République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri Tizi Ouzou

Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques

> Département de Biochimie et Microbiologie



Thèse Présentée en vue de l'obtention du diplôme de : Doctorat Spécialité : Sciences Biologiques

THEME

# Impact d'une hyperhomocystéinémie sur les maladies cardiovasculaires chez un modèle murin

Présenté par : Fouzia ZERROUK

Devant le jury

Présidente	Mme	Rosa BENABDESSELAM
Directeur	Mme	Yasmina BENAZZOUG
<b>Co-Directeur</b>	Mr	Karim HOUALI
Rapporteurs	Mme	Amel BOUMENDJEL-MESSARAH
	Mme	Nadjiba HAMLAT-KHENNAF
	Mme	Lynda LAKABI-AHMANACHE

Professeur à l'UMMTO Professeur à l'USTHB Professeur à l'UMMTO Professeur à l'U. Annaba MCA à l'USTHB MCA à l'UMMTO

Année universitaire 2022-2023

Tout récipient peut être rempli sauf, Celui du savoir car, insatiable. Ali, le 4ème Calife. A la mémoire de mon père,

A ma grande chère mère,

A mes frères et sœurs,

A toute ma famille maternelle et paternelle,

A tous mes enseignant(e)s

A tous mes ami(e)s

#### REMERCIEMENTS

J'exprime ma profonde gratitude en premier lieu à Mme Yasmina BENAZZOUG, Professeur à la FSB, USTHB, à qui je dois d'avoir pu réaliser ce travail. Après m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche Biochimie et remodelage de la matrice extracellulaire, et inspiré le sujet de cette thèse. Je vous remercie pour votre disponibilité, votre bonté, votre rigueur, vos qualités humaines, votre cordialité et vos conseils toujours enrichissants qui m'ont soutenue efficacement et m'ont permis de mener à bien la tâche entreprise. Que Dieu vous garde pour nous.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à **Mr Karim HOUALI**, Professeur à la FSBSA, UMMTO, Je vous remercie pour votre accueil chaleureux dans votre laboratoire ainsi que votre équipe. Je n'oublierai jamais vos encouragements et les moyens que vous avez mis largement à ma disposition, vos conseils, sans compter le temps précieux que vous m'avez consacré et pour avoir accepté de codiriger ce travail.

Je prie **Mme Rosa BENABDESSELAM**, Professeur à l'UMMTO, qui me fait le grand honneur de présider mon jury d'examinassions, de croire à ma vive gratitude et à l'assurance de ma haute considération.

A **Mme Amel BOUMENDJEL-MESSARAH**, Professeur à l'université d'Annaba, pour avoir accepté de se pencher sur ce travail et de le juger. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

A Mme Nadjiba KHENNAF-HAMLAT, Maitre de conférences A à la FSB, USTHB, pour avoir accepté de se déplacer et de se pencher sur ce travail et de le juger. Ses recherches et son expérience sur le syndrome métabolique sur le Psammomys m'ont laissés souhaiter sa présence dans ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et ma grande considération.

Je remercie **Mme Lynda LAKABI-AHMANACHE**, Maitre de conférences A à l'UMMTO, de m'accorder une partie de son temps pour examiner et juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

Je suis très heureuse que l'occasion me soit offerte afin de témoigner ma profonde reconnaissance à **Mme Souhila AOUICHAT-BOUGUERRA**, Professeur à la FSB, USTHB. Je vous remercie pour votre accueil chaleureux dans votre laboratoire ainsi que votre équipe, afin de réaliser une partie de mon travail à savoir la culture cellulaire. Je n'oublierai jamais vos encouragements et votre rigueur scientifique.

Mes remerciements s'adressent également à **Mme Khira OTHMANI-MECIF**, Professeur à la FSB, USTHB. Je vous remercie pour votre rigueur et vos qualités intellectuelles. Qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect. Mes sincères remerciements, mon profond respect et ma grande gratitude vont également à nos collaborateurs **Pr G. KACIMI**, Professeur en biochimie à l'hôpital central de l'armée et **Pr M. CHERIFI**, Professeur au laboratoire central de Biologie, EPH Bologhine Ibn Ziri. Merci pour votre fructueuse collaboration.

Merci à notre ex-ingénieur de laboratoire **Mme Lila KHEDIS** pour son aide technique et ses encouragements, Je vous ai toujours considérée comme une grande sœur, et vous le serai pour toujours. Et merci à notre ingénieur actuel et amie **Mlle Amel BOUZAROUR**.

Je tiens également à adresser mes vifs remerciements à Mme Anissa MOULAHOUM, amie et sœur pour sa gentillesse, ses conseils et surtout de sa disponibilité.

Merci à Mme Souad LAHCENE et Mr Fouad BOUKHALFA pour leur aide, leurs conseils et encouragements.

Que tous les collègues et amis (e) qui m'ont aidé et encouragé trouve ici mes chaleureux remerciements. Je remercie Mme Samia NEGGAZI, Mme Naima CHALOUR, Mme Zineb KHIARI, Mr Adel GHOUL, Mr Billel CHAOUAD, Mme Kahina CHABANE, Mr Hamid SAHRAOUI, Mme Sihem BERDJA, Mme Leila ISMAIL, Mme Saliha BOUMAZA, pour leur soutien moral et de m'avoir permis de vivre de très agréables moments en leur compagnie.

Enfin, aux membres de ma famille

A la mémoire du grand monsieur **Tahar ZERROUK**, mon très cher père, le pilier de notre famille, absent parmi nous, présent toujours dans nos cœurs et pensés. C'est Grâce à toi que j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. J'aurais aimé que tu sois présent aujourd'hui à ce célèbre évènement, pour voir le fruit de tous les sacrifices que tu as déployé<del>s</del> pour mon éducation et ma formation. Que dieu t'accorde sa sainte miséricorde.

Une pensée plus particulière et très chaleureuse à ma mère. Aucun mot n'est assez fort pour te remercier de m'avoir donné la vie. Une vie que tu as su remplir d'amour, de joie et de tendresse.

Je remercie mes sœurs et mes frères qui m'ont toujours soutenu tout en long de mon parcours.

Sans le soutien permanant de ma famille, cette thèse n'aurait pas pu voir le jour. Je pense à vous chaque jour. Ce sont votre amour et votre sacrifice qui m'ont poussé à réaliser un de mes rêves qui fût l'un des vôtres. Avec toute mon estime et mon amour, je vous dédie ce travail, il est le fruit de vos encouragements.

Que tous trouvent ici l'expression de ma sincère gratitude.

#### RESUME

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

L'Hhcy expérimentale est induite chez le rat des sables *Psammomys obesus*, par une injection intrapéritonéale quotidienne de 70 mg/kg de méthionine pendant 6 mois. Nous avons analysé l''impact de l'Hhcy sur certains paramètres biochimiques plasmatiques et sur les structures cellulaires des trois organes (cœur, aorte et foie). Les altérations cellulaires et matricielles des organes ont été analysées par des techniques histo-morphométriques. Une étude *in vitro* est réalisée sur des cellules musculaires lisses aortiques (CMLs) avec une concentration élevée de méthionine, afin d'étudier les effets de cette dernière sur ces cellules.

Nos résultats montrent que l'Hhcy altère non seulement l'homéostasie plasmatique mais aussi des altérations structurales marquées par une augmentation significative des composants de la matrice extracellulaire, en particulier des collagènes qui se sont accumulés dans les espaces interstitiels et périvasculaires des organes étudiés indiquant une installation d'une fibrose. Une stéatose hépatique a été également observée suite à l'administration de la méthionine. Une analyse plus approfondie de l'aorte a montré que l'Hhcy induit également des altérations vasculaires, notamment une réorientation et une prolifération des CMLs associées à la formation d'anévrismes.

Nos résultats montrent pour la première fois que l'Hhcy peut induire un phénotype de maladies cardiovasculaires et hépatiques chez *Psammomys obesus*, une espèce qui s'est précédemment révélée être un bon modèle pour les études sur le diabète et d'autres pathologies liées au métabolisme.

**Mots clés :** CMLs ; Foie ; Hyperhomocystéinémie ; Maladies cardiovasculaires ; Méthionine ; *Psammomys obesus*.

# SOMMAIRE

ABREVIATIONS	
INTRODUCTION	01
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Homocystéine et ses formes circulantes	04
II. Métabolisme de l'homocystéine	
III. Régulation du métabolisme de l'homocystéine	08
IV. Variations physiopathologiques de l'homocystéinémie	09
1. Influence de l'âge et du sexe	09
2. Facteurs génétiques et nutritionnels	10
2.1. Déficits en MTHFR et carences en folates	11
2.2. Mutations de la cobalamine et carences en vitamine B12	12
2.3. Déficits en C $\beta$ S et carences en vitamine B6	13
3. Insuffisance rénale	14
4. Hypothyroïdisme	15
V. Hyperhomocystéinémie et facteurs de risque	15
1. Hyperhomocystéinémie – Diabète	16
2. Hyperhomocystéinémie – Hypertension artérielle	16
3. Hyperhomocystéinémie – Troubles lipidiques	17
VI. Mécanismes de la pathogénécité de l'hyperhomocystéinémie	18
1. Homocystéine et ses interactions avec les protéines	20
2. Homocystéine et dysfonctionnement endothélial	20
2.1. Production d'un stress oxydant	20
2.2. Production et métabolisme du monoxyde d'azote	21
3. Homocystéine et athéro-thrombose	23
4. Homocystéine et insuffisance cardiaque	26
5. Homocystéine et prolifération des cellules musculaires	29
6. Homocystéine et matrice extracellulaire	29

### **MATERIEL ET METHODES**

I.	MATERIEL	33
	1. Matériel biologique	33
	2. Protocol expérimental	33
II.	METHODES	35
	1. Méthodes analytiques	35
	1.1. Dosage de l'homocystéine plasmatique	35
	1.2. Dosage du glucose plasmatique	36
	1.3. Dosage des triglycérides plasmatiques	36
	1.4. Dosage du cholestérol plasmatique	36
	1.5. Dosage des protéines totales plasmatiques	37
	1.6. Dosage de l'acide urique plasmatique	37
	1.7. Technique d'électrophorèse des lipoprotéines	37
	2. Technique histologique	
	3. Culture des cellules musculaires lisses aortiques	
	4. Etude histo et cytomorphométrique	44
	4.1. Etude histomorphométrique du cœur et de l'aorte	44
	4.2. Cytomorphométrie de cellules musculaires lisses aortiques en culture	44
	5. Etude statistique	45

## RSULTATS

# PARTIE I : INSTALLATION DE L'HYPERHOMOCYSTEINEMIE ET SON IMPACT SUR LE POIDS CORPOREL ET CERTAINS PARAMETRES BIOCHIMIQUES PLASMATIQUES

I.	Variation de l'homocystéine plasmatique	49
II.	Evolution du poids corporel des animaux	49
III.	Evolution de la glycémie	50
IV.	Evolution de certains lipides plasmatiques	51
	1. La triglycéridémie	51

	2. La cholestérolémie	51
	3. Les lipoprotéines plasmatiques	52
V.	Evolution de la protéinémie	53
VI.	Evolution de l'acide urique plasmatique	56

# PARTIE II : EFFETS DELETERES DE L'HYPERHOMOCYSTEINEMIE SUR LES STRUCTURES TISSULAIRES, CELLULAIRES ET VASCULAIRES DU FOIE, DU CŒUR ET DE L'AORTE

I. Impact de l'hyperhomocystéinémie sur le foie	56
II. Impact de l'hyperhomocystéinémie sur l'appareil cardio-vasculaire	60
1. Cœurde Psammomys	60
2. Aorte de Psammomys	76
III. Effets de la méthionine sur les cellules musculaires lisses aortiques (CMLs)	
en culture	72
DISCUSSION	75
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	86
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	89
INDEX	
ANNEXE	
ABSTRACT	
PUBLICATION	

# ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ALAT	Alanine aminotransferase
AMPc	Adenosine monophosphate cyclic
ARN	Acide ribonucléique
ASAT	Aspartate aminotransferase
AVC	Accidents vasculaires cérébraux
BHMT	Betaïne homocysteine methyl-transferase
BNP	Brain natriuretic peptides
CβS	Cystathionine $\beta$ synthetase
CMLs	Cellules musculaires lisses
CREB	C-AMP response element binding protein
Cys	Cystéine
DMAA	Dyméthyl arginine asymétrique
DMEM	Milieu essentiel de Eagle modifié par Dubelco
DTT	Dithiothreitol
EDRF	Endothelium-derived releasing factor
ET-1	Endotheline-1
eNOS	Isoforme endothéliale du monoxyde d'azote synthase
ERK	Extracellular-signal-regulated protein kinase
FPIA	Fluorescence polarization immunoassay
GMPc	Guanosine monophosphate cyclic
GNMT	Glycine-N-methyl-transferase
$H_2O_2$	Hydrogen peroxyde
$H_2S$	Hydrogen sulfurred
Нсу	Homocysteine
HDL	High density lipoprotein
Hhcy	Hyperhomocystéinémie
HMG-CoA	β-Hydroxy β-methylglutaryl-CoA
ICAM	Intracellular adhesion molecule
IDL	Intermediar density lipoprotein
IRAK	IL-1R-associated kinase

JNK	Jun kinases
LDL	Low density lipoprotein
Leu	Leucocyte
LOX-1	Lectin-like oxidized LDL receptor-1
Lp (a)	Lipoprotéine (a)
МАРК	Mitogen-activated protein kinase
MAT	Methionine-adenosyl transferase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MCV	Maladies cardiovasculaires
Met	Méthionine
MeTHF	Methylene tetrahydrofolate.
MMP	Matrix metalloprotease
MS	Methionine synthase
MTHF	Methyl tetrahydrofolate.
MTHFR	N <sup>5,10</sup> methylenetetrahydrofolate reductase
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
NF-Kb	Nuclear factor kappa B
NMDA	N-methyl-Daspartate
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
NYHA	New York Heart Association
РКА	Protein kinase A
РКС	Protein kinase C
PLP	5' phosphate pyridoxal.
RBC	Red blood cells
SAH	S adenosyl homocysteine
SAHH	S adenosyl homocysteine hydrolase
SAM	S adenosyl methionine
SREBP-1	Sterol regulatory element binding proteins
SRF	Serum response factor
SVF	Sérum de veau fœtal

THF	Tetrahydrofolate		
TIMP	Tissular metalloprotease inhibitor		
TIR	Toll/interleukin-1 receptor		
TIRAP	Toll-Interleukin I receptor domain-containing adaptor protein		
TLR4	Toll-like receptor 4		
TNFα	Tumor necrosis factor $\alpha$		
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha		
TRAM	TRIF-related adaptor molecule		
TRIF	TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon-b		
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1		
VLDL	Very low density lipoprotein		

# **INTRODUCTION**

Le travail qui fait l'objet de cette thèse s'inscrit dans le cadre des recherches menées au sein de notre équipe, *Biochimie et Remodelage de la Matrice Extracellulaire du Laboratoire de Biologie Cellulaire & Moléculaire*. Ces recherches s'intéressent aux mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire de différents organes induit par une hyperhomocystéinémie chez certaines espèces à savoir le rat Wistar (Raaf et *al.*, 2011; Yefsah-Idres et *al.*, 2016; Ghoul et *al.*, 2017), le rat des sables (Chaouad et *al.*, 2019), et le lapin (Othmani Mecif et *al.*, 2017).

