

N° d'ordre : 26/2011-M/SN

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

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

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES  
(F.S.B)



MÉMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de MAGISTER

EN SCIENCES DE LA NATURE

Spécialité : *PHYSIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE ENDOCRINIENNE ET  
MÉTABOLIQUE*

Présenté par **HAMDIS Nacim**

**Remodelage de la matrice extracellulaire cardiaque induit par  
différentes doses de méthionine chez le Rat Wistar,  
*Rattus norvegicus***

Soutenu publiquement, le 26 Avril 2011, devant le jury composé de :

Président **Mme AOUICHAT-BOUGUERRA S.** Professeur **FSB-USTHB**

Directeur de thèse **Mlle BENZAOUG Y.** Professeur **FSB-USTHB**

Examineurs

**Mr CHERIFI M. E** Maître de conférences A **CHU Parnet**

**Mme OTHMANI-MECIF K.** Maître de conférences A **FSB-USTHB**

**Mme OMARI N.** Maître de conférences A **FSB-USTHB**

*Tout récipient peut être rempli sauf,  
celui du savoir car, insatiable.  
Ali, le 4<sup>ème</sup> Calife.*

## *Dédicaces*

*A mon défunt père,*

*Je dédie ce modeste travail,*

*Cet être exceptionnel, qui m'a procuré amour, soutien et aide.*

*Ses conseils me reviennent toujours à l'esprit, faisant tout son possible pour notre réussite,*

*avec une douceur très remarquable, toujours serein et zen, exemple de ma vie.*

*Que Dieu l'entoure de sa miséricorde.*

*A ma mère*

*Source d'amour, de tendresse et de bien être,*

*à la lumière de mon existence.*

*A mes sœurs que j'aime beaucoup,*

*pour leur soutien omniprésent.*

*A mes frères*

*A mes neveux,*

*Spécialisés en bêtises*

*A tous mes amis. ....*

## REMERCIEMENTS

*Je remercie, Dieu tout puissant.*

*J'exprime ma reconnaissance et ma profonde gratitude à Madame le Professeur Y. Benazzoug, pour la confiance qu'elle m'a accordée en m'accueillant au sein de l'équipe de Biochimie et remodelage de la matrice extracellulaire. Je ne pourrai vous remercier suffisamment, merci de m'avoir encadré, écouté, conseillé, votre intérêt permanent et votre extrême gentillesse ont été véritablement les moteurs de mon projet de fin d'études et de mon Magister. Dieu bénisse les parents qui ont fait en sorte que nous soyons encadrés et suivis par l'être cher à nous tous, le professeur Y. Benazzoug. Dieu vous garde.*

*J'adresse mes remerciements les plus vifs à Mme le Professeur S. Aouichat-Bouguerra, qui me fait le grand honneur de présider mon jury d'examination. Je la remercie de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et de m'avoir sans cesse encouragé durant l'accomplissement de mes travaux.*

*J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur M. Cherifi, Maître de conférences au laboratoire de Biochimie du CHU Parnet, qui a aimablement accepté d'examiner mon travail.*

*J'adresse mes remerciements à Mme K. Othmani-Mecif, Maître de conférences à la FSB, pour avoir accepté de se pencher sur ce travail et de le juger. Je la remercie pour ses conseils tout au long de la préparation de mon mémoire de Magister.*

*Je remercie Mme N. Omari, Maître de conférences à la FSB, d'avoir aimablement accepté d'examiner ce travail et de nous enrichir par ses connaissances.*

*J'exprime ma gratitude au Professeur G. Kacimi du laboratoire de Biochimie de l'Hôpital central de l'armée (HCA), grâce à qui l'électrophorèse des lipoprotéines a pu être réalisée.*

*Je tiens à remercier également Mme L. Khedis, Ingénieur de l'équipe Biochimie et remodelage de la Matrice extracellulaire, pour son aide et ses encouragements.*

*Je remercie tous les membres de notre équipe : M<sup>elle</sup> F. Zerrouk, Mme A. Yefsah-Idres, M<sup>me</sup> A. Moulahoum, M<sup>r</sup> B. Chaouad, M<sup>r</sup> A. Taghlit, M<sup>r</sup> A. Fernane, pour leur aide, conseils et soutien et tout particulièrement mon ami Adel Ghoul pour sa présence dans les moments difficiles.*

*Je remercie également tous les membres de l'équipe de Physiopathologie cellulaire et moléculaire.*

*A tous mes amis et tous ceux que je n'ai pas cité, mais qui m'ont accompagnés par leurs encouragements tout au long de la préparation de ce mémoire de Magister, je dis un grand merci.*

Apo A-I	Apoproteine A-I
Apo E	Apoproteine E
APS	Acide Périodique Schiff
ADMA	Assymmetric Dimethyl Arginine
BHMT	Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase
C $\beta$ S	Cystathionine $\beta$ Synthase
CK	Créatine Kinase
CK-MB	Créatine Kinase Myocardial Band
CL	Cholesterol
CRP	C-Reactive Protein
C $\gamma$ S	Cystathionine $\gamma$ Synthase
DTT	Dithiotreitol
eNOS	endothelial Nitric Oxide Synthase
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FPIA	Fluorescence Polarization Immunoassay
GNMT	Glycine-N-CH <sub>3</sub> -Transferase
GRP	Protéine régulée par le Glucose
G6P-DH	Glucose 6 Phosphate DésHydrogénase
Hcy	Homocystéine
HDL	High-Density Lipoprotein
h- FABP	heart Fatty-Acid Binding Protein
HHcy	Hyperhomocystéinémie
HK	HexoKinase
HMG Co A	3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Co enzyme A
Hsp	Heat shock proteins
HTL	Homocystéine ThioLactone
IL-8	InterLeukine 8
LDL	Low Density Lipoprotein
IMA	Ischemia Modified Albumin
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAT	Methionine-Adenosyl-Transférase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MCV	Maladies CardioVasculaires
MMP	Matrix MetalloProteinase
MTHFR	Methylene TetraHydroFolate Réductase
MS	Methionine Synthase
NADP	Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate
NO	Monoxyde d'azote
NO <sup>2-</sup>	Nitrite
NO <sup>3-</sup>	Nitrate
PI	Planche

ROS	Reactive Oxygen Species
SAH	S-Adenosyl Homocystéine
SAHH	S-Adenosyl-L-Homocystéine Hydrolase
SAM	S-Adenosyl-Methionine
SREBPs	Sterol Regulatory Element Binding Proteins
TBARs	Thiobarbituric Acid-Reactive Substances
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
UPR	Unfolded Protein Rresponse
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
PBS	Phosphate Buffered saline

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	2
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>I. HOMOCYSTEINE</b>	4
1. Les différentes formes d'homocystéine	4
2. Voies de synthèse et dégradation de l'homocystéine	6
3. Régulation du métabolisme de l'homocystéine	8
4. Relation entre les vitamines B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , folates et le métabolisme de l'homocystéine	8
<b>II. HYPERHOMOCYSTEINEMIE</b>	8
1. Facteurs environnementaux et nutritionnels	8
2. Facteurs d'origine génétique	9
<b>III. PATHOLOGIES ASSOCIEES A L'HOMOCYSTEINE</b>	9
1. Homocystéine et diabète	9
2. Homocystéine et homocystinurie	10
3. Homocystéine et athérosclérose	10
4. Homocystéine et infarctus du myocarde	11
<b>IV. HOMOCYSTEINE ET STRESS OXYDANT</b>	11
<b>V. HOMOCYSTEINE ET DIFFERENTS EFFETS SUR LES PROTEINES</b>	12
<b>VI. HOMOCYSTEINE ET MATRICE EXTRACELLULAIRE</b>	13
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	
<b>I. MATERIEL BIOLOGIQUE</b>	15
1. Données biologiques du rat <i>Rattus norvegicus</i>	15
2. Condition d'élevage en animalerie	15
3. Régime alimentaire	15
4. Protocole expérimental	15
<b>II. TECHNIQUES OPERATOIRES</b>	16
1. Evolution du poids corporel et des paramètres biochimiques	16
2. Prélèvement des organes	16

<b>III. TECHNIQUES ANALYTIQUES</b>	16
1. Dosage de l'homocystéine	16
2. Dosage du cholestérol	17
3. Dosage des triglycérides	17
4. Dosage des protéines	18
5. Electrophorèse des lipoprotéines	18
6. Dosage du marqueur cardiaque la créatine kinase MB (CK-MB)	19
7. Approche de l'analyse du stress oxydatif par quantification du monoxyde d'azote (NO)	20

<b>IV. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES</b>	20
1. Fixation	20
2. Déshydratation	21
3. Eclaircissement	21
4. Imprégnation	21
5. Inclusion	21
6. Coloration	21
6.1. Coloration topographique	21
6.2. Colorations histochimiques	21
7. Observations et iconographie	22

<b>V. METHODES STATISTIQUES</b>	22
---------------------------------	----

## **RESULTATS**

<b>I. EVOLUTION DU POIDS CORPOREL</b>	25
<b>II. EVOLUTION DES PARAMETRES BIOCHIMIQUES PLASMATIQUES</b>	26
1. L'homocystéinémie	26
2. La cholestérolémie	27
3. La triglycéridémie	28
4. La protéinémie	30
5. Electrophorèse des lipoprotéines	31
<b>III. APPROCHE DE L'ANALYSE DU STRESS OXYDATIF</b>	33
<b>IV. DOSAGE DU MARQUEUR CARDIAQUE LA CREATINE KINASE MB (CK-MB)</b>	34
<b>V. STRUCTURE HISTOLOGIQUE DE LA PAROI CARDIAQUE</b>	36
1. Structure de la paroi cardiaque du rat Wistar	36
2. Effets de l'hyperhomocystéinémie sur la structure cardiaque du Rat Wistar	36
2.1. Altération matricielles	36
2.2. Altérations cellulaires	40

2.3. Altérations vasculaires	40
<b>DISCUSSION</b>	45
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	54
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	56
<b>ANNEXES</b>	67
<b>INDEX</b>	

# *INTRODUCTION*

Les travaux effectués dans ce mémoire marquent la continuité des recherches expérimentales menées au sein de l'équipe de Biochimie et remodelage de la matrice extracellulaire.

Ils consistent en l'analyse des répercussions d'une hyperhomocystéinémie sur la biochimie plasmatique et l'histologie cardiaque de *Rattus norvegicus*, induite par une surcharge en méthionine.

Les précédents travaux de l'équipe ont porté sur des expérimentations réalisées sur différents modèles aussi bien athérosensibles (Rat des sables et Lapin) qu'athérorésistant (Rat Wistar) rendus hyperhomocystéinémiques par une administration de méthionine à différentes doses (70, 100, 200 et 500 g/Kg de poids corporel). Il a été ainsi, montré qu'une hyperhomocystéinémie est responsable d'altérations athérosclérotiques chez le Rat Wistar (Raaf, 2003), le Lapin (Othmani, 2007 ; Fernane, 2009), le Rat des sables (Chaouad, 2008), d'apparition de thrombose chez *Psammomys obesus* homocystéinémique (Zerrouk, 2007). Elle est également à l'origine d'une modulation de la composition des matrices extracellulaires de nature conjonctive (Kumar *et al.*, 2008).

Dans ce présent travail, une hyperhomocystéinémie est induite chez des Rats Wistar provenant de l'Institut Pasteur d'Alger, par administration de trois doses différentes de méthionine *per os* (300, 400 et 500 mg/Kg de poids corporel/jour) pendant 3 mois.

Différents paramètres ont été suivis et analysés durant l'expérimentation à savoir :

- L'évolution du poids corporel,
- La détermination de :
  - l'homocystéinémie,
  - la cholestérolémie,
  - la triglycéridémie,
  - la protéinémie,
- Une analyse des lipoprotéines plasmatiques,
- Un marqueur du stress oxydatif, le rapport nitrates/nitrites,
- Un marqueur cardiaque, la CK-MB,
- Une analyse histologique et histochimique de la paroi cardiaque.

Le mémoire est structuré en :

- Une introduction situant ce travail dans la thématique globale de l'équipe,
- Une revue bibliographique définissant l'hyperhomocystéinémie et ses divers aspects pathologiques,
- Une partie Matériel et méthodes précisant le matériel biologique et l'ensemble des méthodes et techniques utilisées pour la réalisation de ce travail,
- Une partie Résultats relatant tous les aspects étudiés,
- Une discussion suivie de la conclusion et des perspectives que laissent entrevoir ce modeste travail, qui se continue par la Bibliographie et les Annexes.

# REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

## I. HOMOCYSTEINE

L'homocystéine (Hcy), acide aminé soufré protéinogénique absent de la structure des protéines, est issu de la déméthylation intracellulaire de la méthionine alimentaire. Il constitue le core du métabolisme de cette dernière. Chez les mammifères, l'accumulation de l'homocystéine est diminuée par deux voies métaboliques : la **voie de la reméthylation** et la **voie de trans-sulfuration** effectuées essentiellement au niveau du foie et des reins (Scott et Weir, 1998 ; Fowler, 2005).

### 1. Les différentes formes d'homocystéine

L'homocystéine existe sous différentes formes dans l'organisme (Fig. 1), la forme réduite appelée homocystéine (ou sulfidryl) et le bisulfure ou la forme oxydée dite homocystine (McCully et Wilson, 1975). Cette dernière existe aussi sous forme liée à la cystéine et aux protéines contenant les résidus réactifs de cystéine (homocystéine liée aux protéines).

Les dernières formes oxydées sont désignées sous le nom de disulfides mélangés.

L'homocystéine libre ne compose que 1% à 2% de l'homocystéine totale (Mansoor *et al.* 1993). Les formes oxydées d'homocystéine représentent habituellement 98 à 99% de l'homocystéine totale dans le plasma humain, 80 à 90% sont liées aux protéines (McCully et Wilson, 1975 ; Mudd *et al.*, 2000).

L'homocystéine thiolactone (HTL), un thioester cyclique de l'homocystéine représente 0,3% et 28% de l'homocystéine totale, respectivement dans le plasma et l'urine. L'homocystéine peut également se lier aux protéines par liaison amide (N-Hcy-protéine). La N-Hcy-hémoglobine et N-Hcy-albumine constituent respectivement 75% et 22% de N-Hcy-protéine totale (Jakubowski *et al.*, 2006). Lorsque l'on mesure la concentration de l'homocystéine, tous les ponts disulfures sont réduits par un agent réducteur et toutes les homocystéines passeront sous forme libre. Le terme homocystéine totale est donc la somme de l'homocystéine libre et liée par le pont disulfure. L'homocystéine totale ne compte pas l'homocystéine thiolactone (HTL) et l'homocystéine liée aux protéines par le pont amidé (N-Hcy-protéine), car cette liaison résiste au réactif réducteur, HTL et N-Hcy-protéine ne peuvent pas être réduits en homocystéine libre.

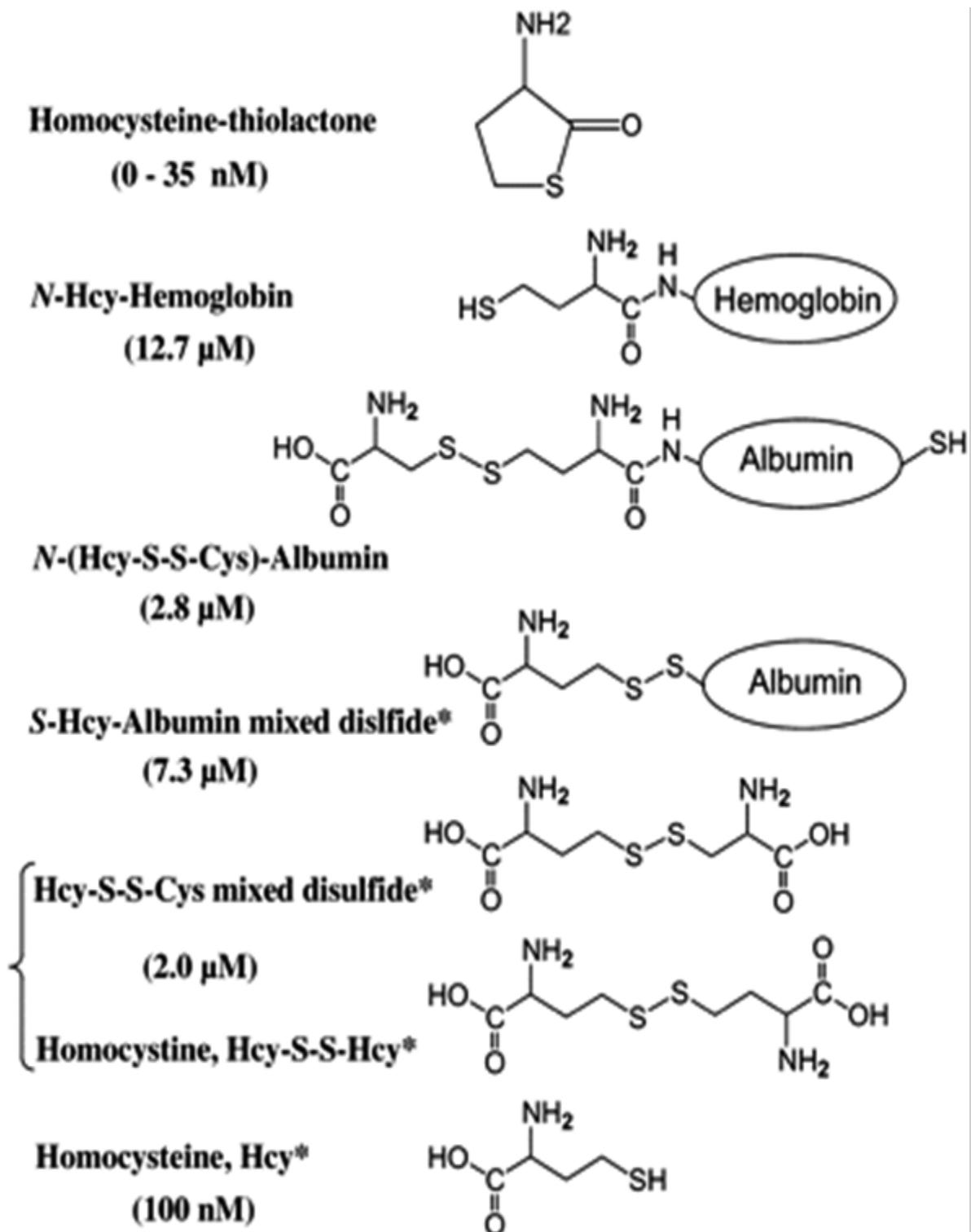


Figure 1 : Différentes formes de l'homocystéine dans le plasma humain.  
(d'après Jakubowski *et al.*, 2006)

## 2. Voies de synthèse et dégradation de l'homocystéine

Plusieurs enzymes et cofacteurs (vitamines du groupe B) entrent dans le métabolisme de l'homocystéine (Fig. 2), qui emprunte la *voie de trans-sulfuration* qui est régulée par la *cystathionine  $\beta$  synthase* (C $\beta$ S) ou la *voie de reméthylation* contrôlée par la *méthionine synthase* (MS).

La première étape du métabolisme de la méthionine consiste en sa conversion par la MAT ou méthionine-adénosyl-transférase (Mato *et al.*, 1997), en présence d'ATP, en S-adénosyl-méthionine (SAM : forme active) qui est considérée comme principal donneur de radicaux méthyles dans de nombreuses réactions aux différents accepteurs importants comme l'ADN, l'ARN, les neurotransmetteurs, les hormones et les phosphatidylcholines (Bailey *et al.*, 2001). La méthylation de l'ADN et les histones se répercutera sur l'activité globale des gènes (Vaillant et Paszkowski, 2007 ; Cedar et Bergman, 2009).

La déméthylation de la SAM donne la S-adénosyl homocystéine (SAH) inhibiteur de toutes les méthyl-transférases (Lu et Mato 2008 ; Luka *et al.*, 2009). La SAH est hydrolysée en homocystéine et adénosine par la S-adénosyl homocystéine hydrolase ou SAHH (Welch et Loscalzo, 1998).

L'homocystéine produite, peut jouer le rôle de précurseur de la méthionine par sa reméthylation par la méthionine synthase (MS) en utilisant le groupement méthyle issu de la N5-méthyle-tétrahydrofolate (5-CH<sub>3</sub>-THF) et la vitamine B<sub>12</sub> comme cofacteur (méthylcobalamine sa forme active). La bétaine-homocystéine S-méthyltransférase (BHMT) catalyse la reméthylation de l'homocystéine indépendamment des folates en utilisant la bétaine (donneur de groupement méthyle dérivé de l'oxydation de la choline). Parallèlement à la reméthylation, l'homocystéine peut être catabolisée par la voie de trans-sulfuration en cystéine en commençant par une conversion irréversible en cystathionine par la cystathionine  $\beta$  synthase (C $\beta$ S) dépendant de la vitamine B<sub>6</sub>, qui donnera à son tour la cystéine par l'enzyme cystathionine  $\gamma$  synthase (C $\gamma$ S) qui pourra être métabolisée en molécules biologiques importantes comme le glutathion (antioxydant).

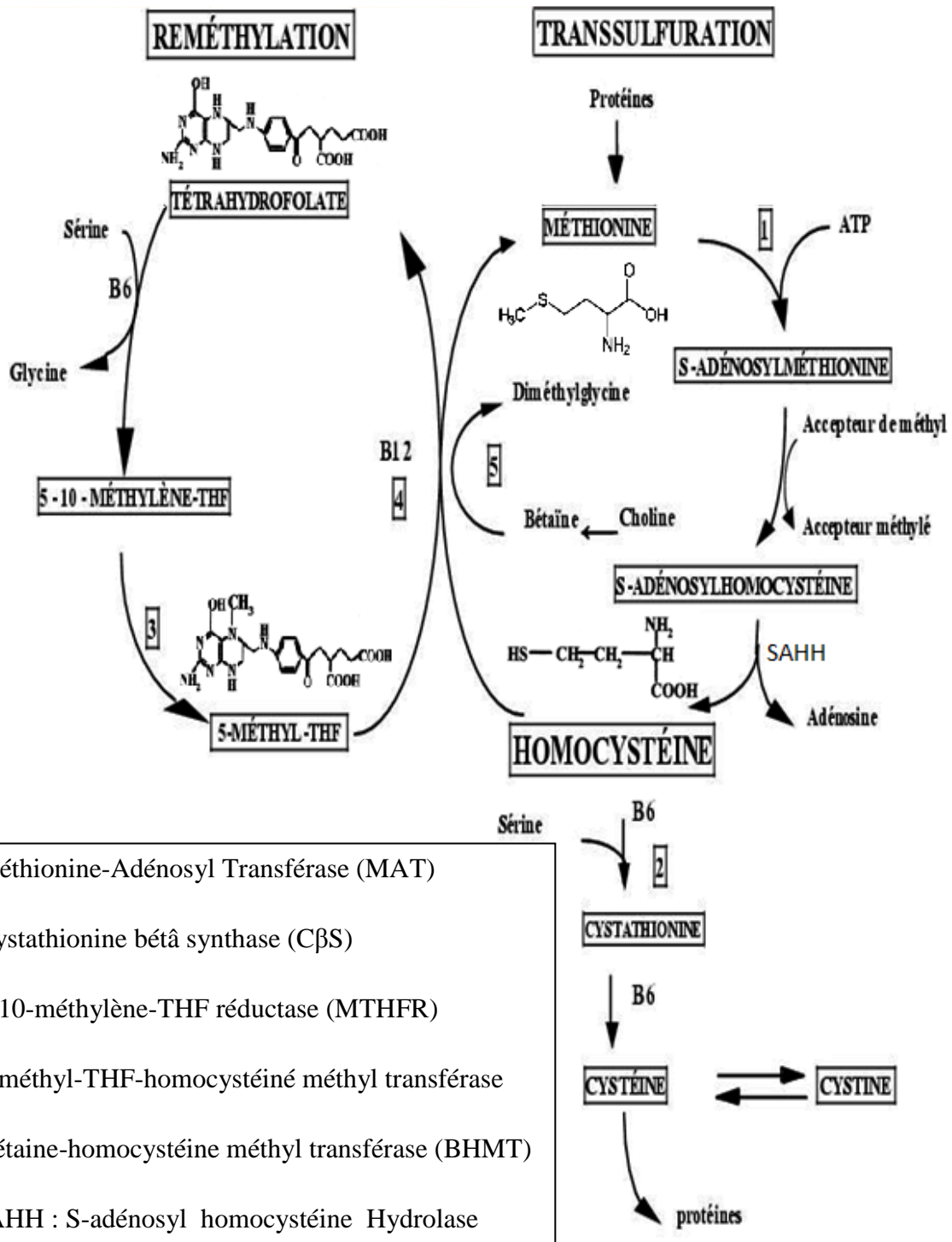


Figure 2 : Métabolisme de l'homocystéine (Murthy *et al.*, 2005 ; Vesin *et al.*, 2007)

### 3. Régulation du métabolisme de l'homocystéine

La reméthylation et la trans-sulfuration dépendent de la disponibilité de la SAM qui est un inhibiteur allostérique de la MTHFR (Guilland *et al.*, 2003), enzyme synthétisant la N5-CH<sub>3</sub>-THF (Kutzback *et al.*, 1967 ; Jencks et Matthews, 1987). Ainsi lorsque le taux de SAM est élevé, la MTHFR est inhibée, la synthèse de la N5-CH<sub>3</sub>-THF diminue ce qui activera la glycine-N-CH<sub>3</sub>-transférase (GNMT) qui catalyse le transfert du groupement méthyle de la SAM sur le groupement amine de la glycine qui donnera la sarcosine. La SAM active la CβS enzyme clé de la trans-sulfuration (Finkelstein *et al.*, 1975). Inversement lorsque le taux de SAM est diminué, l'inhibition sur la MTHFR est levée, la N5-CH<sub>3</sub>-THF est augmentée ainsi la GNMT est inhibée (Guilland *et al.*, 2003).

