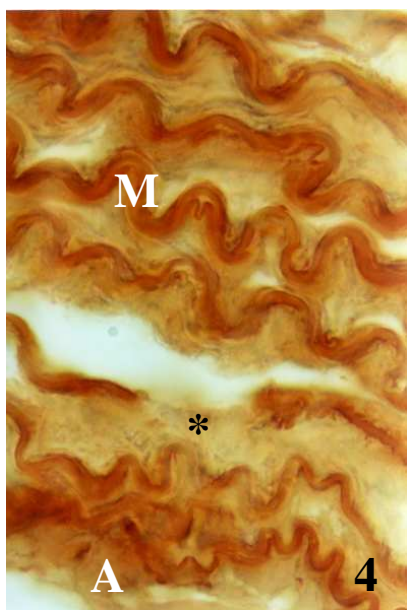
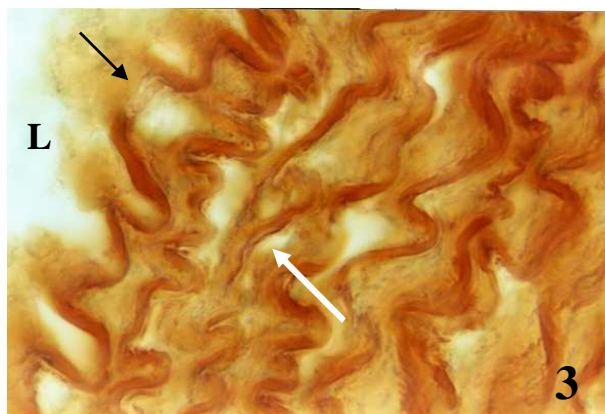
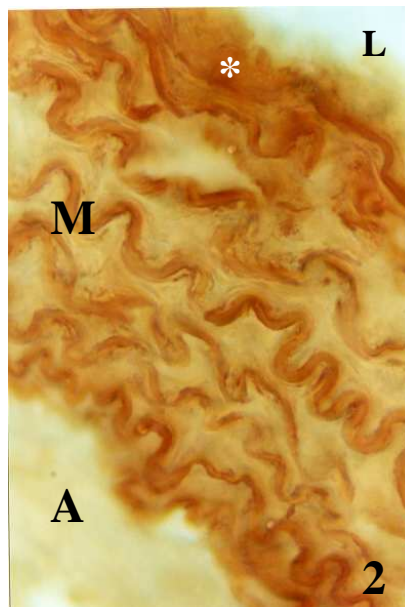
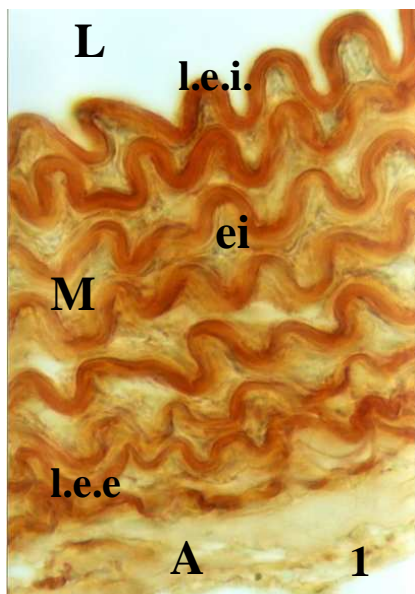


PLANCHE VIII

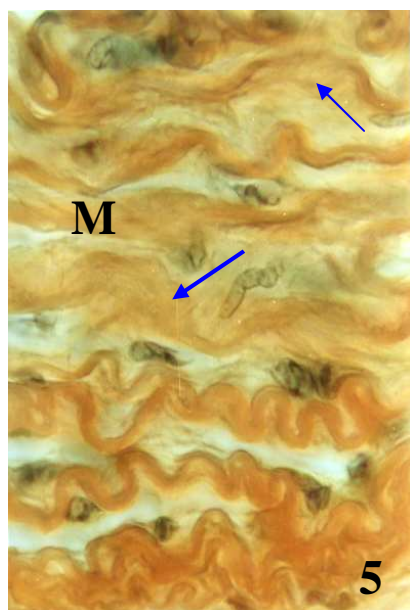
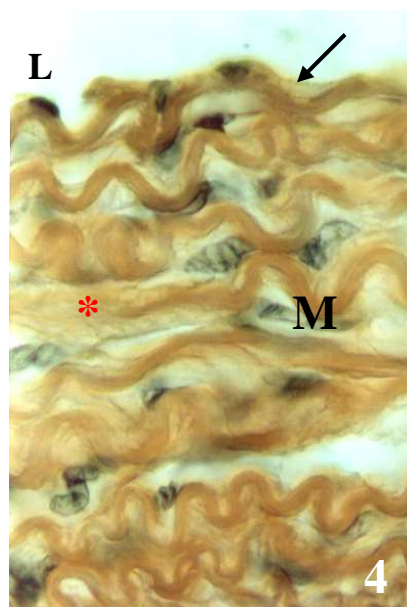
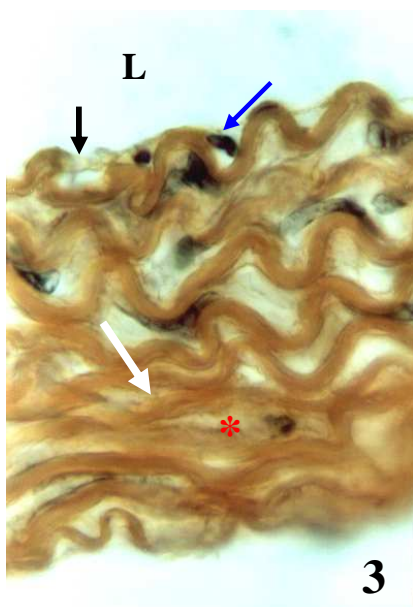
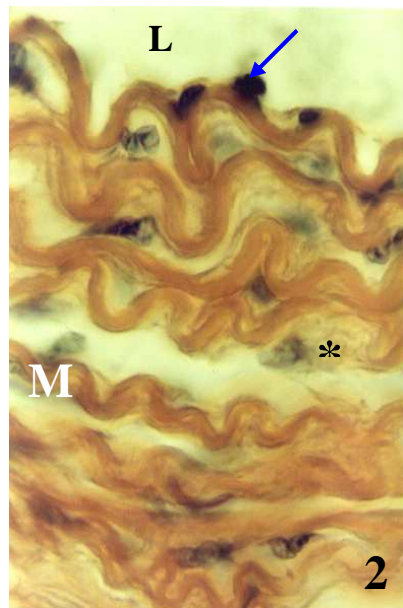
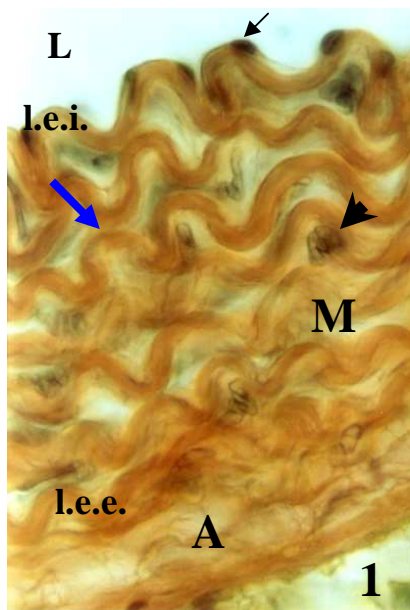


PLANCHE IX

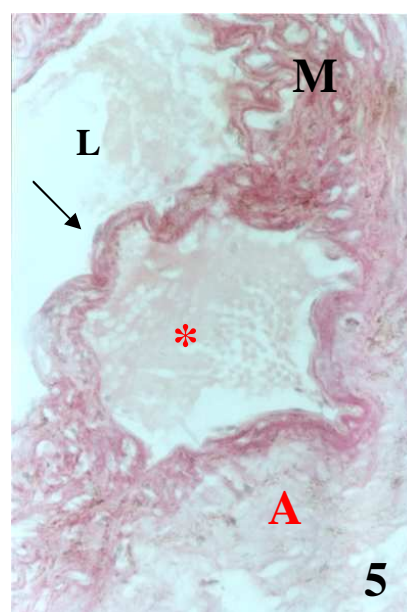
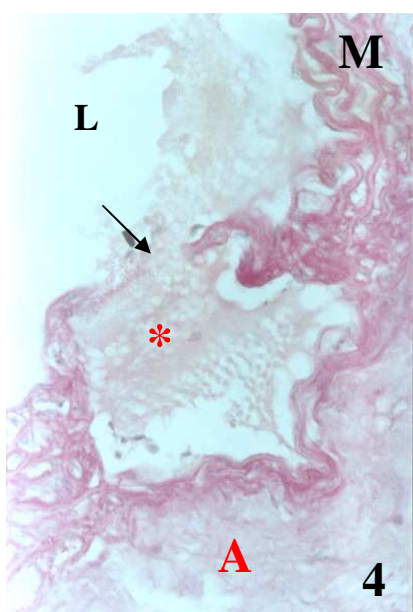
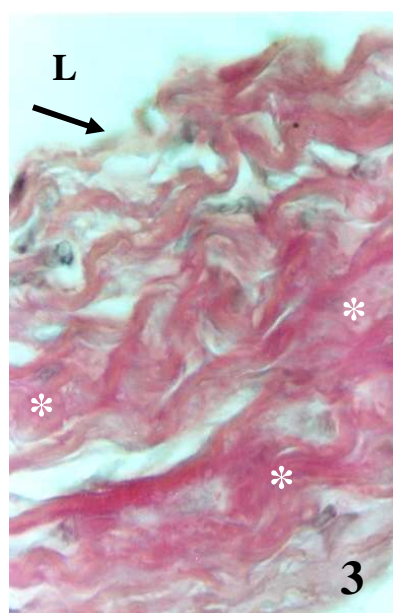
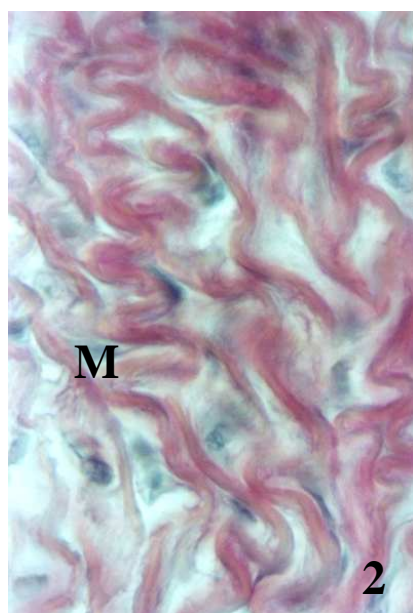
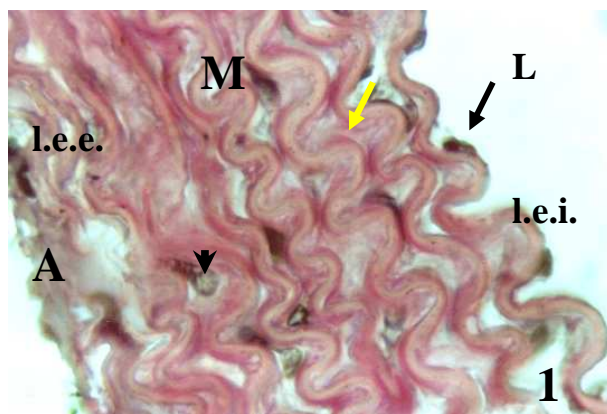
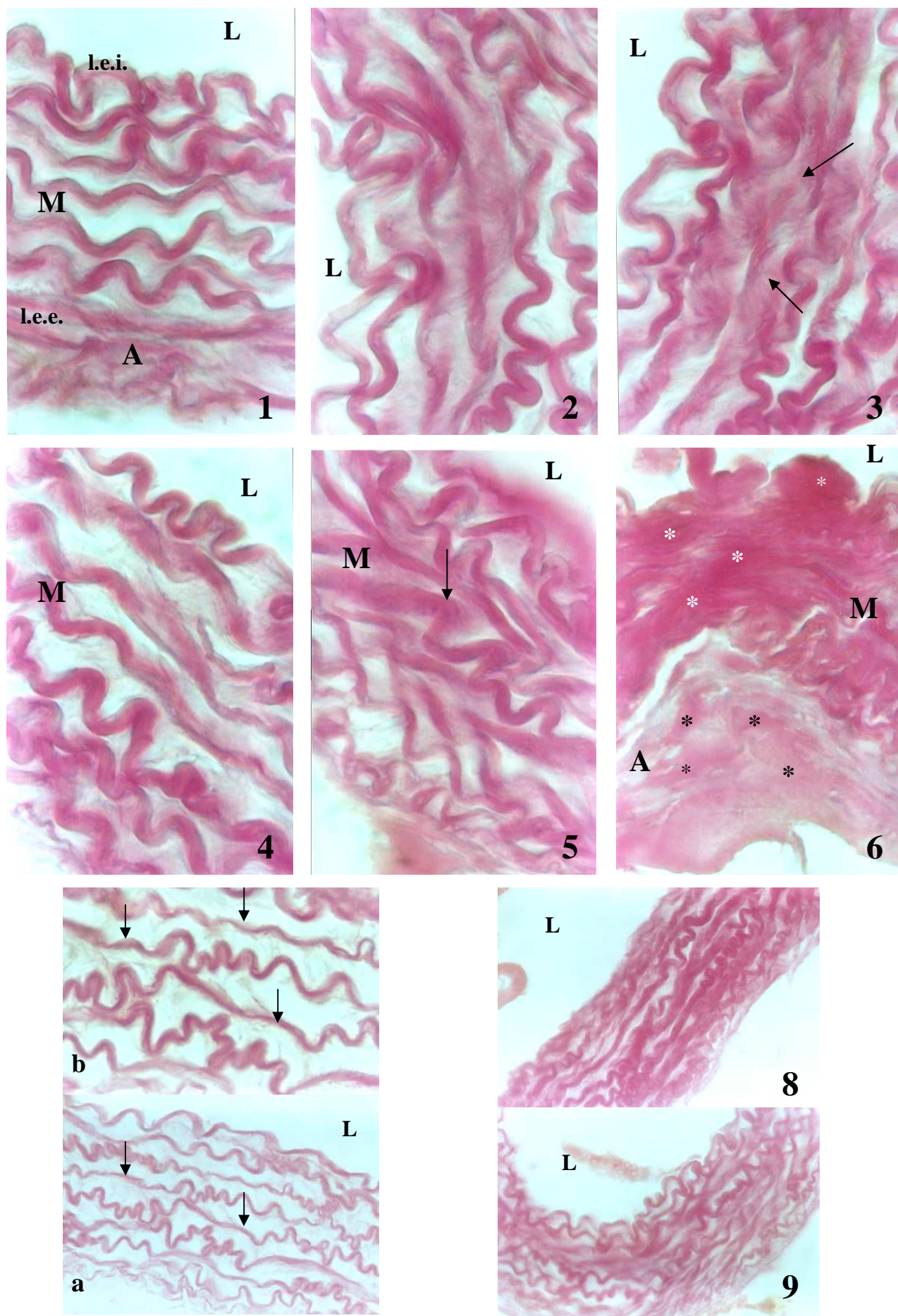


PLANCHE X



2.2. Etude morphométrique :

Nous avons effectué pour chaque paramètre étudié, 50 mesures, réalisées dans différents champs, sur plusieurs préparations provenant de différents animaux (Tab. IX, Fig. 19, 20, 21, 22).

Tableau IX : Effet d'un traitement de 6 mois à la méthionine sur les paramètres morphométriques de la paroi aortique.

	Animaux témoins	Animaux traités
Epaisseur paroi (µm)	119,8 ± 15,95	144,94 ± 57,86 **
Epaisseur adventice (µm)	30,25 ± 16,14	43,48 ± 59,38
Epaisseur média (µm)	87,75 ± 8,43	100,30 ± 24,53 ****
Epaisseur intima (µm)	2,13 ± 0,58	2,87 ± 1,25 ****
Epaisseur espace interlamellaire (µm)	7,55 ± 2,97	9,35 ± 3,77 **
Longueur noyau CML (µm)	8,03 ± 2,80	6,58 ± 2,14 ****
Largeur noyau CML (µm)	3,28 ± 1,15	3,33 ± 1,12
Nombre noyaux des CMLs (par 5625 µm ²)	11,32 ± 3,29	15,06 ± 3,34 ****
Nombre de lames élastiques	7,48 ± 0,91	7,34 ± 1,04

Les valeurs représentent les moyennes affectées de l'écart type.

* Paramètres morphométriques des traités vs des témoins. ** P< 0.01 ; *** P< 0.001 ; ****P< 0.0001.

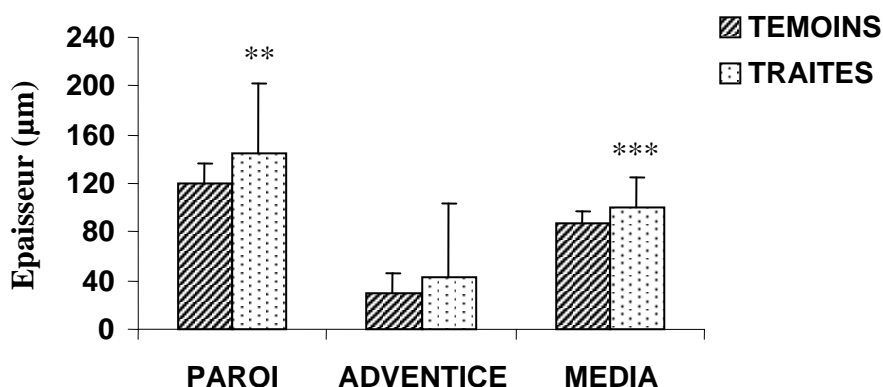


Figure 19 : Effet de la méthionine sur l'épaisseur de la paroi aortique, de l'adventice et de la média pendant 6 mois de traitement.

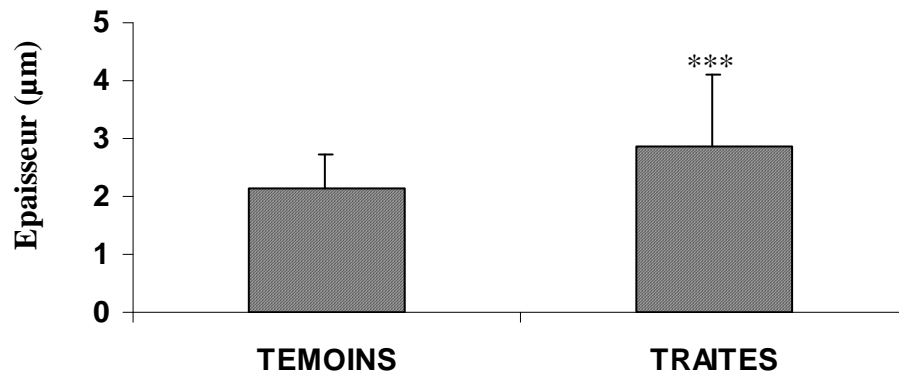


Figure 20 : Effet du traitement à la méthionine sur l'épaisseur de l'intima.