Selon l'OMS (2021), les maladies cardiovasculaires (MCV) restent la première cause de mortalité dans le monde avec les cardiopathies ischémiques en première position, responsables de 16% de tous les décès, et les accidents vasculaires cérébraux (AVC) en deuxième position, responsables de 11% de tous les décès. En Algérie par exemple, selon les chiffres de l'Institut national de la santé publique (2021), un taux de 34% par an de mortalité par les MCV est noté. Ces maladies ont pour origine, plusieurs facteurs de risque dits classiques comme le tabagisme (Rodriguez-Portelles and Rodriguez-Leyva, 2019), l'hypertension artérielle (Denolle et *al.*, 2017), le diabète (Kenny and Abel, 2019), l'hypercholestérolémie (Sharifi et *al.*, 2019) et l'obésité (Charfeddine et *al.*, 2022).

Les dernières découvertes ont provoqué une vague de nouvelles enquêtes pour identifier de nouveaux facteurs de risque émergents pour le développement des maladies cardiovasculaires. Récemment, l'hyperhomocystéinémie (Hhcy), caractérisé par un taux plasmatique élevé d'homocystéine (Hcy), a suscité beaucoup d'intérêt, principalement en raison de sa prévalence dans la population générale et de sa forte corrélation avec le développement d'un certain nombre de maladies cardiovasculaires (Baszczuk et Kopczyński, 2014 ; Dubey et *al.*, 2022 ; Reis, 2022).

L'homocystéine est un acide aminé soufré intermédiaire dans le métabolisme de la méthionine. Il est produit via la déméthylation de la méthionine alimentaire, qui est abondante dans les protéines animales (Guilland et al., 2003). Chez l'homme, des concentrations plasmatiques d'Hcy comprises entre 15 et 100 µmol/L sont considérées comme indicatrices d'une Hhcy cliniquement pertinente (Hasan et al., 2019 ; Zaric et al., 2019 ; Guieu et al., 2022). En 1964, Gibson et ses collaborateurs en 1964 ont signalé pour la première fois, la présence d'anomalies vasculaires chez des patients atteints d'homocystinurie (concentration élevée d'Hcy dans le plasma et l'urine). Quelques années plus tard, en 1969, McCully a émis l'hypothèse selon laquelle une Hhcy peut avoir un rôle causal indépendant de toute anomalie métabolique. C'était la base de sa théorie Hhcy et l'athérosclérose (McCully, 1969). En effet, des décennies d'investigation chez des patients humains ont établi une corrélation étroite entre Hhcy et les maladies cardiovasculaires et des complications ultérieures telles que des crises cardiaques et des accidents vasculaires cérébraux (Baszczuk et Kopczyński, 2014 ; Reis, 2022). À ce jour, l'Hhcy est reconnu comme facteur de risque établi pour les maladies coronariennes, les maladies vasculaires périphériques, l'infarctus du myocarde (Maron et Loscalzo, 2009; Kar et al., 2019; Reis, 2022) et les maladies du foie (Roblin et al., 2007; Buchman, 2009; Lv et al., 2021).

Par ailleurs, il a été démontré qu'un régime riche en méthionine chez des modèles animaux induisait d'une part un état hyperhomocystéinémique (Hidiroglou et *al.*, 2004 ; Stojanović et *al.*, 2018 ; Rahimi et *al.*, 2021) et d'autre part des dommages au système cardiovasculaire par le biais du stress oxydatif, de l'inflammation et du remodelage de la matrice extracellulaire (Sharma et *al.*, 2007 ; Chaturvedi et *al.*, 2016 ; Stojanovic et *al.*, 2016; 2018 ; Rahimi et *al.*, 2021).

Dans son habitat naturel désertique, *Psammomys obesus* se nourrit principalement de plantes riches en eau et en minéraux caractérisant un régime hypocalorique (Hamidatou Khati et *al.*, 2023). Lorsqu'ils sont maintenus dans des conditions de laboratoire et nourris avec un régime standard de laboratoire ou régime riche en glucides (Berdja et *al.*, 2012; 2016) ou en lipides (Hamlat et *al.*, 2010; Sahraoui et *al.*, 2016), ces animaux présentent des troubles métaboliques. C'est un animal athérosensible qui représente un modèle idéal pour l'étude des maladies cardiovasculaires (Nesher et *al.*, 1999; Hamlat et *al.*, 2010; Berdja et *al.*, 2012, 2016; Sahraoui et *al.*, 2016).

Les travaux de notre équipe ont précédemment montré qu'une Hhcy induit un remodelage de la couche myocardique chez *Psammomys obesus* (Chaouad et *al.*, 2019), mais les effets de l'Hhcy sur les autres composants du système cardiovasculaire n'ont point été investigués. De ce fait, notre travail a pour objectif d'étudier et d'analyser, l'impact d'une hyperhomocystéinémie induite par un excès de méthionine (70 mg/kg de poids corporel/jour) pendant 6 mois, sur le remodelage cardiovasculaire et hépatique chez *Psammomys obesus*.

Afin de confirmer l'installation de l'hyperhomocystéinémie (Hhcy), nous avons étudié les variations de l'homocystéine plasmatique et ses répercussions sur le poids corporel et certains paramètres biochimiques plasmatiques (glucose, triglycérides, cholestérol, lipoprotéines, protéines totales, et acide urique).

Nous nous sommes intéressés par la suite, à l'impact de cette Hhcy sur :

- La structure cellulaire et matricielle de la paroi cardiaque, de l'aorte et du foie,
- Certains composants de la structure cardiaque et aortique sur le plan morphométrique,
- La prolifération et le changement phénotypique des cellules musculaires lisses vasculaires (étude *in vivo* et *in vitro*)

Nos conclusions pourraient permettre d'une part de préciser le remodelage cardiovasculaire et hépatique induit par une hyperhomocystéinémie et d'autre part, de confirmer que le rat des sables, *Psammomys obesus*, représente un excellent modèle d'étude des altérations liées aux maladies cardiovasculaires et hépatiques.

Afin d'étudier et d'analyser; nous avons opté pour une approche histologique ; histochimique et morphométrique qui sera complétée par une étude *in vitro* des cellules musculaires lisses aortiques, impliquées dans ce remodelage.

Le contenu de ce manuscrit présente une synthèse bibliographique rapportant les principales données concernant l'homocystéine, son métabolisme et ses effets pathogènes. Nous avons, ensuite, précisé le protocole expérimental et la méthodologie de travail adoptés pour la réalisation de nos travaux. La troisième partie exposant les résultats obtenus est suivie de leur discussion. Une conclusion générale et quelques perspectives clôturent ce manuscrit.

# **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## I. Homocystéine et ses formes circulantes

L'homocystéine (Hcy), acide aminé endogène soufré (HS-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(NH<sub>2</sub>)-COOH) découvert en 1932 par Butz et du Vigneaud, n'intervient pas dans la structure des protéines et n'est pas absorbé par l'alimentation. Il constitue un intermédiaire important dans la fonction de donneur de méthyle de la méthionine et dans le métabolisme de celle-ci vers les autres acides aminés soufrés comme la cystéine (Finkelstein et Martin, 2000 ; Zaric et *al.*, 2019).

La seule source d'Hcy chez les mammifères provient de l'hydrolyse de la S-adénosyl homocystéine (SAH) par une enzyme ubiquitaire, la S-adénosyl homocystéine hydrolase (SAHH). Cette réaction libère une molécule d'Hcy et d'adénosine par molécule de SAH hydrolysée (Palmer and Abeles, 1979).

S-AdénosylHomocystéine + H2O 🔅 Adénosine + Homocystéine

Comme cette réaction est réversible, en cas d'hyperhomocystéinémie (Hhcy), la synthèse de SAH peut être favorisée, cela joue un rôle important dans la régulation de l'activité enzymatique du cycle de la reméthylation de l'Hcy (Palmer and Abeles, 1979).

Les études épidémiologiques et expérimentales ont montré que, l'apport excessif de méthionine chez l'homme et chez les animaux, conduit à une concentration plasmatique élevée d'homocystéine connue sous le nom d'hyperhomocystéinémie (Hhcy). Chez les sujets normaux, après une ingestion de 0,1g/Kg poids corporel de méthionine (Sardharwalla et *al.*, 1974), l'élévation de l'homocystéine plasmatique est très modérée et la valeur de base est retrouvée en quelques heures. Cet état hyperhomocystéinémique est aussi observé chez différents modèles d'animaux, après administration chronique d'un excès de méthionine, comme la souris (Chaturvedi et *al.*, 2016) ; le porc (Charpiot et *al.*, 1998) ; le rat Wistar (Raaf et *al.*, 2011 ; Yefsah-Idres et *al.*, 2016 ; Ghoul et *al.*, 2017 ; Rahimi et *al.*, 2021) ; la gerbille (Hidiroglou et *al.*, 2004) et le lapin (Othmani Mecif et al., 2017).

Dans des conditions physiologiques normales, les concentrations plasmatiques d'homocystéine chez des sujets sains à jeun sont comprises entre 5 et 15  $\mu$ mol/L (Ueland et *al.*, 1993 ; Hasan et *al.*, 2019 ; Paganelli et *al.*, 2021 ; Guieu et *al.*, 2022). Dans le plasma humain, l'homocystéine est retrouvée sous trois formes différentes (Fig. 1) :

- En faible quantité (1 à 2 %) sous forme réduite libre (Ueland et *al.*, 1993 ; Brosnan et *al.*, 2004).
- En plus grande quantité (25-30%) sous la forme oxydée d'homocystine (Hcy-Hcy), de disulfure mixte avec la cystéine, et cyclisée en thiolactone (Olszewski et McCully, 1993; Demuth et *al.*, 2000; Mudd et *al.*, 2000; Sengupta et *al.*, 2001).
- Et majoritairement (70 à 75 %) sous forme de disulfures conjugués aux groupes thiols des protéines (Refsum et *al.*, 1985 ; Miner et *al.*, 1997) ; principalement (65 %) l'albumine (Refsum et *al.*, 1985), et à un degré moindre (25 %) les γ globulines (Jakubowski, 2002 ; Hortin et *al.*, 2006). Les liaisons aux protéines sont saturées chez les sujets hyperhomocystéinémiques, dès que la concentration d'homocystéine dépasse 150 µmol/L (Wiley et *al.*, 1988).



**Figure 1 : Formules chimiques de l'homocystéine et de ses formes circulantes.** (Miner et *al.*, 1997; Guilland et *al.*, 2003; Brosnan et *al.*, 2004; Lévy, 2020)

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

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

#### II. Métabolisme de l'homocystéine

Sur le plan physiologique, l'homocystéine occupe une place centrale dans le métabolisme des acides aminés soufrés (Fig. 2). Elle est produite par la déméthylation de la méthionine (Finkelstein et Martin, 2000 ; Zaric et *al.*, 2019).

L'activation de la méthionine en S-adénosyl-méthionine (SAM) se fait sous l'influence de la méthionine-adénosyl transférase (MAT). La SAM est un important donneur de méthyle (Chiang et al., 1996 ; Stead et al., 2001) aux différents accepteurs importants neurotransmetteurs. comme les acides nucléiques, les les hormones et les phosphatidylcholines (Selhub et Miller, 1992; Dubey et al., 2022). D'après Bodamer et al. (2005), la synthèse de créatine dépend en grande partie de SAM. Celle-ci, en donnant son méthyle, se transforme en S-adénosyl-homocystéine (SAH), qui est hydrolysée en homocystéine et en adénosine par la SAHH ou S-adénosyl-homocystéine hydrolase (Welch and Loscalzo, 1998).

L'homocystéine formée est soit catabolisée en cystathionine *via* la voie de la transsulfuration, soit reméthylée en méthionine *via* la voie de la reméthylation (Guilland et *al.*, 2003 ; Zaric et *al.*, 2019 ; Dubey et *al.*, 2022).