### 4. Relation entre les vitamines B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, folates et le métabolisme de l'homocystéine

Les trois vitamines B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub> et B<sub>12</sub> interviennent dans le métabolisme de l'homocystéine, la vitamine B<sub>6</sub> est le cofacteur de la CβS, la vitamine B<sub>9</sub> (acide folique) participe par son métabolite donneur de méthyle le N5-MTHF, la méthyle cobalamine est le cofacteur de la méthionine synthase. Le taux d'homocystéinémie peut être abaissé par les folates, vitamines B<sub>6</sub> et B<sub>12</sub>, Il existe une corrélation entre l'hyperhomocystéinémie et le statut en vitamines B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> et folates (Cravo *et al.*, 2000).

Une carence en folates est probablement la cause principale et la plus étudiée d'une hyperhomocystéinémie. Hao *et al.* (2007) ont montré que la carence en vitamine B<sub>6</sub> était responsable d'une hyperhomocystéinémie.

En effet, McKinley *et al.* (2002) ont montré que la supplémentation en riboflavine (B<sub>2</sub>) n'engendrait une normalisation de l'homocystéine que si elle était associée à une supplémentation en folates chez des personnes âgées présentant un taux basal diminué de riboflavine.

## II. HYPERHOMOCYSTEINEMIE

L'homocystéinémie physiologique se situe entre 6 et 12 μmol/L (Bostom *et al.*, 2000). Son augmentation engendre une hyperhomocystéinémie qui est, selon Guilland *et al.* (2003), qualifiée de :

- *Modérée* lorsque la concentration en homocystéine est comprise entre 12 et 30 μM,
- *Intermédiaire*, lorsque l'homocystéinémie varie entre 30 et 100 μM,
- *Sévère* lorsque l'homocystéinémie est supérieure à 100 μM.

Les déterminants de l'homocystéinémie sont nombreux et multiples, impliquant des facteurs génétiques, environnementaux et nutritionnels.

### 1. Facteurs environnementaux et nutritionnels

Ils incluent le statut en folates vitamines B<sub>6</sub> B<sub>12</sub>, l'âge, le sexe, les médicaments et différentes conditions pathologiques. Les personnes âgées ont des taux d'Hcy plus élevés que les jeunes, chez qui le statut vitaminique joue un rôle primordial (Selhub *et al.*, 1993). Chez les hommes, l'homocystéinémie est plus élevée que celle des femmes du fait de la masse musculaire et de l'effet des hormones (Anderson *et al.*, 1992 ; Jacobsen *et al.*, 1994).

L'homocystéinémie peut être aussi induite par la prise de certains médicaments (Ueland *et al.*, 1993) tel que le methotrexate (qui interfère dans le métabolisme des folates), le dioxyde d'azote (qui inactive la vitamine B<sub>12</sub>), l'azaribine (qui inhibe la CβS), par différentes pathologies comme l'insuffisance rénale, le diabète de type II, l'hypothyroïdisme, les affections inflammatoires. Par ailleurs, l'usage chronique de tabac ou d'alcool favorise l'hyperhomocystéinémie. Ainsi, une hyperhomocystéinémie chez les sujets alcoolo-dépendants a été décrite pour la première fois par Hultberg *et al.* (1993). Chaouad, (2008) rapporte qu'une hypothyroïdie peut provoquer une hyperhomocystéinémie modérée chez le Rat des sables.

## 2. Facteurs d'origine génétique

Durant les dernières années, les gènes de la CβS, MTHFR et MS, ont été clonés et plusieurs mutations ont été identifiées, comme la mutation causée par la substitution d'une cytosine en une thymidine en position 677 du gène codant pour la MTHFR. Cette mutation ponctuelle causera le remplacement de la valine en alanine (Frosst *et al.*, 1995). Des études *in vitro* rapportent que l'activité de cette enzyme sera réduite de 30 à 50% (Bolander-Gouaille., 2002) favorisant l'HHcy. Chen et Marsh. (1997) ont mis en évidence l'existence de plusieurs polymorphismes de la méthionine synthase, le plus prédominant est la mutation 2756 A→G, au niveau de l'enzyme, (l'aspartate est remplacée par une glycine).

Pour le gène de la CβS, une soixantaine de polymorphismes ont été décrits, le plus répandu est le polymorphisme 833T→C qui serait fortement associé aux problèmes de thromboses (Gaustadnes *et al.*, 2000).

## III. PATHOLOGIES ASSOCIEES A L'HOMOCYSTEINE

L'hyperhomocystéinémie possède de nombreuses actions sur le système cardio-vasculaire : perturbation de la synthèse et de l'effet du monoxyde d'azote (NO) (Ho *et al.*, 2003), multiplication des cellules musculaires lisses (Murthy *et al.*, 2005), remodelage de la matrice extracellulaire (Kumar *et al.*, 2008), oxydation des lipoprotéines (Blacher *et al.*, 2005). Par ailleurs, il est admis que l'hyperhomocystéinémie induit par des mécanismes complexes, un stress oxydatif responsable d'un dysfonctionnement endothélial aboutissant entre autre à une diminution de la production des cellules endothéliales et leur desquamation exposant le sous-endothélium, et responsable de l'activation des processus de coagulation (Demuth *et al.*, 2000)

### 1. Homocystéine et diabète

Les personnes atteintes de diabète sont prédisposées aux maladies cardiovasculaires (MCV). Le taux de décès dû à des problèmes cardiaques est deux à quatre fois plus élevé chez les personnes atteintes de diabète de type 2. Munshi *et al.* (1996) ont montré que le diabète de type 2 est associé à une hyperhomocystéinémie. L'étude Hoorn Study a trouvé que des taux d'homocystéine plus élevés augmentaient le risque de MCV de 38 % chez les personnes sans diabète et de 233 % chez celles atteintes de diabète. Une forte relation entre l'étendue des anomalies coronariennes et la concentration d'homocystéine a été observée chez les diabétiques (Jeger *et al.*, 2001). Chez les personnes atteintes de diabète, la relation entre homocystéine et albuminurie peut être due à des altérations de la fonction rénale (Davis *et al.*, 2001), et que l'hyperhomocystéinémie peut être associée a la rétinopathie diabétique (van Guldener et Stehouwer, 2003). Le stress oxydant généré par l'homocystéine thiolactone conduit à une inhibition de l'activité tyrosine kinase des récepteurs à l'insuline, résultant en une inhibition de la synthèse de glycogène par l'insuline (Najib et Sanchez-Margalet, 2001).

## 2. Homocystéine et homocystinurie

L'homocystinurie est une maladie héréditaire caractérisée biochimiquement par une élévation de l'homocystéinémie et de la méthionine et une diminution de la cystéine conséquence d'un déficit en C $\beta$ S, induisant des thromboses dues à l'accumulation d'homocystéine dans les cellules endothéliales (Drai et Garcia, 2007)

## 3. Homocystéine et athérosclérose

L'homocystéine est capable de provoquer l'athérosclérose de par son aptitude à :

- Oxyder les LDL favorisant la formation de cellules spumeuses qui est un élément formateur des plaques d'athérome (Blacher *et al.*, 2005),
- Réduire la concentration plasmatique en HDL-cholestérol par l'inhibition de la synthèse hépatique de l'Apo A-I, apolipoprotéine la plus importante de l'HDL (Mikael *et al.*, 2006),
- Provoquer un état inflammatoire, en augmentant l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme la MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) qui régule la migration et l'activation des monocytes et macrophages, ainsi que la production de l'IL-8 (interleukine 8) possédant une activité chimioattractante pour les neutrophiles et les lymphocytes T (Poddar *et al.*, 2001),
- Augmenter le taux de la CRP ou protéine réactive C, (Othmani, 2007) activant les cellules inflammatoires,
- Perturber la coagulation (Tab. 1) en interférant avec plusieurs de ses étapes favorisant la thrombose vasculaire par induction de molécules procoagulantes. Rodgers et Kan (1986) ont montré une activation du facteur tissulaire et du facteur endogène V de coagulation après une exposition des cellules endothéliales humaines à l'homocystéine. Zerrouk (2007) a rapporté la présence de lésions particulières au niveau artériel et de thrombose chez le Rat des sables hyperhomocystéinémique. En cas d'hyperhomocystéinémie, le risque de thrombose est multiplié par trois (Den Heijer *et al.*, 1995 ).

**Tableau 1 :** Exemples d'effets de l'homocystéine *in vitro* sur des médiateurs de la coagulation (d'après Demuth *et al.*, 2000)

Médiateurs de la coagulation	Effet de l'homocysteine	Conséquence fonctionnelle
Protéoglycanes de type <i>héparane sulfate</i>	Diminution de l'expression membranaire	Altération de la fonction d'inhibition de l'agrégation plaquettaire et de la coagulation
Facteurs V et XII	Potentialisation de l'activation	Activation de la coagulation
Facteur tissulaire	Induction de l'expression	
Thrombomoduline	Diminution de l'expression membranaire	Altération de la fonction d'inhibition de la coagulation
Activateur tissulaire du plasminogène	Inhibition de la liaison aux récepteurs membranaires	Inhibition de la fibrinolyse
Facteur Von Willebrand	Augmentation de l'expression	Activation de la coagulation

#### **4. Homocystéine et infarctus du myocarde**

De nombreux travaux ont rapporté une élévation de l'homocystéinémie associée aux accidents cardio-vasculaires (Dudman, 1999 ; Aguilar *et al.*, 2004) ainsi qu'après un infarctus du myocarde (Sucu *et al.*, 2005).

L'amélioration des connaissances sur les mécanismes physiopathologiques des maladies cardio-vasculaires nécessite l'émergence de biomarqueurs cellulaires, génétiques ou biochimiques. La recherche de lésions myocardiques, même minimales, nécessite l'utilisation de marqueurs biochimiques qui, parfois, peuvent mettre en évidence des micronécroses (Zerizer *et al.*, 1998).

Parmi ces marqueurs, la CK-MB, marqueur de nécrose, garde sa place lorsque le dosage de la troponine n'est pas disponible (Alpert *et al.*, 2000 ; Bugugnari *et al.*, 2001 ; Valjevac *et al.*, 2009). La CK-MB joue un rôle clé dans l'approvisionnement des myofibrilles cardiaques en ATP nécessaire à la contraction. Selon Chan (1986), le dosage de ce marqueur est non seulement un indice de diagnostic précoce d'infarctus du myocarde mais également un indice de tous types de lésions myocardiques. Chez certaines espèces animales, les isoformes CK-MB notamment la CK-II-MB peuvent représenter un marqueur potentiel précoce des altérations myocardiques (Fredericks *et al.*, 2001).

#### **IV. HOMOCYSTEINE ET STRESS OXYDANT**

La régulation de la voie de transsulfuration de l'Hcy est très sensible aux conditions de stress oxydant, dans le maintien des réserves intracellulaires de glutathion (Vitvitsky *et al.*, 2003). L'Hcy est impliquée dans beaucoup de réactions d'oxydo-réduction, (Zappacosta *et al.*, 2001). L'homocystéine oxydée en homocystine libère du peroxyde d'hydrogène, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, son groupement thiol se lie aux ions ferreux ou cuivreux pour former un mélange oxydant générant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ce complexe participe à l'inactivation des enzymes.

Des études récentes ont également montré que l'Hcy est, en grande partie, impliquée dans les réactions cellulaires oxydantes et réductrices, Ho *et al.* (2003) ont rapporté que l'Hcy est responsable de la production de ROS qui ont un rôle majeur dans la survenue de lésions neurodégénératives, elle sensibilise aussi les cellules au stress oxydant en diminuant l'expression des enzymes anti-oxydantes dont la glutathion peroxydase et l'hème oxygénase (Outinen *et al.*, 1999).

#### **V. HOMOCYSTEINE ET DIFFERENTS EFFETS SUR LES PROTEINES**

L'homocystéine agit sur les protéines en formant des complexes disulfides Hcy-N-protéine.

Elle active l'agrégation des LDL et leur internalisation par les scavenger en se fixant au niveau des résidus lysine (Zinellu *et al.*, 2006).

Zhou *et al.* (2004) ont montré la présence de marqueurs de l'UPR (unfolded protein response) dans tous les types cellulaires de la plaque athéromateuse chez des souris hyperhomocystéinémiques, présentant des lésions athérosclérotiques avancées.

Un état d'hyperhomocystéinémie peut induire un dysfonctionnement du RE aboutissant à une athérosclérose. Ji et Kaplowitz (2003) ont montré que l'hyperhomocystéinémie provoque un stress oxydatif du RE altérant le métabolisme hépatocytaire des lipides en activant une famille de protéines appelées SREBPs (*sterol regulatory element binding proteins*) synthétisées dans le RE qui sont actives dans le cytosol qui vont activer par la suite la transcription des gènes nécessaires à la biosynthèse des triglycérides, des acides gras et du cholestérol.

Les cellules musculaires lisses localisées au niveau des lésions à chape fibreuse épaisse, expriment de forts taux de GRP78/94 et de Hsp47 impliquée dans la maturation du collagène (Nakai *et al.*, 1992).

L'homocystéine peut augmenter le taux de la métalloprotéinase 9 ou MMP-9 (Holven *et al.*, 2006), en activant la voie de signalisation MAPK ( ERK1/2) au niveau nucléaire (Moshal *et al.*, 2006a) et mitochondrial (Moshal *et al.*, 2006 b).

Guo *et al.* (2007) ont montré qu'une hyperhomocystéinémie augmente dans les cellules musculaires lisses vasculaires de rat, la production de la métalloprotéinase 2 ou MMP-2 perturbant la matrice extracellulaire. Cette production peut être diminuée par un traitement à l'héparine.

d'activateur

## **VI. HOMOCYSTEINE ET MATRICE EXTRACELLULAIRE**

La dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) joue un rôle très important dans l'athérogenèse ainsi que dans la perturbation de la plaque athéromateuse.

L'hyperhomocystéinémie perturbe l'organisation des tissus conjonctifs entraînant un basculement du cristallin, une hyperlaxité ligamentaire et un développement anormal des cartilages, retrouvés dans le syndrome de Marfan. 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 desmosine. Elle pourrait aussi perturber le métabolisme des protéoglycanes soufrés tels que le dermatane et l'héparane sulfate (Khan *et al.*, 2001).

Le remodelage de la matrice extracellulaire de nature conjonctive a été rapporté chez le Rat Wistar (Raaf, 2003), le Rat des sables (Zerrouk, 2007) et le lapin (Othmani, 2007) au niveau vasculaire ; et au niveau de l'appareil reproducteur femelle du lapin (Othmani, 2007) et appareil reproducteur mâle du Rat Wistar (Ghoul, 2009). Holven *et al.* (2006) ont signalé une perturbation de la balance MMP-9/TIMP-1 chez des individus hyperhomocystéinémiques, suggérant une dégradation de la MEC augmentant le risque d'accidents cardiovasculaires.

# *MATERIEL ET METHODES*

# I. MATERIEL BIOLOGIQUE

Pour notre étude nous avons choisi le rat Wistar (*Rattus norvegicus*), modèle expérimental le plus disponible.

## 1. Données biologiques du rat *Rattus norvegicus*

Les caractéristiques du Rat Wistar sont les suivantes (Laroche et Rousselet 1990) :

- Poids à la naissance (♂) : 5g
- Poids au sevrage : 35-90g
- Poids adulte : 300-900g
- Température corporelle (°C) : 37,5-38,5
- Rythme cardiaque (batts/min.) : 305(270-350)
- Pression artérielle (mm Hg) : 110-120
- Rythme respiratoire (resp. /min.) : 85,5 (66-114)
- Volume urinaire (ml/24h//100g) : 5,52
- Volémie (ml/Kg) : 64,1 (57,5-69,9)
- Durée de vie au laboratoire : 3 ans au minimum
- Consommation quotidienne d'aliment sec : 8 à 12g pour un rat de 50 à 80g et 10 à 20g pour un poids corporel de 80 à 250g

## 2. Condition d'élevage en animalerie

Les rats sont répartis individuellement dans des cages en plastique équipées d'une litière en sciure et d'un couvercle métallique.

La température ambiante est maintenue constante, la lumière est artificielle.

## 3. Régime alimentaire

La consommation quotidienne en eau et en aliment sont données *ad libitum*.

Nous avons utilisé pour cette étude, un régime alimentaire (La Production locale Bouzaréah Alger), dépourvu d'homocystéine comportant de la méthionine (0,43%), de la cystéine (0,32%), de la sérine (1,2%) et de la glycine (1,12%). Sa composition en vitamines B<sub>6</sub>, en acide folique et en choline est respectivement de l'ordre de 6,5 ; 1,7 et 1900 ppm, celle de la vitamine B<sub>12</sub> est de 2 mg par kg d'aliment.

## 4. Protocole expérimental

L'expérimentation a comporté 29 rats de sexe mâle, provenant de l'Institut Pasteur d'Alger, ayant un poids corporel moyen de  $191,99 \pm 11,20$ g en début d'expérimentation.

Après une période d'adaptation de 10 jours, ils sont répartis en 4 lots : un lot Témoin (n=05 rats) et 3 lots d'animaux traités comportant 8 rats Wistar chacun. Un rat du lot II est mort au début du traitement.

Dans le cadre de ce travail, un état d'hyperhomocystéinémie est induit expérimentalement par administration *per os* d'un excès de DL-Méthionine (Sigma) dissoute dans une solution de NaCl à 0.9% pendant 3 mois. Nous avons étudié l'effet de 3 doses de méthionine :

- 300 mg/Kg de poids corporel pour le Lot I,
- 400 mg/Kg de poids corporel pour le Lot II,

- 500 mg/Kg de poids corporel pour le Lot III.

## II. TECHNIQUES OPERATOIRES

### 1. Evolution du poids corporel et des paramètres biochimiques :

Les rats sont soumis à une pesée hebdomadaire durant toute l'expérimentation en vue d'une étude de l'évolution pondérale. Pour le suivi des paramètres plasmatiques, des ponctions sont effectuées au niveau du sinus rétro-orbital de l'œil à l'aide d'une pipette pasteur préalablement héparinée. Le sang prélevé sur tubes héparinés, citratés est centrifugé à 3000 tr/mn pendant 10 minutes, celui prélevé sur tubes secs est laissé pour se décanter. Le plasma récupéré est conservé à -20°C pour le dosage des paramètres biochimiques (cholestérol, triglycérides, protéines totales, homocystéine, CK-MB...).

### 2. Prélèvement des organes

Au terme de l'expérimentation (3 mois), les animaux sont sacrifiés, après anesthésie par injection intra péritonéale d'uréthane à 25%, à raison de 0,4 ml/100 g de poids corporel. Le cœur, objet de cette étude et tous les autres organes sont prélevés.

- Un fragment ventriculaire de cœur est prélevé dans des conditions stériles en vue d'une étude zymographique,

- Un fragment ventriculaire de cœur est fixé dans le bouin aqueux en vue d'une étude histologique et histochimique.

Les autres organes sont fixés et/ou congelés pour des études ultérieures.

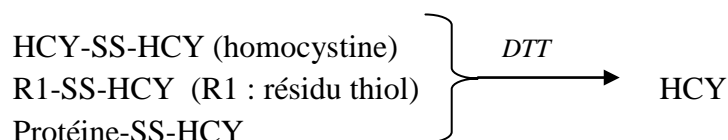
## III. TECHNIQUES ANALYTIQUES

Sur les plasmas obtenus, nous avons déterminé l'homocystéinémie, la cholestérolémie, la triglycéridémie, la protéinémie, un marqueur de stress oxydatif ainsi qu'un marqueur cardiaque. Nous avons également analysé les lipoprotéines plasmatiques.

### 1. Dosage de l'homocystéine

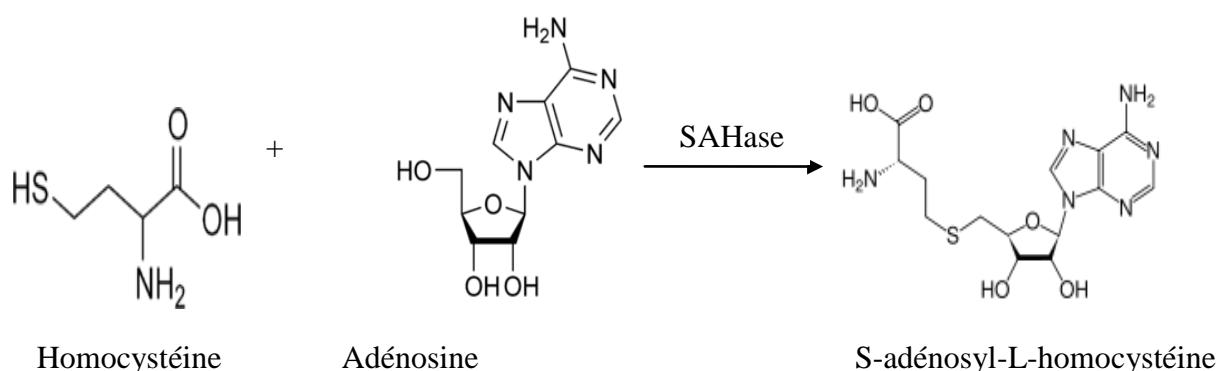
L'homocystéine totale est dosée par la méthode de fluorescence polarisation immunoassay (FPIA), méthode quantitative automatisée sur analyseur AXSYM dont le principe est le suivant :

- ✓ **La réduction** : l'homocystéine, les disulfides mixtes et l'homocystéine liée aux protéines dans le plasma sont réduits en homocystéine libre par le dithiothréitol (DTT).



- ✓ **La conversion enzymatique** : l'homocystéine totale libre est convertie en S-adénosyl-L-homocystéine (SAH) par la S-adénosyl-L-homocystéine hydrolase (SAHase) en présence de d'adénosine (Fig. 3).

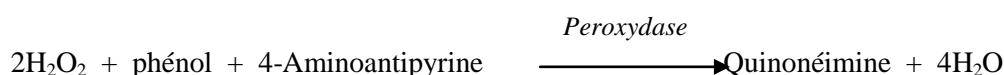
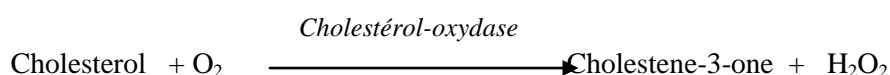
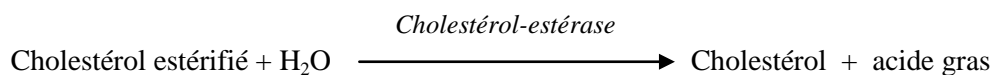
La SAH et le traceur marqué de fluorescéine concurrencent pour les sites sur la molécule monoclonale d'anticorps. L'intensité de la lumière fluorescente polarisée est mesurée par la FPIA optique.



**Figure 3 :** Conversion enzymatique de l'homocystéine libre

## 2. Dosage du cholestérol

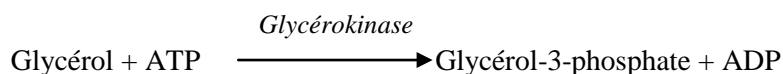
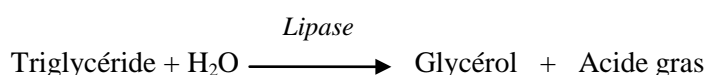
Le cholestérol plasmatique est déterminé selon la méthode de Richmond (1973). Il est libéré par la cholestérol estérase à partir des esters de cholestérol puis oxydé par la cholestérol oxydase en cholestène-3-one avec la libération de peroxyde d'hydrogène. La quinonéimine obtenue sous l'action de la peroxydase, est quantifiée par la mesure de la densité optique à 500 nm.