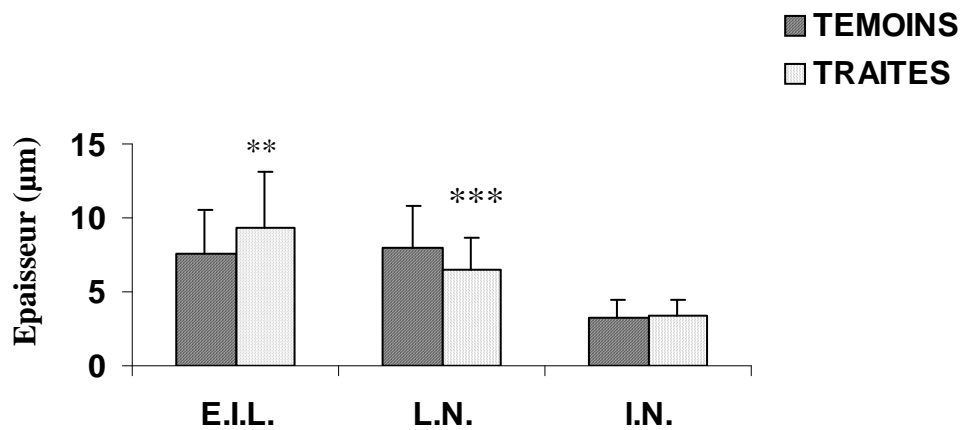


Figure 21 : Effet du traitement de la méthionine sur l'épaisseur des espaces interlamellaires et la longueur des axes nucléaires des CMLs de la média.

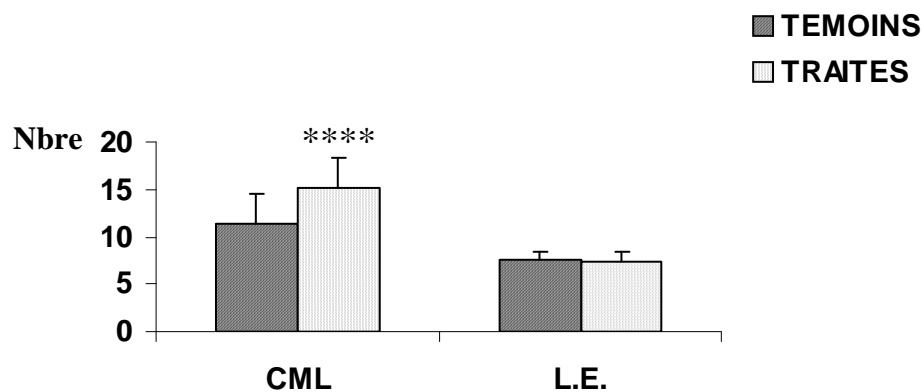


Figure 22 : Effet du traitement de la méthionine sur le nombre de noyaux des CMLs et des lames élastiques de la média.

E.I.L. : Espace interlamellaire. LN. : grand axe nucléaire. I.N. : petit axe nucléaire

CML : nombre de noyaux des CML.

L.E. : nombre de lames élastiques

L'étude morphométrique entreprise a mis en évidence :

- **une augmentation de l'épaisseur de chaque couche de la paroi d'aorte ($P < 0,001$) conduisant à une augmentation de l'épaisseur totale de la paroi ;**
- **Une augmentation de l'épaisseur des espaces interlamellaires ;**
- **Une diminution du nombre de lames élastiques ;**
- **Une augmentation du nombre de CMLs dont les noyaux subissent une diminution du grand axe.**

L'étude morphométrique réalisée a apporté une confirmation à certaines de nos observations histologiques.

- L'accumulation de collagènes et les autres altérations observées sur le plan histologique et histo-chimique est confirmée par l'augmentation d'épaisseur des différentes couches et de la paroi, l'augmentation d'épaisseur des espaces interlamellaires.

- Les altérations touchant la trame élastique sont corrélées avec la diminution du nombre de lames élastiques déterminée par la morphométrie.

- La prolifération cellulaire et la modulation phénotypique des CMLs a également été confirmée sur le plan histo-morphométrique par l'augmentation du nombre de CMLs et le changement de forme de leur noyau.

DISCUSSION

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'impact d'une hyperhomocystéinémie expérimentale sur certains paramètres plasmatiques et sur l'histomorphométrie de la paroi aortique. Pour ce faire, une hyperhomocystéinémie modérée a été induite chez le Rat des sables, *Psammomys obesus*, par une injection de méthionine à raison de 70 mg/Kg de poids corporel / jour.

De nombreuses données expérimentales ont mentionné que l'hyperhomocystéinémie peut être sévère ou modérée. Nos travaux s'inscrivent dans ce dernier cas. L'hyperhomocystéinémie modérée peut se produire par :

- une altération du métabolisme de l'homocystéine due à une carence vitaminique : déficit en vitamine B12 (**Lentz et al., 1997 ; Wright et al., 2004 ; Hickie et al., 2005**), en vitamine B6 (**Martinez et al., 2000**) ou en acide folique (**Durand et al., 1996 ; Huang et al., 2001 ; Wang et al., 2005**),

- une supplémentation d'homocystéine (**Miller et al., 2000 ; Doshi et al., 2005 ; Akasaka et al., 2005**) ou de méthionine (**Yagisawa et al., 2004 ; Doshi et al., 2005**).

Notre protocole expérimental repose sur l'induction d'un état d'hyperhomocystéinémie par administration de méthionine. Dans un précédent travail (**Raaf, 2003**), trois formes d'administration de la méthionine ont été testées à savoir par gavage, par injection ou incorporation dans le régime alimentaire. Nous avons opté pour la forme injectable en intrapéritonéale, mode précédemment réalisé par différents auteurs (**Griffiths et al., 1976 ; Rolland et al., 1995 ; Raaf, 2003**).

Le travail de **Raaf (2003)**, réalisé au sein de notre équipe a nécessité une expérimentation de 10 mois sur le Rat Wistar. Le Rat des sables, *Psammomys obesus*, modèle animal utilisé dans ce présent travail, est une espèce d'une extrême sensibilité, nous avons pour cette raison, limité la durée de l'expérimentation à 6 mois.

Dans la littérature, des doses variables de méthionine sont mentionnées, la plupart d'entre elles sont de l'ordre de 300 à 400 mg/Kg de poids corporel / jour (**Dever et Elfarra, 2006**). Nous avons choisi pour le Rat des sables, la dose de 70 mg/Kg de poids corporel / jour, dose que nous avons estimé être dans les limites des valeurs physiologiques.

L'administration de méthionine à raison de 70 mg/Kg de poids corporel / jour pendant 6 mois provoque chez *Psammomys obesus* un état d'hyperhomocystéinémie modérée. En effet, elle atteint à ce moment une valeur de $20,05 \pm 7,77 \mu\text{mol/l}$ contre $2,63 \pm 2,01 \mu\text{mol/l}$ au début de l'expérimentation soit une augmentation d'un facteur 7,6.

L'hyperhomocystéinémie enregistrée chez le Rat des sables est modérée. En effet, l'hyperhomocystéinémie modérée varie de 12 à 30 $\mu\text{mol/l}$. (**Guilland et al., 2003**). Notre résultat est en accord avec celui observé par divers auteurs (**Rolland et al., 1995 ; Wang et al., 2002 ; Yagisawa et al., 2004 ; Hidiroglou et al., 2004**) sur différents modèles animaux (porc, rat, bovine et gerbille) soumis à des régimes enrichi en méthionine ou en homocystéine.

Au terme de l'expérimentation, nous avons noté une diminution du poids corporel des Rats des sables soumis à la méthionine. Un résultat similaire a été rapporté par **Zhou et al. (2001)** lors de travaux portant sur des souris traitées à la méthionine. Par contre, certains auteurs dont **Rolland et al. (1995) ; Raaf (2003) et Hidiroglou et al. (2004)** ont noté que l'ingestion d'un excès de méthionine n'a pas d'effet sur l'évolution pondérale.

L'ensemble des paramètres biochimiques plasmatiques que nous avons étudié a subi des variations plus ou moins importantes au cours des 6 mois d'expérimentation. Nous avons ainsi enregistré une augmentation de la glycémie après administration de la méthionine pendant 5 mois. Certains travaux dont ceux de **Rolland et al. (1995)** et de notre équipe (**Raaf, 2003**) mentionnent l'absence de variations significatives de la concentration plasmatique en glucose chez différents modèles (porc et rat Wistar respectivement). Nos résultats mettent en évidence une perturbation des lipides plasmatiques chez le Rat des sables soumis à l'injection de méthionine. Une corrélation positive entre la triglycéridémie et l'homocystéinémie ainsi que des variations non significatives de la cholestérolémie sont observées. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Werstuck et al. (2001)**. Ces auteurs ont noté que l'hyperhomocystéinémie induit une dérégulation de la biosynthèse du cholestérol et des triglycérides. Par ailleurs, **Zhou et al. (2001)** ont noté que l'ingestion de la méthionine à court ou à long terme, provoque une légère réduction du taux des triglycérides plasmatiques chez des souris apo E^{-/-}. **Sugiyama et Muramatsu (1990)** ; **Hidiroglou et al. (2004)**, ont rapporté que l'addition de la méthionine à un régime à base de caséine a eu comme conséquence l'augmentation significative de la cholestérolémie chez des gerbilles. Des variations des paramètres biochimiques plasmatiques ont également été précisées chez le Rat Wistar (**Raaf, 2003**).

Le dosage des protéines et d'acide urique plasmatiques que nous avons effectué montre des fluctuations de ces derniers au cours de l'expérimentation avec une hyperprotéinémie (> 90 mg/dl) au 2^{ème} mois de traitement et une élévation du taux d'acide urique au 5^{ème} mois (augmentation d'environ 162% à T5 vs T0). Par contre, **Rolland et al. (1995)** n'ont noté aucun changement de ces deux paramètres chez le porc après administration d'un régime alimentaire enrichi en méthionine ainsi que **Raaf (2003)** chez le Rat Wistar.

Nous avons complété notre étude biochimique en effectuant une électrophorèse horizontale des lipoprotéines plasmatiques de *Psammomys obesus* soumis à une injection de méthionine à la dose de 70 mg/Kg de poids corporel / jour pendant 3 mois. L'analyse des lipidogrammes met en évidence une diminution importante des HDL, molécules cardioprotectrices permettant l'efflux de cholestérol vers le foie (**Schaefer et al., 1979**). Par contre, les VLDL et LDL reconnus comme lipoprotéines hautement athérogènes car véhiculant le cholestérol estérifié vers les cellules pariétales (**Wieland et al., 1980**) sont augmentées chez le Rat des sables soumis à la méthionine. Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Liao et al. (2006)** chez des souris (CβS^{-/-} / apo E^{-/-}) hyperhomocystéinémiques.

Par ailleurs, nous avons noté avec intérêt l'apparition de la lipoprotéine (a) après traitement à la méthionine. Selon **Mezdour et al. (1990)**, la lipoprotéine serait un marqueur additionnel de l'athérosclérose. **Suk Danik et al. (2006)** ainsi que **Aasvee et al. (2006)** montrent qu'un taux élevé de Lp (a) est associé avec une augmentation du risque cardiovasculaire. Cependant notre résultat mériterait d'être confirmé par un échantillonnage plus important.

Les travaux réalisés sur le foie de rat ont montré qu'un apport élevé de méthionine additionnée à de la cystine ou caséine supprime l'incorporation de la cystine au glutathione (**Tateishi et al., 1981**). Une suppression de la synthèse de la glutathione a pu augmenter la susceptibilité des tissus au stress oxydatif. L'alimentation à base de méthionine augmente la peroxydation lipidique hépatique (**Lynch et Strain, 1989**) ; et plasmatique (**Toborek et al., 1995**), et diminue l'activité antioxydante (**Toborek et al., 1995**).

En outre, **Hidiroglou et al. (2004)** ont rapporté que l'administration de la L-méthionine chez les gerbilles, a augmenté non seulement l'homocystéinémie, mais aussi la cholestérolémie et les LDL cholestérol plasmatiques. Les études *in vitro* ont établi que les LDL peuvent être modifiées par l'oxydation, l'acétylation, la glycation et la méthylation (**Aviram, 1993 ; Tabas, 1999**). Pendant l'autooxydation de l'homocystéine, les espèces réactives d'oxygène libérées ont pu provoquer la peroxydation des lipides et mener à l'altération de la fonction endothéliale et à la formation des LDL athérogéniques (**Voutilainen et al., 1999**). Bien que l'homocystéine et d'autres thiols induisent la peroxydation des LDL *in vitro* (**Harpel et al., 1992 ; Heinecke et al., 1993**), aucune différence dans l'ampleur de l'oxydation des LDL n'a été trouvée chez des patients avec une hyperhomocystéinémie modérée et grave dans les études de cas contrôle (**Cordoba-Porras et al., 1996 ; Weiss et al., 1999**).

L'observation de plusieurs coupes d'aorte, a montré que la paroi vasculaire des Rats des sables hyperhomocystéinémiques est le siège de nombreuses altérations focalisées. Une de ces observations que nous avons noté correspond à des agrégations sanguines ou microthrombus. Ces derniers ont été révélés également au niveau de la lumière intima des artères coronaires et d'aorte chez des souris apo E^{-/-} soumises à la méthionine ou l'homocystéine (**Zhou et al., 2001**). L'homocystéine provoque une atteinte des cellules endothéliales à plusieurs niveaux (**McDowell et Lang, 2000**). Elle exerce son rôle pathogène par une action sur plusieurs voies de la coagulation, notamment par une altération du phénotype antithrombotique normal de l'endothélium en augmentant les activités du facteur XII (**Ratnoff, 1968**) et du facteur V (**Rodgers et Kane, 1986**), en diminuant l'activation de la protéine C (**Rodgers et Conn, 1990 ; Abecassis et al., 2004 ; Dayal et al., 2006**) et indirectement par une diminution de la capacité de liaison de l'antithrombine III à la surface des cellules endothéliales (**Abecassis et al., 2004**). L'homocystéine empêche également l'expression de la thrombomoduline (**Lentz et Salder, 1991**), induit l'expression du facteur tissulaire (**Fryer et al., 1993 ; Dayal et al., 2006**), et supprime l'expression de sulfates d'héparane par l'endothélium (**Nishinaga et al., 1993 ; Abecassis et al., 2004**). Finalement tous ces effets facilitent la formation de la thrombine et créent un environnement prothrombotique (**Dayal et al., 2006**). L'athérosclérose se complique par la thrombose luminale, une crise cardiaque représentant un danger pour la vie des êtres vivants (**Zhou et al., 1999**). **Fu et al. (2002)** ont provoqué un état d'hyperhomocystéinémie chez des rats et ils ont noté que celle-ci augmente l'interaction des leucocytes à l'endothélium.

Une hypertrophie de l'endothélium et du sous endothélium est révélée sur nos coupes histologiques d'aorte, cet épaississement intimal est observé après la coloration au trichrome de Masson et PAS. Ces effets ont été rapportés par **Rolland et al. (1995)** qui ont noté, qu'un régime alimentaire enrichi en méthionine administré pendant 4 mois provoque chez le porc, une hypertrophie des cellules endothéliales et du sous endothélium formant ainsi un aspect fibreux oedémateux. Cet aspect est révélé au niveau de l'aorte abdominale et de l'artère coronaire. **Toborek et al. (1995) ; Hofmann et al. (2001) ; Smith et al. (2001)**, ont rapporté que l'hyperhomocystéinémie est en corrélation avec une augmentation de l'hyperplasie intima, et ceci chez différents modèles animaux (lapins, rats et souris respectivement).

L'étude histo-morphométrique de la paroi aortique, que nous avons effectuée met en évidence une augmentation de l'épaisseur de l'intima qui passe de $2,13 \pm 0,58 \mu\text{m}$ au début du traitement à $2,87 \pm 1,25 \mu\text{m}$ au terme de ce dernier. Bien que très significatif, l'épaississement intimal révélé dans le cadre de notre travail ($2,87 \mu\text{m}$), reste largement plus faible que celui ($130 \mu\text{m}$) mentionné par **Osborne-Pellegrin et Fau (1992)**. Cette différence peut être

expliquée par la durée de traitement et les doses de méthionine administrées, qui sont dans notre cas, respectivement plus courtes et plus faibles.

Les agrégations sanguines et l'épaississement intimal pourraient expliquer en partie le dysfonctionnement endothélial lors de l'hyperhomocystéinémie (**Durand et al., 1997 ; Eikelboom et al., 1999 ; Eberhardt et al., 2000**), qui provoque l'expression des molécules d'adhésion; ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) (**Postea et al., 2006**); E-selectine (**Zhang et al., 2004**) et P-selectine (**Dayal et al., 2006**), cette augmentation d'expression mène à l'adhérence accrue des monocytes à l'endothélium aortique (**Wang et al., 2002**). Par ailleurs, les travaux de **Zhang et al. (2004)** sur des rats traités à la méthionine pendant 14 semaines, suggèrent que le stress oxydatif résultant de l'hyperhomocystéinémie stimule l'activation du facteur nucléaire de transcription NF- κ B, induisant l'activation des facteurs inflammatoires et augmentant la réponse inflammatoire de l'endothélium vasculaire.

Nous avons également remarqué sur nos préparations, la rupture de la limitante élastique interne à plusieurs endroits, ce qui favoriserait le passage de matériel cellulaire et fibreux de la média vers l'intima. D'autre part, cette limitante présente, par endroit, un dédoublement. Nos résultats rejoignent ceux des travaux de **Rolland et al. (1995)**.

Chez les Rats des sables que nous avons soumis à l'administration de méthionine, la média présente des altérations assez importantes. Celles-ci sont essentiellement marquées par des amincissements, des ruptures et des dédoublements des lames élastiques. **Augier et al. (1997)** ont noté ces mêmes altérations chez des animaux hypercholestérolémiques, hyperhomocystéinémiques. Chez des poussins traités à la méthionine pendant 3 semaines, les aortes sont le siège d'une importante histopathologie caractérisée par une importante fragmentation des lames élastiques, une prolifération des CMLs et parfois l'apparition d'anévrismes.