La reméthylation de l'homocystéine est catalysée par la méthionine synthase (MS) qui requiert le 5-méthyltétrahydrofolate (5-MTHF) comme donneur de méthyle (Yamada et al., 2006) et la vitamine  $B_{12}$  (méthylcobalamine forme active de la vitamine  $B_{12}$ ) comme  $N^{5,10}$ formation de la cofacteur (Marsh, 1999). La du 5-MTHF dépend méthylénetétrahydrofolate réductase (MTHFR) qui catalyse la réduction du 5,10-MeTHF formé à partir du tétrahydrofolate (THF). Une voie parallèle de reméthylation indépendante des folates et de la cobalamine utilise la conversion de la bétaïne en N, N-diméthylglycine sous l'action de la bétaïne homocystéine méthyl-transférase (BHMT), principalement dans le foie (Guilland et al., 2003; Kharbanda et al., 2005; Dubey et al., 2022). Cette voie permet de maintenir la concentration tissulaire en méthionine à un niveau suffisant pour assurer la synthèse de la SAM en cas de déficit en folates. La S-adénosyl-homocystéine formée dans les réactions de méthylation, est ensuite hydrolysée en homocystéine, qui devient disponible pour démarrer un nouveau cycle de transfert de méthyle. L'hydrolyse de la SAH est une réaction réversible, préférentiellement orientée vers la synthèse de SAH et des concentrations cellulaires élevées SAH précédent accompagnent les de et toutes formes d'hyperhomocystéinémie.

Dans la voie de transsulfuration, l'homocystéine se condense avec la sérine pour former la cystathionine sous l'action de la cystathionine  $\beta$ -synthase, dépendant du pyridoxal 5'-phosphate (PLP), la forme active de la vitamine B<sub>6</sub> (Fig. 2). La cystathionine est ensuite hydrolysée en cystéine et  $\alpha$ -cétobutyrate par une enzyme dépendant du PLP, la  $\gamma$ -cystathionase (Miller et *al.*, 1992 ; Guilland et *al.*, 2003 ; Dubey et *al.*, 2022). Cette voie est très importante puisque la cystéine est à l'origine d'un acide aminé soufré anti-oxydant majeur le glutathion (Anderson, 1998); et d'autres acides aminés utiles, notamment la taurine ; où elle est convertie en sulfates qui sont excrétés dans les urines. Les carbones restants de l'Hcy rejoindront le cycle de Krebs (Wolters et *al.*, 2004 ; Dubey et *al.*, 2022).





## III. Régulation du métabolisme de l'homocystéine

Les études sur la régulation du métabolisme de l'homocystéine ont montré que l'orientation de l'homocystéine vers la voie de la reméthylation ou de la transsulfuration est sous le contrôle de la disponibilité en méthionine et SAM (Fig. 3). La synthèse *de novo* de la méthionine dépend de la teneur en groupements méthyle labiles (méthionine, choline) (Mudd et Poole, 1975 ; Mudd et *al.*, 1980). Lorsque l'apport en méthionine est normal, la molécule d'homocystéine est recyclée environ deux fois par la voie de reméthylation avant d'être catabolisée par la voie de transsulfuration. Lorsque l'apport en méthionine diminue de moitié, le nombre de cycles par molécule d'homocystéine augmente d'un facteur 2. À l'inverse, lorsque l'apport en méthionine augmente, l'homocystéine utilise principalement la voie de la transsulfuration (Zaric et *al.*, 2019 ; Dubey et *al.*, 2022).



**Figure 3 : Régulation du métabolisme de l'homocystéine.** (Guilland et al., 2003; Martinez, 2015, schéma modifié)

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

Le premier mécanisme dépend de la capacité de la SAM à inhiber la MTHFR (Jencks et Mathews, 1987 ; Guilland et *al.*, 2003 ; Zaric et *al.*, 2019) et à activer la cystationine-β-synthase (Finkelstein et Martin, 2000 ; Guilland et *al.*, 2003 ; Zaric et *al.*, 2019). La SAM bloque donc la synthèse du N-5-MTHF nécessaire à la reméthylation de l'homocystéine et favorise la réaction initiale de la transsulfuration. La concentration intracellulaire de la SAM détermine de ce fait, le destin métabolique des molécules d'homocystéine,

Le second mécanisme dépend de la régulation de la concentration intracellulaire de SAM (Guilland et al., 2003 ; Martinez, 2015). Les deux enzymes qui catalysent la synthèse de la SAM présentent une affinité différente pour la méthionine. La première, de poids moléculaire élevé, présente une affinité importante pour la méthionine et fonctionne dans les conditions physiologiques ; la seconde, de poids moléculaire plus bas, a une faible affinité pour la méthionine et ne fonctionne de ce fait qu'en présence d'apports élevés en méthionine.

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

À l'opposé, lorsque l'apport de méthionine est faible, la concentration intracellulaire de SAM n'est pas suffisante pour inhiber la MTHFR et la concentration du N-5-MTHF augmente de telle sorte que la GNMT est inhibée. La voie de reméthylation est donc favorisée d'autant plus que la concentration de la SAM est trop basse pour stimuler la cystathionine- $\beta$ -synthase (Guilland et *al.*, 2003; Martinez, 2015).

#### IV. Variations physiopathologiques de l'homocystéinémie

L'hyperhomocystéinémie caractérisée par un taux élevé d'homocystéine plasmatique (supérieur à 15  $\mu$ mol/L), peut avoir pour origine des troubles d'ordre génétique, nutritionnel et thérapeutique (Hasan et *al.*, 2019 ; Zaric et *al.*, 2019 ; Guieu *et al.*, 2022). Elle peut également être associée à différents états pathologiques (Guilland et *al.*, 2003 ; Hasan et *al.*, 2019 ; Zaric et *al.*, 2019 ; Zaric et *al.*, 2019). L'homocystéinémie est aussi influencée par des facteurs physiologiques, comme l'âge et le sexe (Ueland et *al.*, 1993 ; Guilland et *al.*, 2003 ; Lévy, 2020).

#### 1. Influence de l'âge et du sexe

Plusieurs influences biologiques telles l'âge et le sexe, agissent sur les taux d'homocystéine. Les personnes âgées ont des concentrations plus élevées d'Hcy. Dans cette population, le statut vitaminique a une influence majeure (Huang et *al.*, 2015 ; Lévy, 2020). Chez les enfants dont l'âge est compris entre 3 et 14 ans, les concentrations normales d'homocystéinémie sont de l'ordre de 6 µmol/L (Ueland et *al.*, 1993). Les concentrations plasmatiques d'Hcy enregistrées chez les femmes sont plus faibles que celles rapportées chez les hommes d'environ 21% (Lussier-Cacan et *al.*, 1996 ; Ganji et Kafai, 2003). Panagiotakos et *al.* (2005) ont également montré que les valeurs d'Hcy chez les hommes sont supérieures (d'environ 25%) à celles des femmes (14,5 ± 6 µmol/L *vs* 10,8 ± 3,5 µmol/L).

L'influence des hormones sexuelles sur le taux sanguin d'homocystéine a été rapportée par plusieurs auteurs dont Marchesoni et *al.* (2003). Leurs effets sur le métabolisme de l'Hcy ne sont pas entièrement élucidés selon Cagnacci et *al.* (2004), bien que Giltay et *al.* (1998) mentionnent une augmentation du taux d'homocystéine par les androgènes et une corrélation négative de l'homocystéinémie et les œstrogènes. Smolders et *al.* (2005) ont montré que le taux de l'homocysteine chez la femme ménopausée diminue après administration d'œstrogènes.

Selon Ueland et *al.* (1993), l'homocystéinémie notée chez les femmes postménopausées se rapproche de celles des hommes. Harma et *al.* (2005) ont montré qu'une administration intranasale du 17  $\beta$ -œstradiol pendant 6 mois à des femmes post-ménopausées, a permis de diminuer le taux d'homocystéinémie. Celle-ci présente une corrélation négative avec le taux plasmatique de folates et de vitamine B<sub>12</sub>.

Ces différences ont été attribuées à divers facteurs dont le taux de formation d'homocystéine, la masse musculaire importante et la synthèse accrue de créatine phosphatée chez les hommes (Mudd and Poole, 1975).

#### 2. Facteurs génétiques et nutritionnels

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

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

Selon Zaric et *al.* (2019) et Guieu et *al.* (2022), l'hyperhomocystéinémie peut être classée en fonction de sa cause, de sa prévalence et de sa sévérité en :

- Hyperhomocystéinémie modérée : c'est la forme la plus fréquente caractérisée par des concentrations variant de 15 à 30 µmol/L.
- Hyperhomocystéinémie intermédiaire, lorsque les concentrations en homocystéine varient de 31 à 100 µmol/L.
- Hyperhomocystéinémie sévère lorsque la concentration est supérieure à 100 µmol/L.

Les deux premières catégories sont liées à une mutation du gène codant pour les enzymes clés du métabolisme de l'homocystéine et/ou à un statut inadéquat en folates, vitamines B<sub>6</sub> et B<sub>12</sub> (Martinez, 2015 ; Lévy, 2020). Les cas les plus sévères ( $3^{\text{ème}}$  catégorie) sont dus à un déficit en gène codant pour la cystathionine  $\beta$ -synthase ou à des mutations homozygotes de gènes codant pour d'autres enzymes (Martinez, 2015 ; Lévy, 2020).

L'hyperhomocystéinémie est un marqueur important de la déficience en vitamine  $B_{12}$  et/ou d'insuffisance folique, elle peut également indiquer un taux bas de vitamine  $B_6$  (Smach et *al.*, 2013 ; McCully, 2016). Hung et *al.* (2003) ont rapporté qu'un groupe d'hommes présentant des concentrations sériques en folates supérieures à 9 µg/l présentent un double risque de mort par maladie cardiovasculaire. La concentration sérique normale de la

cobalamine est d'environ 150 pmol/l (200 pg/ml), 10 à 15 % des personnes âgées sont déficientes. Selon Wolters et *al.* (2004), un seuil de 220-258 pmol/l (300-350 pg/ml) serait souhaitable chez les personnes âgées.

D'autres auteurs ont montré l'efficacité d'une supplémentation vitaminique pour diminuer l'homocystéinémie. Van Oort et *al.* (2003), ont estimé qu'une dose quotidienne d'acide folique d'environ 400  $\mu$ g, serait la dose minimale requise pour une réduction adéquate d'homocystéine. Une dose faible de L-MTHF (113  $\mu$ g) induit une diminution de la concentration d'Hcy totale chez les personnes saines (Venn et *al.*, 2003). Chez les personnes dont l'âge est supérieur à 60 ans, une supplémentation en vitamine B<sub>12</sub> devrait être supérieure à 50  $\mu$ g/jour (Wolters et al., 2003). Une administration intraveineuse de bétaïne diminue l'hyperhomocystéinémie provoquée par une surcharge en méthionine chez les rats (Yagisawa et *al.*, 2004).

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

#### 2.1. Déficits en MTHFR et carences en folates

Le N5-méthyltétrahydrofolate est une vitamine indispensable pour la synthèse de la méthionine (Fig. 4). Une altération de sa synthèse est due soit à un apport insuffisant de folates, soit à une diminution de l'activité de la MTHFR qui freine la synthèse de la méthionine (Guilland et *al.*, 2003; Martinez, 2015). L'homocystéine qui doit être reméthylée, s'oriente vers la voie de la transsulfuration. Mais cette voie ne peut prendre en charge la totalité de l'homocystéine pour deux raisons : l'inhibition de la synthèse de la méthionine conduit à une chute de la concentration intracellulaire de la SAM ; le manque de N5-CH<sub>3</sub> THF permet à la GNMT d'être active de manière optimale de telle sorte que la concentration de la SAM diminue encore et la synthèse de l'homocystéine est stimulée (Fig. 4). La voie de transsulfuration devient inefficace car la concentration de SAM est trop basse et l'homocystéine s'accumule dans les cellules. L'homocystéine non métabolisée diffuse dans le compartiment plasmatique et s'y accumule (Guilland et *al.*, 2003; Martinez, 2015).



Figure 4 : Déficits en MTHFR et carences en folates. (Guilland *et al.*, 2003 ; schéma modifié)

#### 2.2. Mutations de la cobalamine et carences en vitamine B12

Une carence en vitamine  $B_{12}$  ou un défaut des enzymes synthétisant la méthyl-cobalamine, entraînent une altération de la voie de reméthylation de l'homocystéine (Fig. 5). Les concentrations intracellulaires de la SAM sont peu affectées car l'augmentation de la concentration intracellulaire du N5-MTHF réduit l'utilisation de la SAM dans la voie de méthylation de la glycine. De ce fait, une plus petite quantité d'homocystéine sera synthétisée à partir de la SAM et la cystathionine  $\beta$ -synthase sera activée. La voie de transsulfuration étant plus active que dans le cas précédent l'hyperhomocystéinémie devrait être moins sévère (Guilland et *al.*, 2003; Martinez, 2015).