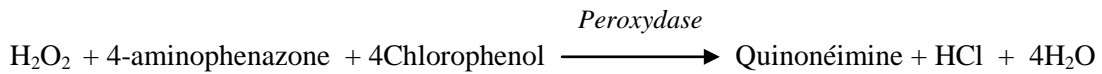
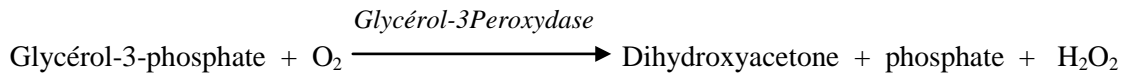


$$\text{Concentration du cholestérol plasmatique} = \frac{\text{DO}_{\text{Plasma}}}{\text{DO}_{\text{standard}}} \times \text{Concentration du standard}$$

## 3. Dosage des triglycérides

Les triglycérides ont été dosés avec le Kit Randox, selon la méthode colorimétrique, après hydrolyse enzymatique par la lipase. L'indicateur qui est la quinonéimine (révélée à 500 nm) est formé à partir du peroxyde d'hydrogène, 4-aminophenazone et la 4-chlorophenol par la peroxydase suivant les réactions ci-dessous :





#### 4. Dosage des protéines totales

La concentration des protéines plasmatiques est déterminée avec le kit Randox par la réaction du Biuret qui consiste en une interaction des liaisons peptidiques avec le sulfate de cuivre en milieu alcalin stabilisé par les tartrates de sodium et de potassium, en présence d'iodure de potassium. La réaction va induire un changement de coloration estimé par la mesure de la densité optique à 546 nm, permettant la quantification des protéines de ce milieu.

#### 5. Electrophorèse des lipoprotéines

La détection et la quantification des lipoprotéines ont été réalisées par le Kit REP LIPIDE-LP (a) par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose selon la méthode de Kalwakami (1989).

- **Principe**

La séparation sur gel d'agarose se fait en fonction de la charge ionique et du poids moléculaire des lipoprotéines.

- **Procédure**

- *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.

- *Dépôt des échantillons*

- Les plasmas 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 A est mis dans l'aire adjacente à la barrette des puits (séchage du porte échantillon).

- *Migration*

- Le tampon REP-PREP est étalé au centre de la chambre de migration en forme de «L» en partant de la gauche.

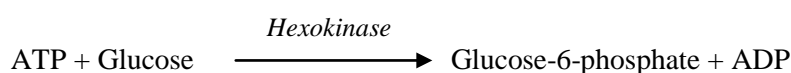
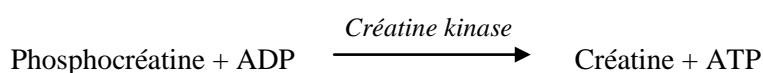
- La plaque de gel est fixée dans la chambre de migration après orientation et étalement du tampon de migration. Pour cela, la plaque de gel est déplacée délicatement de gauche à droite, en évitant la formation de bulles d'air.
- *Coloration et décoloration*
  - Dès que la migration est terminée, la 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 suivis d'un rinçage final dans l'eau distillée.
  - Le gel est séché à 60°C.
- *Lecture des plaques*
  - L'évaluation qualitative de la plaque est réalisée par la visualisation des différentes fractions.
  - L'évaluation quantitative de chaque fraction s'effectue à l'aide d'un densitomètre à 525 nm.
- *Résultats*
  - Les lipoprotéines migrent de la cathode (point d'application) vers l'anode.
  - Les HDL constituent les fractions les plus chargées, aussi sont elles les plus proches de l'anode, elles représentent la bande  $\alpha$ -lipoprotéines.
  - Les chylomicrons restent au point de dépôt.
  - La bande des  $\beta$ -lipoprotéines (LDL) est souvent la fraction la plus importante, elle est proche du point d'origine.
  - Les pré- $\beta$ -lipoprotéines (VLDL) migrent entre les  $\alpha$ -lipoprotéines (HDL) et les  $\beta$ -lipoprotéines.
  - Les IDL n'apparaissent pas car elles se transforment rapidement en LDL.

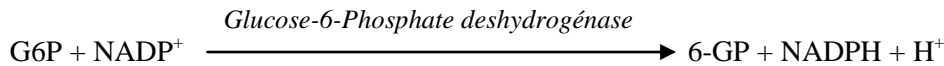
## 6. Dosage du marqueur cardiaque la créatine kinase MB (CK-MB)

La CK-MB a été dosée par la méthode d'immuno-inhibition avec les kits Spinreact.

Principe : un anticorps anti CK-M inhibe complètement la sous unité CK-M de la CK-MB.

L'activité de la sous unité CK-B non-inhibée sera ensuite calculée après les étapes suivantes :





Le taux de NADPH formé mesuré par photométrie, est proportionnel à la concentration catalytique de la CK-B présente dans le plasma.

## 7. Approche de l'analyse du stress oxydatif par quantification du Monoxyde d'azote (NO)

Nous avons dosé le rapport nitrates/nitrites (NO<sub>x</sub>).

### • Principe

Les nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) et les nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) sont les métabolites physiologiquement stables du NO dans les milieux biologiques. La méthode de Griess modifiée qui permet la quantification du NO dans les milieux biologiques est basée sur le dosage de ces deux métabolites.

Elle consiste en un premier temps à transformer, par voie microbiologique, les nitrates contenus dans un échantillon donné (sérum ou surnageant de culture cellulaire) en nitrites.

Une souche bactérienne *Pseudomonas oleovorans*, nitrates réductase (ATCC 8062) est utilisée pour catalyser la réduction des nitrates en nitrites. Ces derniers sont ensuite quantifiés par dosage colorimétrique à 543 nm par le biais du réactif de Griess qui donne une coloration rose plus ou moins intense lorsqu'il réagit avec les nitrites.

### • Mode opératoire

La première étape consiste en une *réduction des nitrates*. Pour cela, 50 µL du milieu à analyser sont mélangés avec 25 µL de la suspension bactérienne et 25 µL du PBS pH 7,2.

Après incubation à 37°C pendant 90 min, la préparation est centrifugée pendant 2 min à 1200 rpm et le surnageant est récupéré.

La deuxième étape est un *dosage colorimétrique des nitrites totaux*. L'échantillon (100µL) est mis en présence de 100 µL du réactif de Griess (50 µL de naphthyléthylène diamine dichloride à 0,5% dans une solution de HCl à 20% additionné de 50 µL de sulfanilamide à 5% dans du HCl à 20%) et 300 µL d'eau distillée. Après 20 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance est lue à 543 nm. Elle est proportionnelle à la concentration des nitrates. Une gamme étalon DO en fonction des nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) a été réalisée au préalable à partir d'une solution mère de NaNO<sub>2</sub> à 500 µM

## IV. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

Nos échantillons sont soumis aux techniques histologiques classiques comportant la fixation, la déshydratation, l'éclaircissement, l'imprégnation, l'inclusion et la coloration (Martoja et Martoja 1967 ; Gabe 1968).

### 1. Fixation

La fixation a pour but de garder les tissus et les organes dans un état proche de l'état vivant.

Les fragments de cœurs sont prélevés et rapidement plongés dans le Bouin aqueux, (liquide fixateur à base de trois agents : le formol, l'acide acétique et l'acide picrique). Ce dernier a un effet mordant qui permet une bonne imprégnation du colorant.

La durée de la fixation est de 3 jours. Les pièces sont ensuite lavées pendant 24h à l'eau courante afin d'éliminer l'excès de liquide fixateur.

## **2. Déshydratation**

Les pièces sont déshydratées dans des bains d'alcool éthylique de degré croissant (50°, 70°, 90°, 100°) à raison de 30 minutes par bain. Cette déshydratation a pour but d'éliminer complètement l'eau contenue dans les cellules et d'assurer la bonne pénétration de la paraffine.

## **3. Eclaircissement**

Un bain intermédiaire de butanol est réalisé entre le dernier bain d'alcool (100°) et celui de la paraffine, il permet de substituer l'alcool par le butanol. La substitution se fait par deux bains de butanol de 30 minutes chacun.

## **4. Imprégnation**

Grâce à différents bains, les pièces sont imprégnées dans la paraffine en effectuant :

- un premier bain de paraffine/ butanol (V/V, 2h),
- un deuxième bain de paraffine pure filtrée (2h), à l'étuve à 58°C.

## **5. Inclusion**

La confection des blocs de paraffine (barre de Leuckart) dans lequel l'organe est inclus est suivie par la réalisation de coupes de 5µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome du type American optical.

## **6. Coloration**

Nous avons utilisé 2 types de coloration, une coloration topographique et deux colorations histochimiques

### **6.1. Coloration topographique**

Elle facilite l'identification des différentes structures tissulaires. La coloration topographique utilisée dans le cadre de cette étude est le trichrome de Masson variante de Goldner qui colore le noyau en noir (Hématoxyline de Groat), le cytoplasme en rose (Fuschine-ponceau et orangé G) et les fibres de collagènes en vert (Vert lumière) ou en bleu (Bleu d'aniline).

## **6.2. Colorations histochimiques**

Deux colorations histochimiques ont été impliquées dans cette étude pour mettre en évidence des composés ou des radicaux présents dans les tissus, il s'agit de :

- **La coloration à l'acide périodique Schiff**

Elle permet de mettre en évidence les polysaccharides, les glycoprotéines et glycolipides qui se colorent en rose par l'acide périodique-Schiff (APS).

Cette coloration est réalisée en deux temps, une première étape de libération des différents groupements à fonction aldéhyde par le traitement des coupes histologiques à l'acide périodique 1% puis une deuxième étape de révélation de ces groupements au réactif de Schiff à base de fuchsine basique.

- **La coloration au bleu alcian**

Il s'agit d'un colorant signalétique mettant en évidence les protéoglycanes qui se colorent en bleu.

## **7. Observations et iconographie**

Les observations et les illustrations ont été réalisées à l'aide d'un microscope de type Zeiss équipé d'un appareil photographique numérique Canon.

Les grossissements portés dans les légendes des planches I à V correspondent au grossissement de l'objectif et de l'oculaire x zoom de l'appareil photographique.

## **V. METHODES STATISTIQUES**

Les résultats biochimiques (Homocystéine, cholestérol, protéines, triglycérides, lipoprotéines, CK-MB, nitrates/nitrites), sont exprimés par la moyenne affectée de son écart type.

La comparaison des moyennes est réalisée par le test *t* de Student (utilisation d'Excel 2007).

Les degrés de significativité précisés dans les résultats sont les suivants : \*  $P < 0,05$  ;

\*\*  $P < 0,02$  ; \*\*\*  $P < 0,01$  ; \*\*\*\*  $P < 0,001$ .

***RESULTATS***

Dans le but d'analyser les effets d'un excès de méthionine chez *Rattus norvegicus*, nous avons effectué :

- un suivi hebdomadaire du *poids corporel* pendant toute la durée d'expérimentation,
  
- *au niveau plasmatique*, certains dosages biochimiques dont
  - l'homocystéinémie,
  - la triglycéridémie,
  - la cholestérolémie,
  - la protéinémie,
  - l'analyse des lipoprotéines plasmatiques (HDL, VLDL, LDL),
  - l'analyse des nitrites totaux,
  - l'analyse de la CK-MB,
  
- *au niveau tissulaire*, l'analyse des éventuelles altérations touchant la paroi cardiaque avec une attention particulière à la matrice extracellulaire et aux cardiomyocytes grâce à une étude histologique et histochimique.

## I. EVOLUTION DU POIDS CORPOREL

Les pesées hebdomadaires effectuées pendant 3 mois ont permis le suivi du poids des rats Témoin et soumis à une administration *per os* de méthionine à raison de 300 mg/Kg de poids corporel/jour (Lot I), 400 mg/Kg de poids corporel/jour (Lot II) et 500 mg/Kg de poids corporel/jour (Lot III). Les résultats sont consignés dans le tableau 2 et figure 3.

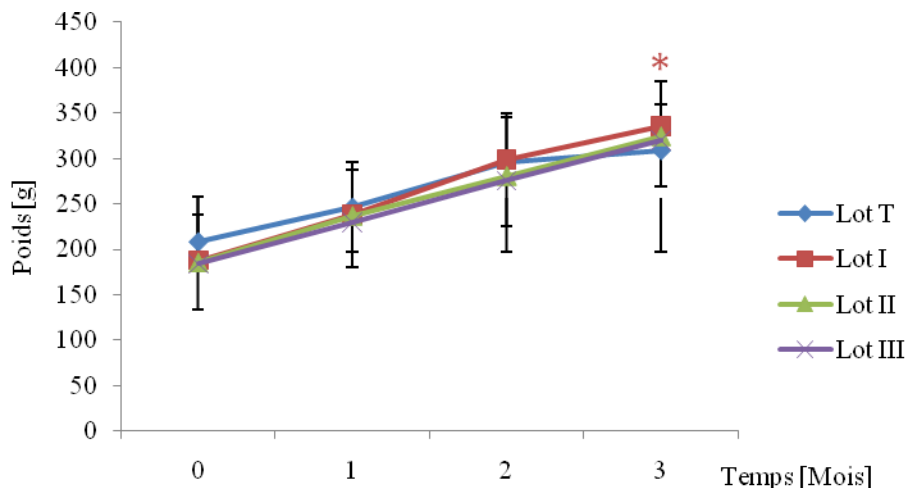
**Tableau 2** : Evolution pondérale (g) des Rats témoins et soumis à différentes doses de méthionine.

	Poids des rats (g)			
	0	1 mois	2 mois	3 mois
Lot Témoin	208 ± 32,39	246 ± 19,15 <sup>°</sup>	295 ± 11,82 <sup>°°</sup>	309 ± 18,48 <sup>°°°</sup>
Lot I	187 ± 24,98	238 ± 39,62 <sup>°°</sup>	299 ± 28,06 <sup>°°°</sup>	335 ± 19,36 <sup>°°°°</sup>
Lot II	185 ± 25,35	236 ± 19,15 <sup>°°</sup>	280 ± 26,18 <sup>°°</sup>	324 ± 19,95 <sup>°°°</sup>
Lot III	184 ± 24,55	229 ± 20,04 <sup>°°°</sup>	275 ± 31,84 <sup>°°°</sup>	319 ± 21,25 <sup>°°°°</sup>

Ces valeurs correspondent aux moyennes du poids affectées de l'écart type.

T1, T2, T3 vs T0 pour chaque Lot : ° p<0.05 ; °° P<0.02 ; °°° P<0.01 ; °°°° P<0.001

Lot I, Lot II, Lot III vs Te



**Figure 4** : Evolution du poids corporel (g) des rats témoins et soumis à la méthionine.

La figure 4 montre une augmentation significative du poids corporel chez les rats de tous les lots. Cette augmentation est plus importante chez les animaux soumis à la méthionine. En effet, à T<sub>3</sub> le poids corporel des rats soumis à 300, 400 et 500 mg de méthionine/Kg de poids corporel/jour a augmenté d'environ 79,75 ; 75,13 et 73% (P<0.05) respectivement vs 49% environ chez les témoins.

### Conclusion

*La méthionine administrée per os serait responsable d'une augmentation du poids corporel des Rats.*

## II. EVOLUTION DES PARAMETRES BIOCHIMIQUES PLASMATIQUES

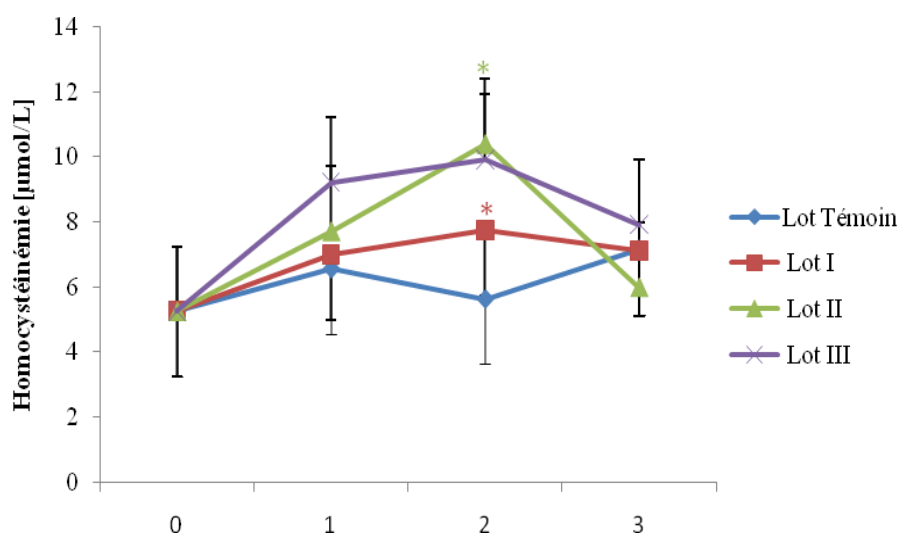
### 1. L'homocystéinémie

L'homocystéinémie exprimée en  $\mu\text{mole/L}$  a été évaluée chaque mois (Tab. 3 ; Fig. 5).

**Tableau 3 :** Evolution de l'homocystéinémie des rats témoins et soumis à la méthionine

	Homocystéinémie [ $\mu\text{mole/L}$ ]			
	0	1 mois	2 mois	3 mois
Lot Témoin	$5,25 \pm 0,82$	$6,56 \pm 1,49$	$5,63 \pm 1,23$	$7,14 \pm 0,03$
Lot I	$5,25 \pm 0,82$	$6,99 \pm 1,26$	$7,74 \pm 2,03^*$	$7,12 \pm 0,64$
Lot II	$5,25 \pm 0,82$	$7,71 \pm 2,63$	$10,39 \pm 5,22^*$	$5,99 \pm 0,98$
Lot III	$5,25 \pm 0,82$	$9,22 \pm 2,84$	$10,34 \pm 6,91$	$7,92 \pm 0,80$

Les valeurs représentent la moyenne affectée de son écart-type. Lot I, II et III vs Te \*  $P < 0,05$

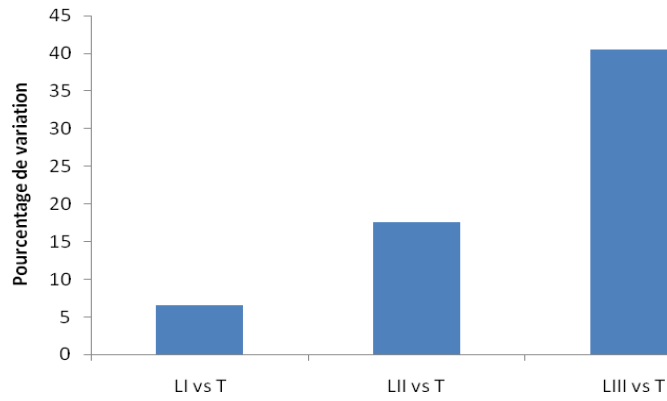


**Figure 5 :** Evolution de l'homocystéinémie ( $\mu\text{mol/L}$ ) des rats témoins et soumis à la méthionine pendant 3 mois

Les valeurs obtenues montrent que l'administration de méthionine engendre une augmentation de l'homocystéinémie.

A  $T_1$ , elle augmente d'environ 7% (lot I), 18% (lot II) et 41% (lot III) mettant en évidence l'effet dose-réponse (Fig. 6). A  $T_2$ , une augmentation d'environ 85% (lot II) et 76% (lot III) est enregistrée.

En fin d'expérimentation, la plus importante augmentation est notée chez les animaux du lot III (51%).



**Figure 6 :** Pourcentage de variation de l'homocystéinémie au premier mois.

## 2. La Cholestérolémie

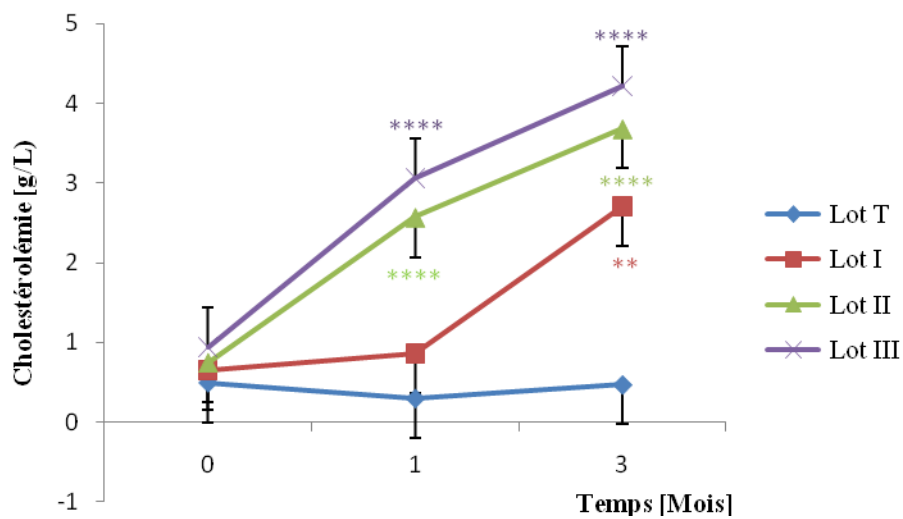
Les résultats du dosage du cholestérol total n'ont pu être effectués qu'au 1<sup>er</sup> et au 3<sup>ème</sup> mois par manque de plasma, sont rapportés dans le tableau 4 et la figure 7.

**Tableau 4 :** Evolution de la cholestérolémie des *Rattus norvegicus* témoins et soumis à différentes doses de méthionine.

	Cholestérolémie [g/L]		
	0	1 mois	3 mois
Lot Témoin	0,43 ± 0,06	0,41 ± 0,08	0,45 ± 0,09
Lot I	0,65 ± 0,05	0,86 ± 0,55	3,03 ± 0,44 **
Lot II	0,75 ± 0,10	2,57 ± 0,62 ****	3,68 ± 0,62 ****
Lot III	0,66 ± 0,31	3,06 ± 0,58 ****	4,74 ± 0,80 ****

Les valeurs représentent la moyenne affectée de son écart-type.

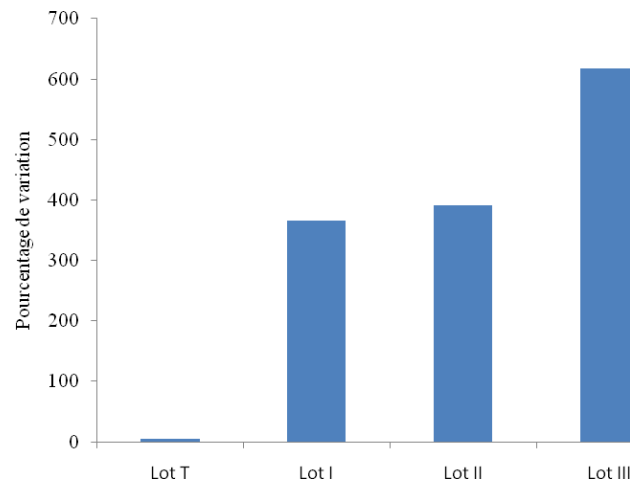
Lot I, II et III vs Te \*\* P<0.02 ; \*\*\*\* P<0.001



**Figure 7 :** Evolution de la cholestérolémie (g/L) chez les rats témoins et des différents lots.

Le tableau 4 et la Figure 7 montrent que la cholestérolémie augmente après un mois d'administration de méthionine chez tous les lots ( $p < 0,01$  pour le lot I ;  $p < 0,001$  pour les lots II et III).

Au bout de 3 mois, cette augmentation devient plus importante chez les rats hyperhomocystéinémiques atteignant environ 366%, 391% et 618% respectivement pour les lots I, II et III vs 4.65% pour les témoins. En fin d'expérimentation, l'effet dose réponse est plus visible (Fig. 8).