Ces études suggèrent qu'un taux élevé de méthionine ou de ses métabolites, perturbe la configuration normale des microfibrilles, menant ainsi à une désorganisation de la trame élastique (**Hill et al., 2002**). Chez le porc, l'hyperhomocystéinémie a eu comme conséquence des troubles fibro-élastiques une prolifération prononcée des CMLs (**Rolland et al., 1995**). Une étude histologique de la paroi aortique des rats nourris à la méthionine pendant 15 semaines, a montré une perte assez importante des lames élastiques (**Zulli et al., 1998**). **Griffiths et al. (1976)** ont mis en évidence que les réticulations des collagènes et de l'élastine sont diminuées après une injection intrapéritonéale d'homocystéine et de méthionine chez des rats.

Par ailleurs, les taux pathologiques de l'homocystéine induisent une dégradation de la trame élastique de la paroi artérielle, en augmentant la sécrétion des métalloprotéinases élastolytiques de type 2 et 9 (MMP2 ; MMP9) (**Hofmann et al., 2001 ; Chausalet et al., 2004**).

Une dégradation extracellulaire intense a été rapportée aussi bien au niveau des artères de patients homocystinuriques (**Gibson et al., 1964 ; McCully, 1969**), que des artères animaux avec une hyperhomocystéinémie légère (**Donahue et al., 1974 ; Rolland et al., 1995**). Ce remodelage est dominé par un important processus élastolytique dépendant de ces métalloprotéinases (**Augier et al., 1997 ; Charpiot et al., 1998**). Il est particulièrement marqué au niveau de la limitante élastique interne et des premières couches de la média proches de l'endothélium (**McCully, 1969 ; Charpiot et al., 1998**). La culture de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine en présence de concentrations pathologiques d'homocystéine, a permis à **Chausalet et al. (2004)** de préciser que le remodelage de la matrice subendothéliale induit par l'homocystéine impliquerait une synthèse accrue de sérine protéinase et de MMPs.

Bescond et al. (1999) ont montré l'activation, par l'homocystéine, de la pro MMP-2 par un processus non-protéolytique. Une importante expression de MMP-2 et MMP-9 a été associée à une dégradation accrue des structures élastiques de la partie subendothéliale de la média (**Bescond et al., 1999**). La participation de ces 2 MMPs dans la dégradation de l'élastine aortique *in vitro* (**Murphy et al., 1991 ; Senior et al., 1991**) aussi bien que l'élastine dermique (**Berton et al., 2000**) est bien connue. **Emonard et Hornebeck (1997)** signalent que l'élastine peut activer la pro MMP-2 (autoactivation de contact) et mener à sa propre élastolyse.

Beaucoup d'études ont ciblé l'effet de l'homocystéine sur la biologie des cellules endothéliales (**Hajjar, 1993 ; Stamler et al., 1993**). La prolifération des cellules musculaires lisses (CMLs) stimulées par l'homocystéine a été également signalée dans les travaux de **Tsai et al. (1996) ; Woo et al. (2000)**, suggèrent que l'homocystéine puisse agir directement sur les CMLs. La prolifération de CMLs dans la paroi des vaisseaux sanguins est une caractéristique de l'athérosclérose (**Schwartz et al., 1990 ; Ross, 1993 ; Majors et al., 1997**), mais la migration et la prolifération des CMLs de la média est également une caractéristique de l'épaississement progressif intimal qui mène à l'artériosclérose (**Ross, 1995 ; Korpelainen et Alitalo, 1998**). **Harker et al. (1976)** ont observé chez des animaux hyperhomocystéinémiques, des lésions artérioscléreuses typiques ou des lésions intimales préathérosclérotiques avec prolifération des CMLs.

Les observations de plusieurs coupes d'aorte de Rat des sables soumis à l'injection de méthionine nous ont permis de noter un épaississement de l'intima ($2,87 \pm 1,25 \mu\text{m}$ vs $2,13 \pm 0,58 \mu\text{m}$) présentant un aspect clair, probablement oedémateux. Ce dernier serait à confirmer lors d'études ultérieures. Nous avons observé des noyaux endothéliaux hypertrophiés. Ces résultats corroborent ceux de **Osborne-Pellegrin et Fau (1992)** et ceux de **Murthy et al. (2005)**. Ces derniers auteurs mentionnent l'apparition d'une hyperplasie intimale avec une épaisseur totale 4 fois supérieure à celle de l'intima témoin.

Les colorations au trichrome de Masson et à l'acide périodique ont mis en exergue de nombreuses altérations de la média. L'observation détaillée de cette couche montre un changement d'orientation des CMLs en de nombreux points de la paroi aortique. La position radiaire des CMLs par rapport à l'axe aortique semble indiquer leur migration. Nous avons, en outre, observé une prolifération des CMLs de la média. En effet, le nombre de CML par espace interlamellaire est en moyenne de 6 à 7 noyaux contre 3 à 4 noyaux dans la média des *Psammomys obesus* témoins. Ces CMLs ont également subi une modulation phénotypique indiquée par les modifications de leurs paramètres nucléaires (diminution du grand axe et augmentation du petit axe). Elles acquièrent un phénotype prolifératif et synthétique alors qu'à l'état normal elles ont un phénotype quiescent et contractile. Selon **Akasaka et al. (2005)**, l'exposition des CMLs aortiques bovines à l'homocystéine *in vitro*, mène à une activation de la protéine kinase p38 qui va augmenter leurs migration et prolifération. Cette activation de la protéine kinase p38 a également été signalée par **Rousseau et al. (1997) et Hedges et al. (1999)**. Chez des rats soumis à la méthionine, **Murthy et al. (2005)** ont montré qu'une hyperhomocystéinémie provoque la prolifération des CMLs aortiques d'un facteur de 3. Un précédent travail réalisé au sein de notre équipe par **Raaf (2003)** mentionne que l'administration en injection intrapéritonéale pendant 6 mois et 10 mois, de méthionine et à la même dose provoque chez le Rat Wistar, une amplification du nombre de CMLs aortiques.

Nos résultats sont en corrélation avec ceux obtenus *in vitro* par **Majors et al. (1997) et Tyagi (1998)** qui ont noté que l'homocystéine stimule la multiplication de ces cellules. Ces effets sont dus en partie à une augmentation de l'expression de l'ARN messager codant pour la cycline D1 et la cycline A (**Tsai et al., 1994 ; 1996**). Selon **Akasaka et al. (2005)**, l'exposition

des CMLs à 2,0 mmol/L de cystéine ne peut pas influencer leur migration ou activer la p38, ils concluent que ces effets (migration, activation de la p38) sont spécifiques de l'homocystéine et de non son métabolite.

L'étude histologique réalisée, nous a permis de noter un dépôt de collagènes au niveau de la média plus particulièrement autour des lames élastiques et dans les espaces interlamellaires. Au niveau de certains espaces interlamellaires, les CMLs et les collagènes semblent dissociés ce qui laisse supposer une modification des interactions cellule – MEC. La trame élastique de la paroi aortique est également altérée. Nous avons observé, non seulement une altération de la limitante élastique interne (dédoublage, rupture) mais également des lames élastiques. Celles-ci deviennent moins ondulées, amincies et présentant un aspect désorganisé et des ruptures. Ces altérations sont en accord avec celles cités par **Augier et al. (1997)**. Cette équipe a également montré une diminution de la concentration en élastine de la média et une augmentation du nombre de fragments courts d'élastine. Cette atteinte de la trame élastique résulterait de l'augmentation de l'activité élastase-like dépendante des métalloprotéases (**Augier et al., 1997 ; Charpiot et al., 1998**) et l'augmentation de l'activité de la MMP2 (**Tyagi, 1998**) lors d'un état d'hyperhomocystéimie.

A la fin de l'expérimentation, la paroi aortique des Rats des sables hyperhomocystéinémiques présente une altération de l'adventive. En effet, nous avons observé un épaississement de cette couche externe qui atteint 144,8 µm contre 119,8 µm au début de l'expérimentation. A ce niveau, un important dépôt de collagènes (nouvellement synthétisés probablement) forme une sorte de plaque au niveau de laquelle sont observés des macrophages, cellules spécialisées dans la phagocytose. **Majors et al. (1997)** ont rapporté que les CMLs en présence d'homocystéine *in vitro*, augmentent la synthèse de leur matrice extracellulaire particulièrement les collagènes.

Chez ce même animal dont l'état général nous a obligé à le sacrifier, la paroi aortique présente une importante rupture qui débute du côté intimal et se prolonge jusqu'à l'adventice. Nous avons également observé à la limite média-adventice, la présence d'une agrégation sanguine. Il est probable qu'une rupture de la paroi aortique entraînant une infiltration de cellules sanguines soit à l'origine de cette agrégation ou thrombose qui par la suite s'est trouvée emprisonnée par une matrice extracellulaire essentiellement conjonctive.

Wang et al. (2003) ont montré chez des souris d'Apo E^{-/-} que l'hyperhomocystéinémie génétique et diététique est responsable de la lésion de la paroi aortique et de l'augmentation des lipides à ce niveau. Ces auteurs ont noté que l'accumulation de lipides athérogènes dans les lésions vasculaires indique la captation accrue des LDL par des macrophages. Ces données pourraient expliquer en partie la présence de macrophages que nous avons observé au niveau de la paroi aortique du *Psammomys obesus* hyperhomocystéinémique.

En définitive, l'ensemble des altérations observées au niveau de la paroi aortique des Rats des sables hyperhomocystéinémiques sont caractéristiques d'un état athéroscléreux à savoir :

- épaissement intimal,
- changement d'orientation et modulation phénotypique des CMLs,
- altération des interactions cellule-MEC,
- amincissement, fragmentation et rupture de la limitante élastique interne et des lames élastiques,
- accumulation de collagènes.

Bien que la formation d'une plaque fibro-lipidique n'ait pu être observé, nous pouvons au terme de ce travail affirmer que l'homocystéine est un facteur de risque des maladies cardio-vasculaires dont l'athérosclérose.

Cependant, ce travail mériterait d'être complété par une étude portant sur un effectif plus important de Rats des sables. Ce modèle animal, montre une fois de plus, sa sensibilité accrue à divers facteurs de risque cardio-vasculaire et précise l'intérêt de son utilisation non seulement pour l'étude des mécanismes qui sous-tendent ces phénomènes pathologiques mais également son utilisation en thérapeutique.

***CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES***

Notre travail a permis de mettre en évidence les effets de l'administration chronique d'un excès de méthionine sur le remodelage de la paroi artérielle d'un nouveau modèle expérimental, *Psammomys obesus*. Les changements structuraux révélés par les techniques histologiques, histochimiques appropriées et morphométrique montrent que le traitement à la méthionine altère l'organisation de cette paroi, en particulier l'intima et la média.

La paroi vasculaire de *Psammomys obesus* hyperhomocystéinémique est le siège de nombreuses altérations focalisées représentées par

- des agrégations sanguines luminales (microthrombus),
- une hypertrophie de l'endothélium et du sous endothélium,
- des ruptures et dédoublements de la trame élastique (limitante élastique interne et des lames élastiques) de la média,
- une accumulation de collagènes,
- un changement d'orientation et de phénotype des cellules musculaires lisses de la média,
- un épaississement de l'adventice est également observé au niveau des zones altérées,
- au 6ème mois de traitement, la paroi artérielle de *Psammomys* présente deux lésions assez particulières, ainsi une importante rupture pariétale et une thrombose.

Les variations enregistrées au niveau des différents paramètres étudiés (glycémie, triglycéridémie, cholestérolémie, protéinémie et acide urique) et les altérations artérielles, nous permettent de penser que l'homocystéine est un facteur de risque de l'athérosclérose. Cette hypothèse, est par ailleurs, confirmée par l'étude des profils électrophorétiques des lipoprotéines plasmatiques, qui sont caractérisés par une augmentation des molécules athérogènes VLDL et LDL, une diminution spectaculaire des molécules cardioprotectrices HDL et l'apparition de la lipoprotéine (a).

Au terme de ce travail, 3 particularités nous semblent importantes et intéressantes à retenir :

1. **l'homocystéine est un facteur de risque des maladies cardiovasculaires,**
2. **l'extrême sensibilité du Rat des sables à l' homocystéine** par rapport au Rat Wistar. Cette sensibilité a déjà été signalée pour d'autres facteurs de risque,
3. la confirmation pour *Psammomys obesus*, de son appellation de « **modèle de choix** » ou **excellent modèle** pour l'étude de certaines pathologies cardiovasculaires.

Pour une meilleure analyse des résultats obtenus au terme de ce travail, nous envisageons en premier lieu d'effectuer une nouvelle expérimentation, avec la même dose de méthionine administrée, mais avec un échantillonnage plus important.

Cette nouvelle expérimentation nous permettra d'aborder certaines perspectives qui nous semblent nécessaires à la compréhension des mécanismes moléculaires qui sous-tendent les altérations observées tant sur le plan biochimique que le plan histologique :

Parmi ces perspectives, nous pouvons cibler :

- Les altérations touchant la structure histologique de la paroi aortique qui méritent d'être étudiées et précisées sur le plan ultrastructural,
- L'effet de l'hyperhomocystéinémie sur la physiologie et la prolifération des CMLs aortiques par une étude comparative *in vitro* et *in vivo*,
- La modulation phénotypique des CMLs observée, qui pourrait être caractérisée par le typage des isoformes de l'actine et également, par leur activité de biosynthèse de certaines macromolécules matricielles en particulier les collagènes,
- La mise en évidence de certaines macromolécules de la matrice extracellulaire (les glycoprotéines par exemple) par une étude immuno-histochimique,
- Le remodelage de la matrice extracellulaire mis en évidence histologiquement. Il peut être précisé par la caractérisation et la quantification des MMPS impliquées. L'étude de la balance TIMP/MMP serait un excellent marqueur,
- La relation hyperhomocystéinémie-lipoprotéines par la détermination et le dosage des lipoprotéines et de leur oxydation,
- La relation hyperhomocystéinémie-stress oxydatif par l'évaluation de certains produits comme le peroxyde d'hydrogène et le monoxyde d'azote,
- La relation hyperhomocystéinémie-inflammation par une évaluation de certaines cytokines pro-inflammatoires et inflammatoires impliquées dans le processus d'athérosclérose,
- Une étude de l'effet d'une supplémentation en vitamines, tels que les vitamines B2, B6 ou l'acide folique, sur la réduction des effets causés par l'hyperhomocystéinémie.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- **Aasvee K. ; Jauhiainen M. ; Kurvinen E. ; Tur I. ; Sundvall J. ; Roovere T. ; Baburin A.** (2006). Determinants of risks factors of atherosclerosis in the postinfarction period : The Tallinn MI Study Scand. *J. Clin. Lab. Invest.*, **66** : 191-9.
- **Abecassis L. ; Padin S. ; Soni T. ; Le Bihan F.** (2004). Homocystéine et bilan de thrombose. *Imm. Ana. Biol. Spéc.*, **19** : 83–88.
- **Akasaka K. ; Akasaka N. ; Di Luozzo G. ; Sasajima T. ; Sumpio B.E.** (2005). Homocysteine promotes p38-dependent chemotaxis in bovine aortic smooth muscle cells. *J. Vasc. Surg.*, **41** : 517-22.
- **Alfthan G. ; Pekkanen J. ; Jauhiainen M. ; Pitkaniemi J. ; Karvonen M. ; Tuomilehto J.** (1994). Relation of serum homocysteine and lipoprotein (a) concentrations to atherosclerotic disease in a prospective. Finnish population based study. *Atherosclerosis.*, **106** : 9–19.
- **Allain C.C. ; Poon L.S. ; Chan C.S.G.** (1974). Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.*, **20** : 470-75.
- **Al-Shaer M.H. ; Raghuvver G. ; Browning R. ; Sinkey C.A. ; Chenard C. ; Stumbo P. ; Haynes W.G.** (2005). Effect of hyperhomocysteinemia induced by methionine administration on flow mediated dilatation of the brachial artery in healthy subjects. *Am. J. Cardiol.*, **95** (3) : 428-30.
- **Anderson M.E.** (1998). Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem. Biol. Int.*, 111–112, 1–14.
- **Arnadottir M. ; Hultherg B. ; Nilsson-Ehle P. ; Thysell H.** (1996). The effect of reduced glomerular filtration rate on plasma total homocysteine concentration. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **56** (1) : 41-46.
- **Arnadottir M. ; Hultherg B. ; Vladov V. ; Nilsson-Ehle P. ; Thysell H.** (1996). Hyperhomocysteinemia in cyclosporine-treated renal transplant recipients. *Transplantation.*, **61** (3) : 509-12.
- **Atar I. ; Korkmaz M.E. ; Demircan S. ; Atar I.A. ; Bozbas H. ; Aydinalp A. ; Ozin B. ; Yildirim A. ; Muderrisoglu H.** (2005). Beta blocker effects on plasma homocysteine levels in patients with hypertension. *Atherosclerosis.*, **181** (2) : 399-402.
- **Augier T. ; Charpiot P. ; Chareyre C. ; Remusat M. ; Rolland P.H. ; Garçon D.** (1997). Medial elastic structure alterations in atherosclerotic arteries in minipigs: plaque proximity and arterial site specificity. *Matrix Biol.*, **15** : 455–467.
- **Au-Yeung K.K.W. ; Woo C.W.H. ; Sung F.L. ; Yip J.C.W. ; Siow Y.L. ; Karmin O.** (2004). Hyperhomocysteinemia Activates Nuclear Factor- KB in Endothelial Cells via Oxidative Stress. *Circ Res.*, **94** : 28-36.
- **Aviram M.** (1993). Modified forms of low density lipoprotein and atherosclerosis. *Atherosclerosis.*, **98** : 1 – 9.
- **Bailey L.B. ; Moyers S. ; Gregory J.F.** (2001). Folates. In Bowman B.A. ; Russell R.M. (eds) : « Present Knowledge in Nutrition, » 8th ed. *Washington, DC : ILSI Press* : 214 – 229.
- **Barak A.J. ; Beckenhauer H.C. ; Kharbanda K.K. ; Tuma D.J.** (2001). Chronic ethanol consumption increases homocysteine accumulation in hepatocytes. *Alcohol.*, **25** : 77 - 81.