Figure 5 : Mutations de la cobalamine et carences en vitamine B12. (Guilland *et al.*, 2003 ; schéma modifié)

#### 2.3. Déficits en CBS et carences en vitamine B6

Aucun métabolite formé par la voie de la transsulfuration n'affecte directement la voie de reméthylation (Guilland et al., 2003; Martinez, 2015). Cependant, lorsque la première voie est défectueuse comme dans le cas d'un déficit homozygote de la cystathionine β-synthase (Fig 6a), l'homocystéine est métabolisée en plus grande proportion par la voie de reméthylation. La synthèse de la méthionine est stimulée et la concentration de la SAM dans les cellules augmente jusqu'à ce qu'elle soit suffisamment élevée pour inhiber la MTHFR et bloquer ainsi la voie de reméthylation. Il s'ensuit alors une accumulation de l'homocystéine conduisant à une hyperhomocystéinémie sévère. Lorsque la voie de transsulfuration fonctionne encore en partie comme dans le cas d'un déficit hétérozygote de la cystathionine  $\beta$ -synthase ou d'une carence en vitamine B<sub>6</sub> (Fig. 6b), la voie de reméthylation et la voie de transsulfuration métabolisent normalement l'homocystéine tant que la quantité d'homocystéine à prendre en charge est faible. La charge métabolique d'homocystéine est faible lorsque l'entrée de méthionine dans la cellule est limitée. C'est le cas du jeun. En revanche, à la suite d'un apport en méthionine, la concentration intracellulaire de SAM augmente et (1) la synthèse du N5méthylTHF est inhibée entraînant le blocage de la voie de reméthylation ; (2) l'activité de la GNMT est maximale résultant en une production accrue d'homocystéine par la méthylation de la glycine (Guilland et al., 2003; Martinez, 2015). Dans ces conditions, l'homocystéine s'accumule et une hyperhomocystéinémie est observée.



Figure 6a : Déficit homozygote de la Cystathionine β-Synthase. (Guilland et *al.*, 2003 ; schéma modifié)



Figure 6b : Déficit hétérozygote de la CβS et carence en vitamine B6. (Guilland et *al.*, 2003 ; schéma modifié)

#### 3. Insuffisance rénale

Les augmentations modérées de la concentration d'homocystéine observées au cours de l'insuffisance rénale pourraient contribuer à l'excès de maladies vasculaires. La prévalence de l'hyperhomocystéinémie est d'environ 80 à 100 % chez des patients en insuffisance rénale terminale (Guilland et *al.*, 2003; Dubey *et al.*, 2022).

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

Cependant, l'hyperhomocystéinémie observée lors de l'insuffisance rénale n'est pas liée à un défaut d'élimination rénale car celle-ci n'intervient normalement que pour 1 % de la clairance métabolique totale de l'homocystéine, et la clairance fractionnelle de l'homocystéine augmente lorsque la filtration glomérulaire diminue. Guttormsen et *al.* (1997) arrivent à une conclusion similaire en comparant la cinétique d'élimination plasmatique après une charge orale en L-homocystéine chez des sujets à fonction rénale normale et chez des sujets insuffisants rénaux traités par hémodialyse. La demi-vie d'élimination est considérablement augmentée chez les insuffisants rénaux par rapport aux sujets à fonction rénale normale. Ces données correspondent à une réduction de 70 % de la clairance plasmatique de l'homocystéine en cas d'insuffisance rénale terminale. Ces auteurs rapportent également que chez le sujet urémique, le débit urinaire d'homocystéine est significativement plus élevé que chez le sujet à fonction rénale normale. En effet 85 % de l'homocystéine filtrée est réabsorbée dans le tubule rénal chez l'urémique contre 99 % dans les conditions normales (Guttormsen et *al.*, 1997).

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

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

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

#### 4. Hypothyroïdisme

L'hypothyroïdisme est l'un des facteurs qui augmente le risque des maladies cardiovasculaires (Udovcic et *al.*, 2017 ; Inoue et *al.*, 2020). Les études récentes ont démontré que la concentration de l'homocystéine est plus élevée chez les patients avec hypothyroïdie comparés aux sujets sains (Catargi et *al.*, 1999 ; Goksel et *al.*, 2007). Nair et *al.* (1994) ont rapporté que les changements de concentrations ou de l'activité biologique de la vitamine  $B_{12}$  ou  $B_6$  et/ou des folates peuvent altérer l'homéostasie de la thyroïde. Ainsi Colleran et *al.* (2003) ont noté que l'activité biologique de la vitamine  $B_{12}$  modifiée pendant l'hyperthyroïdisme, peut entraîner l'hyperhomocystéinémie.

Ebrahimpour *et al.* (2018) ont rapporté que, chez 74 patients présentant une hypothyroïdie, l'existence d'une corrélation significative et directe entre les hormones thyroïdiennes et le taux d'homocystéine plasmatique, marquant ainsi une élévation de ce dernier avec une augmentation du taux des LDL et du cholestérol total.

Une hyperhomocystéinémie est également associée à la créatininémie élevée (Bodamer et *al.*, 2005 ; Kolling et *al.*, 2017), au tabagisme (Hu et *al.*, 2005 ; Rodriguez-Portelles et Rodriguez-Leyva, 2019 ; Rahimi *et al.*, 2021), à la consommation de café (Mursu et *al.*, 2005 ; Rahimi et *al.*, 2021), à l'alcoolisme (Kharbanda et *al.*, 2005 ; Vatsalya et *al.*, 2021) et à la prise de plusieurs médicaments tels que les antifolates, la Levodopa et l'oxyde nitreux (Refsum, 1998 ; Anamnart et Kitjarak, 2021).

#### V. Hyperhomocystéinémie et facteurs de risque classiques

Les données épidémiologiques recueillies au cours de ces dernières années ont suggéré la présence d'un nouveau facteur biologique, par rapport aux facteurs classiques connus, pouvant être associé à l'augmentation du risque de développer une pathologie cardiovasculaire. Parmi ceux-ci, un intérêt croissant a été porté à l'hyperhomocystéinémie. Les premières observations cliniques ayant permis d'évoquer un lien entre l'hyperhomocystéinémie et les maladies cardiovasculaires furent celles de jeunes adultes présentant une hyperhomocystinurie héréditaire (Mudd et *al.*, 1964 ; McCully, 1969).

#### 1. Hyperhomocystéinémie – Diabète

L'hyperhomocystéinémie peut être impliquée dans le développement de nombreuses maladies, y compris le diabète et pourrait aggraver la résistance à l'insuline et le dysfonctionnement endothélial vasculaire chez les patients atteints le diabète du type 2 (Hu et *al.*, 2019).

Mursleen et Riaz (2017) ont rapporté que les complications des maladies cardiovasculaires sont beaucoup plus graves chez les sujets diabétiques type 2 présentant une hyperhomocystéinémie par rapport aux sujets diabétiques. De Luis et *al.* (2005) ont également noté que chez ces sujets diabétiques, lorsque l'homocystéinémie est supérieure à 15  $\mu$ M, l'artériopathie périphérique et la néphropathie sont plus prédominantes (16 % et 93,3 % respectivement).

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

Chez les patients atteints de diabète de type 1, l'insuline joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme de l'homocystéine (Abu-Lebdeh et *al.*, 2006). Gursu et *al.* (2002) ont noté que le diabète de type 1 est associé à une hypohomocystéinémie. En effet, des rats rendus diabétiques par injection de streptozotocine, présentent une homocystéinémie plus faible que celle enregistrée chez les témoins. Cette réduction a été normalisée par l'administration d'insuline d'une façon dose-dépendante, ce qui a permis à ces auteurs de suggérer que l'insuline réduit les activités des enzymes de la transsulfuration et de la reméthylation.

#### 2. Hyperhomocystéinémie – Hypertension artérielle

Chez les individus hypertendus, le risque vasculaire lié à l'hyperhomocystéinémie a été observé en plus forte fréquence. Plus récemment, l'attention s'est concentrée sur les relations directes de l'homocystéine plasmatique à la tension artérielle et à l'hypertension (Sundström et *al.*, 2003). Souvent ces patients présentent une maladie coronarienne plus sévère avec des diminutions significatives de la fraction d'éjection ventriculaire gauche (Yan et *al.*, 2021). Cette dernière a également été observée expérimentalement chez des rats hypertendus et présentant une Hhcy ; parallèlement d'autres observations ont été rapportées tels que le développement de la glomérulosclérose et l'augmentation de l'excrétion urinaire de protéines (Li et *al.*, 2002).

Carnagarin et *al.* (2021) indiquent que l'homocystéine est associée à des lésions vasculaires médiées par l'hypertension et pourrait potentiellement servir à orienter l'antihypertenseur comme traitement de première ligne. En revanche, Atar et *al.* (2005) ont montré que le traitement au métoprolol succinate diminue significativement le taux d'Hcy plasmatique chez les patients hypertendus, particulièrement les femmes.

#### 3. Hyperhomocystéinémie – Troubles lipidiques

Des études cliniques et épidémiologiques ont montré qu'une hyperhomocystéinémie peut augmenter les altérations des profils lipidiques au niveau des vaisseaux sanguins par de multiples voies, augmentant ainsi le risque des maladies cardiovasculaires chez les patients atteints de dyslipidémie (Xiao et *al.*, 2011 ; Ghasemzadeh et *al.*, 2016 ; Niu et *al.*, 2021). Certaines études ont montré que l' hyperhomocystéinémie peut réduire le HDL-Cholestérol en inhibant la synthèse de la protéine ApoA-I (Devlin et Lentz, 2006 ; Liao et *al.*, 2006).

Chez les enfants présentant une hypercholestérolémie familiale, l'homocystéinémie est associée à une histoire parentale de la maladie cardiovasculaire (Tonstad et *al.*, 1997). Dans une population de 4012 patients hyperlipidémiques et athérosclérotiques, 35,39 % présentent une hyperhomocystéinémie (Niu et *al.*, 2021).

En outre, il est possible de réduire des concentrations d'Hcy dans ces populations par administration de vitamine E, d'acide folique (Bayés et *al.*, 2001 ; Han et *al.*, 2018) et par la prise de la protéine de soja (Jenkins et *al.*, 2002 ; Torres et *al.*, 2006).

Les données *in vitro* suggèrent que l'Hcy puisse interagir avec un taux élevé de cholestérol en augmentant l'oxydation des LDL. Ces dernières sont fixées sur des cellules sanguines mononucléées à l'aide des récepteurs LOX-1 (lectin-like oxidized LDL receptor-1). Chez les patients hyperhomocystéinémiques, l'expression du gène LOX-1 est augmentée dans ces cellules, ainsi que la libération de TNF $\alpha$  qui est élevée par la stimulation des LDL oxydées. Un traitement par l'acide folique a mené à la normalisation des taux d'Hcy accompagnée de la réduction d'expression du gène LOX-1 et de la libération de TNF $\alpha$  stimulée par les LDL-oxydées (Holven et *al.*, 2003 ; Ma et *al.*, 2017).

Chez l'homme, les études *in vivo*, ont mis en évidence une corrélation positive entre l'hyperhomocystéinémie et la péroxydation des lipides, et ceci par l'évaluation de la concentration plasmatique en isoprostanes  $F_2$  (Voutilainen et *al.*, 1999 ; Lerman et *al.*, 2014 ; Guo et *al.*, 2018).

Selon Roblin et ses collaborateurs (2007), il existe un lien très étroit entre insulinorésistance et homocystéine et il est possible que l'homocystéine agisse isolément sur plusieurs étapes de la stéatopathie : lors du premier temps en stimulant SREBP-1(Sterol Regulatory Element Binding Proteins, facteur de transcription impliqué dans le métabolisme des lipides), lors du second temps par la stimulation des différentes cytokines pro-inflammatoires secondaires à l'activation du facteur transciptionnel NF-<sub>k</sub>B et enfin sur la fibrose en stimulant TIMP-1 (Fig. 7).



Figure 7 : Mécanisme d'action de l'homocystéine dans la genèse de la stéatohépatite. (Roblin et *al.*, 2007)

NF-Kb : Nuclear factor kappa B; TGF  $\beta$ : Transforming growth factor  $\beta$ ; TIMP 1: Tissular metalloprotease inhibitor 1; SREBP-1: Sterol regulatory element binding proteins

## VI. Mécanismes de la pathogénicité de l'hyperhomocystéinémie

Les désordres du métabolisme aboutissant à un excès d'homocystéine sont associés à de nombreux risques pathogènes tels l'athérogenèse, la néoplasie, le vieillissement,... (Dubey et *al.*, 2022). Plusieurs mécanismes expliquent le danger présenté par une hyperhomocystéinémie dans l'organisme (Fig. 8).



Figure 8 : Facteurs affectant le métabolisme de l'Hcy et ses effets sur la santé humaine. (Dubey et *al.*, 2022)

#### 1. Homocystéine et ses interactions avec les protéines

Des données (Jakubowski, 2002; Hortin et *al.*, 2006; Martinez, 2015) suggèrent que l'Hcy interfère avec la structure et la fonction de diverses protéines en formant le complexe Hcy-N-proteine (N-homocystéinylation) (Fig.9).

L'homocystéine peut réagir sur les cystéines des protéines (Fig. 9) pour former des disulfures mixtes (Sengupta et *al.*, 2001; Martinez, 2015; Dubey et *al.*, 2022). En agissant ainsi, elle perturberait le métabolisme des fibrillines riches en groupes thiols et nécessaires à la bonne organisation des fibres de la matrice extracellulaire (Takagi and Umemoto, 2005). L'homocystéinylation entraîne l'incorporation des groupes thiol supplémentaires pouvant modifier les propriétés physicochimiques et l'activité biologique des protéines et peut contribuer ainsi à accélérer l'athérogenèse. L'homocystéine se fixe sur les LDL au niveau des lysines entraînant l'agrégation des LDL et facilitant leur internalisation par les récepteurs scavengers (Martinez, 2015).



Figure 9 : Les adduits protéiques de l'Hcy avec des protéines plasmatiques. (Perna et *al.*, 2006)

- a. Dérivés protéiques N-homocystéinylés, avec soit l'extrémité N-terminale libre, soit le groupe amine des résidus de lysine (en particulier Lys525 dans l'albumine sérique).
- b. Dérivés de protéine S-homocystéinylés (en particulier avec Cys34 dans l'albumine sérique).