**Figure 8 :** Pourcentage de variation de la cholestérolémie T<sub>3</sub> vs T<sub>0</sub>

### 3. La Triglycéridémie

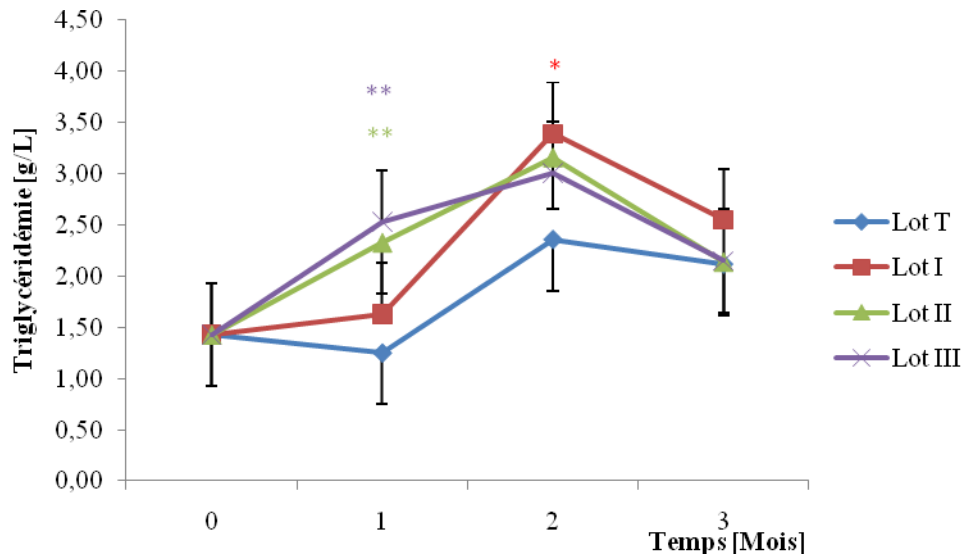
Le dosage des triglycérides sanguins a permis d'obtenir les résultats rapportés dans le tableau 5 et illustrés par la figure 9.

**Tableau 5:** Evolution de la triglycéridémie chez *Rattus norvegicus* témoins et hyperhomocystéinémiques

	Triglycéridémie moyenne [g/L]			
	0	1 mois	2 mois	3 mois
Lot Témoin	1,43 ± 0,19	1,25 ± 0,56	2,36 ± 0,33	2,12 ± 0,45
Lot I	1,43 ± 0,19	1,63 ± 0,30	3,39 ± 0,87 *	2,55 ± 0,91
Lot II	1,43 ± 0,19	2,33 ± 0,37 **	3,16 ± 0,72	2,14 ± 0,37
Lot III	1,43 ± 0,19	2,53 ± 0,50 **	3,01 ± 0,56	2,15 ± 0,47

Les valeurs représentent la moyenne affectée de son écart-type

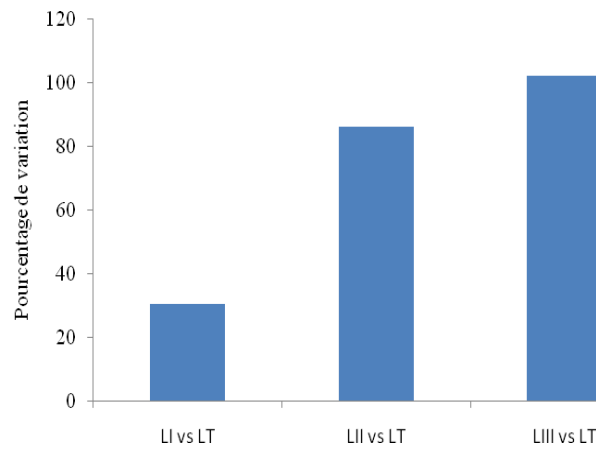
Lot I, II et III vs Te \* P < 0,05 ; \*\* P < 0,02



**Figure 9:** Evolution de la triglycémie chez les rats témoins et soumis à différentes doses de méthionine.

Après 1 et 2 mois d'administration de méthionine, la triglycémie est augmentée chez tous les lots de rats ( $p < 0.01$  pour les lots II et III à  $T_1$ ,  $p < 0.05$  pour le lot I à  $T_2$ ). En fin d'expérimentation, cette augmentation atteint environ 78% (lot I) et 50% (lot II et III).

L'effet dose-réponse est plus net à  $T_1$  (fig. 10).



**Figure 10 :** Pourcentage de variation de la triglycémie des différents lots vs témoin après un mois d'administration *per os* de méthionine.

## 4. La protéinémie

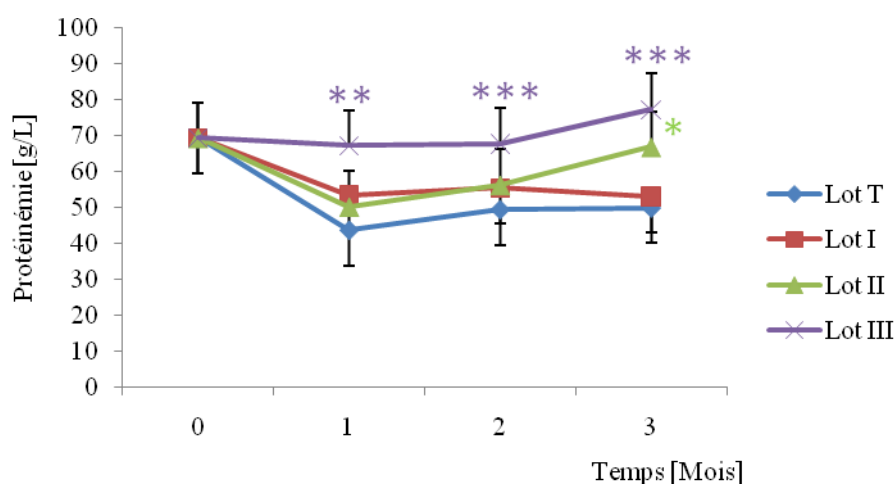
La protéinémie, exprimée en g/L, a été déterminée par la réaction du biuret (Tab. 6 ; Fig. 11).

**Tableau 6 :** Evolution de la protéinémie chez les rats témoins et hyperhomocystéinémiques

	Protéinémie [g/L]			
	0	1 mois	2 mois	3 mois
Lot Témoin	69,36 ± 8,27	43,79 ± 22,97	49,51 ± 7,88	49,97 ± 14,51
Lot I	69,36 ± 8,27	53,47 ± 9,69	55,39 ± 3,47	52,96 ± 6,33
Lot II	69,36 ± 8,27	50,05 ± 8,25	56,16 ± 8,04	66,84 ± 7,07 *
Lot III	69,36 ± 8,27	67,2 ± 10,90 **	67,71 ± 11,43 ***	77,29 ± 9,39 ***

Les valeurs représentent la moyenne affectée de son écart-type

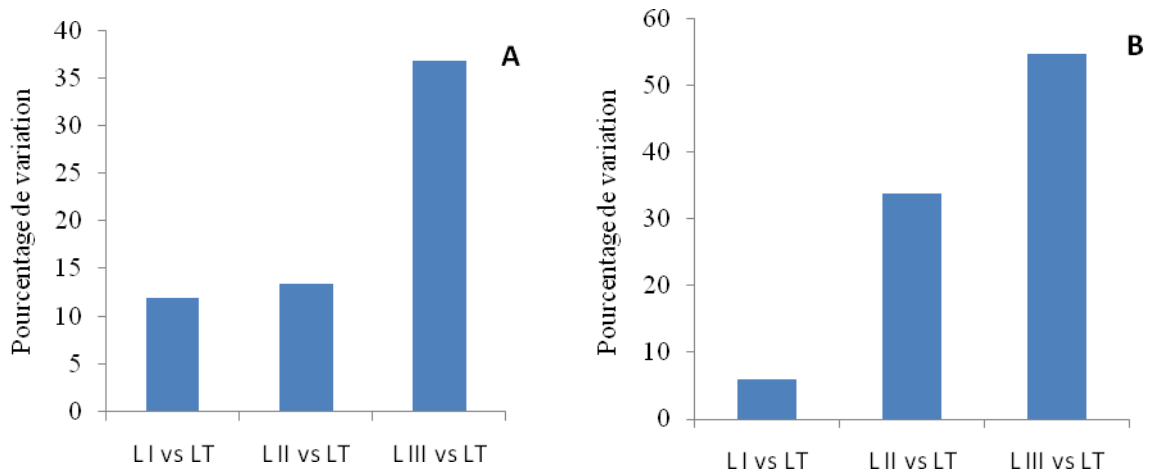
Lot I, II et III vs Te : \* P<0.05 ; \*\* P<0.02 ; \*\*\* P<0.01



**Figure 11 :** Evolution de la protéinémie chez les rats témoins et soumis à la méthionine.

Les résultats obtenus montrent que la protéinémie est plus élevée chez tous les rats hyperhomocystéinémiques. Par rapport aux rats témoins, une augmentation d'environ 14% est notée à T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub> atteignant environ 34% à T<sub>3</sub> chez les animaux soumis à une administration de méthionine à raison de 400 mg/Kg de p. c/jour (lot II). Pour les rats hyperhomocystéinémiques du lot III, cette augmentation atteint 55% environ en fin d'expérimentation.

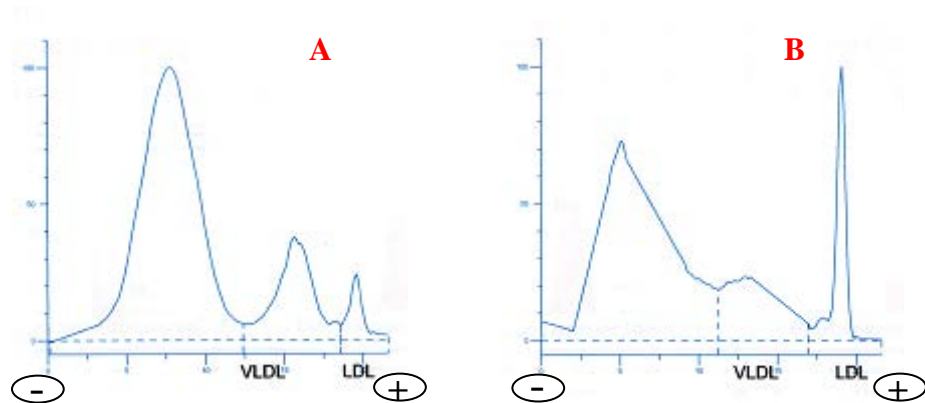
Un effet dose-réponse est observé à T<sub>2</sub> (Fig. 12A) et T<sub>3</sub> (Fig. 12B).



**Figure 12 :** Pourcentage de variation de la protéinémie au 2<sup>ème</sup> (A) et 3<sup>ème</sup> mois (B)

### 5. Electrophorèse des lipoprotéines

L'analyse qualitative des lipidogrammes réalisés au début (T<sub>0</sub>) et en fin d'expérimentation (T<sub>3</sub>) pour les rats du lot III, a permis de noter des variations dans les profils obtenus après électrophorèse horizontale sur gel d'agarose (Fig. 13).



**Figure 13 :** Profils électrophorétiques des lipoprotéines (A : Rat témoin ; B : Rat hyperhomocystéinémique lot III)

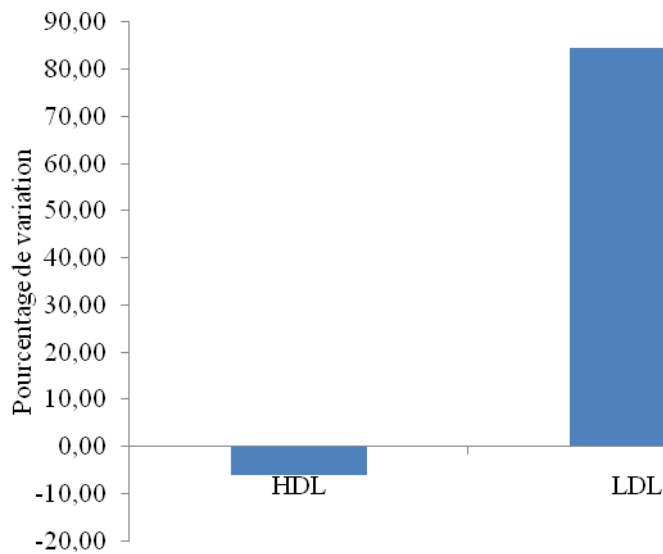
L'évaluation quantitative de chaque fraction effectuée à l'aide d'un densitomètre à 525 nm, est reportée dans le tableau 7.

**Tableau 7** : Evolution de la lipoprotéinémie des rats du lot III

Fractions lipoprotéiques [%]				
	HDL	VLDL	LDL	Rapport lipoprotéique $\beta/\gamma$ (VLDL+LDL)/HDL
T <sub>0</sub>	71,15 ± 5,20	27,17 ± 6,67	5,33 ± 3,64	0,48
T <sub>3</sub>	66,73 ± 4,62	23,42 ± 7,31	9,85 ± 3,51	0,50

Les valeurs représentent la moyenne affectée de son écart-type

La figure 14 met en évidence une diminution de 6,22% de la fraction cardioprotectrice (HDL) associée à une augmentation de 84,6% de la fraction athérogène (LDL) en fin d'expérimentation.



**Figure 14** : Pourcentage de variation de la lipoprotéinémie du lot III T<sub>0</sub> vs T<sub>3</sub>

**Conclusion**

*L'administration per os de méthionine à fortes doses engendre un état hyperhomocystéinémique responsable :*

- De perturbations des paramètres lipidiques plasmatiques,
- D'une augmentation de la protéinémie,
- D'une altération de l'équilibre lipoprotéique.

### III. APPROCHE DE L'ANALYSE DU STRESS OXYDATIF

Nous avons essayé de mettre en évidence l'installation d'un état de stress oxydant par le dosage d'un de ses marqueurs à savoir le rapport nitrates/nitrites.

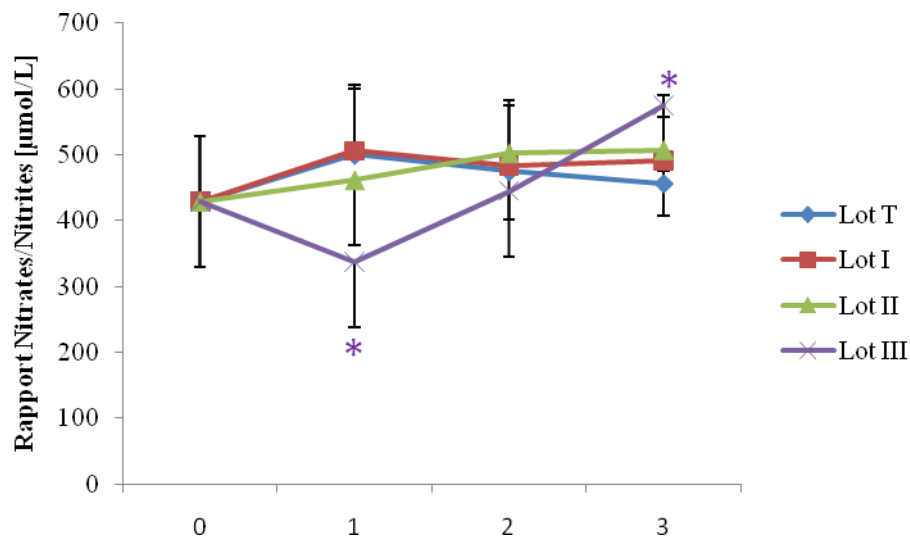
Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 8 et la figure 15.

**Tableau 8 :** Rapport nitrates/nitrites plasmatiques des rats témoins et soumis à la méthionine

	Rapport nitrates/nitrites [ $\mu\text{mol/L}$ ]			
	T0	1 mois	2 mois	3 mois
Lot Témoin	429,12 $\pm$ 76,73	500,31 $\pm$ 86,62	475,2 $\pm$ 143,21	456,93 $\pm$ 32,21
Lot I	429,12 $\pm$ 76,73	506,14 $\pm$ 42,79	498,75 $\pm$ 74,22	491,10 $\pm$ 0,24
Lot II	429,12 $\pm$ 76,73	461,97 $\pm$ 89,80	502,7 $\pm$ 105,75	507,66 $\pm$ 210,14
Lot III	429,12 $\pm$ 76,73	337,39 $\pm$ 35,29*	445,54 $\pm$ 36,14	575,15 $\pm$ 31,16 *

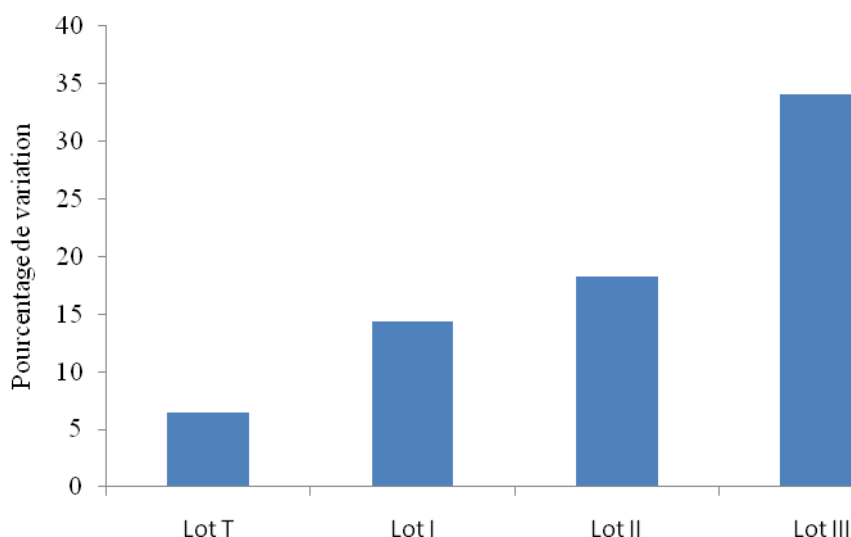
Les valeurs représentent la moyenne affectée de son écart-type.

Lot I, II et III vs Te : \* P < 0,05



**Figure 15 :** Evolution du rapport nitrates/nitrites plasmatiques des rats témoins et soumis à la méthionine.

En fin d'expérimentation, une augmentation de ce rapport d'environ 14% et 18% est noté chez les rats hyperhomocystéinémiques des lots I et II respectivement. Par ailleurs, une augmentation plus importante d'environ 34% est enregistrée pour le lot III vs témoin après 3 mois d'administration de méthionine à raison de 500 mg/Kg p. c /jour (Fig. 16).



**Figure 16 :** Pourcentage de variation du rapport nitrates/nitrites en fin d'expérimentation T<sub>0</sub> vs T<sub>3</sub>

*Conclusion*

*L'hyperhomocystéinémie consécutive à une surcharge élevée de méthionine, engendrerait un état de stress oxydant.*

#### IV. DOSAGE DU MARQUEUR CARDIAQUE LA CREATINE KINASE MB (CK-MB)

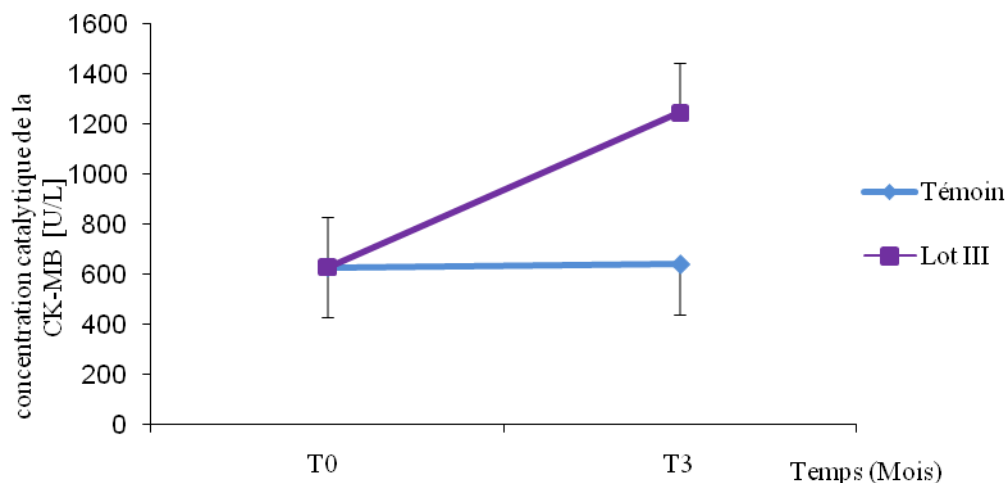
Il nous a semblé intéressant de quantifier la créatine kinase MB ou CK-MB, marqueur cardiaque de nécrose chez les rats du Lot témoin et les rats du Lot soumis à la plus forte dose de méthionine (500 mg/Kg de poids corporel/jour).

Les résultats de ce dosage effectué en début (T<sub>0</sub>) et en fin d'expérimentation (T<sub>3</sub>) sont présentés dans le tableau 9 et la figure 17.

**Tableau 9 :** Evolution de la CK-MB plasmatique (U/L) des rats des Lots témoin et III

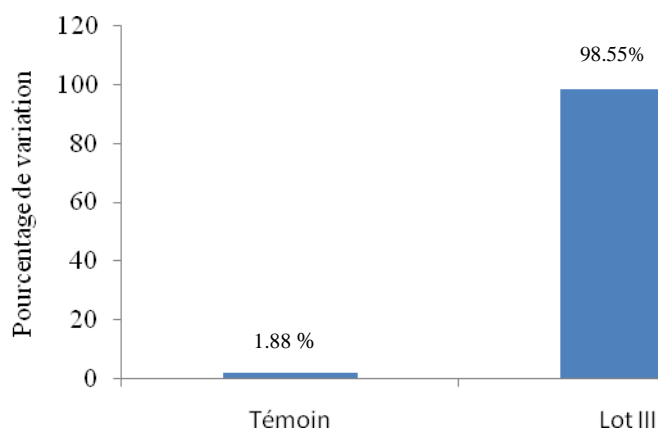
	Lot Témoin	Lot III
T <sub>0</sub>	627,19 ± 182,78	627,19 ± 182,78
T <sub>3</sub>	638,96 ± 163,31	1245,27 ± 502,18

Les valeurs représentent la moyenne affectée de son écart-type



**Figure 17 :** Evolution de la CK-MB plasmatique des rats témoins et traités

Les résultats obtenus montrent, chez les rats Wistar hyperhomocystéinémiques du lot III, une augmentation d'environ 98.55% de la concentration plasmatique en CK-MB vs 1.88% chez les animaux témoins (Fig. 18).



**Figure 18 :** Pourcentage de variation lot III vs témoins en fin d'expérimentation

*Conclusion*

*L'état hyperhomocystéinémique provoquerait une nécrose myocardique marquée par l'augmentation de la CK-MB.*

Il est à signaler que l'étude statistique effectuée n'a, parfois, pas révélée de différences significatives étant donné les variations individuelles enregistrées chez les animaux d'un même lot.

## V. STRUCTURE HISTOLOGIQUE DE LA PAROI CARDIAQUE

### 3. Structure de la paroi cardiaque du rat Wistar

L'observation de la structure cardiaque du rat Wistar a permis de distinguer de l'intérieur vers l'extérieur :

- L'*endocarde* : constitué d'une couche de cellules endothéliales dont leurs noyaux sont imprégnés d'hématoxyline et d'une couche sous endothéliale très réduite contenant peu de matériel conjonctif (Pl. I, Fig. 1 A),
- Le *myocarde* : couche moyenne (Pl. I, Fig. 1 A et B), richement vascularisée constituée de cardiomyocytes à orientation transversale ou longitudinale. Les cardiomyocytes sont des cellules musculaires striées à propriété contractile, avec un noyau unique volumineux ovalaire et un cytoplasme abondant. En plus de ces cellules, le myocarde contient d'autres types de cellules, les fibroblastes, logés entre les travées de myocytes cardiaques et assurant la synthèse de la matrice extracellulaire de nature conjonctive. Le noyau des fibroblastes prend une forme allongée avec un aspect très dense.
- L'*épicarde* : couche la plus externe (Pl. I, Fig. 1 B), de nature conjonctive contenant des fibroblastes.

### 4. Effets de l'hyperhomocystéinémie sur la structure cardiaque du Rat Wistar

L'hyperhomocystéinémie a engendré des altérations au niveau de la structure cardiaque du rat wistar quelque soit la dose de méthionine utilisée.

Nous avons enregistré des altérations touchant aussi bien les cardiomyocytes que la matrice extracellulaire et la vascularisation cardiaque.

L'épicarde ne semble pas altéré sur l'ensemble des préparations observées.

#### 2.1. Altérations matricielles (Pl. I, II, III)

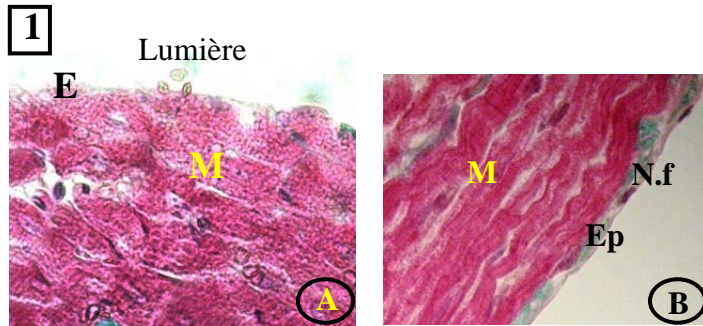
Les altérations matricielles cardiaques touchent trois familles de macromolécules matricielles à savoir les collagènes fibrillaires (collagènes type I et III), les glycoprotéines et les protéoglycanes.