- **Barak A.J. ; Beckenhauer H.C. ; Mailliard M.E. ; Kharbanda K.K. ; Tuma D.J.** (2003). Betaine Lowers Elevated S-Adenosylhomocysteine Levels in Hepatocytes from Ethanol-Fed Rats. *J. Nutr.*, **133** : 2845 –2848.
- **Bayés B. ; Pastor M.C. ; Bonal J. ; Junca J. ; Romero R.** (2001). Homocysteine and lipid peroxidation in haemodialysis : role of folic acid and vitamin E. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **16** : 2172-75.
- **Bellamy M.F. ; McDowell I.F.W.** (1997). Putative mechanisms for vascular damage by homocysteine. *J. Inher. Metab. Dis.*, **20** : 307–15.
- **Berton A. ; Godeau G. ; Emonard H. ; Baba K. ; Bellon P. ; Hornebeck W. ; Bellon G.** (2000). Analysis of the ex-vivo specificity of human gelatinases A and B towards skin collagen and elastic fibers by computerized morphometry. *Matrix Biol.*, **19** : 139–148.
- **Bescond A. ; Augier T. ; Chareyre C. ; Garçon D. ; Hornebeck W. ; Charpiot P.** (1999). Influence of homocysteine on matrix metalloproteinase-2: activation and activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **263** : 498–503.
- **Bodamer O.A. ; Sahoo T. ; Baudet A.L. ; O'Brien W.E. ; Bottiglieri T. ; Stöckler-Ipsiroglu S. ; Wagner C. ; Scaglia F.** (2005). Creatine Metabolism in Combined Methylmalonic Aciduria and Homocystinuria . *Ann. Neurol.*, **57** : 20419-23.
- **Bortolotto L.A. ; Safar M.E. ; Billaud E. ; Lacroix C. ; Asmar R. ; London G.M. ; Blacher J.** (1999). Plasma Homocysteine, Aortic Stiffness, and Renal Function in Hypertensive Patients. *Hypertension.*, **34** , Part 2 : 837 - 842.
- **Bostom A.G. ; Gohh R.Y. ; Morrisey P.** (2000). Hyperhomocysteinemia in chronic renal transplant recipients. *Graft.*, **3** : 195 – 204.
- **Boushey C.J. ; Beresford S.A.A. ; Omenn G.S. ; Motulsky A.G.** (1995). A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA.*, **274** : 1049–57.
- **Brattström L. ; Wilcken D.E.L.** (2000). Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect ?. *Am. J. Clin. Nutr.*, **72** : 315–23.
- **Briani C. ; Cagnin A. ; Gallo L. ; Toffanin E. ; Varagnolo M. ; Zaninotto M. ; Plebani M. ; Ricchieri G. ; Battistin L. ; Pizzolato G.** (2005). Anti-heparan sulphate antibodies and homocysteine in dementia: markers of vascular pathology?. *Journal of the Neurol. Sci.*, **229–230** : 215– 218.
- **Brosnan J.T. ; Jacobs R.L. ; Stead L.M. ; Brosman M.E.** (2004). Methylation demand : a key determinant of homocysteine metabolism. *Acta Polonica.*, **51** : 405 – 413.
- **Cacciari E. ; Salardi S.** (1989). Clinical and laboratory features of homocystinuria. *Haemostasis.*, **19** (Suppl 1) : 10–3.
- **Cagnacci A. ; Malmusi S. ; Zanni A.L. ; Alessandrini C. ; Caretto S. ; Volpe A.** (2004). Comparison of the effect of oral and transdermal hormone therapy on fasting and postmethionine homocysteine levels. *Fertil Steril.*, **81** : 99 – 103.
- **Carson N.A.J. ; Neill D.W.** (1962). Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch. Dis. Child.*, **37** : 505–13.
- **Catargi B. ; Parrot-Roulaud F. ; Cochet C. ; Ducassou D. ; Roger P. ; Tabarin A.** (1999). Homocysteine, hypothyroidism, and effect of thyroid hormone replacement. *Thyroid.*, **9** : 1163 - 6.

- **Chambers J. ; McGregor A. ; Jean-Marie J. ; Obeid O. ; Kooner J.** (1999). Demonstration of a rapid onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia, an effect reversible with vitamin C therapy. *Circulation.*, **99** : 1156–60.
- **Chambers J.C. ; Ueland P.M. ; Wright M. ; Doré C.J. ; Refsum H. ; Kooner J.S.** (2001). Investigation of Relationship Between Reduced, Oxidized, and Protein-Bound Homocysteine and Vascular Endothelial Function in Healthy Human Subjects. *Circ. Res.*, **89** : 187-192.
- **Charpiot P. ; Bescond A. ; Augier T. ; Chareyre C. ; Fraternali M. ; Rolland P.H. ; Garçon D.** (1998). Hyperhomocysteinemia induces elastolysis in minipigs arteries: Structural consequences, arterial site specificity and effect of Captopril–Hydrochlorothiazide. *Matrix Biol.*, **17** : 559–574.
- **Chaussalet M. ; Lamy E. ; Foucault-Bertaud A. ; Genovesio C. ; Sabatier F. ; Dignat-George F. ; Charpiot Ph.** (2004). Homocysteine modulates the proteolytic potential of human vascular endothelial cells. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, **316** : 170–176.
- **Chauveau P. ; Chadefaux B. ; Coude M. ; Aupetit J. ; Hannedouche T. ; Kamoun P. ; Jungers P.** (1992). Increased plasma homocysteine concentration in patients with chronic renal failure. *Miner Electrolyte Metab.*, **18** (2-5) : 196-8.
- **Chauveau P. ; Chadefaux B. ; Coude M. ; Aupetit J. ; Hannedouche T. ; Kamoun P. ; Jungers P.** (1993). Hyperhomocysteinemia, a risk factor for atherosclerosis in chronic uremic patients. *Kidney.*, **41** : 72-7.
- **Chen D. ; Wang Ch.Y. ; Lambert J.D. ; Ai N. ; Welsh W.J. ; Yang Ch.S.** (2005). Inhibition of human liver catechol-O-methyltransferase by tea catechins and their metabolites: Structure–activity relationship and molecular-modeling studies. *Bioch. Pharm.*, **69** : 1523–1531.
- **Chiang P.K. ; Gordon R.K. ; Tal J. ; Zeng, G.C. ; Doctor B.P. ; Pardhasaradhi, K. ; Mc Cann P.P.** (1996). S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB Journal.*, **10** : 471 – 480.
- **Christensen B., Refsum H.; Vintermyr O.; Ueland P.M.** (1991). Homocysteine export from cells cultured in the presence of physiological or superfluous levels of methionine: methionine loading of non-transformed, transformed, proliferating, and quiescent cells in culture. *J. Cell. Physio.*, **146** (1) : 52-62.
- **Colleran K.M. ; Ratliff D.M. ; Burge M.R.** (2003). Potential association of thyrotoxicosis with vitamin B and folate deficiencies, resulting in risk for hyperhomocysteinemia and subsequent thromboembolic events. *Endocr. Pract.*, **9** : 290-5.
- **Cook R.J. ; Wagner C.** (1984). Glycine N-methyltransferase is a folate binding protein of rat liver cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81** : 3631 – 4.
- **Cordoba-Porras A. ; Sanchez-Quesada J.L. ; Gonzalez-Sastre F. ; Ordonez-Lianos J. ; Blanco-Vaca F.** (1996). Susceptibility of plasma low- and high-density lipoproteins to oxidation in patients with severe hyperhomocysteinemia. *J. Mol. Med.*, **74** : 771 – 776.
- **Dalton M. ; Gadson P. ; Wrenn R. ; Rosenquist T.** (1997). Homocysteine signal cascade: production of phospholipids, activation of protein kinase C, and the induction of c-fos and c-myc in smooth muscle cells. *FASEB.*, **11** : 703–11.

- **Daly M. and Daly S.** (1973). On the ecology of *Psammomys obesus* (Rodentia gerbillidae) in the wadi saoura. *Algeria. Mammalia.*, **37** : 546-561.
- **Dayal S. ; Brown K.L. ; Weydert Ch.J. ; Oberley L.W. ; Arning E. ; Bottiglieri T. ; Faraci F.M. ; Lentz S.R.** (2002). Deficiency of Glutathione Peroxidase-1 Sensitizes Hyperhomocysteinemic Mice to Endothelial Dysfunction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **22** : 1996-2002.
- **Dayal S. ; Wilson K.M. ; Leo L. ; Arning E. ; Bottiglieri T. ; Lentz S.R.** (2006). Enhanced susceptibility to arterial thrombosis in a murine model of hyperhomocysteinemia. *Blood.*, **108** : 2237-2243.
- **De Luis D.A. ; Fernandez N. ; Arranz M.L. ; Aller R. ; Izaola O. ; Romero E.** (2005). Total homocysteine levels relation with chronic complications of diabetes, body composition, and other cardiovascular risk factors in a population of patients with diabetes mellitus type 2. *J. Diab. Compl.*, **19** : 42– 46.
- **Dedoussis G.V.Z. ; Panagiotakos D.B. ; Pitsavos C. ; Chrysohoou C. ; Skoumas J. ; Choumerianou D. ; Stefanadis C.** (2005). An association between the methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) C277T mutation and inflammation markers related to cardiovascular disease. *I. J. Card.*, **100** : 409 – 414.
- **Demuth K. ; Drunat S. ; Paul J.L. ; Moati N.** (2000). Hyperhomocystéinémie et athérosclérose. *m./s.*, **16** : 1081 - 90.
- **Dever J.T. ; Elfarra A.A.** (2006). In-Vivo Metabolism of L-Methionine in Mice: Evidence for Stereoselective Formation of Methionine-d-Sulfoxide and Quantitation of Other Major Metabolites. *A.S.P.E.T.*, **34** (12) : 2036-43.
- **Donahue S. ; Struman J.A. ; Gaull G.** (1974). Arteriosclerosis due to homocysteinemia. Failure to reproduce the model in weanling rabbits. *Am. J. Pathol.*, **77** : 163–167.
- **Doshi S. ; McDowell I. ; Goodfellow J. ; Stabler S. ; Boger R. ; Allen R. ; Newcombe R. ; Lewis M. ; Moat S.** (2005). Relationship between S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, asymmetric dimethylarginine, and endothelial function in healthy human subjects during experimental hyper- and hypohomocysteinemia. *Met. Clin. Exp.*, **54** : 351– 360.
- **Durand P. ; Prost M. ; Blache D.** (1996). Pro-thrombotic effects of a folic acid deficient diet in rat platelets and macrophages related to elevated homocysteine and decreased n-3 polyunsaturated fatty acids. *Atherosclerosis.*, **121** : 231 – 43.
- **Eikelboom J.W. ; Lonn E. ; Genest J. ; Hankey G. ; Yusuf S.** (1999). Homocyst(e)ine and cardiovascular disease : a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann. Intern. Med.*, **131** : 363 - 75.
- **Emonard H. ; Hornebeck W.** (1997). Binding of 92 kDa and 72 kDa progelatinases to insoluble elastin modulates their proteolytic activation. *Biol. Chem.*, **378** : 265–271.
- **Emsley A. ; Jeremy J. ; Gomes G. ; Angelini G. ; Planer F.** (1999). Investigation of the inhibitory effects of homocysteine and copper on nitric oxide-mediated relaxation of rat isolated aorta. *Br. J. Pharmacol.*, **126** : 1034–40.
- **Evans R.W. ; Shaten J. ; Hempel J.D. ; Cutler J.A.** (1997). Kuller LH for the MRFIT Research Group Homocyst(e)ine and risk of cardiovascular disease in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **17** : 1947–53.

- **Falcon C.R. ; Cattaneo M. ; Panzeri D. ; Martinelli I. ; Mannucci P.M.** (1994). High prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with juvenile venous thrombosis. *Arterioscler. Thromb.*, **14** : 1080 – 3.
- **Fallon U.B. ; Jarmo V. ; Ian Y. ; Dorothy M.M. ; Yoav B.S. ; Nigel W. ; Alexander S.W. ; George D.S.** (2003). Homocysteine and Cerebral infarction in Finnish Male Smokers. *Stroke.*, **34** : 1359 – 1363.
- **Finkelstein J.D. ; Lyle W.E. ; Martin J.L. ; Pick A.M.** (1975). Activation of cystathionine synthase by adenosylmethionine and adenosylethionine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66** : 81 - 87.
- **Finkelstein J.D. ; Martin J.J.** (2000). Homocysteine. *Int. J. Bioch. Cel. Biol.*, **32** : 385 – 389.
- **Folch J. ; Lees M and Stanly G.H.S.** (1957). A simple method for the isolation on purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**: 497-509.
- **Folsom A.R. ; Nieto J. ; McGovern P.G. ; Tsai M.Y. ; Malinow M.R. ; Eck-feldt J.H.** (1998). Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphism, and B vitamins. *Circulation.*, **98** : 204– 21.
- **Fonseca V.A. ; Fink L.M. ; Kern P.A.** (2003). Insulin sensitivity and plasma homocysteine concentrations in non-diabetic obese and normal weight subjects. *Atherosclerosis.*, **167** : 105 – 109.
- **Fonseca V.A. ; Mudaliar S. ; Schmidt B. ; Fink L.M. ; Kern P.A. ; Henry R.R.** (1998). Plasma homocysteine concentrations are regulated by acute hyperinsulinemia in nondiabetic but not type 2 diabetic subjects. *Metabolism: Clin. Exp.*, **47** : 686 - 9.
- **Fossati P. and Prencipe L.** (1982). Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin. Chem.*, **28** : 2077-80.
- **Fryer R.H. ; Wilson B.D. ; Gubler D.B. ; Fitzgerald L.A. ; Rodgers G.M.** (1993). Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb.*, **13** : 1327-33.
- **Fu W.Y. ; Dudman N.P. ; Perry M.A. ; Wang X.L.** (2002). Leukocytes extravation in acute homocysteinemic rats. *Atherosclerosis.*, **161** : 177 – 183.
- **Fu Y.F. ; Xiong Y. ; Fu S.H.** (2003). Captopril restores the endothelium-dependent relaxation of rat aortic rings after exposure to homocysteine. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **42** : 566–572.
- **Fu Y.F. ; Xiong Y. ; Guo Z.** (2005). A reduction of endogenous asymmetric dimethylarginine contributes to the effect of captopril on endothelial dysfunction induced by homocysteine in rats. *Eur. J. Pharm.*, **508** : 167– 175.
- **Gabe M.** (1968). Techniques histologique. *Ed. Masson et cie, Paris.* 1113p.
- **Ganji V. ; Kafai M.R.** (2003). Third National Health and Nutrition Examination Survey. Demographic, health, lifestyle, and blood vitamin determi-nants of serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988– 1994. *Am. J. Clin. Nutr.*, **77** : 826 – 33.

- **García-Tevijano E.R. ; Berasain C. ; Rodríguez J.A. ; Corrales F.J. ; Arias R. ; Martín-Duce A. ; Caballería J. ; Mato J.M. ; Avila M.A.** (2001). Hyperhomocysteinemia in Liver Cirrhosis. Mechanisms and Role in Vascular and Hepatic Fibrosis. *Hypertension.*, **38** : 1217.
- **Gibson J.B. ; Carson N.A.J. ; Neill D.W.** (1964). Pathological findings in homocystinuria. *J. Clin. Pathol.*, **17** : 427–437.
- **Giltay E.J. ; Hoogeveen E.K. ; Elbers J.M. ; Gooren L.J. ; Asscheman H. ; Stehouwer C.D.** (1998). Effects of sex steroids on plasma total homocysteine levels: a study in transsexual males and females. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83** : 550 – 3.
- **Glowacki R. et Jakubowski H.** (2004). Cross-talk between Cys34 and Lysine Residues in Human Serum Albumin Revealed by N-Homocysteinylolation. *J. Biol. Chem.*, **279** : 10864-71.
- **Glueck C.J. ; Shaw P. ; Lang J.E. ; Tracy T. ; Sieve-Smith L. ; Wang Y.** (1995). Evidence that homocysteine is an independent risk factor for atherosclerosis in hyperlipidemic patients. *Am. J. Cardiol.*, **75** (2) : 132-6.
- **Griffiths R. ; Tudball N. ; Thomas J.** (1976). Effect of induced elevated plasma levels of homocysteine and methionine in rats on collagen and elastin structures. *Connect. Tissue Res.*, **4** : 101–106.
- **Guilland J.C. ; Favier A. ; Potier de Courcy G. ; Galan P. ; Hercberg S.** (2003). L’hyperhomocystéinémie : Facteur de risque cardiovasculaire ou simple marqueur ? –1. Données fondamentales . *Path. Biol.*, **51** : 101 - 110.
- **Gursu M.F. ; Baydas G. ; Cikim G. ; Canatan H.** (2002). Insulin Increases Homocysteine Levels in a Dose-Dependent Manner in Diabetic Rats. *Archives of Medical Research.*, **33** : 305–307.
- **Guttormsen A.B. ; Ueland P.M. ; Svarstad E. ; Resfum H.** (1997). Kinetic basis of hyperhomocysteinemia in patients with chronic renal failure. *Kidney.*, **52** (2) : 495 – 502.
- **Hajjar K.** (1993). Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. *J. Clin. Invest.*, **91** : 2873-9.
- **Harker L. ; Ross R. ; Slichter S. ; Scott C.** (1976). Homocystine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J. Clin. Invest.*, **58** : 731-41.
- **Harma M. ; Harma M. ; Kocyigit A. ; Yaltali T.** (2005). Intranasal 17 β -estradiol treatment and Vitamin B12, folate and homocysteine in menopause. *Maturitas.*, **50** : 353 – 358.
- **Harpel P.C. ; Chang V.T. ; Borth W.** (1992). Homocysteine and other sulfhydryl compounds enhance the binding of lipoprotein (a) to fibrin : a potential biochemical link between thrombosis, atherogenesis, and sulfhydryl compound metabolism. *Proc. Natl. Sci. USA.*, **89** : 10193-10197.
- **Harrison M.J. ; Russell R.W.** (1972). Effect of dexamethasone on experimental cerebral infarction in the gerbil. *J. Neurol. Neurosurq. Psychiatry.*, **35** (4) : 520-1.
- **Hedges J. ; Dechert M. ; Yamboliev I. ; Martin J. ; Hickey E. ; Weber L. ; et al.** (1999). A role for p38MAPK/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration. *J. Bio. Chem.*, **274** : 24211-9.