#### 2. Homocystéine et dysfonctionnement endothélial

#### 2.1. Production d'un stress oxydant

L'homocystéine, bien que disposant d'un groupement thiol réducteur, possède paradoxalement des propriétés pro-oxydantes (Olszewski and McCully, 1993; Kaplan *et al.*, 2020). L'oxydation de l'homocystéine en homocystine (Fig. 10, 11) libère du peroxyde d'hydrogène,  $H_2O_2$  (McDowell et Lang, 2000 ; Smach et *al.*, 2013; Kaplan et *al.*, 2020). Le groupe thiol de l'homocystéine se lierait aussi aux ions ferreux ou cuivreux pour former un mélange oxydant générant  $H_2O_2$  (Sengupta et *al.*, 2001; Guilland et *al.*, 2003; Smach et *al.*, 2013). La forme cyclique de l'homocystéine, l'homocystéine thiolactone, est oxydée en sulfate par un processus mettant en jeu l'ascorbate, le thiorétinamide (produit de conjugaison entre l'homocystéine et l'acide rétinoïque) et le superoxyde, sous contrôle de la thyroxine et

de l'hormone de croissance (McCully, 1975 ; 2016). L'homocystéine entraîne une baisse des ARN messagers et de l'activité de la glutathion peroxydase des cellules endothéliales, augmentant ainsi la teneur intracellulaire en  $H_2O_2$  mais aussi en peroxydes organiques et en peroxynitrites qui sont habituellement détruits par la glutathion peroxydase (Smach et *al.*, 2013 ; Kaplan et *al.*, 2020).



Figure 10 : Hyperhomocystéinémie et stress oxydatif (Sharma *et al.*, 2006)

 $DDAH-1: Dimethylargenine dimethyaminohydrolase 1; EC-SOD: Extracellular superoxide dismutase ; eNOS : Isoforme endothéliale du monoxyde d'azote synthase ; GPx : Glutathione peroxidase; H_2O_2: Hydrogen peroxyde ; ICAM-1: Intracellular adhesion molecule 1; MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1 ; NO: Nitric oxide ; NOS : Nitric oxide synthase ; ONOO- : Peroxyninrite ; Pal-1 : Plasminogen activator inhbitor 1 ; PRMT 1 : Protein arginine methyl tranferase 1 ; VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule-1$ 

En effet les travaux antérieurs de notre équipe ont montré un lien entre l'Hhcy et le stress oxydatif. Yefsah-Idres et *al.* (2016) et Ghoul et *al.* (2017) ont montré chez des rats rendus hyperhomocystéinémiques, une diminution de la catalase, Nitrates/Nitrites et de la SOD associée à une augmentation de la peroxydation lipidique et oxydation protéique au niveau plasmatique et tissulaire. Des résultats concordants ont également été décrits chez l'homme, démontrant une association positive entre l'élévation de homocystéine, le marqueur de la peroxydation lipidique (TBARS) et le marqueur d'oxydation des protéines avec la diminution de la capacité anti-oxydante totale (Dietrich-Muszalska et *al.*, 2012 ; Molina-López et *al.*, 2016).

#### 2.2. Production et métabolisme du monoxyde d'azote

Chez l'homme, une homocystéinémie supérieure à 10 µmol/L seulement, est fortement associée à un dysfonctionnement endothélial (Toya et *al.*, 2020). Ce dysfonctionnement peut être décrit comme un déséquilibre entre les molécules vasodilatatrices et vasoconstrictrices

produites par l'endothélium, il est considéré comme le principal statut pathologique systémique dans le processus de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires (Lai et Kan, 2015 ; Esse et *al.*, 2019 ; Dubey et *al.*, 2022). Le monoxyde d'azote (NO) est principalement synthétisé à partir de l'arginine par l'isoforme endothéliale de NO synthase (eNOS) en réponse au stimulus vasodilatateur. Le NO endothélial diffuse jusqu'aux CMLs vasculaires où il active la guanylate cyclase cytosolique qui augmente la production de GMPc et finalement une relaxation des CMLs (Carvajal et *al.*, 2000 ; Esse et *al.*, 2019).

L'exposition à l'homocystéine de cellules endothéliales en culture a un effet biphasique sur la production de monoxyde d'azote, NO (Fig. 10 et 11). Dans un premier temps, nous observons une libération de NO, de S-nitrosothiols et de S-nitroso-homocystéine, puis la poursuite de l'exposition entraîne un stress oxydant prédominant qui diminue la production de NO (Stamler et *al.*, 1993 ; Kaplan et *al.*, 2020). C'est pourquoi l'exposition de cellules endothéliales à l'homocystéine durant 15 min augmente la sécrétion de l'endothelium-derived releasing factor (EDRF) et de S-nitroso-homocystéine, alors qu'une exposition supérieure à trois heures diminue cette sécrétion (Stamler et *al.*, 1993).

La S-nitroso-homocystéine, qui se forme lors d'expositions de courte durée, a une action très différente de l'homocystéine étant antiagrégante et ne générant pas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Stamler et al., 1993). Sa formation diminue réciproquement la toxicité du NO et de l'homocystéine qui ne peuvent plus produire de radicaux oxygénés par oxydation. L'homocystéine stimule l'expression des molécules d'adhésion, VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) et Eselectine *in vivo*, menant à l'adhérence accrue des monocytes à l'endothélium aortique (Wang et al., 2002; Yuyun et al., 2018), et aboutissant à l'augmentation de la sécrétion des cytokines par ces monocytes (Wang et al., 2003; Barroso et al., 2016). Ces derniers vont induire la synthèse de NO par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses des vaisseaux (Welch et Loscalzo, 1998; Fu et al., 2003; Yuyun et al., 2018), en activant le gène de eNOS par un mécanisme médié par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, probablement par activation du facteur de transcription NF-<sub>K</sub>B (Barroso et al., 2016; Zhao et al., 2017; Esse et al., 2019). Dans les conditions normales, l'endothélium vasculaire joue un rôle important dans la prévention de l'athérosclérose en produisant du NO (Chinbo et al., 2015). Sur le plan expérimental, l'homocystéine provoque une atteinte des cellules endothéliales, freine la libération de NO et affecte la vasotonicité dépendant du flux sanguin (Girs and Giet, 2006). L'effet des doses élevées et chroniques d'homocystéine s'expliquerait aussi par la formation de peroxynitrites très toxiques par réaction entre le NO et les superoxydes générés par l'oxydation de l'homocystéine (Sharma et al., 2006).

L'homocystéine thiolactone se combine avec la lipoprotéine à basse densité (LDL) pour former les agrégats qui sont capturés par les macrophages intimaux et incorporés aux cellules spumeuses au niveau des plaques athéromateuses naissantes (Esse et *al.*, 2019).



Figure 11 : Schéma d'implication de l'Hhcy dans le dysfonctionnement endothélial et les maladies cardiovasculaires. (Esse *et al.*, 2019)

# ADMA : Asymetric dimethylarginine ; ET-1 : endotheline-1 ; HC : N-homocysteinylation; NF-Kb: Nuclear factor kappa B; OxLDL: Low density lipoprotein; ROS: Reactive oxygen species

#### 3. Homocystéine et athéro-thrombose

L'homocystéine exerce de nombreuses actions sur le système cardiovasculaire (Fig. 12 et 13) : dysfonctionnement endothélial via l'effet du NO (Barroso et *al.*, 2016 ; Zhao et *al.*, 2017 ; Esse et *al.*, 2019), prolifération des cellules musculaires lisses (Murthy et *al.*, 2005 ; Zou et *al.*, 2010 ; Bennett, Sinha et Owens, 2016), modification de la matrice extracellulaire (Zhou et *al.*, 2001; Chaussalet et *al.*, 2004 ; Othmani Mecif et *al.*, 2017), oxydation des lipoprotéines (Sharma et *al.*, 2006 ; Xiao et *al.*, 2011 ; Martinez, 2015). L'homocystéine initie aussi la production de TNF- $\alpha$  et de nombreux signaux cellulaires impliqués dans le processus inflammatoire (Chen, 2009 ; Dubey et *al.*, 2022).


Figure 12 : Hyperhomocystéinémie et athérothrombose.

(Santilli et al., 2015).

 $\label{eq:MTHFR} MTHFR: Methylene tetrahydrofolate reductase ; GPx: Glutathione peroxidase; H_2O_2: Hydrogen peroxyde; NO: Nitric oxide ; ROS: Reactive oxygen species$ 



### Figure 13 : Homocystéine et formation de la plaque d'athérome. (Yang et *al.*, 2005; Govindaraju et Rao, 2011)

HDL : High density lipoprotein; LDL : Low density lipoprotein; MMP: Matrix metalloprotease; TG Triglycerid; VLDL: Very low density lipoprotein.

L'homocystéine se lie aux lipoprotéines et augmente ainsi leur capacité de liaison à la fibrine, potentialisant le risque athérogène (Welch et Loscalzo, 1998 ; Takagi et Umemoto, 2005). Elle exerce son rôle pathogène par action sur plusieurs voies de la coagulation (Mayer et *al.*, 2002 ; Ebbesen et Ingerslev, 2005 ; Martinez, 2015), notamment par une inhibition du système thrombomoduline-protéine C-protéine S et indirectement par une diminution de la capacité de liaison de l'antithrombine III à la surface des cellules endothéliales (Fig. 14), cela par suppression de la synthèse de sulfates d'héparane (Abecassis et *al.*, 2004).

L'homocystéine altère les propriétés antithrombotiques de l'endothélium. Elle diminuerait la capacité des cellules endothéliales à inhiber l'agrégation plaquettaire. Par ailleurs, l'exposition des cellules endothéliales à l'homocystéine augmente l'expression du facteur tissulaire ainsi que l'activation du facteur V en facteur Va favorisant ainsi l'initiation et la propagation de la coagulation génératrice de thrombine. De plus, cette exposition altère les systèmes anticoagulants thrombomoduline/protéine C et anti-thrombine III. Elle inhibe la synthèse et l'activité de la thrombomoduline, l'activité de la protéine C, l'activation du système anticoagulant thrombomoduline/protéine C par la thrombine ainsi que les capacités de liaison de l'antithrombine III à la surface endothéliale en diminuant l'expression d'anticoagulant, héparane sulfate. Par ailleurs, en diminuant la liaison et l'action de l'activateur du plasminogène de type tissulaire (t-PA) à la surface des cellules endothéliales, l'homocystéine inhiberait la fibrinolyse dépendante de l'endothélium (Fig. 14).



L'ensemble de ces observations suggèrent donc que l'hyperhomocystéinémie favorise le développement de thromboses (Sharma et *al.*, 2006 ; Perla-Kaján et *al.*, 2007).

Figure 14 : Influence de l'homocystéine sur la coagulation du sang et la fibrinolyse. (Perła-Kaján *et al.*, 2007)

APC : Activated protein C ; Hcy : Homocystein ; TPA : Tissue plasminogen activator

L'homocystéine inhibe la relaxation vasculaire induite par le NO sur des aortes isolées de rat (Fu et *al.*, 2003) et même *in vivo* (Fu et *al.*, 2005). Ainsi une charge en L-méthionine (100 mg/kg) chez des sujets normaux entraîne, dans l'heure suivante, une baisse de la dilatation artérielle médiée par le flux sanguin (Al-Shaer et *al.*, 2005).

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

### 4. Homocystéine et insuffisance cardiaque

En expérimentation animale, l'Hhcy est associée à une dysfonction systolique et diastolique, ainsi qu'une augmentation de l'expression de la BNP (brain natriuretic peptides) (Herrmann et *al.*, 2007). Chez l'animal, l'Hhcy s'accompagne d'un remodelage de la masse cardiaque, avec accumulation intracardiaque de collagènes interstitiel et périvasculaire, et parfois avec un infarctus du myocarde (Herrmann et *al.*, 2007). L'induction de stress oxydant par l'Hhcy favoriserait une fibrose myocardique et une dysfonction diastolique (Joseph et *al.*, 2008). L'homocystéinurie est associée à une augmentation de la prévalence des

cardiomyopathies chez l'enfant, probablement par altération de l'ADN par anomalies de méthylation de l'histone durant l'embryogenèse (Profitlich et *al.*, 2009). Compte tenu de la morbidité, de la mortalité et du poids économique engendrés par l'insuffisance cardiaque congestive, l'identification des facteurs de risque de cette pathologie est un objectif prioritaire de santé publique. Les principaux facteurs de risque identifiés à ce jour sont l'âge avancé, l'infarctus du myocarde, l'hypertension artérielle, les valvulopathies, le diabète sucré et l'obésité. Le taux d'homocystéine plasmatique a été identifié comme étant un facteur de risque majeur de complications de l'athérosclérose. Pour de nombreux auteurs, l'augmentation du taux d'homocystéine plasmatique constitue également un facteur de risque indépendant de développement de l'insuffisance cardiaque congestive (Vizzardi et *al.*, 2009).

La première étude prospective ayant mis en évidence ce lien de causalité a été publié par Sundström et *al.* (2004) et Sundström et Vasan, (2005). Deux mille six cent quatre-vingt-dix-sept patients (âge moyen : 58 ans, dont 58 % de femmes) de la cohorte de Framingham, ne présentant pas d'insuffisance cardiaque congestive au moment de l'inclusion et sans antécédents d'infarctus du myocarde, ont été inclus et suivis durant huit ans, période au cours de laquelle l'équipe a évalué l'incidence de survenue d'un premier épisode d'insuffisance cardiaque congestive évalué par échocardiographie. Un dosage de l'homocystéine plasmatique est réalisé deux fois par an. Les résultats ont montré que les patients présentant un taux plasmatique d'homocystéine supérieur à la valeur moyenne en fonction du sexe présentaient un risque relatif accru de développer une insuffisance cardiaque congestive Le lien entre homocystéinémie et insuffisance cardiaque congestive était plus important (p=0,0004) chez les sujets de sexe féminin (Sundström *et al.*, 2004; Sundström and Vasan, 2005).