L'endocarde et plus exactement la couche sous endothéliale présente des épaisissements focalisés (Pl. I, Fig. 2 à 4 ; Pl. II Fig. 4). A certains endroits, cette couche conjonctive est quatre fois plus importante (Pl. I, Fig. 5) chez certains rats hyperhomocystéinémiques du lot III.

Par ailleurs, une fibrose caractérisée par une accumulation de collagènes fibrillaires interstitiels, est également observée en position périvasculaire (Pl. II, Fig. 2, 3).

Une augmentation de la PAS-positivité des glycoprotéines (Pl. III, Fig.1 à 4) et des protéoglycanes (Pl. III, Fig. 7 à 9) matérialisée par la coloration à l'APS et au bleu alcian met en évidence une accumulation de ces deux macromolécules dans la matrice extracellulaire cardiaque des rats hyperhomocystéinémiques. Le dépôt des glycoprotéines est essentiellement marqué entre les cardiomyocytes (Pl. III, Fig. 3), en position périvasculaire (Pl. III, Fig. 2) et au niveau de l'endocarde (Pl. II, Fig. 4'). Les protéoglycanes sont particulièrement accumulés au niveau de l'endocarde (Pl. III, Fig. 7 à 9). Par ailleurs, chez certains animaux du lot III, un œdème focalisé est observé au niveau myocardique (Pl. III, Fig. 5 et 6).

**Planche I**  
**STRUCTURE MYOCARDIQUE DU RAT WISTAR TEMOIN ET**  
**HYPERHOMOCYSTEINEMIQUE**  
**Coloration Trichrome de Masson**



**Figure 1** : Paroi ventriculaire du Rat Wistar Témoin (A : Gr : 400 x 4 ; B : Gr : 400 x 5,6)  
 La paroi cardiaque comporte 3 couches : l'endocarde (E) délimitant la cavité ventriculaire (Fig. 1A), le myocarde (M) et l'épicarde(Ep) sur lequel (Fig. 1B) on peut observer les noyaux de fibroblastes (N.f)

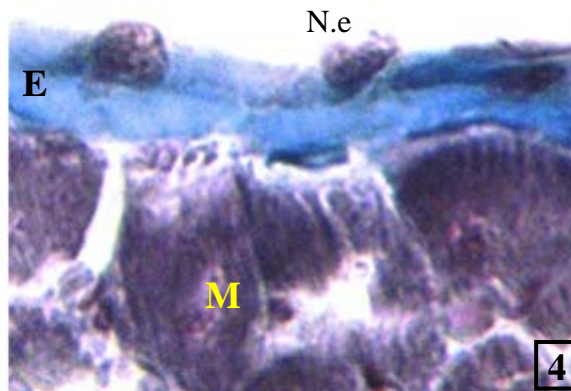


**Figure 2** : Paroi ventriculaire du Rat Wistar hyperhomocystéinémique du lot I (Gr : 400 x 11)

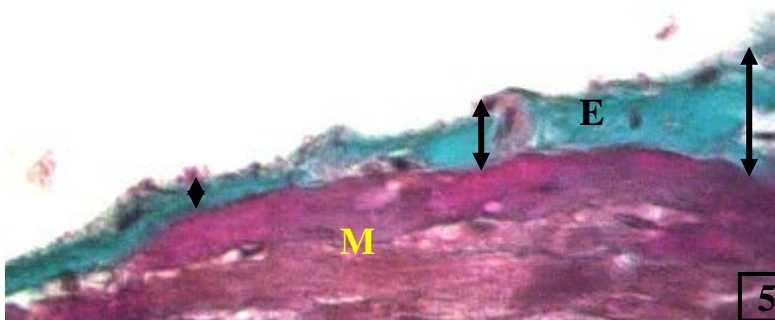
L'endocarde (E) constitué d'un endothélium dont on observe les noyaux (N.e) et d'une couche conjonctive épaissie, délimite le myocarde (M).



**Figure 3** (Gr : 400 x 4)  
 Épaississement de l'endocarde chez les rats hyperhomocystéinémiques du Lot II



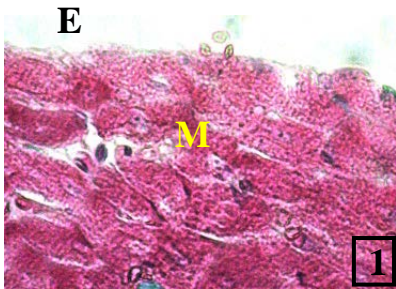
**Figure 4** (Gr : 1000 x 4)  
 Légère hypertrophie des noyaux endothéliaux (N.e)



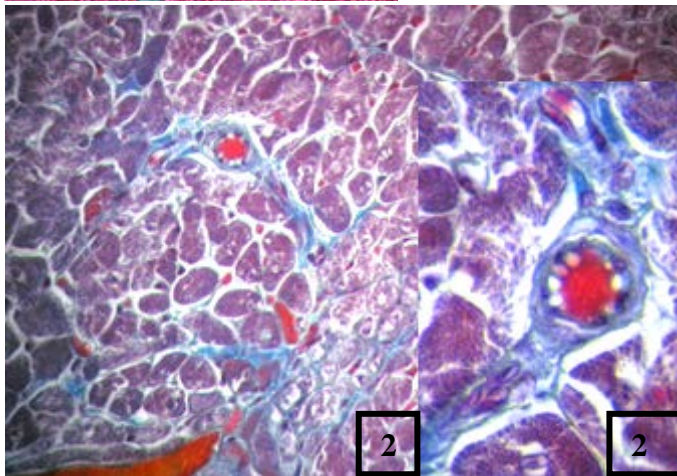
**Figure 5** : Paroi cardiaque des rats du Lot III (Gr : 400 x4)

Important épaississement focalisé de l'endocarde (Flèche noire)

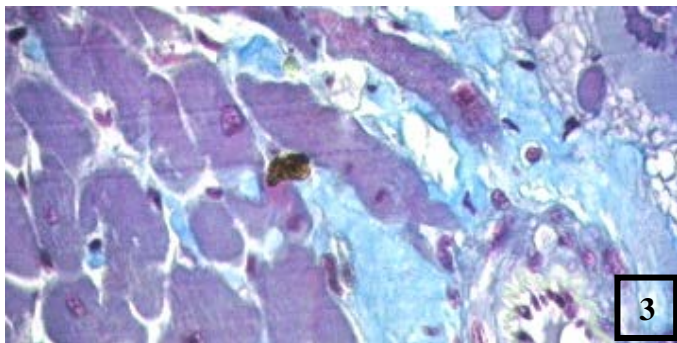
**Planche II**  
**STRUCTURE MYOCARDIQUE DU RAT WISTAR TEMOIN ET**  
**HYPERHOMOCYSTEINEMIQUE**  
**Coloration Trichrome de Masson**



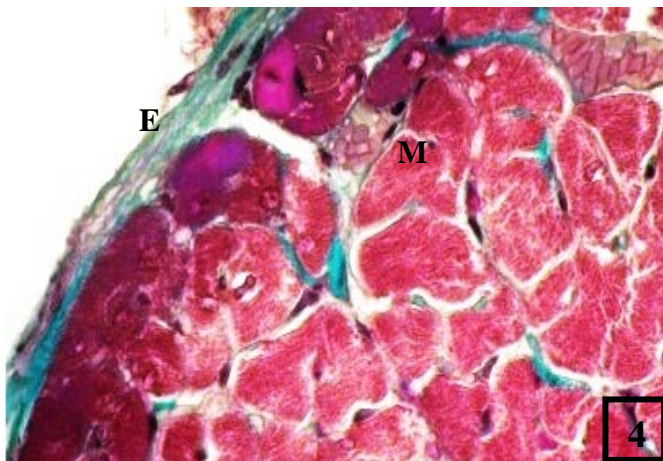
**Figure 1 :**  
 Paroi ventriculaire du Rat Wistar Témoin. Gr : 400 x 4  
 Le tissu conjonctif est très réduit au niveau de l'endocarde et du myocarde.



**Figure 2 :**  
 Myocarde du Rat hyperhomocystéinémique du Lot I  
 Nous observons une accumulation de collagènes (visualisée par la coloration bleue) entre les cardiomyocytes (Gr : 400 x 4) et en position périvasculaire (encadré 2' Gr : 1000 x 4)



**Figure 3 :**  
 Myocarde du Rat hyperhomocystéinémique du Lot II  
 (Gr : 400 x 4)  
 Importante accumulation de collagènes (colorés en bleu) entre les cardiomyocytes et en position périvasculaire



**Figure 4 :**  
 Myocarde du Rat hyperhomocystéinémique du Lot III  
 (Gr : 400 x 4)  
 Importante accumulation de collagènes au niveau de l'endocarde (E) et entre les cardiomyocytes

**PLANCHE III**  
**GLYCOPROTEINES ET PROTEOGLYCANES DE LA MATRICE MYOCARDIQUE**  
**DES RATS WISTAR TEMOIN ET HYPERHOMOCYSTEINEMIQUE**

**Figures 1 à 6 : Coloration à l'acide périodique Schiff**

**Figure 1 :** Faible présence de glycoprotéines dans la matrice extracellulaire myocardique du rat

Wistar témoin (Gr : 100 x 9.1)

**Figure 2 :** Dépôts de glycoprotéines au niveau des travées interstitielles du myocarde et en position

périvasculaire (Gr : 400 x 5.6) du Lot I

**Figure 3 :** Myocarde du rat Wistar hyperhomocysténémique du Lot II (Gr : 400 x 4)

Nous notons une positivité de la coloration à l'APS mettant en évidence la présence de

glycoprotéines matricielles essentiellement entre les cardiomyocytes

**Figure 4 :** Glycoprotéines matricielles myocardiques du Lot III (Gr : 400x4)

Nous observons un dépôt important de glycoprotéines au niveau de l'endocarde

**Figure 5** (Gr : 100 x 4) et **figure 6** (Gr : 400 x 4):

Présence d'un œdème au niveau de la couche myocardique chez certains rats hyperhomocystéinémiques du Lot III .

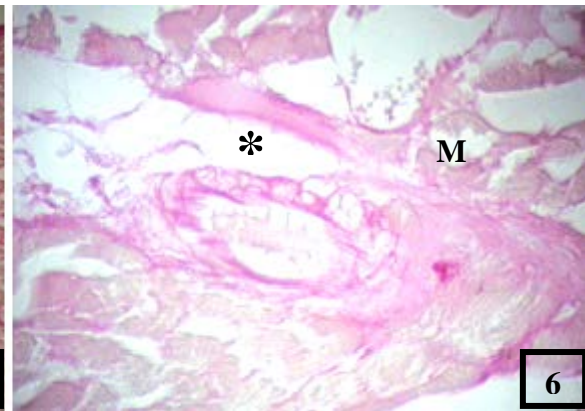
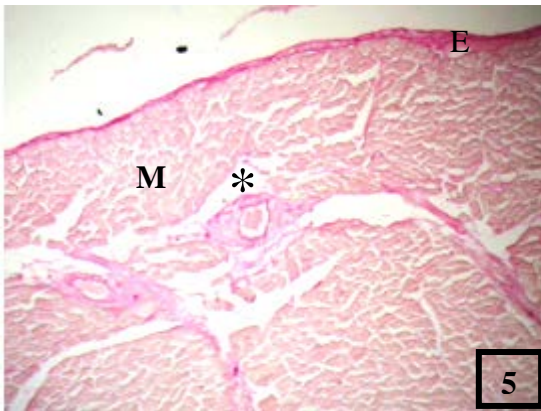
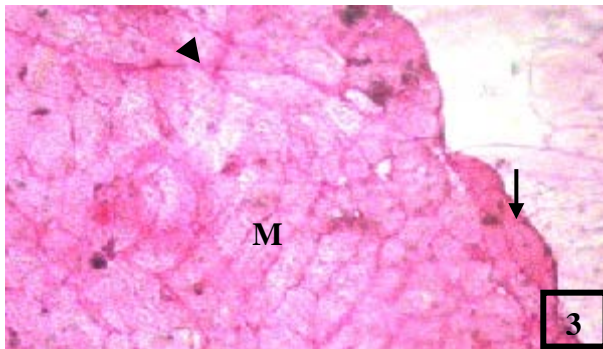
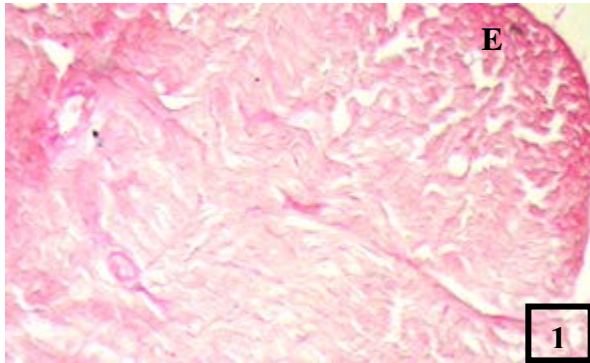
**Figures 7 à 9 : Coloration au Bleu alcian (Gr : 400 x 4)**

Myocarde du Rat hyperhomocystéinémique du Lot I (Figure 7), Rat hyperhomocystéinémique du Lot II (Figure 8) et Rat hyperhomocystéinémique du Lot III (Figure 9).

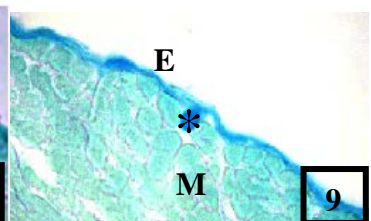
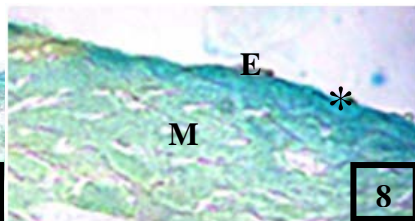
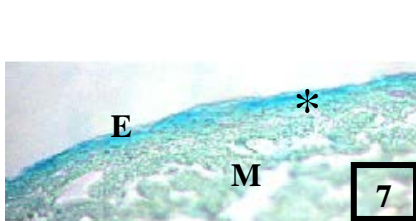
L'intensité de la coloration bleue observée met en évidence la présence dose-dépendante de protéoglycanes au niveau de l'endocarde.

### Planche III

ALTERATIONS MATRICIELLES DE LA STRUCTURE MYOCARDIQUE DU RAT WISTAR  
TEMOIN ET HYPERHOMOCYSTEINEMIQUE  
Coloration Acide périodique-Schiff et Bleu alcian



Coloration au Bleu Alcian



### **2.1. Les altérations cellulaires (Pl. IV)**

Au sein du myocarde, certains cardiomyocytes présentent une désorganisation cytoplasmique

(Pl. IV, Fig. 1). Nous avons noté la présence de noyaux apoptotiques présentant une structure altérée (Pl. IV, Fig. 2 et 3).

Par ailleurs la coloration au trichrome de Masson semble montrer une hétérogénéité des cardiomyocytes présentant des caractéristiques tinctoriales différentes (Pl. IV, Fig. 4).

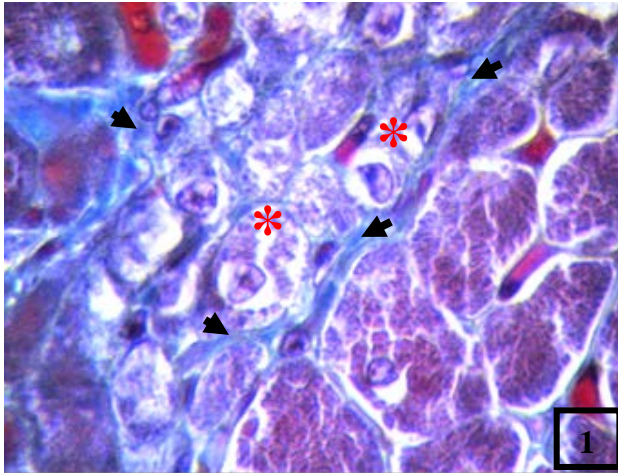
Le myocarde semble être le siège d'un début d'inflammation. Nous avons en effet observé, par endroits, la présence de polymorphonucléaires neutrophiles entre les cardiomyocytes (Pl. IV, Fig. 5).

### **2.2. Les altérations vasculaires (Pl. V)**

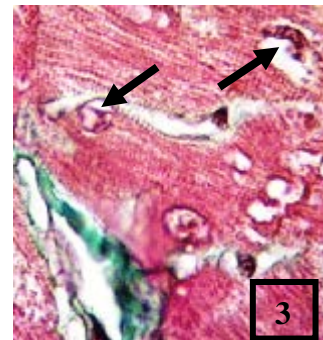
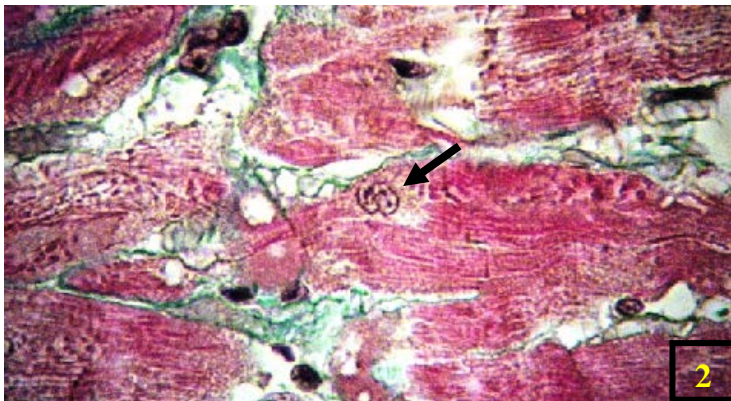
La vascularisation myocardique est le siège d'altérations caractérisées par une richesse vasculaire associée à une dilatation des capillaires chez tous les animaux hyperhomocystéinémiques (Pl. V, Fig. 1 à 5).

Chez certains rats soumis à la plus forte dose de méthionine (500 mg/Kg de pc/jour), nous avons observé une rupture de capillaires (Pl. V, Fig. 6).

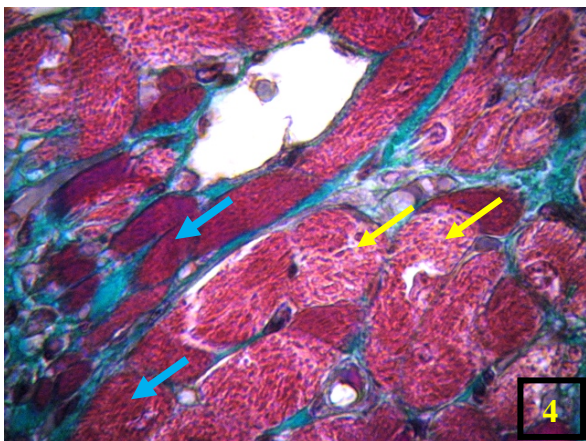
**Planche IV**  
**ALTERATIONS CELLULAIRES DE LA STRUCTURE MYOCARDIQUE DES RATS WISTAR**  
**HYPERHOMOCYSTEINEMIQES**  
**Coloration Trichrome de Masson**



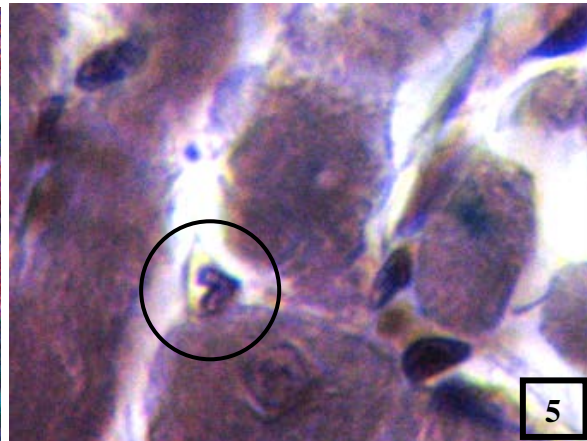
**Figure 1** Myocaride de Rat wistar du Lot I (Gr : 1000 x 5.6)  
 Certains cardiomyocytes (\*) présentent une désorganisation cytoplasmique.  
 Entre ces cellules, nous notons la présence d'un abondant collagène (tête de flèche noire)



**Figures 2 et 3 :** Myocaride des Rats Wistar du Lot III (Gr : 1000 x 4)  
 Les noyaux observés au niveau de certains cardiomyocytes présentent un aspect apoptotique

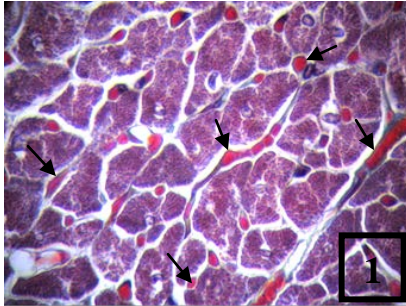


**Figure 4** Lot III (Gr : 1000 x 4)  
 Hétérogénéité tinctoriale cytoplasmique observée au niveau de certains cardiomyocytes (Flèches bleue et jaune).  
 Présence de collagènes abondant entre les cellules.



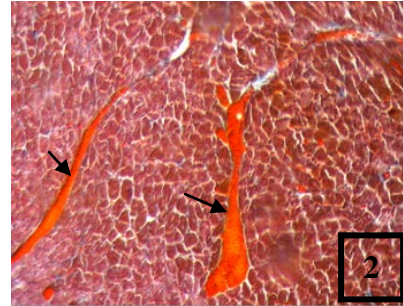
**Figure 5** Lot III (Gr : 1000 x 11)  
 La présence de polynucléaires neutrophiles entre certains cardiomyocytes (cercle noir) semble indiquer l'installation d'un début d'inflammation.

**Planche V**  
**ALTERATIONS VASCULAIRES DE LA STRUCTURE MYOCARDIQUE DES RATS WISTAR**  
**HYPERHOMOCYSTEINEMIQUES**  
**Coloration Trichrome de Masson**



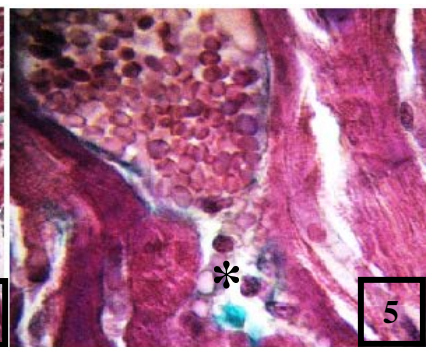
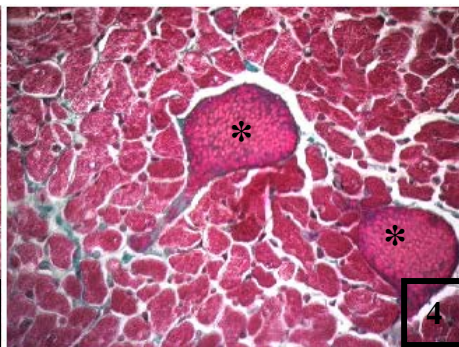
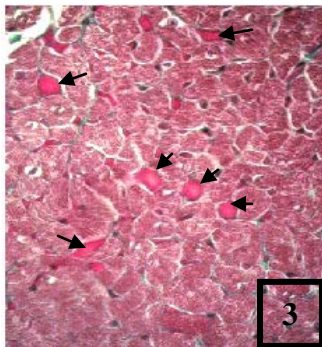
**Figure 1** (Gr : 400 x 4)

Importante vascularisation myocardique (Flèche noire).  
 Présence d'espaces entre les cardiomyocytes Lot I



**Figure 2** (Gr : 100 x 9.1)

Dilatation des capillaires myocardiques (Flèche noire) Lot I



**Figure 3** (Gr : 100 x 4) Lot III et **Figure 4** (Gr : 400 x 4) Lot III

Importante vascularisation myocardique (flèche noire).  
 Dilatation des capillaires (\*)  
 Présence de collagènes colorés en vert, entre les cardiomyocytes

**Figure 5** (Gr : 1000 x 4)

Nous notons une rupture de la paroi vasculaire d'un capillaire (\*) chez certains rats hyperhomocystéinémiques du lot III.