- **Heinecke W.** (1988). Superoxide-mediated oxidation of low density lipoprotein by thiols. In: Cerutti PA, Fridovich I, McCord M, eds. Oxy-radicals in molecular biology and pathology. *New York: Alan R. Liss*, 443-57.
- **Heinecke W. ; Rosen H. ; Suzuki L.A. ; Chait A.** (1987). The role of sulfur-containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *Biol. Chem.*, **262** : 10098-103.
- **Heinecke J.W.; Kawamura M.; Suzuki L.; Chait A.** (1993). Oxidation of low density lipoprotein by thiol : superoxide-dependent and -independent mechanisms. *J. Lipid. Res.*, **34** : 2051- 2061.
- **Herrmann W. ; Schorr H. ; Obeid R. ; Makowski J. ; Fowler B. ; Kuhlmann M.K.** (2005). Disturbed Homocysteine and Methionine Cycle Intermediates S-Adenosylhomocysteine and S-Adenosylmethionine Are Related to Degree of Renal Insufficiency in Type 2 Diabetes. *Clin. Chem.*, **51** : 891-897.
- **Hickie I. ; Naismith S. ; Ward P.B. ; Scott E. ; Mitchell P. ; Wilhelm K. ; Parker G.** (2005). Vascular risk and low serum B12 predict white matter lesions in patients with major depression. *J. Aff. Dis.*, **85** : 327–332.
- **Hidiroglou N.; Giliani G.S.; Long L.; Zhao X.; Madere R.; Cockell K.; Belonge B.; Ratnayake W.M.N.; Peace R.** (2004). The influence of dietary vitamin E, fat, and methionine on blood cholesterol profile, homocysteine levels, and oxidizability of low density lipoprotein in the gerbil. *J. Nutr. Bio.*, **15**: 730-740.
- **Hill C.H. ; Mecham R. ; Starcher B.** (2002). Fibrillin-2 Defects Impair Elastic Fiber Assembly in a Homocysteinemic Chick Model. *J. Nutr.*, **132** : 2143–2150.
- **Ho P.I. ; Collins S.C. ; Dhitavat S. ; Ortiz D. ; Ashline D. ; Rogers E.** (2001). Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. *J. Neurochem.*, **78** : 249–53.
- **Hofmann M.A. ; Lalla E. ; Lu Y. ; Gleason M.R. ; Wolf B.M. ; Tanji N. ; Ferran L.J. ; Kohl B. ; Rao V. ; Kisiel W. ; Stern D.M. ; Schmidt A.M.** (2001). Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J. Clin. Invest.*, **107** : 675 – 683.
- **Holven K.B. ; Scholz H. ; Halvorsen B. ; Aukrust P. ; Ose L. ; Nenseter M.S.** (2003). Hyperhomocysteinemic Subjects Have Enhanced Expression of Lectin-Like Oxidized LDL Receptor-1 in Mononuclear Cells. *J. Nutr.*, **133** : 3588–3591.
- **Hopkins I. ; Townley R.R. ; Shipman R.T.** (1969). Cerebral thrombosis in a patient with homocystinuria. *J. Pediatr.*, **75** : 1082–3.
- **Hortin G.L.; Seam N.; Hoehn G.T.** (2006). Bound Homocysteine, Cysteine, and Cysteinylglycine Distribution between Albumin and Globulins. *Clin. Chemis.*, **52** : 2258-2264.
- **House J.D. ; Brosnan M.E. ; Brosnan J.T.** (1998). Renal uptake and excretion of homocysteine in rats with acute hyperhomocysteinemia. *Kidney Int.*, **54** : 1601 – 1607.
- **Hu R. ; Zhang X.X. ; Wang W.Q. ; Lau C.P. ; Tse H.F.** (2005). Smoking, homocysteine and degree of arteriolar retinopathy. *Atherosclerosis.*, **183** (1) : 95-100.
- **Huang R.S.; Hsu Y.; Lin H.; Yang F.L.** (2001). Folate depletion and elevated plasma homocysteine promote oxidative stress in rat livers. *J. Nutr.*, **131** : 33 – 8.

- **Hung J. ; Beilby J.P. ; Knuiman M.W. ; Divitini M.** (2003). Folate and vitamin B-12 and risk of fatal cardiovascular disease : cohort study from Busselton, Western Australia. *B.M.J.* , **326** : 7381 - 131.
- **Hussein W.I. ; Green R. ; Jacobson D. ; Faiman C.** (1999). Normalization of hyperhomocysteinemia with l-thyroxine in hypothyroidism. *Ann. Intern. Med.*, **131** : 348-51.
- **Jacobsen D.W.** (1996) : Determinants of hyperhomocysteinemia : a matter of nature and nurture. *Am. J. Clin. Nutr.*, **64** : 641 - 642.
- **Jacques P.F. ; Bostom A.G. ; Selhub J. ; Rich S. ; Ellison R.C. ; Eckfeldt J.H. ; Gravel R.A. ; Rozen R.** (2003). Effects of polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase on total plasma homocysteine in the NHLBI Family Heart Study. *Atherosclerosis.*, **166** : 49 – 55.
- **Jacques P.F. ; Bostom A.G. ; Williams R.R. ; Ellison R.C. ; Eckfeldt J.H.** (1996). Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation.*, **93** : 7–9.
- **Jakubowski H.** (2002). Homocysteine is a protein amino acid in humans. Implications for homocysteine linked disease. *J. Biol. Chem.*, **277** : 30425 – 8.
- **Jencks D.A. ; Matthews R.G.** (1987). Allosteric inhibition of methylenetetra-hydrofolate reductase by adenosylmethionine. *J. Biol. Chem.*, **262** : 2485 - 2493.
- **Jenkins D.J.A. ; Kendall C.W.C. ; Jackson C.J.C. ; Connelly Ph.W. ; Parker T. ; Faulkner D. ; Vidgen E. ; Cunnane S.C. ; Leiter L.A. ; Josse R.G.** (2002). Effects of high- and low-isoflavone soyfoods on blood lipids, oxidized LDL, homocysteine, and blood pressure in hyperlipidemic men and women. *Am. J. Clin. Nutr.*, **76** : 365–72.
- **Jungers P. ; Massy Z.A. ; Khoa1 T.N. ; Fumeron C. ; Labrunie M. ; Lacour1 B. ; Descamps-Latscha B. ; Man N.K.** (1997). Incidence and risk factors of atherosclerotic cardiovascular accidents in predialysis chronic renal failure patients: a prospective study. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **12** : 2597–2602
- **Kalwakami K.** (1989). A rapid electrophoretic method for the detection of serum Lp (a) lipoprotein. *Clin. Chem. Acta.*, **185**: 147-156.
- **Khan M. ; Yamauchi M. ; Srisawasdi S. ; Stiner D. ; Doty S. ; Paschalis E.P.** (2001). Homocysteine decreases chondrocyte-mediated matrix mineralisation in differentiating chick limb-bud mesenchymal cell micro-mass cultures. *Bone.*, **28** : 387–98.
- **Kharbanda K.K. ; Rogers D.D. ; Mailliard M.E. ; Siford G.L. ; Barak A.J. ; Beckenhauer H.C. ; Sorrell M.F. ; Tuma D.J.** (2005). A Comparison of the Effects of Betaine and S-Adenosylmethionine on Ethanol-Induced Changes in Methionine Metabolism and Steatosis in Rat Hepatocytes. *J. Nutr.*, **135** :519-524.
- **Korpelainen E. ; Alitalo K.** (1998). Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **10** : 159-64.
- **Korpelainen E. ; Alitalo K.** (1998). Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **10** : 159-64.
- **Lentz S.R. ; Sadler J.E.** (1991). Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *Clin. Invest.*, **88** : 1906-14.

- **Lentz S.R.; Malinox M.R.; Piegors D.J.; Bhopathar M.; Faraci F.M.; Heistad D.D.** (1997). Consequences of hyperhomocyst(e)inemia on vascular function in atherosclerotic monkeys. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **17** : 2930 – 34.
- **Li N. ; Chen Y.F. ; Zou A.P.** (2002). Implications of Hyperhomocysteinemia in Glomerular Sclerosis in Hypertension. *Hypertension.*, **39**, Part 2 : 443 - 448.
- **Liao D.; Tan H.; Hui R.; Li Zh.; Jiang X.; Gaubatz J.; Yang F.; Durante W.; Chan L.; Schafer A.I.; Pownall H.J.; Yang X.; Wang H.** (2006). Hyperhomocysteinemia Decreases Circulating High-Density Lipoprotein by Inhibiting Apolipoprotein A-I Protein Synthesis and Enhancing HDL Cholesterol Clearance. *Cir. Res.*, **99** : 598
- **Lien E.A. ; Nedrebo B.G. ; Varhaug J.E. ; Nygard O. ; Aakvaag A. ; Ueland P.M.** (2000). Plasma total homocysteine levels during short-term iatrogenic hypothyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85** : 1049- 53.
- **Loscalzo J.** (1996). The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *Clin. Invest.*, **98** : 5-7.
- **Lussier-Cacan S.; Xhignesse M.; Piolot A.; Selhub J.; Davignon J.; Genest Jr.J.** (1996). Plasma total homocysteine in healthy subjects: sex-specific relation with biological traits. *Am. J. Clin. Nutr.*, **64** : 587-93.
- **Lynch S.M. ; Strain J.J.** (1989). Increased hepatic lipid peroxidation with methionine toxicity in the rat. *Free Rad. Res. Comm.*, **5** : 221-6.
- **Majors A. ; Ehrhat A. ; Pezacka E.H.** (1997). Homocysteine as a Risk Factor for Vascular Disease. Enhanced Collagen Production and Accumulation by Smooth Muscle Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **17** : 2074 – 81.
- **Mannisto P.T. ; Ulmanen I. ; Lundstrom K. ; Taskinen J. ; Tenhunen J. ; Tilgman C.** (1992). Characteristics of catechol O-methyl-transferase (COMT) and properties of selective COMT inhibitors. *Prog. Drug. Res.*, **39** : 291 - 350.
- **Mansoor M.A. ; Svardal A.M. ; Ueland P.M.** (1992). Determination of the in vivo redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine and glutathione in human plasma. *Anal. Biochem.*, **200** : 218 – 29.
- **Marchesoni D. ; Driul L. ; Plaino L. ; Villani M.T. ; Becagli L. ; Mozzanega B.** (2003). Menopause rather than estrogen modifies plasma homocysteine levels. *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, **81** : 293 – 7.
- **Marsh E.N.** (1999). Coenzyme B12 (cobalamin)-dependent enzymes. *Essays Biochem.*, **34** : 139 – 54.
- **Martinelli I. ; Battaglioli T. ; Pedotti P. ; Cattaneo M. ; Mannucci P.M.** (2003). Hyperhomocysteinemia in cerebral vein thrombosis. *Blood.*, **102** : 1363 – 66.
- **Martinez M.; Cuskelly G.; Williamson J.; Toth J.P.; Gregory J.F.** (2000). Vitamin B6 Deficiency in Rats Reduces Hepatic Serine Hydromethyltransferase and Cystathionine β -Synthase Activities and Rates of In Vivo Protein Turnover, Homocysteine Remethylation and Transsulfuration. *J. Nutr.*, **130** : 111 – 23.
- **Martinez-Triguero ML, Hernandez-Mijares A, Nguyen TT, Munoz ML, Pena H, Morillas C, et al.** (1998). Effect of thyroid hormone replacement on lipoprotein (a), lipids, and apolipoproteins in subjects with hypothyroidism. *Mayo. Clin. Proc.*, **73** : 837-41.

- **Martoja R. et Martoja M.** (1967). Initiation aux techniques de l'histologie animale. *Ed. Masson et cie, Paris.*
- **Massy Z.A. ; Chadefaux-Vekemans B. ; Chevalier A. ; Bade C.A. ; Drüeke T.B. ; Legendre C. ; Lacour B. ; Kamoun P. ; Kreis H.** (1994). Hyperhomocysteinaemia: a significant risk factor for cardiovascular disease in renal transplant recipients. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **9** : 1103-1108.
- **McCully K.S.** (1969). Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am. J. Pathol.*, **56** : 111–128.
- **McCully K.S.** (1975). Growth disorders and homocysteine metabolism. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **5** : 147-152.
- **McCully K.S.** (1994). Chemical pathology of homocysteine. II. Carcinogenesis and homocysteine. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **24** : 27–59.
- **McCully K.S. ; Olszewski A.J. ; Vezeridis M.P.** (1990). Homocysteine and lipid metabolism in atherogenesis: effect of the homocysteine thiolactonyl derivatives, thioretinaco and thioretinamide. *Atherosclerosis.*, **83** : 197–206.
- **McDowell I.F.W. and Lang D.** (2000). Homocysteine and Endothelial Dysfunction: A Link with Cardiovascular Disease. *J. Nutr.*, **130** : 369–372.
- **Mezdour H. ; Parra H.J. ; Aguié-Aguié G. ; Fruchart J.C.** (1990). La lipoprotéine (a) un marqueur additionnel de l'athérosclérose. *Ann. Biol. Clin.*, **48**: 139-153.
- **Miller A. ; Mujumdar V. ; Shek E. ; Guillot J. ; Angelo M. ; Palmer L. ; Tyagi S.C.** (2000). Hyperhomocyst(e)inemia induces multiorgan damage. *Heart vessels.*, **15** : 135 – 43.
- **Miller J.W. ; Ribaya-Mercado J.D. ; Russell R.M. ; Shephard D.C. ; Morrow F.D.** (1992). Total homocysteine in fasting plasma is not a good indicator of B6 deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.*, **55** : 1154–60.
- **Miner S.E.S. ; Evroski J. ; Cole D.E.C.** (1997). Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. *Clin. Biochem.*, **30** : 189–201.
- **Moundras C. ; Remesy C. ; Levrat M.A. ; Demigne C.** (1995). Methionine deficiency in rats fed soy protein induces hypercholesterolemia and potentiate lipoprotein susceptibility to peroxidation. *Metabolism.*, **44** : 1146-52.
- **Mudd S.H. ; Ebert M.H. ; Scriver C.R.** (1980). Labile methyl group balances in the human: the role of sarcosine. *Metabolism.*, **29** : 707 – 20.
- **Mudd S.H. ; Finkelstein J.D. ; Irreveré F. ; Laster L.** (1964). Homocystinuria : an enzymatic defect. *Science.*, **143** : 1443–5.
- **Mudd S.H. ; Finkelstein J.D. ; Refsum H. ; Ueland P.M. ; Malinow M.R. ; Lentz S.R. ; Jacobsen D.W. ; Brattström L. ; Wilcken B. ; Wilcken D.E.L. ; Blom H.J. ; Stabler S.P. ; Allen R.H. ; Selhub J. ; Rosenberg I.H.** (2000). Homocysteine and its disulfide derivatives. A suggested consensus terminology. *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.*, **20** : 1704 - 07.
- **Mudd S.H. ; Levy H.L. ; Skovby F.** (1989). Disorders of transsulfuration. In : Scriver C.R. ; Beaudet A.L. ; Valle D. ; Sly W.S., editors. *The metabolic basis of inherited disease*, 6th ed. New York7 Mc Graw Hill : 693.

- **Mudd S.H. ; Levy H.L. ; Skovby F.** (1995). Disorders of transsulfuration. In : Scriver C.R. ; Beaudet A.L. ; Valle D. ; Sly W.S., editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease, 7th ed. New York : Mc Graw Hill Book, **1** : 1270 – 327.
- **Mudd S.H. ; Levy H.L. ; Kraus J.P.** (2001). Disorders of transsulfuration. In: Scriver C.R. ; Beaudet A.L. ; Valle D. ; Sly W.S., editors. The metabolic and molecular basis of inherited disease, 8th ed. New York7 Mc Graw Hill : 2007 – 56.
- **Mudd S.H. ; Poole J.R.** (1975). Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. *Metabolism.*, **24** : 721 – 34.
- **Mudd S.H. ; Skovby F. ; Levy H.L.** (1985). The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.*, **37** : 1–31.
- **Murphy G. ; Cockett M.I. ; Ward R.V. ; Docherty A.J.** (1991). Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan: a quantitative comparison of the activities of 95 kDa and 72 kDa gelatinases, stromelysins-1 and -2 and punctuated metalloproteinase (PUMP). *Biochem. J.*, **277** : 277–279.
- **Murray L. ; Dalaa S. ; Rico P. ; Chenault V.** (2004). Evaluation of the Estrous Cycle in the Sand Rat, (*Psammomys obesus*), an Animal Model of Nutritionally Induced Diabetes Mellitus. *Online J. Vet. Res.*, **8** : 7 – 15.
- **Mursu J. ; Voutilainen S. ; Nurmi T. ; Alfthan G. ; Virtanen J.K. ; Rissanen T.H. ; Happonen P. ; Nyysfnen K. ; Kaikkonen J. ; Salonen R. ; Salonen J.T.** (2005). The effects of coffee consumption on lipid peroxidation and plasma total homocysteine concentrations: a clinical trial. *F. Rad. Biol. Med.*, **38** : 527– 534.
- **Murthy S.N. ; Obregon D.F. ; Chattergoon N.N. ; Fonseca N.A. ; Mondal D. ; Dunne J.B. ; Diez J.G. ; Jeter J.R. ; Kadowitz Ph.J. ; Agrawal K.C. ; McNamara D.B. ; Fonseca V.A.** (2005). Rosiglitazone reduces serum homocysteine levels, smooth muscle proliferation, and intimal hyperplasia in Sprague-Dawley rats fed a high methionine diet. *Met. Clin. Expe.*, **54** : 645– 652.
- **Naruszewicz M. ; Mirkiewicz E. ; Olszewski A.J.** (1994). Thiolation of lowdensity lipoprotein by homocysteine thiolactone causes increased aggregation and altered interaction with cultured macrophages. *Nutr. Metab. Cardiovasc.*, **4** : 70-77.
- **Nedrebo B.G. ; Ericsson U.B. ; Nygard O. ; Refsum H. ; Ueland P.M. ; Aakvaag A.** (1998). Plasma total homocysteine levels in hyperthyroid and hypothyroid patients. *Metabolism.*, **47** : 89 - 93.
- **Nishinaga M. ; Ozawa T. ; Shimada K.** (1993). Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. *Clin. Invest.*, **92** : 1381 - 6.
- **Olsewski A. ; McCully K.** (1993). Homocysteine metabolism and the oxidative modification of proteins and lipids. *Free Radic. Biol. Med.*, **14** : 683–93.
- **Osborne-Pellegrin M.J. et Fau D.** (1992). Effects of Chronic Absorption of Dietary Supplements of Methionine and cysteine on Arterial Morpathology in the Rat. *Exp. Molec. Path.*, **56** : 49-59.
- **Panagiotakos D.B. ; Pitsavos C. ; Zeimbekis A. ; Chrysohoou C. ; Stefanadis C.** (2005). The association between lifestyle-related factors and plasma homocysteine levels in healthy individuals from the " ATTICA " Study . *I. J. Card.*, **98** : 471 – 477.