Naruszewicz et *al.* (2007) ont évalué les taux plasmatiques d'homocystéine chez 108 patients atteints d'insuffisance cardiaque (dont 81 hommes d'âge moyen de  $66 \pm 11$  ans). Le taux moyen d'homocystéinémie pour l'ensemble des 108 patients est de  $12,5 \pm 5,5$  mol/L (extrêmes allant de 2,3 à 28,3 mol/L). Il existe une Hhcy chez 38 patients (35 %) . En analyse multivariée, une insuffisance cardiaque sévère (classification de la New York Heart Association NYHA de l'insuffisance cardiaque élevée) (p < 0,0001), un taux plasmatique élevé de NT-proBNP (p < 0,001), une filtration glomérulaire réduite (p < 0,0001) et une uricémie élevée (p < 0,05) sont prédictifs d'une Hhcy. L'hyperhomocystéinémie est associée à une mortalité cardiaque accrue (RR = 3,26 ; 95 % IC : 1,78-5,98 ; p = 0,0001), même après ajustement sur les facteurs pronostiques conventionnels. Chez les patients avec Hhcy, la survie à trois ans était de 37 % (95 % CI : 22-52 %) *vs* 73 % de survie (95 % CI : 63-83 %) chez les patients ayant une homocystéinémie normale (p < 0,0001) (Naruszewicz et *al.*, 2007).

Récemment, il a été rapporté un nouveau mécanisme potentiellement impliqué dans les changements induits par l'Hcy dans le système cardiovasculaire qui inclut le TLR4 ou récepteur Toll-like 4 (Fig. 15), connu dans la pathogenèse des maladies cardiovasculaires (Becher et *al.*, 2018), il participe à la pathogenèse de l'athérosclérose (den Dekker et *al.*, 2010), une cardiopathie ischémique (Satoh et *al.*, 2016), une insuffisance cardiaque (Liu et *al.*, 2015) ou un anévrisme de l'aorte (Lai et *al.*, 2016). Les résultats de Jeremic et ses collaborateurs indiquent que l'ablation de TLR4 chez les souris Hhcy diminue les changements induits par des niveaux accrus de l'Hcy tels que l'hypertrophie ventriculaire

gauche, l'augmentation du stress oxydatif et la diminution de la capacité antioxydante, et l'augmentation du dépôt de collagènes, ce qui provoque finalement l'hypertension (Jeremic *et al.*, 2017a ; 2017b).

Les mécanismes moléculaires et les voies de signalisation impliqués dans les changements mentionnés ci-dessus du système cardiovasculaire induits par l'Hhcy via TLR4 sont probablement identiques ou similaires à ceux qui existent dans d'autres cellules et tissus. Le domaine intracellulaire de TLR4, le domaine du récepteur Toll/interleukine-1 (TIR), active plusieurs protéines adaptatrices telles que le gène de réponse primaire de différenciation myéloïde 88 (MyD88), la protéine adaptatrice contenant le domaine du récepteur Toll-Interleukin I (TIRAP), le domaine TIR- contenant la protéine adaptatrice induisant l'interféron-b (TRIF), la molécule adaptatrice liée au TRIF (TRAM), qui représente en fait la première étape de la transduction du signal TLR (Goulopoulou et al., 2016). MyD88 engage en outre les kinases associées à l'IL-1R (IRAK) qui initient l'activation de l'amplificateur de la NF-kB et la production de cytokines. La voie TRIF, nécessite TRAM, qui, par l'activation de plusieurs kinases (kinase sérine/thréonine-protéine 1 (RIP-1) interagissant avec les récepteurs et la kinase 1 activée par le facteur de croissance transformant b (TAK-1)) active NF-κB et la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK). Le résultat global est l'augmentation de l'expression des gènes pro-inflammatoires et la synthèse des cytokines inflammatoires (Djuric et al., 2018) (Fig. 15).

Les résultats de plusieurs enquêtes, il y a quelques décennies, indiquent le lien (Fig. 15) entre l'Hcy et le récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (Doronzo et al., 2010 ; Djuric et al., 2018). L'augmentation de l'afflux et de la surcharge de  $Ca^{2+}$  due à l'activation des récepteurs NMDA, va induire une production de ROS résultant des perturbations de la fonction mitochondriale et de l'environnement pro-apoptotique dans la cellule. L'augmentation Ca<sup>2+</sup> active la voie de signalisation PI3K/Akt (voie phosphoinositide 3-kinase et la protéine kinase B), ce qui induit en outre la phosphorylation et l'activation consécutive de la protéine kinase C (PKC), de NOX et de la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK) : 1. signal extracellulaire - protéines kinases régulées (ERK), 2. Jun kinases/SAPK (JNK) et 3. p38. L'augmentation de l'activité NOX induit une production accrue de ROS. L'augmentation de la production de ROS active en outre MAPK, qui active davantage NF-KB et l'environnement pro-inflammatoire (Pang et al., 2014). De plus, la surcharge en  $Ca^{2+}$  et l'activation de PI3K induisent une production accrue de NO par NOS (Simon et al., 2014). Mais, comme indiqué ci-dessus, NO dans des conditions de synthèse accrue d'O<sup>2-</sup>, forme ONOO-, tandis que les cytokines pro-inflammatoires induisent une expression accrue d'iNOS, un découplage de NOS et une production accrue d'O<sup>2-</sup> par NOS, créant ainsi un cercle vicieux (Campos-Mota et al., 2017).



# Figure 15 : Mécanismes et voies impliqués des effets délétères induits par l'homocystéine sur le système cardiovasculaire.

(Djuric et *al.*, 2018)

ERK - extracellular-signal-regulated protein kinase; IRAK - IL-1R-associated kinase; JNK - Jun kinases/SAPK; MAPK - mitogen-activated protein kinase; MMP - matrix metalloproteinases; MyD88 - myeloid differentiation primary response gene 88; NADPH oxidase - nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase; NF- $\kappa$ B - nuclear factor kappa B; NMDA - N-methyl-Daspartate; NOS - nitric oxide sinthase; NOS - nitric oxide; RBC - red blood cells; TIR - toll/interleukin-1 receptor; TIRAP - toll-Interleukin I receptor domain-containing adaptor protein; TLR4 - toll-like receptor 4; TRAM - TRIF-related adaptor molecule; TRIF - TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon-b; TNF- $\alpha$  - tumor necrosis factor alpha.

### 5. Homocystéine et prolifération des cellules musculaires

La prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) est fréquemment observée dans l'athérosclérose. L'homocystéine provoque une croissance et une prolifération accrue des cellules musculaires lisses impliquées dans l'athérogénèse (Girs and Giet, 2006). En culture, l'exposition des CMLV à l'homocystéine mène à une activation de la protéine kinase p38 qui va augmenter leurs migration et prolifération (Akasaka et *al.*, 2005). Cet effet est dû en partie à une augmentation de l'expression de l'ARN messager des cyclines D1 et A (Tsai et *al.*, 1994, 1996). *In vivo*, Murthy et *al.* (2005) ont également rapporté cette prolifération après traitement à la méthionine administrée à des rats.

### 6. Homocystéine et matrice extracellulaire

Le remodelage tissulaire constitue un processus physiologique nécessaire pour la morphogenèse des tissus et la réparation cellulaire et implique une dégradation de la matrice extracellulaire (MEC). Cette dégradation est hautement régulée et dépendante des métalloprotéinases (MMP) et de leurs inhibiteurs, TIMP (Brew and Nagase, 2010).

En effet, une étude récente réalisée *in vitro* et *ex vivo* avec des fibroblastes humains en culture, a montré que la fibronectine pouvait être homocystéinylée et causer ainsi une

diminution de sa liaison avec la fibrine, ces deux protéines jouant un rôle dans l'adhérence des différents constituants de la MEC (Hubmacher et *al.*, 2011). Les MMP sont des marqueurs de l'altération de la MEC. Leur expression, généralement faible dans les tissus sains, augmente lors des processus de remodelage tissulaire physiopathologique *via* l'action des MAPK ou Mitogen-Activated Protein Kinases (Fig. 16). L'Hcy à une concentration de 0,3 mM, induit une augmentation de l'abondance et de l'activité de la MMP-9 dans des macrophages péritonéaux de souris en culture (Lee et *al.*, 2012). De plus, l'ERK ou Extracellular signal-Regulated Kinase, un membre de la famille des MAPK, jouerait un rôle prépondérant dans l'induction de la MMP-9 par l'Hcy. Il a aussi été montré que la SAH pouvait augmenter la quantité de MMP-2 dans des cellules microgliales (Lin et *al.*, 2009). Chaussalet et *al.* (2004) ont noté que les niveaux pathologiques d'homocystéine induisent une dégradation de la structure élastique de la paroi artérielle, et ceci en augmentant la sécrétion des métalloprotéinases élastolytiques de type 2 et 9 (MMP2 ; MMP9). Étant donné que le renouvellement de l'élastine est plus lent que celui du collagène (Rucklidge et *al.*, 1992), l'élastine dégradée est remplacée par du collagène, entraînant ainsi une fibrose.



Figure 16 : Mécanismes de l'homocystéine dans l'insuffisance cardiaque. (Herrmann et *al.*, 2007)

ADAM : A disintegrin and metalloprotease; ADMA: Asymmetric dimethylarginine; AP-1: a nuclear factor required for activation of multiple genes; DDAH: Dimethylarginine dimethylaminohydrolase; ECM: Extracellular matrix; E-M: Endothelialmyocyte; ERK: Extracellular signal regulated kinase; GPCR: G-protein coupled receptor; HCY: homocysteine; MAPK: Mitogen-activated kinase; MMP: Matrix metalloproteinase; PAR: Protease-activated receptors; ROS: Reactive oxygen species.

Ces différentes observations montrent que l'excès d'Hcy pourrait perturber la balance MMP/TIMP provoquant une désorganisation de la MEC et conduire par conséquent, à la rupture de la plaque d'athérome d'où l'augmentation du risque (Fig. 17) de maladies cardiovasculaires (Holven et *al.*, 2006; Raeeszadeh-Sarmazdeh et *al.*, 2020).



Figure 17 : Mécanismes expliquant les maladies cardiovasculaires liées à l'Hhcy (Essouma and Noubiap, 2015)

Mécanismes principaux (flèche noire) ; mécanismes mineurs (flèche en pointillé). Hhcy Hyperhomocystéinémie ; NO monoxyde d'azote ; DMAA dyméthyl arginine asymétrique ; LDLox lipoprotéines de basse densité oxydée ; MCV maladies cardiovasculaires.

# **MATERIEL ET METHODES**

# Matériel et méthodes

# I. MATERIEL

### 1. Matériel biologique

*Psammomys obesus* ou rat des sables (Fig. 18), est un modèle animal de choix pour l'étude de plusieurs pathologies en particulier le diabète (Benazzoug, 1981; Hamlat et *al.*, 2010; Berdja et *al.*, 2012), l'athérosclérose (Aouichat Bouguerra et *al.*, 2004; Hamlat et *al.*, 2010), le remodelage myocardique (Chaouad et *al.*, 2019) et la stéatose hépatique (Bouderba et *al.*, 2012).

Afin de reproduire ces phénomènes pathologiques observés chez l'homme, notre étude est réalisée sur ce modèle expérimental athéro-sensible, de la classe des Gerbillidés, un rongeur déserticole de la région d'Abadla à 150 Km de Beni-Abbes, sud-ouest d'Alger (30°7 de latitude nord et 2°10 de longitude ouest).

# **Taxonomie :**

- Règne : Animalia
- Embranchement : Chordata
- Sous embranchement : Vertebrata
- Super classe : Gnathostomes
- Classe : Mammalia
- Ordre : Rodentia
- Sous ordre : Sciurognathi
- Famille : Muridae
- Sous famille : Gerbillinae
- Genre : Psamommys
- Espèce : Psamommys obesus



Figure 18 : Psammomys obesus au laboratoire

Dans son milieu naturel, cette gerbille se nourrit de Chénopodiacées halophiles pauvres en calories (0,4 kcal/g pour *Salsola foetida*). Les Chénopodiacées sont très riches en eau et en sels minéraux, notamment en carbonate de sodium (annexe 1). *Psammomys* est un animal principalement diurne, vivant seul ou en petits groupes dans des terriers offrant un abri contre la température extérieure avec une humidité élevée (50 à 80 %) (Harrison et Ross Russell, 1972 ; Daly et Daly, 1973 ; Hamidatou Khati et *al.*, 2023).

*Psammomys obesus* a un cycle de reproduction saisonnier adapté à ses conditions environnementales. La phase sexuellement inactive se produit pendant les mois (juin à août) où les fortes chaleurs, les faibles précipitations, et le manque de nourriture qui en résulte intensifient la compétition spécifique entre les animaux. Tandis que la reproduction aura lieu pendant la période allant de septembre à mai, avec des conditions de survie favorables (Boubekri and Gernigon, 2013).

### 2. Protocole expérimental

Pour des raisons de disponibilité, nous avons utilisé des animaux de sexe femelle.

A l'arrivée des *Psammomys* au laboratoire et afin de les maintenir en survie dans des conditions proches de leur biotope, les animaux sont répartis dans des cages individuelles, munies d'une litière en sciure, renouvelée tous les deux jours et des boîtes métalliques à surface lisse et arrondie servant de terriers, et d'un fragment de bois pour aiguiser leurs incisives. La température de l'animalerie est maintenue constante à  $25 \pm 1$  °C notamment en hiver.