*En conclusion,*

*L'administration per os de méthionine induit une **hyperhomocystéinémie** qui est responsable :*

- *D'une augmentation du poids corporel,*
- ***Au niveau plasmatique**, de perturbations marquées par :*
  - *Une hypercholestérolémie,*
  - *Une augmentation de la triglycéridémie,*
  - *une augmentation de la protéinémie,*
  - *une dyslipoprotéinémie caractérisée par une augmentation des LDL et une diminution des HDL,*
  - *l'installation d'un état de stress oxydant,*
- ***Au niveau tissulaire**, d'altérations observées au niveau du :*
  - *compartiment matriciel (remodelage mis en évidence par la fibrose interstitielle, épaissement de l'endocarde, l'augmentation des glycoprotéines et protéoglycanes au sein du myocarde,*
  - *compartiment cellulaire (désorganisation des cardiomyocytes et apoptose) et du*
  - *compartiment vasculaire (fibrose péri-vasculaire, richesse en capillaires dilatés, rupture).*

*Ces altérations, signe d'un remodelage cardiaque, sont confirmées par l'augmentation de la CK-MB*

*Pour la plupart des perturbations et altérations observées, un effet dose-réponse est noté*

*DISCUSSION*

Notre étude analyse les effets d'une hyperhomocystéinémie sur le remodelage de la matrice extracellulaire cardiaque et ses répercussions sur la biochimie plasmatique du rat Wistar. L'hyperhomocystéinémie est engendrée par une administration *per os* de différentes doses de méthionine à savoir 300 mg, 400 mg et 500 mg/Kg de poids corporel/jour pendant 3 mois.

Une *hyperhomocystéinémie* peut être engendrée par un déficit en vitamines B<sub>6</sub> ou B<sub>12</sub> (Lentz *et al.*, 1997 ; Martinez *et al.*, 2000) ou en acide folique (Huang *et al.*, 2001), par administration d'homocystéine (Miller *et al.*, 2000, 2001) ou de méthionine (Rolland *et al.*, 1995 ; Mori *et al.*, 2001). Pour notre part, nous avons opté pour une administration de méthionine.

Plusieurs voies d'administration de la méthionine sont citées dans la littérature, la voie *per os* a été utilisée par plusieurs chercheurs dans l'eau de boisson (Zhou *et al.*, 2001 ; Ungvari *et al.*, 2003 ; DiBello *et al.*, 2010), par les membres de notre équipe (Othmani, 2007 ; Goul, 2009) et dans ce présent travail. Elle peut également être intégrée dans l'aliment donné (Zhou *et al.*, 2001). Afin d'induire un état hyperhomocystéinémique, Moshal *et al.* (2009) ont choisi d'administrer de la DL-homocystéine dans l'eau de boisson. Raaf (2003) et Zerrouk (2007) ont opté pour l'injection intra péritonéale de méthionine.

Les doses de méthionine utilisées afin d'induire un état d'hyperhomocystéinémie varient en fonction du modèle animal utilisé. Au sein de notre équipe, les doses utilisées chez le Rat Wistar sont de 70 et 200 mg/Kg de poids corporel/jour pendant 10 et 6 mois respectivement (Raaf, 2003 ; Ghoul, 2009), de 70 mg/Kg de poids corporel/jour pendant 6 mois chez *Psammomys obesus* (Zerrouk, 2007) et varient de 0,5 à 1,5 g/jour chez le lapin pendant 3 et 2 mois respectivement (Othmani, 2007 ; Fernane, 2009 ; Taghli, 2010). Dans ce présent travail, nous avons testé, chez le rat Wistar, trois doses de méthionine (300, 400 et 500 mg/ Kg de poids corporel/jour) pendant 3 mois.

Les *pesées hebdomadaires* que nous avons effectuées indiquent un gain de poids corporel plus important chez les rats soumis à une surcharge en méthionine par rapport à celui enregistré chez les rats du lot Témoin. Des expérimentations réalisées sur le rat Wistar ne rapportent aucun changement du poids corporel (Joseph *et al.*, 2003 ; Ghoul, 2009). Une augmentation très significative a, au contraire, été notée chez la lapine non-gestante par Othmani (2007). D'autres chercheurs comme Zhou *et al.* (2001), Troen *et al.* (2003), Zerrouk

(2007) ont noté une diminution du poids corporel respectivement chez la souris et le rat des sables *Psammomys obesus*.

L'administration de la méthionine a engendré une augmentation de l'*homocystéinémie* par altération des voies de trans-sulfuration et de méthylation conduisant à un état d'*hyperhomocystéinémie* (Refsum et Ueland, 1990) que nous avons observé après 1 mois chez tous les rats expérimentés. Un résultat similaire est observé par Zhou *et al.* (2001) et Sharma *et al.* (2007). Nos résultats confirment les travaux antérieurs de notre équipe sur les différents modèles utilisés et les différentes doses de méthionine administrées. La diminution observée au delà de deux mois, est en accord avec celle précédemment signalée par Wilson *et al.* (2007) chez des souris apoE<sup>-/-</sup> ainsi que Fernane (2009) chez le lapin.

La surcharge en méthionine pendant un mois, a provoqué une augmentation significative ( $p < 0.001$ ) de la *cholestérolémie* chez les rats des lots II et III. Le même résultat est observé après trois mois de traitement. Une augmentation significative est également notée chez nos rats du lot I. Ces résultats rejoignent ceux de Poole *et al.* (1967) effectués sur le lapin (250 mg/jour). Un résultat identique a été observé *in vitro*, au niveau des cellules hépatiques des rats Sprague-Dawley par Hirche *et al.* (2006). Par contre Raaf (2003) et Ghouil (2009) ont observé chez le rat Wistar de légères fluctuations de la cholestérolémie à des doses de méthionine plus faibles (70 et 200 mg/Kg p. c /jour). Des résultats indiquent que l'homocystéine provoque un stress oxydatif par la génération de ROS. Ces derniers vont diminuer la biodisponibilité du monoxyde d'azote, altérer l'expression des gènes et augmenter le stress du réticulum endoplasmique en activant la synthèse du cholestérol (Werstuck *et al.*, 2001). Selon plusieurs auteurs (Packart *et al.*, 1993 ; Skin et Osborne., 2003 ; Lopez *et al.*, 2007), l'*hyperhomocystéinémie* augmenterait la cholestérolémie en agissant sur l'expression hépatique des récepteurs LDL, en générant le peroxyde d'hydrogène issu de l'auto-oxydation de l'homocystéine qui va initier l'oxydation des LDL responsable de l'activation des SREBPs (*sterol regulatory element binding proteins*) contrôlant les gènes nécessaires à la synthèse du cholestérol ainsi que celle du récepteur des LDL. Woo *et al.* en 2006 ont montré que l'*hyperhomocystéinémie* est responsable de l'activation du facteur de transcription CREB (cAMP response element binding protein) hépatocytaire par la voie de signalisation cAMP/PKA en agissant directement sur la PKA qui active ce facteur (CREB) nécessaire à

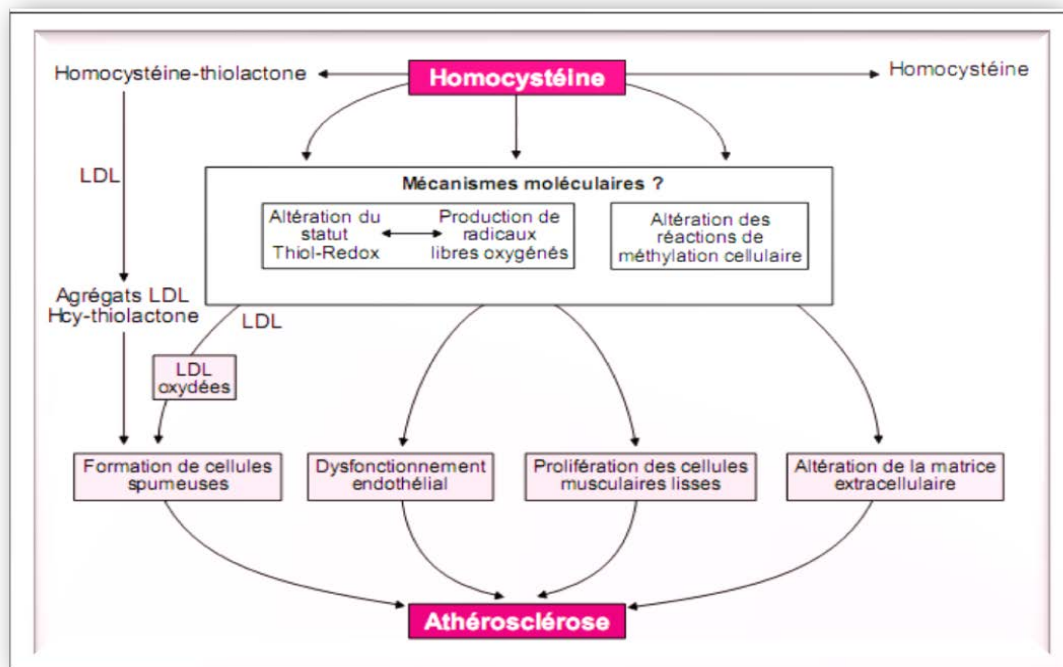
l'expression de la HMG CoA réductase et à l'augmentation de la biosynthèse du cholestérol hépatique. Elle agirait aussi sur la lipoprotéine lipase et la lipase hépatique.

La *triglycéridémie* s'avère perturbée au bout d'un mois de supplémentation en méthionine. Une légère augmentation est enregistrée chez les rats hyperhomocystéinémiques du lot I. Cette augmentation est plus importante et plus significative ( $p < 0.01$ ) pour les rats Wistar des lots II et III, mettant en évidence l'effet dose-réponse. En fin d'expérimentation, les valeurs diminuent pour se rapprocher de celle des témoins. Nos résultats confirment les travaux de notre laboratoire réalisés sur le rat des sables (Zerrouk, 2007). Par contre Woo *et al.* (2005) et Sharma *et al.* (2007) n'ont pas enregistré de changements significatifs de la triglycéridémie chez le rat Wistar Sprague-Dawley à des doses de méthionine inférieures à 0,5g/Kg de p. c. Par contre, à des doses supérieures à 0,5g/Kg de p. c, Sharma (2007) a observé une augmentation de ce paramètre lipidique. Ji et Kaplowitz. (2003) ont montré que l'hyperhomocystéinémie provoque un stress oxydatif du RE altérant le métabolisme hépatocytaire des lipides en activant une famille de protéines du RE, les SREBPs (sterol regulatory element binding proteins) responsables du contrôle de l'expression des gènes nécessaires pour la biosynthèse des triglycérides, des acides gras et du cholestérol.

Nos résultats montrent une *altération des lipoprotéines plasmatiques* induite par l'hyperhomocystéinémie. En effet, la quantification des lipoprotéines plasmatiques met en évidence une diminution de 6,22% de la fraction cardioprotectrice (HDL) associée à une augmentation de 84,6% de la fraction athérogène (LDL). Un résultat similaire est rapporté par Liao *et al.* (2006) qui montrent une diminution des particules HDL chez les souris CBS<sup>-/-</sup>/apoE<sup>-/-</sup>. Une diminution de la fraction HDL et une augmentation de la fraction LDL est rapportée par Zerrouk (2007) et Chaouad (2008) chez le rat des sables, *Psammomys obesus*, hyperhomocystéinémique et hypothyroïdique respectivement. Des rats Wistar rendus hyperhomocystéinémiques voient leur HDL diminuer de 84% et leur LDL-VLDL augmenter de 13% (Ghoul 2009). Cette modification de l'équilibre HDL-LDL et l'apparition de la lipoprotéine a est également observée chez le Lapin hyperhomocystéinémique femelle (Othmani, 2007) et male (Fernane 2009 ; Taghlit, 2010). Par ailleurs, nous avons enregistré une augmentation d'environ 4.2% du rapport lipoprotéique  $\beta/\gamma$  (VLDL+LDL/HDL) après administration *per os* de méthionine à raison de 500mg/Kg de poids corporel/jour pendant 3 mois. Othmani, (2007) a également rapporté une variation de ce rapport chez la lapine.

La fraction cardioprotectrice HDL en culture cellulaire, élimine 80% de l'homocystéine-thiolactone (forme toxique), prévenant ainsi son accumulation grâce à la paraoxonase qui lie les HDL et transforme l'Hcy-thiolactone en Hcy (Jakubowski *et al.*, 2000). Selon Ferretti *et al.* (2006), les lipoprotéines plasmatiques sont susceptibles d'être homocystéinylées via l'interaction Homocystéine-thiolactone (Fig. 19). Ces modifications des HDL conduisent à la perte de leurs propriétés anti-inflammatoires et cyto-protectrices, ce qui pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse de l'athérosclérose (Demuth *et al.*, 2000).

Ces variations lipidiques plasmatiques pourraient, dans une étude ultérieure, être complétées et corrélées aux éventuelles variations des lipides tissulaires cardiaques.



**Figure 19** : Mécanismes hypothétiques de la pathogénicité de l'hyperhomocystéinémie.

(Demuth *et al.*, 2000).

Le dosage des *protéines totales* réalisé après 1 mois d'administration de méthionine a révélé, une augmentation significative à T<sub>1</sub> pour le lot III (p<0.01) et pour le lot II (p<0.05) vs témoin et une protéinémie fluctuante pour le lot I. Ce résultat rejoint celui noté par Othmani (2007) qui rapporte une augmentation significative de la protéinémie chez la lapine rendue hyperhomocystéinémique. Des résultats similaires ont été enregistrés par Ghoul (2009) chez le rat Wistar soumis à une administration de méthionine à la dose de 200mg/Kg de poids

corporel/jour pendant 6 mois. Zerrouk (2007) a enregistré une hyperprotéinémie chez le rat des sables rendu hyperhomocystéinémique par injection intrapéritonéale de méthionine à faible dose soit 70 mg/Kg de poids corporel/jour. Chez le Lapin mâle hyperhomocystéinémique, Taghli (2010) a également noté une augmentation significative de la protéinémie. Une analyse des protéines plasmatiques par électrophorèse pourrait apporter des éléments complémentaires intéressants.

Sur le *plan histologique*, plusieurs modifications sont enregistrées au niveau de la structure de la paroi ventriculaire du rat Wistar soumis à une surcharge en méthionine. Les répercussions de l'hyperhomocystéinémie touchent non seulement les cardiomyocytes mais également la vascularisation cardiaque et la matrice extracellulaire, plus particulièrement sa composition biochimique.

Nous avons observé sur nos préparations, un épaississement hétérogène de l'endocarde. Rolland *et al.* (1995) ont rapporté un épaississement similaire au niveau aortique chez le porc. Le myocarde est altéré par la présence d'œdème et une dilatation des espaces intercellulaires entre les cardiomyocytes. Les travaux réalisés, au niveau artériel, par les chercheurs de notre équipe ont montré un épaississement de l'intima et la présence d'espaces amorphes au niveau de la média, indiquant une altération des relations cellules-matrice extracellulaire aussi bien chez le rat Wistar (Raaf, 2003) que chez le rat des sables (Zerrouk, 2007 ; Chaouad, 2008) et le Lapin (Othmani, 2007). Augier *et al.* (1997) ont remarqué au niveau de l'aorte de poussins hyperhomocystéinémiques, une fragmentation des lames élastiques et parfois des anévrismes. Holven *et al.* (2006) ont signalé une perturbation de la balance MMP-9/TIMP-1 chez des individus hyperhomocystéinémiques, suggérant une dégradation de la MEC augmentant le risque d'accident cardiovasculaire.

Au niveau vasculaire, nous avons observé une fibrose péri-vasculaire caractérisée par une accumulation de collagènes autour des vaisseaux ainsi qu'une richesse en capillaires qui sont dilatés. Kumar *et al.* (2008) enregistrent cette accumulation de collagènes au niveau des artères coronaires de souris C $\beta$ S-/+ hyperhomocystéinémiques. Nakai *et al.* (1992) ont montré que les cellules musculaires lisses localisées au niveau des lésions à chape fibreuse épaisse, exprimaient de forts taux de GRP78/94 et de Hsp47 impliquée dans la maturation des collagènes. Chez certains rats du Lot III, nous avons relevé au niveau de la vascularisation

myocardique, une rupture de capillaires. Dans un précédent travail réalisé au sein de notre équipe, Zerrouk (2007) a rapporté la rupture de la paroi artérielle du *Psammomys obesus* hyperhomocystéinémique.

Il est à signaler que la dilatation des capillaires et leur abondance au niveau de différents organes (foie, pancréas, rein, surrénales, épididyme ...) ainsi que la fibrose péri-vasculaire a également été rapporté par les chercheurs de notre équipe, chez le rat Wistar, chez *Psammomys obesus* et chez le Lapin.

Sur nos observations, la matrice extracellulaire est altérée par une accumulation de collagènes fibrillaires (type I et III) entre les cardiomyocytes. Cette accumulation de collagènes est également observée par Zhou *et al.* (2001) et Joseph *et al.* (2003). Une synthèse de collagènes a été observée lors d'une hyperhomocystéinémie par Iris *et al.* (2004). Deux autres familles de macromolécules matricielles cardiaques sont également concernées par une modification, ce sont les glycoprotéines caractérisées par la coloration à l'acide périodique Schiff et les protéoglycanes matérialisés par la coloration au Bleu Alcian. Selon Khan *et al.* (2001), l'hyperhomocystéinémie pourrait perturber le métabolisme des protéoglycanes soufrés.

Les altérations des collagènes, des glycoprotéines et des protéoglycanes mettent en évidence une modulation de la composition de la matrice extracellulaire cardiaque responsable d'un remodelage. Ce dernier est signalé par Fernane (2009) au niveau cardiaque chez le Lapin male. Othmani (2007) a constaté un accroissement du volume matriciel conduisant à la diminution du rapport cellules musculaires lisses/MEC.

L'augmentation des collagènes par l'homocystéine pourrait être le résultat de la stimulation de leur synthèse au niveau transcriptionnel. Les travaux de Tyagi *et al.* (1998) ont montré l'induction, par l'homocystéine, de l'expression du gène codant pour le collagène I au niveau des CML en culture. Le mécanisme d'action de l'homocystéine sur le métabolisme du collagène peut être élucidé par la détermination de l'activité des métalloprotéases matricielles ou MMPs d'une part, et l'expression des gènes codant pour les collagènes fibrillaires (type I et III) d'autre part. Ce travail mériterait d'être complété par l'analyse, la caractérisation et la quantification des MMPs responsables de ce remodelage.

La structure des cardiomyocytes est altérée notamment au niveau cytoplasmique et nucléaire. Nous avons en effet, observé une désorganisation cytoplasmique essentiellement myofibrillaire. En outre, les rats hyperhomocystéinémiques soumis à la plus forte dose de méthionine (500 mg/kg de poids corporel/jour) semblent présenter au niveau myocardique, deux types de cardiomyocytes caractérisés par des propriétés tinctoriales différentes. La désorganisation de ces cardiomyocytes altère leur fonctionnement, essentiellement leur contractilité, et conduirait à leur dégradation ou mort cellulaire.

Par ailleurs, nous avons également noté la présence de noyaux de type apoptotique. Sharma *et al.* (2006), Zerrouk (2007) et Fernane (2009) rapportent un résultat identique. Selon Zhang *et al.* (2001), l'homocystéine induit la mort cellulaire par apoptose de cellules endothéliales en culture via l'activation de l'UPR ou unfolded protein response et de la caspase 3 (Tyagi *et al.*, 2006). Les résultats obtenus chez le rat par Seda *et al.* (2009), suggèrent qu'un état hyperhomocystéinémique est capable d'induire l'expression du facteur proapoptotique Bax et d'inhiber l'expression du facteur antiapoptotique augmentant le nombre de cellules apoptotiques au niveau du foie. L'apoptose devrait être, dans un travail ultérieur, confirmée par des méthodes appropriées.

L'observation de la couche myocardique de certains rats hyperhomocystéinémiques du Lot III permet de noter la présence de polynucléaires neutrophiles entre les cardiomyocytes. Fernane (2009) a observé des zones d'infiltration de cellules inflammatoires au niveau myocardique. L'infiltration des tissus par les cellules immunitaires peut être expliquée par la stimulation des cellules endothéliales par une élévation de l'homocystéinémie générant un taux élevé de ROS et une diminution du relargage du NO, ce qui va augmenter la stimulation de l'adhésion et la migration des cellules (Zhu *et al.*, 2009). L'homocystéine est capable de provoquer un état inflammatoire, en augmentant l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme la MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) qui régule la migration et l'activation des monocytes et macrophages, et également la production de l'interleukine 8 possédant une activité chimio-attractante pour les neutrophiles et les lymphocytes T (Poddar *et al.*, 2001). Othmani (2007) a rapporté chez des lapins hyperhomocystéinémiques, une augmentation de la protéine réactive C (CRP) qui induira alors, l'activation des cellules inflammatoires. Il serait intéressant de déterminer le statut inflammatoire par le dosage de certaines cytokines pro-inflammatoires et inflammatoires.

Nous avons effectué le dosage de la *CK-MB* plasmatique, biomarqueur cellulaire de lésions myocardiques (Zerizer *et al.*, 1998). Nos résultats montrent une nette augmentation de ce marqueur en fin d'expérimentation chez nos animaux hyperhomocysténémiques soumis à la plus forte dose de méthionine. Ce résultat biochimique confirme les altérations que nous avons observées au niveau tissulaire. Chez des rats traités à la farmorubicine (induisant à fortes doses une insuffisance cardiaque), Przybyszewski et Widel (1996), ont remarqué que la *CK-MB* a augmenté d'un facteur 5, indiquant la présence au niveau tissulaire d'altérations cardiaques. Cette augmentation de la *CK-MB* plasmatique, a également été notée par Valjevac *et al.* (2009) chez des patients après infarctus du myocarde. Ce biomarqueur reflète une lésion du myocarde mais sans indication de son mécanisme (Bertinchant *et al.*, 2003). Selon Przybyszewski et Widel (1996), la *CK-MB* peut être un marqueur sensible de lésion peroxydative. Bien que la *CK-MB* soit plus cardio-spécifique que la *CK-MM*, elle reste néanmoins moins spécifique que les Troponine I ou T. Actuellement, le dosage des Troponines est, du fait de leur cardio-spécificité, le test le plus intéressant au niveau diagnostique (Bodor *et al.*, 1992 ; Bodor., 1994).

Afin de compléter cette analyse des lésions cardiaques, il serait intéressant de procéder au dosage non seulement de la troponine cardiaque, mais également au dosage d'autres marqueurs de nécrose et d'ischémie tels l'Albumine modifiée par l'ischémie ou IMA, le h-FABP ou heart fatty-acid binding protein ou de marqueurs de dysfonction cardiaque comme par exemple la protéine ST2 soluble ou l'urocortine.

Dans le but d'expliquer les différentes altérations observées, nous avons abordé l'analyse du *stress oxydant* par le dosage d'un marqueur à savoir le rapport nitrates/nitrites. Nos résultats mettent en évidence une perturbation de ce rapport qui augmente significativement en fin d'expérimentation après une diminution à T<sub>1</sub>. Une diminution dose dépendante de la disponibilité du monoxyde d'azote a été rapportée *in vitro* par Sharma *et al.* (2007) chez le rat Wistar. Selon Vignini *et al.* (2004), cette diminution du monoxyde d'azote est liée à la diminution d'activité de la eNOS par les LDL liés à l'homocystéine. Selon Faraci (2003), le mécanisme principal par lequel l'hyperhomocystéinémie induirait un dysfonctionnement vasculaire semble être lié à la biodisponibilité du NO. En 2009, Moshal *et al.* ont observé chez la souris hyperhomocystéinémique, une augmentation du taux de ROS qui perturbe la fixation du calcium altérant ainsi le fonctionnement des myocytes. Certains travaux dont ceux de Stuhlinger *et al.* (2003), suggèrent qu'une augmentation des ADMA

**(Dimethylarginine asymétrique)** peut contribuer, lors d'une hyperhomocystéinémie, à la diminution de la disponibilité du monoxyde d'azote. Par ailleurs, l'hyperhomocystéinémie est associée chez l'Homme, selon Vouitilainen *et al.* (1999), à une augmentation de la peroxydation lipidique. Cette étude pourrait être complétée d'une part par l'évaluation du statut oxydant (via d'autres marqueurs) et anti-oxydant et d'autre part, par le dosage de marqueurs de la peroxydation lipidique comme les diènes conjugués, les TBARS...

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, l'administration *per os* de méthionine pendant 3 mois à doses élevées (300, 400 et 500 mg/Kg de poids corporel/jour) engendre chez le Rat Wistar une augmentation de l'homocystéinémie.

Cette hyperhomocystéinémie est responsable :

- D'une augmentation du poids corporel
- Des perturbations des lipides plasmatiques,
- D'une augmentation de la protéinémie,
- D'altérations tissulaires cardiaques aussi bien au niveau matriciel qu'au niveau cellulaire et vasculaire.