- **Parameswaran N.C.P. ; Viswanathan G. ; Noronha J.M.** (1994). Folate-mediated incorporation of ring-2-carbon of histidine into nucleic acids: influence of thyroid hormone. *Metabolism.*, **43** : 1575 - 8.
- **Petter F.** (1961). Repartition géographique et écologie des rongeurs désertiques de la region paléarctique. *Mammalia.*, **25** : 1- 223.
- **Postea O. ; Krotz F. ; Henger A. ; Keller Ch. ; Weiss N.** (2006). Stereospecific and Redox-Sensitive Increase in Monocyte Adhesion to Endothelial Cells by Homocysteine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **26** : 508-513.
- **Raaf L.** (2003). Effet de l'hyperhomocystéinémie sur la matrice extracellulaire de la paroi d'aorte du rat de laboratoire *Rattus norvegicus*. Thèse de magister. USTHB. Alger.
- **Rampersaud G.C. ; M.S. ; R.D. ; Kauwell G.P.A. ; Ph.D. ; R.D. ; Bailey L.B. ; Ph.D.** (2003). Folate : A Key to Optimizing Health and Reducing Disease Risk in the Elderly. *J. Am. Coll. Nutr.*, **22** : 1 – 8.
- **Ratnoff O.D.** (1968). Activation of Hageman factor by L-homocystine. *Science*, **162** : 1007 - 9.
- **Refsum H. ; Helland S. ; Ueland P.M.** (1985). Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine. *Clin. Chem.*, **31** : 624 – 628.
- **Refsum H. ; Guttormsen A.B. ; Fiskerstrand T. ; Ueland P.M.** (1998). Hyperhomocysteinemia in terms of steady-state kinetics. *Eur. J. Pediatr.*, **157** : S45 – S49.
- **Rodgers G.M. ; Conn M.T.** (1990). Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood*, **75** : 895-901.
- **Rodgers G.M. ; Kane W.H.** (1986). Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *Clin. Invest.*, **77** : 1909-16.
- **Rolland P.H. ; Friggi A. ; Barlatier A. ; Piquet P. ; Latrille V. ; Faye M.M. ; Guillou J. ; Charpiot P. ; Bodard H. ; Ghiringhelli O. ; Calaf R. ; Luccioni R. ; Garçon D.** (1995). Hyperhomocysteinemia-Induced Vascular Damage in the Minipig. Captopril-Hydrochlorothiazide Combination Prevents Elastic Alterations. *Circulation.*, **91** : 1161-1174.
- **Rolland P.H. ; Friggi A. ; Barlatier A. ; Piquet P. ; Latrille V. ; Faye M.M. ; Guillou J. ; Charpiot P. ; Bodard H. ; Ghiringhelli O. ; Calaf R. ; Luccioni R. ; Garçon D.** (1995). Hyperhomocysteinemia-induced vascular damage in the minipig. *Circulation.*, **91** : 1161–1174.
- **Ross R.** (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.*, **362** : 801-9.
- **Ross R.** (1995). Cell biology of atherosclerosis. *Annu. Rev. Physiol.*, **57** : 791-804.
- **Rousseau S. ; Houle F. ; Landry J. ; Hout J.** (1997). p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene.*, **15** : 2169-77.
- **Sardharwalla I.B. ; Fowler B. ; Robins A.J. ; Komrower G..M.** (1974). Detection of heterozygotes for homocystinuria. Study of sulfur-containing amino acids in plasma and urine after L-methionine loading. *Arch. Dis. Child.*, **49** : 553 - 9.

- **Sawle Ph. ; Foresti R. ; Green C.J. ; Motterlini R.** (2001). Homocysteine attenuates endothelial haem oxygenase-1 induction by nitric oxide (NO) and hypoxia. *FEBS Letters.*, **508** : 403-406.
- **Schaefer E.J. ; Foster D.M. ; Jenkins L.L. ; Lindgren F.T. ; Berman M. ; Levy R.I. ; Brewer H.B.** (1979). The composition and metabolism of high density lipoprotein subfractions. *Lipids.*, **14** : 511-522.
- **Schmidt-Nielsen K. ; Haines H.B. ; Hackel D.B.** (1964). Diabetes mellitus in the sand rat induced by standard laboratory diets. *Science.*, **143** : 689-690.
- **Schultz A.** (1984). Uric acid. *Clin. Chem.*, **418** : 1261-66.
- **Schwartz S. ; Heimark R. ; Majesky M.** (1990). Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Physiol. Rev.*, **70** : 1177-209.
- **Selhub J.** (1999). Homocysteine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.*, **19** : 217 – 46.
- **Selhub J. ; Miller J.W.** (1992). The pathogenesis of homocysteinemia : interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am. J. Clin. Nutr.*, **55** : 131 - 138.
- **Sengupta S. ; Wehbe C. ; Majors A.K. ; Ketterer M.E. ; DiBello P.M. ; Jacobsen D.W.** (2001). Relative Roles of Albumin and Ceruloplasmin in the Formation of Homocystine, Homocysteine-Cysteine-mixed Disulfide, and Cystine in Circulation. *J. Biol. Chem.*, **276 (50)** : 46896–904.
- **Senior R.M. ; Griffin G.L. ; Fliszar C.J. ; Shapiro S.D. ; Goldberg G.I. ; Welgus H.G.** (1991). Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *J. Biol. Chem.*, **266** : 7870–7875.
- **Shafir E.** (2001). Albert Renold memorial lecture: molecular background of nutritionally induced insulin resistance leading to type 2 diabetes – from animal models to Humans. *Int. Jnl. Experimental. Diab. Res.*, **2** : 299-319.
- **Shah P.K.; Falk E.; Badimon J.J.; Fernández-Ortiz A.; Mailhac A.; Villareal-Levy G.; Fallon J.T.; Regnstrom J.; Fuster V.** (1995). Human monocytederived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques: potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation.*, **92** : 1565–1569.
- **Smith D.L. ; Bodamer O.A.** (2002). Practical management of combined methylmalonicaciduria and homocystinuria. *J. Child. Neurol.*, **17** : 353 – 6.
- **Smith T.P. ; Cruz C.P. ; Brown A.T. ; Eidt J.F. ; Moursi M.M.** (2001). Folate supplementation inhibits intimal hyperplasia induced by high-homocysteine diet in a rat carotid endarterectomy model. *J. Vasc. Surg.*, **34** : 474 – 481.
- **Soinio M.; Marniemi J.; Laakso M.; Lehto S.; Ronnema T.** (2004). Elevated plasma homocysteine level is an independent predictor of coronary heart disease events in patients with type 2 diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.*, **140** : 94 - 100.
- **Splaver A. ; Lamas G.A. ; Hennekens C.H.** (2004). Homocysteine and cardiovascular disease: biological mechanisms, observational epidemiology, and the need for randomized trials. *Am. Heart. J.*, **148** : 34–40.

- **Stamler J.; Osborne J.; Jaraki O.; Rabbani L.; Mullins M.; Singel D.; et al.** (1993). Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J. Clin. Invest.*, **91** : 308-18.
- **Stead L.M. ; Au K.P. ; Jacobs R.L. ; Brosnan M.E. ; Brosnan J.T.** (2001). Methylation demand and homocysteine metabolism: effects of dietary provision of creatine and guanidinoacetate. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **281** : 1095-1100.
- **Sugiyama K. et Muramatsu K.** (1990). Significance of amino acid composition of dietary protein in the regulation of plasma cholesterol. *J. Nutr. Sci. Vitam.*, **36** : 1058-108.
- **Suk Danik S.J.; Rifai N.; Buring J.E.; Ridker P.M.** (2006). Lipoprotein (a), measured with an assay independent of apolipoprotein (a) isoform size, and risk of future cardiovascular events among initially healthy women. *JAMA.*, **296** : 1363-70.
- **Sundström J. ; Sullivan L. ; R.B. D'Agostino ; Jacques P.F. ; Selhub J. ; Rosenberg I.H. ; Wilson P.W.F. ; Levy D. ; Vasan R.S.** (2003). Plasma Homocysteine, Hypertension Incidence, and Blood Pressure Tracking. The Framingham Heart Study. *Hypertension.*, **42** : 1100-1105.
- **Suzuki Y. ; Lorenzi M. ; Shi S. ; Day R. ; Blumberg J.** (2000). Homocysteine exerts cell type-specific inhibition of AP1 transcription factor. *Free Rad. Biol. Med.*, **28** : 39–45.
- **Tabas I.** (1999). Nonoxidative modifications of lipoproteins in atherogenesis. *Annu. Rev. Nutr.*, **19** : 123 – 139.
- **Takagi H. ; Umemoto T.** (2005). Homocysteinemia is a risk factor for aortic dissection. *Medical Hypotheses.*, **64** : 1007–10.
- **Tateishi N. ; Higashi T. ; Naruse A. ; Hikata K. ; Sakamoto Y.** (1981). Relative contribution of sulfur atoms of dietary cysteine and methionine to rat liver glutathione and protein. *J. Biochem.*, **90** : 1603-10.
- **Tawakol A. ; Omland T. ; Gerhard M. ; Wu J.T. ; Creager M.A.** (1997). Hyperhomocyst(e)inemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilatation in humans. *Circulation.*, **95** : 1119–21.
- **Toborek M.; Kopieczna-Grzebieniak E.; Drozd M.; Wieczorek M.** (1995). Increased lipid peroxidation as a mechanism of methionine-induced atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis.*, **115** : 214 - 7.
- **Tonstad S. ; Refsum H. ; Ueland P.M.** (1997). Association Between Plasma Total Homocysteine and Parental History of Cardiovascular Disease in Children With Familial Hypercholesterolemia *Circulation.*, **96** : 1803-1808.
- **Tonstad S. ; Smerud K. ; Hoie L.** (2002). A comparison of the effects of 2 doses of soy protein or casein on serum lipids, serum lipoproteins, and plasma total homocysteine in hypercholesterolemic subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, **76** : 78–84.
- **Torres L.; Garcia-Trevijano E.R.; Rodriguez J.A.; Carretero M.V. ; Bustos M. ; Fernandez E.; Equinoa E.; Mato J.M.; Avila M.A.** (1999). Induction of TIMP-1 expression in rat hepatic stellate cells and hepatocytes: a new role for homocysteine in liver fibrosis. *Biocim. Biophys. Acta.*, **1455** (1) : 12-22.
- **Trinder P.** (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.*, **6** : 24.

- **Tsai J. ; Wang H. ; Perrella M. ; Yoshizumi M. ; Sibinga N. ; Tan L. ; et al.** (1996). Induction of cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.*, **97** : 146-53.*
- **Tsai J.C. ; Perrella M. ; Yoshizumi M. ; Hsier C.M. ; Haber E. ; Schlegel R.** (1994). Promotion of vascular smooth cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91** : 6369–73.
- **Tyagi S.C.** (1998). Homocysteine redox receptor and regulation of extracellular matrix components in vascular cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **274** : C396 – 5.
- **Ubbink J.B. ; Fehily A.M. ; Pickering J. ; Elwood P.C. ; Vermaak W.L.** (1998). Homocysteine and ischaemic heart disease in the Caerphilly cohort. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **140** : 3549–60.
- **Ueland P.M.** (1982). Pharmacological and biochemical aspects of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Pharmacol. Rev.*, **34** : 223–53.
- **Ueland P.M.** (1982). Pharmacological and biochemical aspects of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Pharmacol. Rev.*, **34** : 223–53.
- **Ueland P.M.** (1995). Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin. Chem.*, **41** : 340-2.
- **Ueland P.M. ; Refsum H. ; Beresford S.A.A. ; Vollset S.E.** (2000). The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am. J. Clin. Nutr.*, **72** : 324–32.
- **Ueland P.M. ; Refsum H. ; Stabler S.P. ; Malinow M.R. ; Andersson A. ; Allen R.H.** (1993). Total homocysteine in plasma or serum : Methods and clinical applications. *Clin. Chem.*; **39** : 1764 - 1779.
- **Upchurch G. ; Welch G. ; Fabiani A. ; Freedman J. ; Johnson J. ; Keaney J.** (1997). Homocysteine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.*, **27** : 17012–7.
- **Upchurch G.R. ; Welch G.N. ; Loscalzo J.** (1996). Homocysteine, EDRF, and endothelial function. *J. Nutr.*, **126**: 1290.
- **Uthus E.O. ; Yokoi K. ; Davis C.D.** (2002). Selenium Deficiency in Fisher-344 Rats Decreases Plasma and Tissue Homocysteine Concentrations and Alters Plasma Homocysteine and Cysteine Redox Status. *J. Nutr.*, **132** : 1122–28.
- **Van Guldener C. ; Gans R.O. ; ter Wee P.M.** (1995). Constant infusion clearance is an inappropriate method for accurate assesment of an impaired glomerular filtration rate. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **10** (1) : 47 – 51.
- **Van Guldener C. ; Stehouwer C.D.** (2000). Hyperhomocysteinemia, vascular pathology, and endothelial dysfunction. *Semin. Thromb. Hemost.*, **26** : 281–9.
- **Van Oort F.V. ; Melse-Boonstra A. ; Brouwer I.A. ; Clarke R. ; West C.E. ; Katan M.B. ; Verhoef P.** (2003). Folic acid and reduction of plasma homocysteine concentration in older adults : a dose-response study. *Am. J. Clin. Nutr.*, **77** : 1318 – 23.
- **Venn B.J. ; Green T.J. ; Moser R. ; Mann J.I.** (2003). Comparison of the effect of low-dose supplementation with L-5-methyltetrahydrofolate or folic acid on plasma homocysteine : a randomized placebo-controlled study. *Am. J. Clin. Nutr.*, **77** : 658 – 62.

- **Voutilainen S. ; Lakka T.A. ; Hämelehti P. ; Lehtimäki T. ; Poulsen H.E. ; Salonen J.T.** (2000). Plasma total homocysteine concentration and the risk of acute coronary events: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *J. Intern. Med.*, **248** : 217–22.
- **Voutilainen S.; Morrow J.D.; Roberts L.J.; Alfthan G.; Alho H.; Nyssonen K.; Salonen J.T.** (1999). Enhanced *in vivo* lipid peroxidation at elevated plasma total homocysteine levels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **19** : 1263 – 1266.
- **Wald D.S. ; Law M. ; Morris J.K.** (2002). Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *B.M.J.*, **325** : 1202 – 8.
- **Wang G. ; Dai J. ; Mao J. ; Zeng X. ; Yang X. ; Wang X.** (2005). Folic acid reverses hyper-responsiveness of LPS-induced chemokine secretion from monocytes in patients with hyperhomocysteinemia. *Atherosclerosis.*, **179** : 395–402.
- **Wang G. ; Woo C.W.H. ; Sung F.L. ; Siow Y.L. ; Karmin O.** (2002). Increased Monocyte Adhesion to Aortic Endothelium in Rats With Hyperhomocysteinemia. Role of Chemokine and Adhesion Molecules. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **22** : 1777–1783.
- **Wang H.; Jiang X.H.; Yang F.** (2003). Hyperhomocysteinemia accelerates atherosclerosis in cystathionine β -synthase and apolipoprotein E double knock-out mice with and without dietary perturbation. *Blood.*, **101** : 3901-3907.
- **Weiss N. ; Feussner A.; Hailer S. ; Spengel F.A. ; Keller C.; Wolfram G.** (1999). Influence of folic acid, pyridoxal phosphate and cobalamin on plasma homocyst(e)ine levels and susceptibility of low-density lipoprotein to *ex-vivo* oxidation. *Eur. J. Med. Res.*, **4** : 425 – 432.
- **Welch G.N. ; Loscalzo J.** (1998). Homocysteine and atherothrombosis. *N. Engl. J. Med.*, **338** : 1042 - 50.
- **Welch G.N. ; Loscalzo J.** (1998). Homocysteine and atherothrombosis. *N. Engl. J. Med.*, **15** : 1042 – 50.
- **Welch G.N. ; Upchurch G.R.J. ; Loscalzo J.** (1997). Hyperhomocyst(e)inemia and atherothrombosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **811** : 48-58.
- **Werstuck G.H. ; Lentz S.R. ; Dayal S. ; Hossain G.S. ; Sood S.K. ; Shi Y.Y. ; Zhou J. ; Maeda N. ; Krisans S.K. ; Malinow M.R. ; Austin R.C.** (2001). Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J. Clin. Invest.*, **107** : 1263 –1273.
- **Wieland H. ; Seidel D. ; Wiegand V. ; Kreuzer H.** (1980). Serum lipoproteins profile and coronary artery disease (CAD). Comparison of the lipoprotein profile with the results of coronary angiography. *Atherosclerosis.*, **36** : 269-280.
- **Wiley V.C. ; Dudman N.P.B. ; Wilcken D.E.L.** (1988). Interrelations between plasma free and protein-bound homocysteine and cysteine in homocystinuria. *Metabolism.*, **37** : 191 – 195.
- **Wolters M. ; Hermann S. ; Hahn A.** (2003). B vitamins, homocysteine, and methylmalonic acid in elderly German woman. *Am. J. Clin. Nutr.*, **78** : 765 - 72.
- **Wolters M. ; Ströhle A. ; Ph.D-student ; Hahn A.** (2004). Cobalamin: a critical vitamin in the elderly. *Preventive Medicine.*, **39** : 1256 – 1266.

- **Woo D.K. ; Dudrick S.J. ; Sumpio B.E.** (2000). Homocysteine stimulates MAP kinase in bovine aortic smooth muscle cells. *Surgery*, **128** : 59-66.
- **Wright C.B.; Lee H.S.; Paik M.C.; Stabler S.P.; Allen R.H.; Sacco R.L.** (2004). Total homocysteine and cognition in a tri-ethnic cohort: The Northern Manhattan Study. *Neurology.*, **63** (2) : 254–260.
- **Yagisawa M. ; Okawa N. ; Shigematsu N. ; Nakata R.** (2004). Effects of intravenous betaine on methionine-loading-induced plasma homocysteine elevation in rats. *J. Nutr. Bio.*, **15** : 666 – 671.
- **Yamada K.; Gravel R.A.; Toraya T.; Matthews R.G.** (2006). Human methionine synthase reductase is a molecular chaperone for human methionine synthase. *PNAS.*, **103** (25) : 9476-81.
- **Yang F.; Tan H.M.; Wang H.** (2005). Hyperhomocysteinemia and atherosclerosis. *Acta Physiologica Sinica.*, **57** (2) : 103-114.
- **Zhang R. ; Ma J. ; Xia M. ; Zhu H. ; Ling W.H.** (2004). Mild Hyperhomocysteinemia Induced by Feeding Rats Diets Rich in Methionine or Deficient in Folate Promotes Early Atherosclerotic Inflammatory Processes. *J. Nutr.*, **134** : 825–830.
- **Zhang X. ; Li H. ; Jin H. ; Ebin Z. ; Brodsky S. ; Goligorsky M.S.** (2000). Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **279** : 671–8.
- **Zhou J. ; Chew M. ; Ravn H.B. ; Falk E.** (1999). Plaque pathology and coronary thrombosis in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Scand. J. Clinl. Lab. Invest.*, **59** : 3–11.
- **Zhou J. ; Moller J. ; Danielsen C.C. ; Bentzon J. ; Ravn H.B. ; Austin R.C. ; Falk E.** (2001). Dietary Supplementation With Methionine and Homocysteine Promotes Early Atherosclerosis but Not Plaque Rupture in ApoE-Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **21** :1470-1476.
- **Zhou J. ; Moller J. ; Ritskes-Hoitinga M. ; Larsen M.L. ; Austin R.C. ; Falk E.** (2003). Effects of vitamin supplementation and hyperhomocysteinemia on atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis.*, **168** : 255–62.
- **Zulli A. ; Buxton B.F. ; Doolan L. ; Liu J.J.** (1998). Augmented effects of methionine and cholesterol in decreasing the elastic lamina while thickening the aortic wall in the rat aorta. *Clin. Sci.*, **95**: 589–593.