Dans la journée, l'éclairage est réalisé par la lumière artificielle. Les animaux continuent de recevoir les plantes salées provenant de leur biotope et ce pendant une période d'adaptation de quinze à vingt jours. Cette nourriture est progressivement complétée puis remplacée par des plantes salées, de la même famille, poussant sur le littoral (Anse de Kouali, Tipaza, ouest d'Alger).

Après cette période d'adaptation, les femelles sont réparties en deux lots, l'un témoin et l'autre expérimental :

- Un lot contrôle (n = 5) d'un poids corporel moyen de 93 g recevant quotidiennement 50 g de plantes halophiles correspondant à un apport énergétique quotidien de 20 -22 Calories par animal,
- Un lot expérimental (n = 5) d'un poids corporel moyen de 96 g recevant quotidiennement 50 g de plantes halophiles, et soumis à une injection intrapéritonéale de méthionine (Sigma-Aldrich, 64340, St. Louis, MO 63103 USA), préalablement dissoute dans l'eau physiologique, à la dose de 70 mg/kg de poids corporel/jour, dose inférieure à celles mentionnées dans les travaux antérieurs de notre équipe (Ghoul, 2009; Raaf *et al.*, 2011; Chaouad *et al.*, 2019) et dans la littérature (Augier *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2001; Hidiroglou *et al.*, 2004).

Cette dose a orienté notre choix d'une durée de 6 mois, durée plus longue que celle précédemment utilisée chez *Psammomys obesus* (Chaouad *et al.*, 2019).

Un lot de 2 animaux témoins est utilisé pour l'étude *in vitro* des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLs).

Afin de contrôler l'évolution du poids corporel, les animaux sont pesés de façon hebdomadaire durant les 6 mois de l'expérimentation. Toutes les expérimentations sont réalisées conformément à la législation algérienne (Loi n°12-235/2012) relative à la protection des animaux, aux recommandations de l'Association Algérienne des Sciences Animales Expérimentales (AASEA 45/DGLPAG/DVA/SDA/14), et la directive européenne 2010/63/UE pour les expérimentations animales.

Pour le suivi métabolique, des prélèvements sanguins sont effectués au début (T0), au milieu (T3) et à la fin de l'expérimentation (T6), au niveau du sinus rétro-orbitaire de l'œil de l'animal (Aouichat Bouguerra *et al.*, 2004). Le sang prélevé sur des tubes secs (pour le dosage des lipoprotéines) et héparinés (pour le dosage de l'homocystéine, le glucose, les triglycérides, le cholestérol total, les protéines totales et l'acide urique), est centrifugé à 3000 tours/min pendant 10 min. Le sérum est directement utilisé alors que le plasma collecté est stocké à -80°C.

Au terme de l'expérimentation (6 mois), les animaux sont sacrifiés, après anesthésie par une injection intrapéritonéale d'uréthane (25 %), à raison de 0,4 mL/100 g de poids

corporel. Pour l'étude histologique, les cœurs, les aortes et les fragments de foie sont fixés dans le Bouin aqueux pendant 3 jours. Certaines aortes d'animaux témoins sont prélevées dans des conditions stériles pour la culture cellulaire.

# **II. METHODES**

Pour la réalisation de ce travail, nous avons fait appel à différents types de méthodes (méthode analytique, histologique, histochimique, primoculture et morphométrique).

### 1. Méthodes analytiques

Nous avons procédé sur des plasmas à la quantification de l'homocystéine totale et à la détermination de certains paramètres biochimiques couramment dosés dans les maladies cardiovasculaires (glucose, triglycérides, cholestérol, protéines totales et acide urique) à l'aide des kits *Biomérieux*. Les plasmas ont été collectés pour la mesure des lipoprotéines totales sur gel d'agarose par la méthode de Kawakami et *al.* (1989).

### 1.1. Dosage de l'homocystéine plasmatique

Le taux d'homocystéine plasmatique est révélé par la technique de FPIA (Fluorescence Polarization Immunoassay), méthode quantitative automatisée sur analyseur IMx®, dont le principe repose sur deux étapes :

- La réduction : l'homocystine, le disulfure mixte et l'homocystéine liée aux protéines sont réduits sous forme réduite libre d'homocystéine en utilisant le dithiothreitol (DTT) (Frantzen *et al.*, 1998).



 La conversion enzymatique : l'homocystéine libre totale est convertie en S-adénosyl-L-homocystéine (SAH) par la présence de l'adénosine et l'enzyme SAH hydrolase bovine.



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.

### 1.2. Dosage du glucose plasmatique

Le glucose sanguin est déterminé selon la méthode enzymatique colorimétrique à la glucose oxydase (Trinder, 1969), qui catalyse les réactions suivantes :

Glucose <u>Glucose oxydase</u> Acide gluconique + H2O2 2H2O2 + Phénol + Amino-4 antipyrine <u>Peroxydase</u> Quinonéimine + 4 H2O

Le peroxyde d'hydrogène formé est proportionnel à la quantité de glucose mesurée par spectrophotométrie à 500 nm.

# 1.3. Dosage des triglycérides plasmatiques

La triglycéridémie est déterminée selon la méthode colorimétrique enzymatique de (Fossati and Prencipe, 1982). Le glycérol libéré lors de l'hydrolyse des triglycérides par la lipoprotéine lipase est dosé après phosphorylation par le glycérol kinase (GK) et oxydation par le glycérol 3 phospho-oxydase. La quinonéimine, produit de la rédaction de la phénazol et le chlorophénol avec les molécules de  $H_2O_2$  est révélée à 500 nm.

Triglycérides <u>Lipase</u> Glycérol	+ Acides gras
Glycérol + ATP Glycérol kinase → Glycéro	1 3 phosphate + ADP
Glycérol 3 phosphate <i>Glycérol 3 phosphate oxydase</i>	$\longrightarrow$ Dihydroxyacétone phosphate + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
2H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Parachlorophénol + Amino-4 antipyrine	Péroxydase Quinonéimine + 4 H2O

# 1.4. Dosage du cholestérol total plasmatique

Le cholestérol plasmatique est quantifié selon la méthode enzymatique colorimétrique de Allain et *al.* (1974). Le cholestérol est libéré par le cholestérol estérase à partir des esters de cholestérol puis oxydé par le cholestérol oxydase en cholesténe-20ne, parallèlement à la libération des molécules de peroxyde d'hydrogène. Les taux de quinonéimine produite par l'action de la peroxydase sont définis par la mesure de la densité optique à 500 nm.

Cholestérol estérifié	<i>Cholestérol estérase</i> Cholestérol + Acides gras
Cholestérol <u>Choles</u>	<i>térol oxydase</i> Cholestène-4 + H2O2
2H2O2 + Phénol + A	nino-4 antipyrine $\frac{P\acute{e}roxydase}{}$ Quinonéimine + 4 H <sub>2</sub> O

### 1.5. Dosage des protéines totales plasmatiques

La concentration des protéines plasmatiques est déterminée par la réaction de Biuret qui consiste en une interaction des liaisons peptidiques avec le sulfate de cuivre. La réaction a lieu en milieu alcalin stabilisé par les tartrates de sodium et de potassium, en présence d'iodure de potassium. La modification de la coloration du milieu réactionnel estimée par la mesure de la densité optique à 545 nm permet la quantification des protéines présentes dans ce milieu (Doumas et *al.*, 1981).

### 1.6. Dosage de l'acide urique plasmatique

L'acide urique plasmatique est déterminé selon la méthode colorimétrique décrite par Fossati et Prencipe (1982). L'acide urique est oxydé par l'uricase en allantoïne et peroxyde d'hydrogène lequel, en présence de peroxydase, 4-aminophénazone et 2-4 dichlorophénol sulfonate, forme un composé rosacé, le quinonéimine. L'intensité de ce composé, mesurée à 520 nm, est proportionnelle à la concentration d'acide urique présent dans l'échantillon.

Acide urique +  $2H_2O + O_2$  *Uricase* Allantoïne +  $CO_2 + 2H_2O_2$ 

 $2H_2O_2 + 4$ -Aminophénazone + 2-4-Dichlorophénol sulfonate Péroxydase Quinonéimine +  $4H_2O_2$ 

### 1.7. Electrophorèse des lipoprotéines

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

### **Principe**

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

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

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

Ils sont repérables après révélation par le Fat Red 7B.

### **Procédure**

La réalisation de cette technique nécessite :

- La préparation des plaques :
  - La plaque de gel est sortie de son emballage, l'excès de tampon est essuyé sur l'arrière du gel,

- Le film protecteur du gel est ôté et déposé sur l'embase spéciale prévue à cet effet,
- La surface entière du gel est séchée à l'aide d'un buvard C.
- Le dépôt des échantillons
  - Les sérums doivent être fraîchement prélevés (les plasmas congelés ou prélevés sur héparine ne sont pas utilisés),
  - 40 µl de sérum sont distribués dans chaque puits de la barrette,
  - 3 ml de polyclean sont mis dans la rigole extérieure (lavage du porte échantillon) et 3 ml d'eau distillée dans la rigole intérieure (rinçage du porte échantillon), les deux rigoles ne doivent pas être mélangées,
  - Un buvard des puits (séchage du porte échantillon).
- La migration
  - Le tampon REP-PREP est étalé au centre de la chambre de migration en forme de « L » en partant de la gauche,
  - La plaque de gel est fixée dans la chambre de migration après orientation et étalement du tampon de migration. Pour cela, la plaque de gel est déplacée délicatement de gauche à droite, en évitant la formation de bulle d'air,
- La coloration et la décoloration
  - Immédiatement la migration terminée, la phase du gel est sortie et colorée pendant 2 minutes dans le colorant Fat Red 7B.
  - La décoloration est réalisée dans deux bains successifs du décolorant de Fat Red 7B 52, suivie d'un rinçage final dans l'eau distillée.
  - Le gel est séché à 60°C.
- La lecture des plaques : elle concerne :
  - L'évaluation qualitative de la plaque par la visualisation des différentes fractions,
  - L'évaluation quantitative de chaque fraction à l'aide d'un densitomètre à 525 nm.
- Les figures 19 et 20 montrent que :
  - Les lipoprotéines migrent de la cathode (point d'application) vers l'anode.
  - Les HDL constituent les fractions les plus légères, aussi sont-elles les plus proches de l'anode, elles représentent la bande α-lipoprotéines.
  - Les chylomicrons restent au point de dépôt.
  - La bande des  $\beta$ -lipoprotéines (LDL) est souvent la fraction la plus importante, elle est proche du point d'origine.

- Les pré-β-lipoprotéines (VLDL) migrent entre les α-lipoprotéines (HDL) et les β-lipoprotéines.
- Les IDL n'apparaissent pas car elles se transforment rapidement en LDL.



Figure 19 : Représentation d'une plaque de lipidogramme après coloration.



Figure 20 : Exemple d'un profil électrophorétique normal chez l'homme.

### 2. Technique histologique

Afin de mettre en évidence d'éventuelles altérations cellulaires et/ou matricielles, générées par une hyperhomocystéinémie (Hhcy) au niveau cœur (ventricule gauche), aorte et foie chez le *Psammomys obesus*, nous avons utilisé les techniques histologiques courantes décrites par (Martoja and Martoja, 1967).

Pour l'étude histologique et histochimique, nous avons utilisé 5 rats témoins et 5 rats Hhcy. En fin d'expérimentation, les animaux sont anesthésiés par injection intra-péritonéale de l'uréthane 25 % (0,4 mL/100g de poids corporel) puis disséqués. Les organes prélevés (cœur, aorte et foie) sont rapidement fixés dans deux solutions de fixations différentes (le Bouin aqueux et formol tamponnée 10 %), pendant 3 jours puis déshydratés dans des bains d'alcool de degré croissant (50°, 70°, 96° et 100°) de 30 min chacun. Les organes sont ensuite éclaircis dans 2 bains de butanol de 30 min chacun, puis imprégnés dans la paraffine fondue (deux bains de deux heures chacun à une température de 60°). Après la mise en blocs à l'aide des barres de *Leuckart*, les organes sont coupés à l'aide d'un microtome de type *Lab-Kite*. Les coupes obtenues de 5  $\mu$ m d'épaisseur sont étalées sur des lames *Superfrost* plus. Après séchage à 37°C pendant 24 heures, les lames sont soumises à une coloration topographique et histochimique (annexe 2).

La coloration topographique au Trichrome de Masson permet l'observation de différentes structures tissulaires. Elle colore le noyau en noir (Hématoxyline de Groat), le cytoplasme en rose (Fuschine-ponceau et orange G) et les fibres de collagènes et l'élastine en vert (vert lumière).

Les colorations histochimiques réalisées colorent sélectivement les protéoglycanes (bleu Alcian), les glycoprotéines (APS, Acide Périodique Schiff) et les dépôts lipidiques (noir Soudan) selon les méthodes décrites par Martoja et Martoja (1967).

Après coloration, les coupes sont déshydratées dans des bains d'alcool de concentration croissante (50°, 70°, 96°, 100°) puis dans deux bains de toluène. Une goutte d'Eukitt est déposée sur la coupe sur laquelle une lamelle de verre est appliquée. L'ensemble lame-lamelle est placé sur une plaque chauffante à 50°C afin d'activer l'étalement. Les coupes histologiques des ventricules gauches, de l'aorte et du foie, sont observées et analysées à l'aide d'un microscope photonique de type *Zeiss*. La photographie de ces coupes aux différents grossissements est réalisée à l'aide d'un appareil photo numérique de type *Canon power shot A640* intégré au microscope *Zeiss*.