Ces altérations, observées après 1 mois d'administration de méthionine et exacerbées en fin d'expérimentation, pourraient être en partie expliquées par un état de stress oxydant comme le montre le dosage du rapport nitrates/nitrites que nous avons effectué.

Dans les précédents travaux de l'équipe, ces altérations sont observées au niveau plasmatique et tissulaire, chez le Rat Wistar après 10 et 6 mois d'expérimentation (administration de méthionine à raison de 70 mg/Kg p. c/jour et 200 mg /Kg de p. c /jour respectivement) et chez le rat des sables (70 mg/Kg p. c /jour) et chez le lapin (500 mg ; 1,5g de methionine).

Nos résultats permettront de réduire la durée de l'expérimentation à 1 mois après administration d'une surcharge en méthionine à raison de 500 mg/Kg de poids corporel/jour.

Ce travail mériterait d'être complété par :

- L'étude du remodelage tissulaire par la quantification des MMPs par zymographie,
- La détermination de la balance oxydants/antioxydants,
- La détermination des statuts :
  - inflammatoire (IL-8, IL-10),
  - Procoagulant de l'homocystéine.
- L'étude de l'effet d'une supplémentation en antioxydants sur la réduction des effets induits par l'hyperhomocystéinémie,
- La quantification de la troponine cardiaque,
- L'étude de l'effet de l'hyperhomocystéinémie sur la contractilité des cardiomyocytes (actine, myosine et calcium).

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

✍

- **Aguilar B. ; Rojas JC. ; Callados MT.** (2004). Metabolism of homocystéine and its relationship with cardiovascular disease. *J. Thromb. Thrombol.*, **18**:75-87
- **Augier T. ; Charpiot P. ; Chareyre C. ; Remusat M. ; Rolland PH. ; Garçon D.** (1997). Medial elastic structure alterations in atherosclerotic arteries in minipigs : plaque proximity and arterial site specificity. *Matrix Biol.*, **15** : 455–467
- **Alpert JS. ; Thygesen K. ; Antman E. ; Bassand JP.** (2000). A consensus document of the joint European Society of Cardiology/ American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **36** : 959-69
- **Andersson A. ; Brattstrom L. ; Israelsson B. ; Isaksson A. ; Hamfelt A. ; Hultberg B.** (1992). Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender and menopausal status. *Eur. J. Clin. Invest.*, **22** : 79-87

✍

- **Bailey LB. ; Moyers S. ; Gregory JF.** (2001). Folates. In Bowman B.A. ; Russell R.M. (eds) : « Present Knowledge in Nutrition, » 8th ed. *Washington, DC : ILSI Press* : 214 – 29
- **Blacher J. ; Czernichow S. ; Horellou MH. ; Conad J. ; David P. ; Chadeaux-vekemans B. ; Ankria A. ; Galan P. ; Hercberg S. ; Ducimetiere P.** (2005). Homocystéine, acide folique, vitamines du groupe B et risque cardiovasculaire. *Arch Mal. Cœur. Vaiss.*, **98** : 145-52
- **Bertinchant JP. ; Polge A. ; Juan JM. ; Olivia-Lauraire MC. ; Giuliani I. ; Marty-Double C. ; Burdy JY. ; Fabbro-Peray P. ; Laprade M. ; Bali JP. ; Granier C. ; De la Coussaye JE. ; Dautzat M.** (2003). Evaluation of cardiac troponin I and T levels as markers of myocardial damage in doxorubicin-induced cardiomyopathy rats, and their relationship with echocardiographic and histologic findings. *Clin. Chem. Acta.*, **329** : 39-51
- **Bodor GS.** (1994). Cardiac troponin I : a highly specific biochemical marker for myocardial infarction. *J. Clin. Immunoassay.*, **17** : 40-44
- **Bodor GS. ; Porter S. ; Landt Y. ; Ladenson JH.** (1992). Development of monoclonal antibodies for an assay of cardiac troponin I and preliminary results in suspected cases of myocardial infarction. *Clin. Chem.*, **38** : 2203-14
- **Bolander-Gouaille C.** (2002). Focus on homocysteine and vitamins involved in its metabolism. Paris : Springer-Verlag, 2nd Edition
- **Bostom AG. ; Gohh RY. ; Morrisey P.** (2000). Hyperhomocysteinemia in chronic renal transplant recipients. *Graft.*, **3** : 195 – 204
- **Bugugnani MJ. ; Leroy G. ; Nerbonne-Bleton F. ; Detaint D. ; Uzan L.** (2001). Les marqueurs cardiaques dans les syndromes coronaires aigus et dans l'insuffisance cardiaque. *Immunoanal. Biol. Spéc.*, **16** : 312-15

*C*

- **Cedar H. et Bergman Y.** (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat. Rev. Genet.*, **10** : 295-304
- **Chan KM.** (1986). Increased creatine kinase MB in the absence of acute myocardial infarction. *Clin. Chem.*, **32** : 2044-51
- **Chaouad B.** (2008). Effet *in vitro* du carbimasol sur la paroi aortique et *in vitro* du glucose sur les fibroblastes adventiciels du rat des sables, *Psammomys obesus*. Thèse de magister USTHB. Alger. 88p
- **Chen HP et Marsh EN.** (1997). How enzymes control the reactivity of adenosylcobalamin: effect on coenzyme binding and catalysis of mutations in the conserved histidine-aspartate pair of glutamate mutase. *Biochemistry.*, **36**:7884-89
- **Cravo ML et Camilo ME.** (2000). Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: relations to folic acid and vitamins B6 and B12 status. *Nutrition.*, **16** : 296-302

*D*

- **Davies L. ; Wilmshurst EG. ; McElduff A. ; Gunton J. ; Clifton-Bligh P. ; Fulcher GR.** (2001). The relationship among homocysteine, creatinine clearance, and albuminuria in patients with Type 2 diabetes. *Diabetes Care.*, **24**: 1805-9
- **DiBello PM. ; Dayal S. ; Kaveti S. ; Zhang D. ; Kinter M. ; Lentz SR. ; Jacobsen DW.** (2010). The nutrigenetics of hyperhomocysteinemia. Quantitative proteomics reveals differences in the methionine cycle enzymes Of gene-induced vs diet-induced hyperhomocysteinemia. *Mol. Cell. Proteomics.*, **9** : 471-85
- **Demuth K. ; Drunat S. ; Paul J.L. ; Moatti N.** (2000). Hyperhomocystéinémie et athérosclérose. *M/S.*, **16** : 1081-90
- Den Heijer M. ; Gerrits WBJ. ; Haak HL. ; Wijermans PW. ; Bos GMJ. ; Blom HJ. ; Rosendaal FR. (1995). Is hyperhomocysteinaemia a risk factor for recurrent venous thrombosis?. *Lancet.*, **345**: 882-85
- **Drai J et Garcia I.** (2007). les vitamines. *In* Cahier de formation Bioforma N°38
- **Dudman NPB. ; Temple SE. ; Guo XW. ; Fu W. ; Perry MA.** (1999). Homocysteine enhances neutrophil-endothelial interactions in both cultured human cells and Rats *in vivo*. *Circ. Res.*, **84** : 409-16

*F*

- **Faraci FM.** (2003). Hyperhomocysteinemia: a million ways to lose control. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*, **23** : 371-73
- **Fernane.** (2009). Homocystéine, stress oxydatif et remodelage cardiovasculaire chez le lapin domestique mâle. Thèse de magister. USTHB. Alger. 131p
- **Ferretti G. ; Bacchetti T. ; Nègre-Salvayre A. ; Salvayre R. ; Dousset N. ; Curatola G.** (2006). Structural modifications of HDL and functional consequences. *Atheroscl.*, **184** : 1-7
- **Finkelstein JD. ; Lyle WE. ; Martin JL. ; Pick M.** (1975). Activation of cystathionine synthase by adenosylmethionine and adenosylthionine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66** : 81 - 87

- **Fredericks S. ; Merton GK. ; Lerena MJ. ; Heining P. ; Carter ND. ; Holt DW.** (2001). Cardiac troponins and creatine kinase content of striated muscle in common laboratory animals. *Clin. Chem. Acta.*, **304** : 65-74
- **Frosst P. ; Blom HJ. ; Milos R. ; Goyette P. ; Sheppard CA. ; Matthews RG. ; Boers GJH. ; Den Heijer M. ; Kluijtmans LAJ. ; Van den Heuvel LP. ; Rozen R.** (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylene tetrahydrofolate reductase. *Nat. Genet.*, **10** : 111-13
- **Fowler B.** (2005). Homocysteine: overview of biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Semin. Vasc. Med.*, **5** : 77-86

G

- **Gabe M.** (1968). Techniques histologique. *Ed. Masson et Cie, Paris.*
- **Ghoul A.** (2009). Hyperhomocystéinémie et remodelage de la matrice extracellulaire testiculaire, épидидymaire et vésiculaire chez le rat Wistar, *Rattus norvegicus*. Thèse de magister. USTHB. Alger. 94p
- **Guilland JC. ; 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 - 10
- **Guo H. ; Lee LD. ; Uzui H. ; Yue H. ; Wang P. ; Toyoda K. ; Gueshi T. ; Ueda T.** (2007). Effects of heparin on the production of homocysteine-induced extracellular matrix metalloproteinase in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Can. J. Cardiol.*, **23**: 275-280

H

- **Hao L. ; Ma J. ; Zhu J. ; Stampfer MJ. ; Tian Y. ; Willett WC. ; Li Z.** (2007). High prevalence of hyperhomocysteinemia in Chinese adults is associated with low folate, vitamin B12, and vitamin B6 status. *J. Nutr.*, **137**: 407-13
- **Hirche F. ; Schroider A. ; Stangl KGI. ; Ider K.** (2006). Effect of dietary methionine on plasma and liver cholesterol concentration in rats and experimental of hepatics genes involved in cholesterol metabolism. *Brit. J. Nutr.*, **95** : 879-88
- **Ho EC. ; Dunn C. ; Proops D. ; Warfield A.** (2003). Case report: explantation of a cochlear implant secondary to chronic granulating labyrinthitis. *Cochlear. Implants. Int.*, **4** :191-95
- **Holven KB. ; Halvorsen B. ; Bjerkeli V. ; Damås JK. ; Retterstøl K. ; Mørkrid L. ; Ose L. ; Aukrust P. ; Nenseter MS.** (2006). Impaired inhibitory effect of interleukin-10 on the balance between Matrix Metalloproteinase-9 and its inhibitor in mononuclear cells from hyperhomocysteinemic subjects. *Stroke.*, **37**:1731-36
- **Huang RS. ; HSU Y. ; Lin H. ; Yang FL.** (2001). Folate depletion and elevated plasma homocysteine promote oxidative stress in rat livers. *J. Nutr.*, **131** : 33-38
- **Hultberg B. ; Berglund M. ; Andersson A. ; Frank A.** (1993) Elevated plasma homocysteine in alcoholics. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **17** : 687-89

*J*

- **Iris S. ; Sampfer MJ. ; Ma J. ; Manson JE. ; Hankinson SE. ; Cannuscio C. ; Curhan G. ; Rimm EB.** (2004). Homocysteine as a risk factor for coronary heart diseases and its association with inflammatory biomarkers, lipid and dietary factors. *Atheroscl.*, **177** : 375-81

*J*

- **Jacobsen DW. ; Gatautis VJ. ; Green R. ; Robinson K. ; Savon SR. ; Secic M. ; Ji J. ; Otto JM. ; Taylor LM.** (1994). Rapid HPLC determination of total Homocysteine and other Thiols in serum and plasma: Sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. *Clin. Chem.*, **40** : 873-81
- **Jager A. ; Kostense PJ. ; Nijpels G. ; Dekker JM. ; Heine RJ. ; Bouter LM. ; Donker AJ. ; Stehouwer CD.** (2001). Serum homocysteine levels are associated with the development of (micro) albuminuria: *the Hoorn study*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **21** : 74-81
- **Jakubowski H.** (2000). Homocysteine thiolactone : Metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. *J. Nutr.*, **130** : 377S-81S
- **Jakubowski H.** (2006). Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *J. Nutr.*, **136** : 1741-49
- **Jencks DA et Matthews RG.** (1987). Allosteric inhibition of methylene tetrahydrofolate reductase by adenosylmethionine. *J. Biol. Chem.*, **262** : 2485 - 93
- **Ji C et Kaplowitz N.** (2003). Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterol.*, **124** : 1488-99
- **Joseph J. ; Joseph L. ; Shekhawat NS. ; Devi SS. ; Wong J. ; Melchert RB. ; Hauer-Jensen M. ; Kennedy RH.** (2003). Hyperhomocysteinemia leads to pathological ventricular hypertrophy in normotensive rats. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **285** : H686-H688

*K*

- **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.** (2001). Homocysteine decreases chondrocyte-mediated matrix mineralisation in differentiating chick limb-bud mesenchymal cell micro-mass cultures. *Bone.*, **28** : 387-98
- **Kumar M. ; Tyagi N. ; Moshal KS. ; Sen U. ; Kundu S. ; Mishara PK. ; Givvimani S. ; Tyagi S.C.** (2008). Homocysteine decreases blood flow to the brain due to vascular resistance in carotid artery. *Neurochem. Intern.*, **53** : 214-19
- **Kutzback C et Stostad ELR.** (1967). Feedback inhibition of methylene tetrahydrofolate reductase in rat liver by S-adenosylmethionine. *Biochem. Biophys. Acta.*, **139** : 217-20

*L*

- **Lentz SR. ; Malinox MR. ; Piegors DJ. ; Bhopatkar M. ; ; Faraci FM. ; Heistad DD.** (1997). Consequences of hyperhomocysteinemia on vascular function in atherosclerotic monkeys. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **17**: 2930 – 34
- **Lhroche MJ. et Rousselet F.** (1990). Les animaux de laboratoire. Ed. *Masson*, 175 p.
- **Liao D. ; Tan H. ; Hui R. ; Li Z. ; Jiang X. ; Gaubatz J. ; Yang F. ; Durante W. ; Chan L. ; Schafer AI. ; Pownall HJ. ; Yang X. ; Wang H.** (2006). Hyperhomocysteinemia decreases circulating High-Density Lipoprotein by inhibiting Apolipoprotein A-I Protein synthesis and enhancing HDL Cholesterol clearance. *Circ Res.*, **99** : 598-606
- **Lopez D. ; Abisambra Socarrás Jose F. ; Bedi M. ; Ness Gene C.** (2007). Activation of the hepatic LDL receptor promoter by thyroid hormone. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1771**: 1216-25
- **Lu SC. et Mato JM.** (2008). S-Adenosylmethionine in cell growth, apoptosis and liver cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **23** Suppl 1, S73-77
- **Luka Z. ; Mudd SH. ; Wagner C.** (2009). Glycine N-methyltransferase and regulation of S-adenosylmethionine levels. *J. Biol. Chem.*, **284** : 22507–11

*M*

- **Mansoor MA. ; Ueland PM. ; Svardal AM.** (1994). Redox statut and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with hyperhomocysteinemia due to cobalamine deficiency. *Clin. Nutr.*, **59** : 631-35
- **Martinez M.; Cuskelly G.; Williamson J. ; Toth JP.; Gregory JF.** (2000). Vitamin B6 deficiency in Rats reduces hepatic serine hydroxymethyltransferase and cystathionine  $\beta$ - Synthase activities and rates of *in vivo* protein turnover, homocysteine remethylation and transsulfuration. *J. Nutr.*, **130** : 111 - 23
- **Martoja R. et Martoja M.** (1967). Initiation aux techniques de l’histologie animale. Ed. *Masson et Cie*, Paris
- **Mato JM. ; Alvarez L. ; Ortiz P. ; Pajares MA.** (1997). S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacol. Ther.*, **73** : 265–80
- **McCully KS. et Wilson RB.** (1975). Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atheroscler.*, **22** : 215-27
- **McKinley MC. ; McNulty H. ; McPartlin J. ; Strain J. ; Scott JM.** (2002). Effect of riboflavin supplementation on plasma homocysteine in elderly people with low riboflavin status. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **56** : 850-56
- **Miller A. ; Mujumdar V. ; Shek E. ; Guillot J. ; Angelo M. ; Palmer L. ; Tyagi SC.** (2000). Hyperhomocyst(e)inemia induces multiorgan damage. *Heart vessels.*, **15** : 135 - 43
- **Miller A. ; Mujumdar V. ; Palmer L. ; Bower JD. ; Tyagi SC.** (2002). Reversal of endocardial endothelial dysfunction by folic acid in homocysteine hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.*, **15** : 157–63

- **Mori N. et Hirayama K.** (2001). Long-term consumption of a methionine-supplemented diet increases iron and lipid peroxide levels in rat liver. *J. Nutr.*, **130** : 2349-55
- **Moshal KS. ; Kumar M. ; Tyagi N. ; Mishra PK. ; Metreveli N. ; Rodriguez WE. ; Tyagi SC.** (2009). Restoration of contractility in hyperhomocysteinemia by cardiac-specific deletion of NMDA-R1. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **296** : H887–H892
- **Moshal KS. ; Sen U. ; Tyagi N. ; Henderson B. ; Steed M. ; Ovechkin AV. ; Tyagi SC.** (2006a). Regulation of homocysteine-induced MMP-9 by ERK1/2 pathway. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **290** : C883–C891
- **Moshal KS. ; Singh M. ; Sen U. ; Rosenberger DSE. ; Henderson B. ; Tyagi N. ; Zhang H. ; Tyagi SC.** (2006b). Homocysteine-mediated activation and mitochondrial translocation of calpain regulates MMP-9 in MVEC. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **291**: H2825-H2835
- **Mudd SH. ; Finkelstein JD. ; Refsum H. ; Ueland PM. ; Malinow MR. ; Lentz SR. ; Jacobsen DW. ; Brattstrom L. ; Wilcken B. ; Wilcken DE. ; Blom HJ. ; Stabler SP. ; Allen RH. ; Selhub J. ; Rosenberg IH.** (2000). Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested consensus terminology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **20** : 1704-06
- **Munshi MN. ; Stone A. ; Fink L. ; Fonseca V.** (1996). Hyperhomocysteinemia following a methionine load in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and macrovascular disease. *Metabolism.*, **45** : 133-35
- **Murthy SS. ; Fonseca VA. ; McNamara DB.** (2005). Hyperhomocysteinemia exacerbates the development of intimal hyperplasia in Sprague-Dawley rats: Alleviation by rosiglitazone. *Exp. Clin. Cardiol.*, **10** : 154-59

*N*

- **Nakai A. ; Satoh M. ; Hirayoshi K. ; Nagata K.** (1992). Involvement of the stress protein HSP47 in procollagen processing in the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.*, **117** : 903-14
- **Najib S. et Sánchez-Margalet V.** (2001). Homocysteine thiolactone inhibits insulin signaling, and glutathione has a protective effect. *J. Mol. End.*, **27** : 85–91

*O*

- **Othmani K.** (2007). Remodelage de la matrice extracellulaire induit par une hyperhomocystéinémie et par la gestation chez le lapin. Caractérisation et suivi de marqueurs de la gravité. Thèse de Doctorat *es Sciences*. USTHB. Alger.194p
- **Outinen PA. ; Sood SK. ; Pfeifer SI. ; Pamidi S. ; Podor TJ. ; Li J. ; Weitz JL. ; Austin RC.** (1999). Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood.*, **94** : 959-67

*P*

- **Packard CJ. ; Shepherd J. ; Lindsay GM. ; Gaw A. ; Taskinen MR.** (1993). Thyroid replacement therapy and its influence on postheparin plasma lipases and apolipoprotein-B metabolism in hypothyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **76** :1209-16
- **Poddar R. ; Sivasubramanian N. ; DiBello PM. ; Robinson K. ; Jacobsen DW.** (2001). Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and Interleukin-8 in human aortic endothelial cells : Implications for vascular disease. *Circulation.*, **103** : 2717-23
- **Poole WJ. ; Shimer SR. ; Dunlop WR. ; Urban WE.** (1967). Effect of methionine supplementation on experimental atherosclerosis in rabbits. *J. Nutr.*, **91** : 441-46.
- **Przybyszewski WM. et Widel M.** (1996). Activity of creatine kinase MB-isoenzyme in rat serum after heart irradiation and/or farmorubicin (4'-epidoxorubicin) treatment. *Canc. Letters.*, **100** : 145-50

*R*

- **Raaf L.** (2003). Effet de l'hyperhomocystéinémie sur la matrice extracellulaire de la paroi artérielle. Thèse de magister. USTHB. Alger.113p
- **Refsum H. et Ueland PM.** (1990). Clinical significance of pharmacological modulation of homocysteine metabolism. *Trends Pharmacol. Sci.*, **11** : 411-16
- **Richmond W.** (1973). Preparation and proprieties of cholesterol oxidase from *Nocardia sp* and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin. Chem.*, **19** : 1350-56
- **Rolland PH. ; Friggi A. ; Barlatier A. ; Piquet P. ; Latrille V. ; Faye MM. ; Guillou J. ; Charpiot P. ; Bodard H. ; Ghiringhelli O. ; Calaf R. ; Luccioni R. ; Garçon D.** (1995). Hyperhomocysteinemia-induced vascular damage in the minipig. *Circulation.*, **91** : 1161-74

*S*

- **Scott JM. et Weir DG.** (1998). Folic acid, homocysteine and one-carbon metabolism: a review of the essential biochemistry. *J. Cardiovasc. Risk.*, **5** : 223-27
- **Seda Y. ; Yeşim U. ; Murat G. ; Vakur O. ; Semra DA. ; Müjdat U.** (2009). Oxidative and nitrosative stress and apoptosis in liver of rat fed on high methionine diet: protective effect of taurine. *Nutrition.*, **25** : 436-44
- **Selhub J. ; Jaques PF. ; Wilson PWF. ; Rush D. ; Rosenberg IH.** (1993). Vitamins status and intake as primary determinants of homocysteine in an elderly population. *JAMA.*, **270** : 2693-98
- **Sharma P. ; Senthilkumar RD. ; Brahmachari V. ; Sundaramoorthy E. ; Mahajan A. ; Sharma A. ; Sengupta S.** (2006). Mining literature for a comprehensive pathway analysis: A case study for retrieval homocysteine related genes for genetics and epigenetic studies. *Lip. Health. Dis.*, **5** : 1-19
- **Sharma M. ; Rai SK. ; Tiwari M. ; Chandra R.** (2007). Effect of homocysteinemia on cardiovascular risk factor and initiation of atherosclerosis in Wistar rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **574** : 49-60

- **Shin DJ. et Osborne TF.** (2003). Thyroid hormone regulation and cholesterol metabolism are connected through sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2). *J. Biol. Chem.*, **278** : 34114-18
- **Stuhlinger MC. ; Oka RK. ; Graf EE. ; Schmolzer I. ; Upson BM. ; Kapoor O; Szuba A. ; Malinow MR. ; Wascher TC. ; Pachinger O. ; Cooke JP.** (2003). Endothelial dysfunction induced by hyperhomocysteinemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation.*, **108** : 933–8
- **Sucu M.M. ; Karadede A. ; Toprak G. ; Toprak N.** (2005). The serial changes in plasma homocysteine levels and its relationship with acute phase reactants in early postmyocardial infarction period. *Anadolu. Kardiyol. Derg.*, **5** : 8-12

*T*

- **Troen AM. ; Lutgens E. ; Smith DE. ; Rosenberg IH. ; Selhub J.** (2003). The atherogenic effect of excess methionine intake. *PNAS.*, **100** : 15089–94
- **Tyagy SC.** (1998). Homocysteine redox receptor and regulation of extracellular matrix components in vascular cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **274**: C396 – 405
- **Tyagi N. ; Ovechkin AV. ; Lominadze D. ; Tyagi SC.** (2006) Mitochondrial mechanism of microvascular endothelial cells apoptosis in hyperhomocysteinemia. *J. Cell. Biochem.*, **98** : 1150-62

*U*

- **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** : 1764-79
- **Ungvari Z. ; Csiszar A. ; Edwards J.G. ; Kaminski P.M. ; Wolin M.S. ; Kaley G. ; Koller A.** (2003). Increased Superoxide production in coronary arteries in hyperhomocysteinemia. Role of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , NAD(P)H Oxidase, and inducible Nitric Oxide Synthase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**: 418-24