RESUME

Durant les dernières décennies, plusieurs études cliniques et épidémiologiques ont montré que l'hyperhomocystéinémie est associée aux maladies cardiovasculaires et pourrait donc représenter un facteur de risque.

Dans le cadre de notre travail, une hyperhomocystéinémie est induite chez le rat des sables *Psammomys obesus* par une injection intrapéritonéale de méthionine à raison de 70 mg/Kg de poids corporel/jour durant 6 mois. Parallèlement, les rats témoins reçoivent des injections de NaCl à 0,9%.

Durant l'expérimentation, nous avons suivi l'évolution pondérale par pesée hebdomadaire ainsi que celle des paramètres biochimiques plasmatiques (dosages mensuels par méthode enzymatique colorimétrique, FPIA et électrophorèse des lipoprotéines). Les techniques histologiques ont permis l'étude histo-morphométrique de la paroi aortique.

Une hyperhomocystéinémie modérée ($20,05 \pm 7,77 \mu\text{M}$) est observée chez *Psammomys* soumis à la méthionine au 6^{ème} mois de traitement contre $2,63 \pm 2,01 \mu\text{M}$ au début de l'expérimentation.

Au terme de l'expérimentation, nous avons noté une diminution du poids corporel des Rats des sables soumis à la méthionine. L'ensemble des paramètres biochimiques plasmatiques que nous avons étudié ont subi des variations plus ou moins importantes au cours des 6 mois d'expérimentation. Nous avons ainsi enregistré une augmentation de la glycémie après administration de la méthionine pendant 5 mois. Une corrélation positive entre la triglycémie et l'homocystéinémie ainsi que des variations non significatives de la cholestérolémie sont observées. Des fluctuations de la protéinémie et de l'acide urique plasmatique sont notées au cours de l'expérimentation avec une hyperprotéinémie ($> 90 \text{ mg/dl}$) au 2^{ème} mois de traitement et une augmentation du taux d'acide urique de 162 % au 5^{ème} mois. L'analyse des lipidogrammes met en évidence une diminution importante des HDL, par contre, les VLDL et LDL sont augmentées chez le Rat des sables soumis à la méthionine. Par ailleurs, nous avons noté avec intérêt l'apparition de la lipoprotéine (a) après 3 mois de traitement à la méthionine.

La paroi vasculaire des *Psammomys obesus* hyperhomocystéinémiques est le siège de nombreuses altérations focalisées représentées par des agrégations sanguines luminales (microthrombus), une hypertrophie de l'endothélium et du sous endothélium, des ruptures et dédoublements de la limitante élastique interne et des lames élastiques de la média, une accumulation de collagènes ainsi qu'un changement d'orientation et une modulation phénotypique des cellules musculaires lisses de la média. Un épaississement de l'adventice est également observé au niveau des zones altérées.

L'hyperhomocystéinémie expérimentale installée dès le 3^{ème} mois, altère la structure de la paroi vasculaire et l'homéostasie lipidique.

Les résultats préliminaires obtenus mettent en évidence l'extrême sensibilité du Rat des sables *Psammomys obesus* qui constitue un modèle de choix pour l'étude de certaines pathologies cardiovasculaires.

Mots clés : athérosclérose, homocystéine, matrice extracellulaire, paroi artérielle, *Psammomys obesus*.

ABSTRACT

During the last decades, several clinical and epidemiologic studies showed that the hyperhomocysteinemia is associated the cardiovascular diseases and could thus represent a factor of risk.

Within the framework of our work, a hyperhomocysteinemia is induced in the rat of sands *Psammomys obesus* by an injection intraperitoneal of methionine at a rate of 70 mg/Kg of weight corporel /day during 6 months. In parallel, the pilot rats receive NaCl injections with 0,9%.

During the experimentation, we followed the ponderal evolution by weekly weighing like that of the plasmatic biochemical parameters (monthly proportioning by colorimetric enzymatic method, FPIA and electrophoresis of the lipoproteins). The histological techniques allowed the histo-morphometric study of the aortic wall.

A moderate hyperhomocysteinemia ($20,05 \pm 7,77 \mu\text{M}$) is observed in *Psammomys* subjected to methionine in the 6th month of treatment against $2,63 \pm 2,01 \mu\text{M}$ at the beginning of the experimentation. At the end of the experimentation, we noted a reduction in the body weight of the Rats of the sands subjected to methionine. The whole of the plasmatic biochemical parameters that we studied underwent of the more or less important variations during 6 months of experimentation. We thus recorded an increase in the glycemia after administration of methionine for 5 months. A positive correlation between the triglyceridemia and the homocysteinemia as of the nonsignificant variations of the cholesterolemia are observed. Fluctuations of the proteinemia and plasmatic uric acid are noted during the experimentation with a hyperproteinemia ($> 90 \text{ mg/dl}$) in the 2nd month of treatment and an increase in the uric rate of acid of 162 % in the 5th month. The analysis of the lipidograms highlights a major reduction in the HDL, on the other hand, the VLDL and LDL are increased in the Rat of the sands subjected to methionine. In addition, we noted with interest the appearance of the lipoprotein (A) after 3 months of treatment methionine.

The vascular wall of hyperhomocysteinemic *Psammomys obesus* is the seat the many focused deteriorations represented by blood aggregations luminals (microthrombus), a hypertrophy of the endothelium and under endothelium, of the ruptures and unfoldings of limiting elastic internal and of the elastic blades of the media, an accumulation of collagens as well as a change of orientation and a phenotypic modulation of the muscular cells smooth media. A thickening of adventitious is also observed on the level of the faded zones.

The experimental hyperhomocysteinemia installed as of the 3rd month, deteriorates the structure of the vascular wall and lipidic homeostasis.

The preliminary results obtained highlight the extreme sensitivity of the Rat of sands *Psammomys obesus* which constitutes a model of choice for the study of certain cardiovascular pathologies.

Keys words: atherosclerosis, homocystein, extracellular matrix, arterial wall, *Psammomys obesus*.

ملخص

أثبتت الدراسات العيادية و الوبائية خلال العقود الماضية بأن ارتفاع بروتين الهوموسيستين يرتبط بأمراض قلبية و وعائية و يمكن من ثمة أن يشكل عامل خطورة.

في إطار عملنا قمنا باستحداث ارتفاع الهوموسيستين لدى جرذان الرمل بحقن الميتونين في الغشاء المصلي للتجفيف البطني بمقدار 70 ملغ في كلغ الواحد من إجمالي الوزن في اليوم و لمدة ستة أيام. بالموازاة حقنت الفئران بحمض كلور الصوديوم بنسبة 0.9%.

خلال التجربة قمنا بمتابعة التطور الوزني للفئران أسبوعياً و كذا متابعة تطور قيم المواد البيوكيميائية المكونة للبلازما (تتبع الجرعات الشهرية بطريقة القياس اللوني الإنزيمي و عملية الطرد الكهربائي للمعدن الليبيدية البروتينية). و قد سمحت التقنيات النسيجية بالقيام بدراسة قياسية لتشكيل الأنسجة الوتينية.

و شوهد ارتفاع معقول في الهوموسيستين (7.77 ± 20.05) عند جرذان الرمل المحقونة بالميتونين في الشهر السادس من المعالجة مقارنة ب : 2.63 ± 2.01 عند بداية التجربة.

بنهاية التجربة لاحظنا تناقص في وزن الفئران المعالجة بالميتونين، كما شوهدت تغيرات هامة نوعاً ما في المكونات البيوكيميائية للبلازما موضوع الدراسة خلال الأشهر الستة.

و سجلنا ارتفاعاً لنسبة السكر في الدم بعد حقن الميتونين خلال خمسة أشهر، كما شوهدت علاقة إيجابية بين نسبة الغليسيريدات الثلاثية و الهوموسيستين إضافة إلى تغيرات مهمة في نسبة الكوليسترول.

فضلاً عن ذلك، لوحظت تغيرات في قيم البروتينات و حمض البولة (اليوريا) في البلازما الدموية خلال فترة التجربة، إذ ارتفعت نسبة البروتينات البلازمية (90 مغ/دل) خلال الشهر الثاني مع ارتفاع نسبة حمض اليوريا بمعدل 162% في الشهر الخامس. إن تحليل المخططات الليبيدية أظهر انخفاضاً محسوساً في (أش دي أل HDL): (معدنات بروتينية ليبيدية عالية الكثافة) فيما ارتفعت نسبة المعدنات البروتينية الليبيدية شديدة انخفاض الكثافة (في أل دي أل VLDL) و منخفضة الكثافة (أل دي أل LDL) عند الفئران المعرضة للميتونين.

يعد الجدار الوعائي لجرذان الرمل المصابة بارتفاع مستوى الهوموسيستين مقراً لعدة تغيرات مركزة متمثلة في تجمعات للدم، تضخم في أنسجة الخلايا الطلائية الداخلية و الطبقة الخارجية، تمزق و انشطار في الطبقة المرنة الداخلية و كذا في الألياف المرنة للطبقة المتوسطة و تراكم الكولاجين (بروتينات ليفية) مع تغير في اتجاه و مورفولوجيا الخلايا العضلية غير المخططة (الملساء) على مستوى الطبقة الوسطى. كما شوهدت زيادة في حجم البطانة الخارجية في المناطق التي طرأ عليها التغيير.

لقد غير ارتفاع مستوى الهوموسيستين التجريبي الذي شرع فيها ابتداءً من الشهر الثالث من بنية الجدار الوعائي و كذا من استقرار نسبة الليبيدات.

و عليه فإن النتائج الأولية المحصل عليها تظهر الحساسية الفائقة التي أبدتها جرذان الرمل، التي تعد بذلك نموذجاً مفضلاً لدراسة بعض الأمراض القلبية الوعائية.

الكلمات الأساسية: تصلب عصيدي، هوموسيستين، المصفوفة خارج الخلية، جدار شراييني، جرذان الرمل.

ملخص

أثبتت الدراسات العيادية و الوبائية خلال العقود الماضية بأن ارتفاع بروتين الهوموسيستين يرتبط بأمراض قلبية و وعائية و يمكن من ثمة أن يشكل عامل خطورة.

في إطار عملنا قمنا باستحداث ارتفاع الهوموسيستين لدى جرذان الرمل بحقن الميتونين في الغشاء المصلي للتجفيف البطني بمقدار 70 ملغ في كلغ الواحد من إجمالي الوزن في اليوم و لمدة ستة أيام. بالموازاة حقنت الفئران بحمض كلور الصوديوم بنسبة 0.9%.

خلال التجربة قمنا بمتابعة التطور الوزني للفئران أسبوعيا و كذا متابعة تطور قيم المواد البيوكيميائية المكونة للبلازما (تتبع الجرعات الشهرية بطريقة القياس اللوني الإنزيمي و عملية الطرد الكهربائي للمعدن الليبيدية البروتينية). و قد سمحت التقنيات النسيجية بالقيام بدراسة قياسية لتشكيل الأنسجة الوتينية.

و شوهد ارتفاع معقول في الهوموسيستين (20.05 ± 7.77) عند جرذان الرمل المحقونة بالميتونين في الشهر السادس من المعالجة مقارنة ب : 2.01 ± 2.63 عند بداية التجربة.

بنهاية التجربة لاحظنا تناقص في وزن الفئران المعالجة بالميتونين، كما شوهدت تغيرات هامة نوعا ما في المكونات البيوكيميائية للبلازما موضوع الدراسة خلال الأشهر الستة.

و سجلنا ارتفاعا لنسبة السكر في الدم بعد حقن الميتونين خلال خمسة أشهر، كما شوهدت علاقة إيجابية بين نسبة الغليسيريديت الثلاثية و الهوموسيستين إضافة إلى تغيرات مهمة في نسبة الكوليسترول.

فضلا عن ذلك ، لوحظت تغيرات في قيم البروتينات و حمض البولة (اليوريا) في البلازما الدموية خلال فترة التجربة، إذ ارتفعت نسبة البروتينات البلازمية (90 مغ/دل) خلال الشهر الثاني مع ارتفاع نسبة حمض اليوريا بمعدل 162% في الشهر الخامس. إن تحليل المخططات الليبيدية أظهر انخفاضا محسوسا في (أش دي أل HDL): (معدنات بروتينية ليبيدية عالية الكثافة) فيما ارتفعت نسبة المعدنات البروتينية الليبيدية شديدة انخفاض الكثافة (في أل دي أل VLDL) و منخفضة الكثافة (أل دي أل LDL) عند الفئران المعرضة للميتونين.

يعد الجدار الوعائي لجرذان الرمل المصابة بارتفاع مستوى الهوموسيستين مقرا لعدة تغيرات مركزة متمثلة في تجمعات للدم، تضخم في أنسجة الخلايا الطلائية الداخلية و الطبقة الخارجية، تمزق و انشطار في الطبقة المرنة الداخلية و كذا في الألياف المرنة للطبقة المتوسطة و تراكم الكولاجين (بروتينات ليفية) مع تغير في اتجاه و مورفولوجيا الخلايا العضلية غير المخططة (الملساء) على مستوى الطبقة الوسطى. كما شوهدت زيادة في حجم البطانة الخارجية في المناطق التي طرأ عليها التغيير.

لقد غير ارتفاع مستوى الهوموسيستين التجريبي الذي شرع فيها ابتداء من الشهر الثالث من بنية الجدار الوعائي وكذا من استقرار نسبة الليبيدات.

و عليه فإن النتائج الأولية المحصل عليها تظهر الحساسية الفائقة التي أبدتها جرذان الرمل، التي تعد بذلك نموذجا مفضلا لدراسة بعض الأمراض القلبية الوعائية.

الكلمات الأساسية: تصلب عصيدي، هوموسيستين، المصفوفة خارج الخلية، جدار شراييني، جرذان الرمل.

ANNEXES

Tableau I : Evolution pondérale (g) des *Psammomys* témoins.

		1	2	3	4	5	Moy.	E.T.	Moy.	E.T.
T0		94	92	88	83	109	93	9,8	93	9,8
	S1	112	100	99	86	125	104	15		
T1	S2	100	88	92	82	115	95	13		
	S3	153	85	99	90	131	112	29		
	S4	89	74	100	90	132	97	22	102	7,4
	S5	97		106	95	135	108	18		
T2	S6			96	87	125	103	20		
	S7			104	93	131	109	20		
	S8			102	89	126	106	19	106	3
	S9			109	98	139	115	21		
T3	S10			112	95	145	117	25		
	S11			115	100	143	119	22		
	S12			116	97	146	120	25	118	2
	S13			114	94	143	117	25		
T4	S14			120	100	154	125	27		
	S15			120	102	153	125	26		
	S16			125	102	156	128	27	124	4,6
	S17			122	101	153	125	26		
T5	S18			121	100	157	126	29		
	S19			116	91	149	119	29		
	S20			117	97	143	119	23	122	4
	S21			105	87	124	105	19		
T6	S22			108	86	121	105	18		
	S23			108	93	131	111	19		
	S24			108	81	114	101	18	106	4

Les chiffres 1, 2, 3, 4 et 5 représentent les rats des sables utilisés.

Tableau II : Evolution pondérale (g) des *Psammomys* traités.

		1	2	3	4	5	6	7	Moy.	E.T.	Moy.	E.T.
T0		67	90	66	128	119	104	97	96	24	96	24
	S1	77	93	61	129	121	108	100	98	24		
T1	S2	64	75	60	134	116	126	104	97	31		
	S3	59	93	60	135	118	129	108	100	31		
	S4	79	98	68	131	114	123	107	103	23	100	2,4
	S5	84	87	76	118	109	106	99,6	97	15		
T2	S6	67	73	84	118	104	110	104	94	20		
	S7	70	77	92		100	91	97	88	12		
	S8	80	93	92		96		97	92	6,7	93	3,9
	S9	82	93	90		94		103	92	7,8		
T3	S10	77	91	91				103	90	11		
	S11	73	89	81					81	8,1		
	S12	81	92	72					82	9,9	86	6,1
	S13	88	106						97	13		
T4	S14	88	103						95	10		
	S15	95	111						103	11		
	S16	88	109						98	15	98	3,4
	S17	93	109						101	11		
T5	S18	88	103						95	10		
	S19	82	99						90	12		
	S20	81	95						88	9,8	94	5,6
	S21	84	95						90	7,8		
T6	S22	85	99						92	9,4		
	S23	66	94						80	20		
	S24		93						93		89	5,7

Les chiffres de 1 à 7 désignent les animaux utilisés au cours de cette expérimentation.

Tableau III : Evolution de la glycémie (mg/dl).**Témoins :**

	1	2	3	4	5	Moy.	E.T.
T0	210	84,61	68	80	53	99,12	63,18
T1	90,21	66,91	46	32	52	57,42	22,2
T2			48	48	44	46,67	2,31
T3			62	58	61	60,33	2,08
T4			66	54	57	59	6,24
T5			53	38	42	44,33	7,76
T6			60,75	38,22	50,12	49,7	11,27

Traités :

	1	2	3	4	5	6	7	Moy.	E.T.
T0	34,1	37	72,72	126,2	81,53	296,2	123,8	110,2	83,15
T1		103	124,8	59,97	34,69	50,55	32,71	67,62	34,58
T2	143,9		77,69		67,01		87,62	94,05	29,68
T3	49,23	66,15	50,55				310,1	119	110,5
T4	58,48	50,55						54,52	3,96
T5	117,5	93,81						105,7	11,84
T6	118	128,3						123,2	5,16

Tableau IV : Evolution de la cholestérolémie (mg/dl).