*V*

- **van Guldener C et Stehouwer CDA.** (2003). Homocystéine et complications cardiovasculaires du diabète. *Diabetes. Voice.*, **48**: 31-33
- **Vaillant I. et Paszkowski J.** (2007). Role of histone and DNA methylation in gene regulation. *Curr. Opin. Plant. Biol.*, **10**: 528-33
- **Valjevac A. ; Džubur A. ; Nakaš-Ićindić E. ; Hadžović-Džuvo A. ; Zaćiragić A. ; Lepara O. ; Arslanagić A.** (2009). Changes in serum homocysteine level follow two different trends in patients during early post myocardial infarction periode. *BJBMS.*, **9** :161-65
- **Vesin C. ; Horellou M.H. ; Mairesse S. ; Conard J. ; Safar M. ; Blacher J.** (2007). Homocystéine et risque cardiovasculaire. *STV.*, **19** : 143-49
- **Vignini A.L. ; Nanetti T. ; Bacchetti G. ; Ferretti G. ; Curatola G. ; Mazzanti L.** (2004). Modification induced by homocysteine and low-density lipoprotein on human aortic endothelial cells: An *in vitro* study. *J. Clin. Endocrin. Metab.*, **89** : 4558-61

- **Vitvitsky V. ; Prudora A. ; Stabler S. ; Dayal S. ; Lentz S.R. ; Benarjee R.** (2007). Testosterone regulation of renal cystathionine-synthase implication for sex-dependent difference in plasma homocysteine levels. *Am. J. Physiol. Renal.*, **293** : F594-F600

W

- **Wilson KM ; McCaw RB. ; Leo L. ; Arning E. ; Lhoták S. ; Bottiglieri T. ; Austin R.C. ; Lentz S.R.** (2007). Prothrombotic effects of hyperhomocysteinemia and hypercholesterolemia in ApoE-deficient Mice. *Arterioscle. Thromb. Vasc. Biol.*, **27** : 233-40
- **Welch GN. et Loscalzo J.** (1998). Homocysteine and atherothrombosis. *N. Engl. J. Med.*, **338** : 1042 – 50
- **Werstuck GH. ; Lentz SR. ; Dayal S. ; Hossain GS. ; Sood SK. ; Shi YY. ; Zhou J. ; Maeda N. ; Krisans SK. ; Malinow MR. ; Austin RC.** (2001). Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J. Clin. Invest.*, **107** : 1263-73 In DiBello PM.; Dayal S.; Kaveti S.; Zhang D.; Kinter M.; Lentz SR.; Jacobsen DW. (2010). The nutrigenetics of hyperhomocysteinemia. Quantitative proteomics reveals differences in the methionine cycle enzymes Of gene-induced vs diet-induced hyperhomocysteinemia. *Mol. Cell. Proteomics.*, **9** : 471-85
- **Woo CWH. ; Siow YL. ; Pierce GN. ; Choy PC. ; Munik GY. ; Mymin D. ; Karmin O.** (2005). Hyperhomocysteinemia induces hepatic cholesterol and lipids accumulation via activation of transcription factors. *Am. J. Physiol. Endocrin. Metab.*, **288** : E1002-E1010
- **Woo CWH.; Siow YL.; Karmin O.** (2006). Homocysteine activates cAMP-response element binding protein in HepG2 through cAMP/PKA signaling pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **26**:1043-50

Z

- **Zappacosta B. ; Mordente A. ; Persichilli S. ; Minucci A. ; Carlino P. ; Martorana GE. ; Giardina B. ; De Sole P.** (2001). Is homocysteine a pro-oxidant?. *Free Radi. Res.*, **35** : 499-505
- **Zerizer S. ; De La Fage F. ; Valdiguie P.** (1998). Place de la Troponine I cardiaque, de la CK-MB massive et de la myoglobine parmi les marqueurs cardiaques traditionnels et aspects économiques. *Ann. Biol. Clin.*, **56** : 195-99
- **Zerrouk F.** (2007). Modulation de la composition de la matrice extracellulaire vasculaire par une hyperhomocysteinémie chez *Psammomys obesus*. Thèse de magister. USTHB. Alger. 86p
- **Zhou J. ; Møller J. ; Danielsen CC. ; Bentzon J. ; Ravn NB. ; Austin RC. ; 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** :1470-76

- **Zhou J. ; Werstuck GH. ; Lhotak S. ; Lawrence de Koning AB. ; Sood SK. ; Hosain GS.; Møller J. ; Ritskes-Hoitinga M. ; Falk E. ; Dayal S. ; Lentz SR. ; Austin RC.**(2004). Association of multiple cellular stress pathways with accelerated atherosclerosis in hyperhomocysteinemic apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.*,**110** : 207-13
- **Zhu WG. ; Li S. ; Lin LG. ; Yan H. ; Fu T. ; Zhu JH.** (2009). Vascular oxidative stress increases dendritic cell adhesion and transmigration induced by homocysteine. *Cell. Immunol.*, **254** : 110-16
- **Zinellu A. ; Zinellu E. ; Sotgia S. ; Formato M. ; Cherchi GM. ; Deiana L. ; Carru C.** (2006). Factors Affecting S-Homocysteinylation of LDL Apoprotein B. *Clin. Chem.*, **52** : 2054–59

**ANNEXES**

**Tableau 1 : EVOLUTION DU POIDS [G] DES RATS WISTAR TEMOINS ET SOUMIS A UNE ADMINISTRATION *PER OS* METHIONINE A DIFFERENTES DOSES.**

	Rat	T0	T1	T2	T3
<b>Lot témoin</b>	N1	172	235	285	283
	N2	180	234	315	310
	N3	214	229	293	302
	N4	249	263	288	317
	N5	228	271	298	333
	<i>Moyenne</i>	208,6	246,4	295,8	309
	<i>Ecart type</i>	32,39	19,15	11,82	18,48
<b>Lot I</b> (300mg de p.c/jour)	N6	172	253	288	344
	N7	168	238	303	348
	N8	175	229	326	338
	N9	162	249	313	347
	N10	204	269	299	339
	N11	178	209	266	296
	N12	212	163	258	317
	N13	232	294	340	354
	<i>Moyenne</i>	187,88	238	299,13	335,38
	<i>Ecart type</i>	24,98	39,62	28,06	19,36

	Rat	T0	T1	T2	T3
<b>Lot II</b> (400mg /Kg p.c/jour)	N14	157	209	251	299
	N15	169	244	273	338
	N16	171	222	296	337
	N17	186	224	279	346
	N18	193	260	301	321
	N19	182	258	317	332
	N20	239	239	246	295
	<i>Moyenne</i>	185,29	236,57	280,43	324
	<i>Ecart type</i>	26,54	19,15	26,18	19,95
<b>LotIII</b> (500mg /Kg p.c/jour)	N21	165	227	281	304
	N22	168	200	295	325
	N23	186	254	290	325
	N24	178	215	268	350
	N25	229	237	207	302
	N26	153	210	274	303
	N27	185	252	317	350
	N28	208	243	274	299
	<i>Moyenne</i>	184	229,75	275,75	319,75
	<i>Ecart type</i>	24,55	20,04	31,84	21,25

- N<sub>1</sub> à N<sub>28</sub> représentent les Rats Wistar utilisés

**Tableau 2 : EVOLUTION DE L'HOMOCYSTEINEMIE [μmole/L]**

<b>T<sub>0</sub> global</b>	<b>1 mois</b>				<b>2 mois</b>				
6,00	Lot T	Lot I	Lot II	Lot III	Lot T	Lot I	Lot II	Lot III	
4,64	6,00	7,50	6,10	6,42	5,76	9,08	4,96	7,84	
5,99	5,42	7,17	6,00	8,17	6,00	9,99	5,95	7,06	
7,51	8,25	5,49	7,32	15,91	3,91	4,48	9,87	6,86	
5,05	8,83	8,57	6,40	10,03	4,85	6,88	6,90	7,11	
4,66	8,29	8,47	13,19	6,47	5,43	9,96	16,50	6,50	
6,36	5,13	6,55	8,92	11,37		6,73	10,14	8,28	
4,26		5,08	6,07	6,97		7,05	18,42	10,13	
4,16		7,07		8,10				11,68	
5,40				8,55				29,48	
5,40				5,14				8,48	
5,80				4,96	<b>Moyenne</b>	5,19	7,74	10,39	10,34
				8,07	<b>ET</b>	0,75	2,03	5,22	6,91
				9,98					
				9,87					
				9,16					
				6,17					
				8,68					
				5,97					
				7,15					
				4,08					
				18,33					
				25,05					
				10,49					
				6,00					
				9,40					
<b>Moyenne</b>	5,25	6,56	6,99	7,71	9,22				
<b>ET</b>	0,82	1,49	1,26	2,63	4,60				

<b>3mois</b>				
Lot T	Lot I	Lot II	Lot III	
7,16	7,8	4,91	7,43	
7,12	6,38	6,81	7,67	
	7,48	6,25	8,29	
	6,82		8,34	
			8,41	
			7,39	
<b>Moyenne</b>	7,14	7,12	5,99	7,92
<b>ET</b>	0,03	0,64	0,98	0,48

**Tableau 3 : EVOLUTION DE LA CHOLESTEROLEMIE [g/L].**

<b>Cholestérolémie à T<sub>0</sub></b>				
Lot T	Lot I	Lot II	Lot III	
0,44	0,55	0,72	0,43	
0,5	0,66	0,66	0,46	
0,5	0,66	0,66	0,44	
0,4	0,66	0,83	0,83	
0,44	0,72	0,88	0,94	
0,43	0,66		0,88	
0,51			1	
0,42			1,05	
0,31			1,16	
			0,44	
			1,22	
			0,46	
			0,46	
			0,37	
			0,39	
			0,39	
			0,32	
<b>Moyenne</b>	0,43	0,65	0,75	0,66
<b>ET</b>	0,06	0,05	0,1	0,31

<b>Cholestérolémie à un mois</b>				
Lot T	Lot I	Lot II	Lot III	
0,47	0,72	1,96	3,62	
0,3	1,69	2,67	3,71	
0,46	0,5	1,86	2,98	
0,33	0,56	2,53	2,49	
0,49		2,23	2,5	
		3,14		
		3,57		
<b>Moyenne</b>	0,41	0,86	2,56	3,06
<b>ET</b>	0,08	0,55	0,62	0,58

<b>Cholestérolémie à 3 mois</b>				
Lot T	Lot I	Lot II	Lot III	
0,5	3,02	3,57	5,15	
0,44	2,62	4,78	4,98	
0,51	2,83	3,41	3,33	
0,52	3,66	3,32	5,28	
0,35		3,31	5	
0,55				
0,3				
<b>Moyenne</b>	0,45	3,03	3,67	4,74
<b>ET</b>	0,09	0,44	0,62	0,8

**Tableau 4 : EVOLUTION DE TRIGLYCERIDEMIE [g/L]**

<b>T0 global</b>	
	1,35
	1,24
	1,30
	1,05
	1,49
	1,51
	1,20
	1,54
	1,73
	1,32
	1,62
	1,52
	1,70
	1,41
	1,51
<b>Moyenne</b>	1,43
<b>ET</b>	0,19

<b>1 mois</b>				
	Lot Témoin	Lot I	Lot II	Lot III
	1,65	1,97	1,97	2,83
	0,86	1,32	2,11	2,27
		1,78	2,93	2,04
		1,81	2,24	1,97
		1,25	2,40	2,96
		1,38		3,13
		1,88		
<b>Moyenne</b>	1,25	1,63	2,33	2,53
<b>ET</b>	0,56	0,30	0,37	0,50

<b>2 mois</b>				
	Lot Témoin	Lot I	Lot II	Lot III
	2,12	3,80	2,51	3,23
	2,73	3,80	2,47	3,51
	2,24	1,85	3,10	2,22
		3,88	3,56	3,08
		3,60	4,15	
<b>Moyenne</b>	2,36	3,39	3,16	3,01
<b>ET</b>	0,33	0,87	0,72	0,56

<b>3 mois</b>				
	Lot Témoin	Lot I	Lot II	Lot III
	2,44	3,74	1,98	2,54
	1,79	1,70	2,69	1,45
		3,31	1,92	1,99
		2,01	1,98	2,18
		2,01		2,61
<b>Moyenne</b>	2,12	2,55	2,14	2,15
<b>ET</b>	0,46	0,91	0,37	0,47

**Tableau 5 : EVOLUTION DE LA PROTEINEMIE [g/L]**

T0 global	Lot Témoin			Lot II				
	1 mois	2 mois	3 mois	1 mois	2 mois	3 mois		
67								
72								
70								
58	60,04	37,05	40,28	43,7	57,19	63,84		
59	27,55	47,31	35,15	39,9	54,72	75,81		
70		51,68	59,28	49,4	49,59	63,65		
72		54,15	65,17	58,9	69,35	58,52		
55		57,38		58,33	49,97	72,39		
67	<b>Moyenne</b>	43,8	49,51	49,97	<b>Moyenne</b>	50,05	56,16	66,84
62	<b>ET</b>	22,97	7,88	14,51	<b>ET</b>	8,52	8,04	7,07
56								
70								
73,34								
62,32								
61,56								
85,31								
68,21								
76,76								
79,99								
69,73								
65,36								
66,88								
83,98								
63,08								
72,39								
80,75								
62,13	<b>Moyenne</b>	53,47	55,39	52,96	<b>Moyenne</b>	67,2	67,71	77,3
62,51	<b>ET</b>	9,69	3,47	6,33	<b>ET</b>	10,9	11,43	9,39
67,26								
81,89								
77,52								
80,56								
<b>Moyenne</b>	69,36							
<b>ET</b>	8,27							

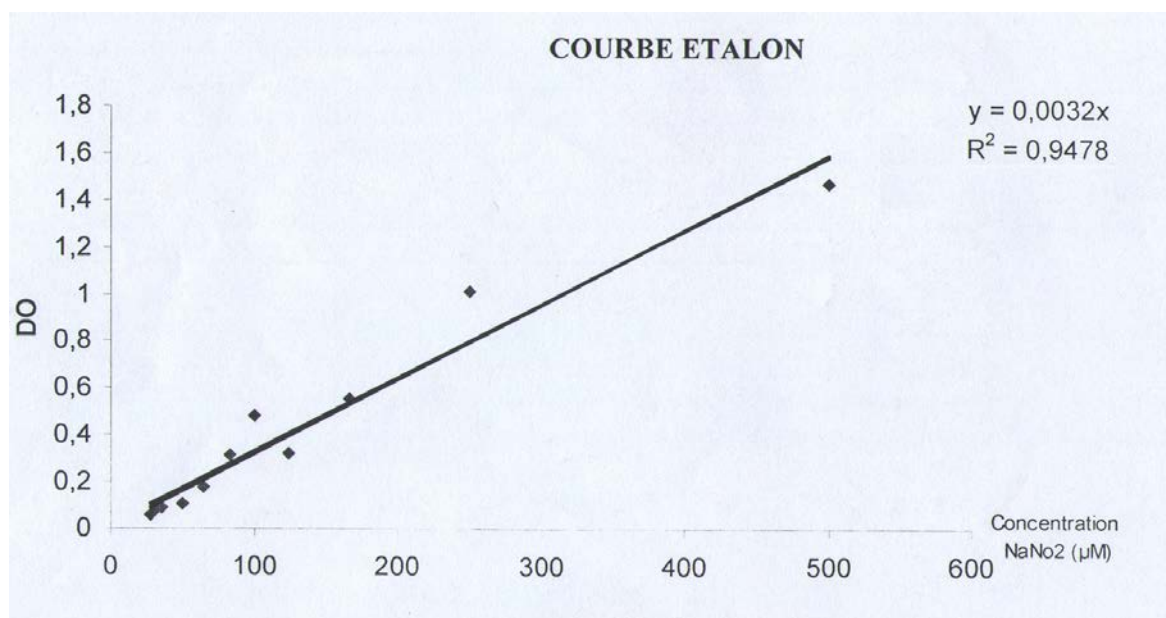
**Tableau 6 : QUANTIFICATION [%] DES LIPOPROTEINES PLASMATIQUES**

T0				3 mois			
	HDL	VLDL	LDL	<i>HDL</i>	<i>VLDL</i>	<i>LDL</i>	
	65,6	35,35	11,77	68,55	17,72	13,72	
	77,24	31,21	3,18	61,48	31,66	6,86	
	68,34	18,28	4,48	70,16	20,88	8,96	
	73,43	27,73	3,93				
		23,26	3,31				
<b>Moyenne</b>	71,15	27,17	5,33	<b>Moyenne</b>	66,73	23,42	9,85
<b>ET</b>	5,20	6,67	3,64	<b>ET</b>	4,62	7,31	3,51

**Tableau 7 : EVOLUTION DU TAUX DE MONOXYDE D'AZOTE [ $\mu\text{mol/L}$ ]**

	T <sub>0</sub> global	Lot Témoin			Lot I		
		1 mois	2 mois	3 mois	1 mois	2 mois	3 mois
	326,25						
	399,375	561,56	584,06	491,25	468,75	531,25	491,27
	468,75	439,06	529,06	462,19	552,81	544,68	490,94
	420		312,5	460,88	496,88	531,25	
	531,25			413,44		387,81	
<b>Moyenne</b>	429,13	500,31	475,21	456,94	506,15	498,75	491,1
<b>ET</b>	76,73	86,62	143,57	32,21	42,79	74,22	0,24

	Lot II			Lot II		
	1 mois	2 mois	3 mois	1 mois	2 mois	3 mois
	389,69	611,25	359,06	332,19	400	597,19
	433,75	496,88	656,25	305	446,88	
	562,5	400		375	446,88	553,13
					488,44	
<b>Moyenne</b>	461,98	502,71	507,66	337,4	445,55	575,16
<b>ET</b>	89,8	105,75	210,14	35,29	36,14	31,16



Courbe étalon Concentration  $\text{NaNO}_2$  ( $\mu\text{M}$ )/DO

**Tableau 8** : EVOLUTION DE LA CK-MB (U/L) PLASMATIQUE EN DEBUT (T0 ) ET FIN D'EXPERIMENTATION (T3) CHEZ LES RATS WISTAR DU LOT TEMOIN ET DU LOT III (500 mg/Kg poids corporel/jour)

<b>T0 global</b>		<b>3 mois</b>	
		Lot T	Lot III
	476,7	786	855,7
	593	463,2	1233
	751	667,7	1958
	682		934,4
	935,1		
	381,6		
<b>Moyenne</b>	627,19	638,97	1245,28
<b>ET</b>	182,78	163,31	502,18

## **COLORATION AU TRICHOME DE MASSON (VARIANTE MASSON-GOLDNER)**

Déparaffinage

Hydratation

Coloration nucléaire à l'hématoxyline de Groat	1 s
Lavage à l'eau courante	5 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	
Bleu d'aniline	4 min 30 s

Rinçage à l'eau acétifiée jusqu'à l'élimination du colorant

Déshydratation

Montage au baume de Canada.

## **COLORATION A L'ACIDE PERIODIQUE-SCHIFF**

Déparaffinage

Hydratation

Traitement à l'acide périodique	10 min
Lavage à l'eau courante	10 min
Coloration au réactif de Schiff	26 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	22 h
Lavage à l'eau distillée	1 min
Lavage à l'eau courante	1 min

Déshydratation

Montage au baume de Canada

# *INDEX*

## INDEX DES FIGURES

Figures	Titre	Page
1	Métabolisme de l'homocystéine (Murthy <i>et al.</i> , 2005 ; Vesin <i>et al.</i> , 2007)	5
2	Différentes formes de l'homocystéine dans le plasma humain. (Jakubowski <i>et al.</i> , 2006)	7
3	Conversion enzymatique de l'homocystéine libre	17
4	Evolution du poids corporel (g) des rats témoins et traités.	25
5	Evolution de l'homocystéinémie ( $\mu\text{mol/L}$ ) des rats traités et témoins.	26
6	Pourcentage de variation de l'homocystéinémie au premier mois	27
7	Evolution de la cholestérolémie (g/L) chez les rats témoins et traités.	27
8	Pourcentages de variation de la cholestérolémie T <sub>3</sub> vs T <sub>0</sub>	28
9	Evolution de la triglycéridémie chez les rats témoins et traités à la méthionine	29
10	Pourcentage de variation de la triglycéridémie des différents lots vs témoin après un mois d'administration <i>per os</i> de méthionine	29
11	Evolution de la protéinémie chez les rats témoins et traités à la méthionine	30
12	Pourcentage de variation de la protéinémie au 2 <sup>ème</sup> (A) et 3 <sup>ème</sup> mois (B)	31
13	Profils électrophorétiques des lipoprotéines (A : Rat témoin ; B : Rat hyperhomocystéinémique lot III)	31
14	Pourcentage de variation de la lipoprotéinémie du lot III T <sub>0</sub> vs T <sub>3</sub>	32
15	Evolution du rapport nitrates/nitrites plasmatiques des rats témoins et traités à la méthionine	33
16	Pourcentage de variation du rapport nitrates/nitrites	34
17	Evolution de la CK-MB plasmatique des rats témoins et traités	35
18	Pourcentage de variation lot III vs témoins en fin d'expérimentation	35
19	Mécanismes hypothétiques de la pathogénicité de l'hyperhomocystéinémie. (Demuth <i>et al.</i> , 2000)	48

## INDEX DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
1	Exemples d'effets de l'homocystéine <i>in vitro</i> sur des médiateurs de la coagulation (Demuth <i>et al.</i> , 2000)	11
2	Evolution pondérale (g) des Rats témoins et traités à différentes doses de méthionine	25
3	Evolution de l'homocystéinémie des rats traités et témoins	26
4	Evolution de la cholestérolémie des <i>Rattus norvegicus</i> témoins et traités à différentes doses de méthionine.	27
5	Evolution de la triglycéridémie chez <i>Rattus norvegicus</i> témoins et traités	28
6	Evolution de la protéinémie chez les rats témoins et traités à la méthionine	30
7	Evolution de la lipoprotéinémie des rats du lot III	32
8	Rapport nitrates/nitrites plasmatiques des rats témoins et traités à la méthionine	33
9	Evolution de la CK-MB plasmatique (U/L) des rats des Lots témoin et lot III	34

## INDEX DES PLANCHES

N° Planche		Page
I	Structure myocardique du Rat Wistar témoin et hyperhomocystéinémique coloration trichrome de Masson	37
II	Structure myocardique du Rat Wistar témoin et hyperhomocystéinémique coloration trichrome de Masson	39
III	Altérations matricielles de la structure myocardique du Rat Wistar témoin et hyperhomocystéinémique coloration acide périodique-schiff et bleu alcian	40
IV	Altérations cellulaires de la structure myocardique des Rats Wistar hyperhomocystéinémique coloration trichrome de Masson	41
V	Altérations vasculaires de la structure myocardique des Rats Wistar hyperhomocystéinémique coloration trichrome de Masson	42

## Abstract

An experimental hyperhomocysteinemia was induced with oral administration of 3 doses (300, 400 and 500 mg/Kg B W/day) of methionine during 3 months in mal Wistar rat. The repercussion of this cardiovascular risk factor was analyzed by weight, plasma and tissue. Our results indicate that hyperhomocysteinemia generates a body weight elevation and disorder of many plasmatic factors (CT, TG, proteins). Nitrates/nitrites ratio as indicator of oxidative stress was measured for explaining this damage. Several alterations were observed essentially in extra cellular matrix composition (collagen I and III, GPs and PGs), cardiomyocytes and heart vascularization. In the whole of these results a response dose effect is observed.

**Key words:** Homocysteine,-Methionine-Heart-Oxidative stress-Matrix remodeling-*Rattus norvegicus*

## الملخص

استحدثنا حالة ارتفاع نسبة الأموسيسستيين البلازمي على ذكور فئران مخابر بإطعامهم ثلاث كميات مختلفة من مادة الميثيونين (300مع, 400 مع و 500 مع/كغ من الوزن في اليوم) وذلك لمدة ثلاثة أشهر. ثم قمنا بتحليل مختلفة و لاحظنا أن الأموسيسستيين قد أحدثت تغيرات في الوزن الجسمي, البلازما والأنسجة. نتائجننا تشير إلى أن حالة ارتفاع نسبة الأموسيسستيين البلازمي أدت إلى ارتفاع الوزن و تغيرات مختلفة على المستوى البلازمي (كلستيرول, تريغلسريدات و البروتينات). تم تحليل معدل النترات/النتريت كدليل لاضطراب الأوكسدة لتفسير مختلف هذه التغيرات. في الجانب النسيجي سجلنا تغيرات على الأساس في تركيبة الوسط خارج خلوي (من بينها الكلاجن I و II, الجليكوبروتينات والبروتيوجليكانات), خلايا القلب و الأوعية القلبية. في عموم هذه النتائج لاحظنا خاصية التجاوب مع الكمية.

**الكلمات الأساسية:** الأموسيسستيين, الميثيونين, القلب, اضطراب الأوكسدة, فأر ويستار, إعادة عرض الوسط خارج خلوي.