Témoins :

	1	2	3	4	5	Moy.	E.T.
T0	40,93	59,53	60	50	50	52,09	7,925
T1	57,97	94,4	50	46	47	59,07	20,3
T2			98	58	77	77,67	20,01
T3			72	46	65	61	13,45
T4			68	55	0,5	41,17	35,81
T5			44	53	26	41	13,75
T6			76	62	35	57,67	20,84

Traités :

	1	2	3	4	5	6	7	Moy.	E.T.
T0	22,3	40,8	48,51	40,93	57,67	39,07	48,37	42,52	11
T1		107,3	69,5	51,34	46,37	33,12	53	60,1	25,91
T2	68,75		24,18		100,3		51,44	61,17	31,9
T3	22,32	72,55	66,25				47,36	52,12	22,57
T4	81,15	99,37						90,26	12,88
T5	56,59	146,6						101,6	63,66
T6	57	19,73						38,37	26,35

Tableau V : Evolution de la triglycéridémie (mg/dl).**Témoins :**

	1	2	3	4	5	Moy.	E.T.
T0	48,57	77,14	9	54	39	45,54	24,79
T1	102,3	105,3	24	26	28	57,1	42,62
T2			71	68	42	60,33	15,95
T3			51	31		41	14,14
T4			42	53	31	42	11
T5			27	23	22	24	2,64
T6			81	95	49	75	23,58

Traités :

	1	2	3	4	5	6	7	Moy.	E.T.
T0	41,88	21,36	37,55	77,14	102,9	177,1	108,6	80,93	53,96
T1		17,84	32,41	159,4	42,1	36,09	51,12	56,49	51,6
T2	44,26		74,28		191,3		129,2	109,8	64,74
T3	57,14	142,9	57,14				271,2	132,1	101,1
T4	27,06	187,2						107,1	113,2
T5	141,6	295,7						218,6	108,9
T6	142	292,3						217,2	106,3

Tableau VI : Evolution de la protéinémie (mg/dl).

Témoins :

	1	2	3	4	5	Moy.	E.T.
T0	80,69	90,34	44	48	35	59,61	24,36
T1	51,82	79,58	45	45	38	51,88	16,24
T2			47	38	32	39	7,55
T3			45	46		45,5	0,70
T4			54	51	55	53,33	2,08
T5			50	52	45	49	3,60
T6			49	45	48	47,33	2,082

Traités :

	1	2	3	4	5	6	7	Moy.	E.T.
T0	21,04	27,61	40,59	99,31	86,89	98,62	82,75	65,26	34,22
T1			79,76	78,35	86,99	64,78	50,59	72,09	14,45
T2	98,11		95,86		95,62		78,35	91,99	9,16
T3	42,75	88,96	91,92				81,52	76,29	22,78
T4	75,88	58,61						67,25	12,21
T5	73,41							73,41	
T6	73	86,08						79,54	9,25

Tableau VII : Evolution de l'homocystéinémie ($\mu\text{mol/l}$).**Témoins :**

	1	2	3	4	5	Moy.	E.T.
T0	2,42	3,44	1,53	0,78	0,49	1,73	1,21
T1	2,58	6,1	2,38	1,17	0,76	2,60	2,10
T2				1,2	1,04	1,12	0,11
T3				0,75	0,99	0,87	0,17
T4				0,88	1,49	1,18	0,43
T5				3,44	2,58	3,01	0,61
T6				1,84	2,06	1,95	0,15

Traités :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Moy.	E.T.
T0	0	0	2,58	4,98	0,61	2,58	4,54	4,7	3,66	2,63	2,01
T1	3,94	2,04	1,64		0,56	1,78	2,47	1,96	2,16	2,07	0,94
T2	2,5		4,21				23,76		5,1	8,89	9,97
T3	2,89	6,47	1,97							3,77	2,37
T4	2,01	1,46								1,73	0,39
T5	25	1,37								13,19	16,71
T6	25,54	14,55								20,05	5,49

Tableau VIII : Evolution de l'acide urique plasmatique (mg/dl).**Témoins :**

	1	2	3	4	5	Moy.	E.T.
T0	2,55	7,88	6,39	7,66	4,26	5,748	2,294
T1	5,11	10,65	8,52	5,32	3,4	6,6	2,923
T2			6,81	7,45	4,89	6,383	1,332
T3			2,34	6,39		4,365	2,864
T4			5,11	6,81	2,76	4,893	2,034
T5			7,45	4,26	5,32	5,677	1,625
T6			8,45	5,11	3,4	5,653	2,568

Traités :

	1	2	3	4	5	6	Moy.	E.T.
T0	10,65	8,52	2,98	5,11	11,07	3,4	6,95	3,60
T1		8,61	9,79	6,81	9,15	7,45	8,36	1,22
T2	12,35		2,76	2,98		6,81	6,22	4,49
T3	8,3	2,34	4,89			12,14	6,92	4,25
T4	7,45	6,39					6,92	0,75
T5	19,17	17,25					18,21	1,36
T6	12,35	12,15					12,25	0,14

Tableau IX : Etude morphométrique de la paroi aortique chez les *Psammomys* témoins.

	EPAISSEUR (μm)							Nbre CML / 5625 μm^2	Nbre L.E.
	PAROI	ADVENTICE	MEDIA	INTIMA	E.I.L.	L.N.	I.N.		
1	150	47,5	102,5		10	7,5	5	14	7
2	142,5	48,75	92,5	1,25	5	7,5	5	6	7
3	117,5	13,75	102,5	1,25	7,5	10	5	5	8
4	100	13,75	85	1,25	7,5	12,5	2,5	11	7
5	122,5	52,5	67,5	2,5	5	5	5	10	7
6	125	25	97,5	2,5	7,5	6,25	5	14	6
7	105	15	87,5	2,5	5	6,25	5	15	8
8	110	22,5	85	2,5	10	5	2,5	12	7
9	112,5	22,5	87,5	2,5	7,5	10	2,5	10	8
10	137,5	45	90	2,5	10	10	2,5	10	6
11	160	91,25	67,5	1,25	7,5	10	2,5	9	6
12	115	30	85		12,5	10	2,5	12	7
13	127,5	30	97,5		10	7,5	2,5	8	7
14	137,5	47,5	90		5	5	2,5	10	7
15	125	23,75	100	1,25	10	5	2,5	7	7
16	112,5	22,5	87,5	2,5	10	7,5	2,5	10	8
17	127,5	26,25	100	1,25	17,5	10	2,5	11	6
18	135	52,5	80	2,5	7,5	5	5	10	8
19	110	20	87,5	2,5	12,5	10	3,75	7	6
20	122,5	32,5	90		2,5	5	2,5	6	8
21	100	12,5	87,5		7,5	2,5	2,5	12	8
22	122,5	35	85	2,5	12,5	7,5	5	7	7
23	120	31,25	87,5	1,25	10	12,5	2,5	10	7
24	160	72,5	85	2,5	5	10	2,5	11	8
25	135	42,5	90	2,5	5	7,5	2,5	7	7
26	140	42,5	95	2,5	10	10	2,5	6	9
27	135	48,75	85	1,25	7,5	7,5	2,5	8	8
28	130	32,5	95	2,5	7,5	2,5	2,5	11	7
29	120	22,5	95	2,5	5	12,5	2,5	9	10
30	90	10	77,5	2,5	10	15	2,5	12	9

E.I.L. : Espace interlamellaire,

L.N. : Grand axe nucléaire des CMLs,

I.N. : Petit axe nucléaire des CMLs,

L.E. : Lamé élastique

31	122,5	32,5	87,5	2,5	10	3,75	2,5	12	9
32	112,5	27,5	82,5	2,5	7,5	10	2,5	14	8
33	115	25	90		5	5	2,5	13	7
34	102,5	32,5	70		2,5	7,5	2,5	14	8
35	115	27,5	85	2,5	5	10	2,5	15	7
36	120	27,5	90	2,5	7,5	10	5	17	7
37	122,5	45	77,5		5	7,5	5	10	8
38	112,5	7,5	102,5	2,5	10	5	2,5	8	7
39	110	18,75	90	1,25	5	5	2,5	13	9
40	107,5	17,5	87,5	2,5	5	5	5	16	8
41	85	7,5	75	2,5	7,5	10	5	13	8
42	107,5	18,75	87,5	1,25	5	12,5	5	12	8
43	112,5	22,5	87,5	2,5	5	10	2,5	15	7
44	122,5	31,25	90	1,25	5	10	5	20	6
45	112,5	20	90	2,5	7,5	7,5	2,5	17	7
46	87,5	16,25	70	1,25	5	10	2,5	16	7
47	112,5	27,5	82,5	2,5	2,5	10	2,5	13	8
48	127,5	25	97,5	2,5	7,5	7,5	2,5	13	9
49	127,5	37,5	87,5	2,5	10	5	2,5	13	7
50	107,5	12,5	92,5	2,5	10	7,5	5	12	8
MOYENNE	119,8	30,25	87,75	2,134	7,55	8,025	3,275	11,32	7,48
E.T.	15,95	16,14	8,43	0,58	2,97	2,80	1,15	3,29	0,91

Tableau X : Etude morphométrique de la paroi aortique chez les *Psammomys* traités.

	EPAISSEUR (μm)							Nb CML / 5625 μm^2	Nb L.E.
	PAROI	ADVENTICE	MEDIA	INTIMA	E.I.L.	L.N.	I.N.		
1	275	200	75	7,5	5	2,5	2,5	12	7
2	140	27,5	110	2,5	10	5	2,5	17	7
3	135	27,5	102,5	2,5	7,5	5	5	16	8
4	107,5	7,5	92,5	5	12,5	7,5	3,75	14	9
5	132,5	15	115	2,5	5	7,5	2,5	13	8
6	152,5	25	125	2,5	5	2,5	2,5	14	9
7	350	260	90		20	7,5	5	16	7
8	125	10	115		15	7,5	2,5	10	6
9	122,5	27,5	92,5	2,5	12,5	7,5	5	16	8
10	135,5	30	102,5	5	10	5	5	17	8
11	147,5	30	117,5	2,5	12,5	7,5	5	16	6
12	362,5	272,5	90		17,5	5	5	11	6
13	130	7,5	122,5		10	5	2,5	19	6
14	137,5	32,5	102,5	3,75	10	5	2,5	13	6
15	156,25	25	130	1,25	12,5	7,5	2,5	15	6
16	127,5	5	120	2,5	5	7,5	2,5	14	7
17	125,75	10	112,5	3,75	7,5	7,5	2,5	13	7
18	125	10	112,5	2,5	10	7,5	2,5	11	8
19	180,25	42,5	137,5	1,25	7,5	5	2,5	14	8
20	222,5	102,5	117,5	2,5	10	7,5	5	12	5
21	135	22,5	110	2,5	7,5	7,5	2,5	17	7
22	130	20	105	5	10	2,5	2,5	21	7
23	125	22,5	100	2,5	7,5	10	2,5	17	8
24	64	52,5	102,5	5	15	7,5	2,5	18	8
25	202,5	42,5	157,5	2,5	10	10	5	11	7
26	125	17,5	105	2,5	7,5	5	5	13	8
27	177,5	50	125	2,5	15	10	2,5	19	8
28	122,5	7,5	112,5	2,5	12,5	5	2,5	12	7
29	142,5	17,5	122,5	2,5	10	10	5	15	9
30	162,5	15	137,5	5	17,5	10	3,75	13	7

31	262,5	167,5	95		10	7,5	5	17	7
32	135	37,5	95	2,5	5	7,5	2,5	9	6
33	100	85	15		5	10	2,5	15	7
34	120	97,5	20	1,25	10	7,5	2,5	16	8
35	120	5	112,5	1,25	5	5	2,5	16	7
36	112,5	15	92,5	2,5	10	5	2,5	22	7
37	112,5	15	92,5	2,5	5	7,5	3,75	17	8
38	92,5	12,5	77,5	2,5	7,5	5	2,5	16	7
39	125	35	87,5	2,5	5	5	2,5	17	10
40	97,5	7,5	87,5	2,5	7,5	10	3,75	14	9
41	105	7,5	95	2,5	7,5	7,5	2,5	15	7
42	105	23,75	80	1,25	12,5	7,5	5	24	7
43	135	47,5	85	2,5	10	2,5	2,5	17	7
44	97,5	17,5	77,5	2,5	5	7,5	5	12	6
45	117,5	12,5	102,5	2,5	10	7,5	3,75	22	7
46	125	10	87,5	2,5	5	5	2,5	11	7
47	110	27,5	77,5	5	5	5	2,5	8	8
48	127,5	40	85	2,5	7,5	5	5	12	9
49	122,5	35	85	2,5	5	2,5	2,5	17	9
50	147,5	40	105	2,5	12,5	5	2,5	17	6
MOYENNE	144,94	43,48	100,30	2,87	9,35	6,50	3,33	15,06	7,34
E.T.	57,86	59,38	24,53	1,25	3,77	2,14	1,12	3,34	1,04

Coloration au **trichrome de Masson** (variante Masson-Goldner)

Déparaffinage

Hydratation

Coloration nucléaire à l'hématoxyline de Groat 1 min 15 s

Lavage à l'eau courante 1 min

Coloration à la fuschine-ponceau 1 min 30 s

Rinçage à l'eau acétifiée

Coloration à l'orangé G molybdique 1 min 30 s

Rinçage à l'eau acétifiée

Coloration au vert lumière 1 min 15 s

Rinçage à l'eau acétifiée

Déshydratation

Montage au baume de Canada

Les lames sont lavées à l'eau acétifiée jusqu'à l'élimination du colorant

Coloration au **Van Gieson**

Déparaffinage

Hydratation

Coloration nucléaire à l'hématoxyline de Groat 1 min 15 s

Lavage à l'eau courante 1 min

Coloration à la picrofuschine 5 min

Rinçage à l'eau distillée

Déshydratation

Montage au baume de Canada

Coloration à l'**orcéine**

Déparaffinage

Hydratation

Coloration à l'orcéine 30 min

Déshydratation

Montage au baume de Canada

Coloration à l'**APS**

Déparaffinage

Hydratation

Traitement à l'acide périodique 10 min

Lavage à l'eau courante	10 min
Coloration au réactif de Schiff	20 min à l'obscurité
Rinçage à l'eau distillée	
Déshydratation	
Montage au baume de Canada	

Coloration au **Bleu alcian**

Déparaffinage	
Hydratation	
Coloration au bleu alcian	2 h
Lavage à l'eau distillée	1 min
Coloration nucléaire à l'hématoxyline de Groat	1 min 15 s
Lavage à l'eau courante	1 min
Déshydratation	
Montage au baume de Canada	

INDEX

INDEX DES FIGURES

N° Figure	Titre de la figure	Page
1	Formules chimiques de l'homocystéine, de ses formes circulantes et de ses dérivés.	06
2	Métabolisme de l'homocystéine.	08
3	Régulation du métabolisme de l'homocystéine.	10
4	Déficits en MTHFR et carences en folates.	13
5	Mutations de la cobalamine et carences en vitamine B12.	13
6-a	Déficit homozygote de la Cystathionine β -Synthase.	14
6-b	Déficit hétérozygote de la Cystathionine β -Synthase et carence en vitamine B6.	15
7	Les effets vasculaires de l'homocystéine.	21
8	Injection intrapéritonéale au <i>Psammomys</i> .	25
9	Représentation d'une plaque de lipidogramme après coloration.	31
10	Exemple d'un profil électrophorétique normal.	31
11	Evolution du poids corporel des rats témoins et traités.	35
12	Evolution de la glycémie (mg/dl) chez <i>Psammomys obesus</i> témoins et traités.	36
13	Evolution de la cholestérolémie (mg/dl) chez <i>Psammomys obesus</i> témoins et traités.	37
14	Evolution de la triglycéridémie (mg/dl) chez <i>Psammomys obesus</i> témoins et traités.	38
15	Evolution de la protéinémie (mg/dl) chez <i>Psammomys obesus</i> témoins et traités.	39
16	Evolution de l'homocystéinémie (μ mol/l) chez <i>Psammomys obesus</i> témoins et traités.	40
17	Evolution de l'acide urique (mg/dl) chez <i>Psammomys obesus</i> témoins et traités.	41
18	Profils électrophorétiques des lipoprotéines plasmatiques chez <i>Psammomys obesus</i> témoin et traité à la méthionine pendant trois mois.	42
19	Effet de la méthionine sur l'épaisseur de la paroi aortique, de l'adventice et de la média pendant 6 mois de traitement.	56
20	Effet du traitement à la méthionine sur l'épaisseur de la média.	57
21	Effet du traitement de la méthionine sur l'épaisseur des espaces interlamellaires et la longueur des axes nucléaires des CMLs de la média.	58
22	Effet du traitement de la méthionine sur le nombre des CMLs et des lames élastiques de la média.	59

INDEX DES TABLEAUX

N° Tableau	Titre du Tableau	Page
I	Evolution pondérale (g) des rats des sables témoins et traités à la méthionine.	34
II	Evolution de la glycémie (mg/dl) chez <i>Psammomys obesus</i> témoins et traités à la méthionine.	35
III	Evolution de la cholestérolémie (mg/dl) chez <i>Psammomys obesus</i> témoins et traités à la méthionine.	36
IV	Evolution de la triglycéridémie (mg/dl) chez <i>Psammomys obesus</i> témoins et traités à la méthionine.	37
V	Evolution de la protéinémie (mg/dl) chez <i>Psammomys obesus</i> témoins et traités à la méthionine.	38
VI	Evolution de l'homocystéinémie ($\mu\text{mol/l}$) chez <i>Psammomys obesus</i> témoins et traités à la méthionine.	39
VII	Evolution de l'acide urique (mg/dl) chez <i>Psammomys obesus</i> témoins et traités à la méthionine.	40
VIII	Lipoprotéines plasmatiques (%) chez <i>Psammomys</i> traité à la méthionine pendant 3 mois.	41
IX	Effet d'un traitement de 6 mois à la méthionine sur les paramètres morphométriques de la paroi aortique.	56

INDEX DES PLANCHES

N° Planche	Titre de la planche	Page
I	Structure de l'aorte chez <i>Psammomys</i> témoins et traités à la méthionine pendant 6 mois. Coloration : trichrome de Masson.	46
II	Structure de l'aorte chez <i>Psammomys</i> traités à la méthionine pendant 6 mois. Coloration : trichrome de Masson.	47
III	Structure de l'aorte chez <i>Psammomys</i> traités à la méthionine pendant 6 mois. Coloration : trichrome de Masson.	48
IV	Structure de l'aorte chez <i>Psammomys</i> traités à la méthionine pendant 6 mois. Coloration : trichrome de Masson.	49
V	Structure de l'aorte chez <i>Psammomys</i> traités à la méthionine pendant 6 mois. Coloration : trichrome de Masson.	50
VI	Structure de l'aorte chez <i>Psammomys</i> traités à la méthionine pendant 6 mois. Coloration : trichrome de Masson.	51
VII	Structure de l'aorte chez <i>Psammomys</i> témoins et traités à la méthionine pendant 6 mois. Coloration : Orcéine.	52
VIII	Structure de l'aorte chez <i>Psammomys</i> témoins et traités à la méthionine pendant 6 mois. Coloration : Van Gieson.	53
IX	Structure de l'aorte chez <i>Psammomys</i> témoins et traités à la méthionine pendant 6 mois. Coloration : PAS avec coloration nucléaire.	54
X	Structure de l'aorte chez <i>Psammomys</i> témoins et traités à la méthionine pendant 6 mois. Coloration : PAS.	55