### 3. Culture des cellules musculaires lisses aortiques

Les cellules musculaires lisses sont cultivées par la technique des explants (Ross, 1971) (annexe 3). L'aorte témoin est retirée et immédiatement plongée dans une boîte de Pétri contenant du milieu d'Eagle de Dulbecco (DMEM) modifié avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) additionné de 1 % d'antibiotiques (streptomycine 50 mg/mL, pénicilline 50 UI/mL, Sigma), 1,2 % de glutamine (Sigma) et 5 % d'HEPES pour maintenir un pH de 7,4 (Fig. 21). La lumière aortique est alors vidée de son sang. L'aorte est incubée pendant 20 min à 37° C dans la collagénase I (Sigma, 0,1 % dans PBS), afin d'éliminer l'endothélium et faciliter la séparation de l'adventice et de la média. Cette dernière est coupée en explants de 1 mm.

8 à 10 explants sont placés dans des flacons de culture de 25 cm<sup>3</sup> et incubés en présence de DMEM contenant 20 % de SVF, 1,2 % de glutamine et 1 % d'antibiotiques et placés dans l'incubateur à 37 °C sous atmosphère humidifiée avec 95 % d'air et 5 % CO2. La culture des explants est la culture primaire.

Au deuxième passage de culture et au  $7^{\text{ème}}$  passage et à confluence (Fig. 22), les cellules sont remises en suspension après trypsinisation. Elles sont ensemencées dans des plaques de 6 puits à raison de  $0.8 \times 10^6$  cellules/mL/puits dans du DMEM additionné de 10 % de SVF, 1,2 % de glutamine et 1 % d'antibiotiques et incubées en présence de 50 mM de méthionine pendant 72 h (Benavides *et al.*, 2007). A confluence, le milieu est éliminé ; les CMLs témoins et les CMLs cultivées en présence de méthionine sont réincubées dans 1,5 ml de DMEM sans SVF pendant 24 h. Les milieux sont utilisés pour le dosage des protéines totales (Bradford, 1976) et les CMLs pour leur quantification et l'étude morphométrique de ces cellules (Fig. 22).

Le taux de prolifération cellulaire est réalisé sur 100  $\mu$ L de suspension cellulaire, en présence de bleu trypan, par comptage à l'aide de la cellule de Malassez.



Figure 21 : Diagramme représentant les étapes de la culture des cellules musculaires lisses aortiques.



Figure 22 : Protocole expérimental utilisé pour les CMLs incubées en présence /absence de méthionine.

### 4. Etude histo et cytomorphométrique

Nous avons effectué une étude morphométrique pour les structures cardiaques et aortiques d'une part et pour les CMLs d'autre part.

### 4.1. Etude histomorphométrique du cœur et de l'aorte

L'étude morphométrique de la structure des deux organes ciblés a été réalisée, à l'aide du logiciel *Axio Vision 4.8 de CARL ZEISS*, après étalonnage et au grossissement 1000 (Fig. 23). Pour chacun des paramètres étudiés, nous avons effectué 50 mesures sur différents champs de plusieurs coupes histologiques, correspondant aux différents animaux témoins et expérimentés. Les microphotographies ont été réalisées avec un photomicroscope de type *Zeiss Primo Star*.

Dans le cœur, nous avons déterminé l'épaisseur de l'endocarde, du myocarde et du péricarde. Dans l'aorte, nous avons mesuré l'épaisseur (paroi artérielle, intima, média, adventice et espaces interlamellaires), le nombre de lames élastiques, le nombre de noyaux des CMLs et les dimensions des noyaux des CMLs (longueur de leurs axes majeur et mineur).



**Figure 23 : Mesure d'épaisseur de l'épicarde en coupe histologique transversale.** par *Axio Vision 4.8* de *CARL ZEISS.* 

# 4.2. Cytomorphométrie de cellules musculaires lisses aortiques en culture

Afin d'analyser l'effet de la méthionine sur les CMLs ( $7^{\text{ème}}$  passage), les cellules sont étalées dans des plaques à 6 puits à raison de 0,8 x 10<sup>6</sup> cellules/mL/puits en présence de méthionine (50 mM) pendant 72h. Après cette période, le milieu est retiré et les cellules sont lavées une fois dans une solution tampon de phosphate saline (PBS) et fixées dans le Bouin

aqueux pendant 30 min. Après rinçage avec du PBS et de l'éthanol (96%), les cellules sont colorées pendant 10 min avec une solution de colorant Giemsa (1% dans méthanol) et May Grunwald (0,7g/L) (V/V, 1:1), dilués à 1/3 dans de l'eau distillée. L'excès de colorant est éliminé par lavage au PBS.

Afin d'évaluer l'état phénotypique des CMLs (synthétiques et contractiles) soumises à la méthionine, nous avons effectué 25 mesures concernant certains paramètres cellulaires et nucléaires, à savoir le grand axe cellulaire, le grand et le petit axe nucléaire, nombre de nucléoles dans chaque noyau et rapport axe majeur nucléaire/axe majeur cellulaire des CMLs. Chaque paramètre est mesuré dans différents champs de vision et dans plusieurs puits. L'étude morphométrique des CMLs a été réalisée à l'aide du logiciel cité précédemment (Fig. 24).

Fichier Editer Vues Acquisition Functions Annotation Measure Evaluate Tools  Fichier Editer Vues Acquisition Functions Annotation Measure Evaluate Tools  Fichier Editer Vues Acquisition Functions Annotation Measure Evaluate Tools  Fichier Editer Vues Acquisition Functions Annotation Measure Evaluate Tools  Fichier Editer Vues Acquisition Functions Annotation Measure Evaluate Tools  Fichier Editer Vues Acquisition Functions Annotation Measure Evaluate Tools  Fichier Editer Vues Acquisition Functions Annotation Measure Evaluate Tools  Fichier Editer Vues Acquisition Functions Annotation Measure Evaluate Tools  Fichier Editer Vues Acquisition Functions Annotation Measure Evaluate Tools  Fichier Editer Vues Acquisition Functions Annotation Measure Evaluate Tools  Fichier Editer Vues Acquisition Functions Annotation Measure Evaluate Tools  Fichier Editer Vues Acquisition Functions Annotation Measure Evaluate Tools  Fichier Editer Vues Acquisition Functions Annotation Measure Evaluate Tools  Fichier Editer Vues Acquisition Functions Annotation Measure Evaluate Tools  Fichier Editer Vues Acquisition Functions Annotation Measure Evaluate Tools  Fichier Editer Vues Acquisition Functions Aperçu ROI Cooper Copier Coller  Fichier Editer Vues Acquisition Functions	Axiovision LE - [MESURE CML.png *]	
Ouvrir l'image Explorateur   Enregistrer sous Aperçu   ROI Couper   Couper Couper <th>Fichier Editer Vues Acquisition Functions Annotation Measure Evaluate To</th> <th>ols _ = × ×</th>	Fichier Editer Vues Acquisition Functions Annotation Measure Evaluate To	ols _ = × ×
MESURE CML.png*	Ouvrir l'image Explorateur Enregistrer sous Aperçu ROI Copier ROI Couper Copier	Coller Live Snap Bi
9       9       29       49       89       µm         50       07       µm       12,08       µm           8       50       07       µm       12,08       µm           9       12,08       µm       12,08       µm </td <td>MESURE CML.png *</td> <td>4 Þ ×</td>	MESURE CML.png *	4 Þ ×
8 50,07 µm 12,08 µm 12	0 10 20 30 40 50 1	μm
	8 50,07 µm 12,08 µm 12	E

Figure 24 : Mesure des grands axes d'une CML de phénotype synthétique en culture par Axio Vision 4.8 de CARL ZEISS.

# 5. Etude statistique.

Les résultats quantitatifs sont analysés par le programme *GraphPad Prism* version 8. (GraphPad Inc., San Diego, Californie, États-Unis).

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne affectée de l'erreur standard à la moyenne (SEM).

Le test de *Mann-Whitney* est utilisé pour évaluer la différence entre les paramètres des animaux témoins et soumis à la méthionine.

Le test de *Student* « *t* » est utilisé pour l'étude de la culture des CMLs.

Lorsque les valeurs de p sont inférieures à 0,05 ; la différence est considérée comme statistiquement significative. Les degrés de significativité précisés dans les résultats sont les suivants : \* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001.



Un récapitulatif de l'approche méthodologique adoptée afin de répondre aux objectifs fixés est illustré par la figure 25.

Figure 25 : Approche méthodologique utilisée pour la réalisation des objectifs fixés.

# RESULTATS

# PARTIE I

# INSTALLATION DE L'HYPERHOMOCYSTEINEMIE ET SON IMPACT SUR LE POIDS CORPOREL ET CERTAINS PARAMETRES BIOCHIMIQUES PLASMATIQUES

### I. Variations de l'homocystéine plasmatique

La quantification de l'homocystéine est réalisée par la méthode FPIA (*Fluorescence Polarization Immunoassay*) chez les 2 lots d'animaux, et ceci au début, au milieu et en fin d'expérimentation. Les résultats de ce dosage sont représentés dans la figure 26.



Figure 26 : Homocystéine plasmatique chez les *Psammomys* témoins et soumis à la méthionine.

Les valeurs de base de l'homocystéinémie déterminées chez les lots Témoin et soumis à la méthionine au début de l'expérimentation sont respectivement de 3,38 et 3,24  $\mu$ M avec une différence non significative (p >0,05). En fin d'expérimentation, en revanche, une injection intrapéritonéale quotidienne de 70 mg/kg de méthionine pendant 6 mois, a induit une augmentation importante de 529,93 % (p <0,001) de l'homocystéine plasmatique par rapport aux témoins. Ce paramètre passe en effet d'une valeur de 3,24 ± 0,94  $\mu$ mol/L (T0) à une valeur de 20,41 ± 6,03  $\mu$ mol/L, confirmant l'installation d'un état d'hyperhomocystéinémie modérée chez les animaux soumis à la méthionine (Fig. 1).

Il est à signaler que la réponse des animaux à l'injection de méthionine est très hétérogène avec des valeurs variantes entre 1,97 et 8,89  $\mu$ M au troisième mois, et entre 13,18 et 25,54  $\mu$ M au terme de l'expérimentation.

Les rats des sables soumis à la méthionine (70 mg/kg/j) pendant 6 mois deviennent, ainsi, hyperhomocystéinémiques (Hhcy).

### II. Evolution du poids corporel des animaux

Les pesées hebdomadaires ont permis le suivi de l'évolution pondérale des animaux témoins et hyprhomocystéinémiques (Hhcy). Les résultats concernant cette évolution sont consignés dans la figure 27.



Figure 27 : Evolution pondérale des *Psammomys* témoins et soumis à la méthionine.

Au premier mois de l'expérimentation, aucune différence significative du poids corporel n'est signalée entre les *Psammomys* témoins et expérimentés. Au cours de l'expérimentation, nous constatons une augmentation progressive du poids corporel des animaux témoins et une diminution progressive chez les animaux hyperhomocystéinémiques (Hhcy). Par rapport au poids initial, nous avons noté en fin d'expérimentation, un gain de 13,2% chez le lot témoin et une perte de 7,54 % chez les rats Hhcy. Par ailleurs, une diminution de 16 % (p < 0,05) du poids corporel est observée chez *Psammomys* Hhcy *vs* témoins en fin d'expérimentation.

# Ces résultats montrent que l'administration chronique de méthionine a un effet négatif sur le poids corporel des rats des sables.

### III. Evolution de la glycémie

La glycémie exprimée en mg/dl a été déterminée dans les 2 lots d'animaux (Fig. 28).



Figure 28 : Evolution de la glycémie chez *Psammomys* témoins et soumis à la méthionine.

Une diminution plus au moins importante de la glycémie est observée chez les *Psammomys* témoins (diminution d'environ 37 % en fin d'expérimentation). A l'inverse, une augmentation d'environ 29 % est enregistrée chez les rats des sables soumis à la méthionine (après 6 mois d'expérimentation).

### L'administration chronique de méthionine augmente la glycémie des rats des sables.

### IV. Evolution de certains lipides plasmatiques

### 1. La triglycéridémie

La triglycéridémie (Fig. 29) a été déterminée chez les animaux témoins et chez les animaux soumis à des injections intrapéritonéales de méthionine (70 mg/Kg poids corporel/jour) pendant 6 mois.



# Figure 29 : Evolution de la triglycéridémie chez *Psammomys* témoins et soumis à la méthionine.

La triglycéridémie reste relativement stable chez les animaux témoins pendant toute la durée de l'expérimentation, alors que chez les animaux soumis à la méthionine, elle augmente d'un pourcentage de 151 % au  $3^{eme}$  mois et de 285 % (p < 0,05) au  $6^{eme}$  mois de l'expérimentation.

L'administration chronique de méthionine semble augmenter le taux des triglycérides plasmatiques chez les rats des sables.

#### 2. La cholestérolémie

L'évolution de la cholestérolémie durant l'expérimentation est rapportée dans la figure 30.



Nous avons noté des fluctuations de la cholestérolémie chez les animaux témoins avec cependant une augmentation non significative chez les animaux soumis à la méthionine. Il faut cependant souligner, que chez ces derniers, des variations des valeurs individuelles sont importantes au  $6^{eme}$  mois de l'expérimentation.

Nos résultats montrent que l'administration chronique de méthionine a un effet positif non significatif sur la cholestérolémie des rats des sables.

# 3. Les lipoprotéines plasmatiques

Nous avons abordé l'étude des lipoprotéines plasmatiques grâce à l'électrophorèse horizontale sur gel d'agarose. La figure 31 montre les profils électrophorétiques obtenus chez les animaux témoins et soumis à la méthionine.



Figure 31 : Profils électrophorétiques des lipoprotéines plasmatiques chez *Psammomys* obesus témoins et soumis à la méthionine.

Les résultats obtenus mettent en évidence une diminution significative de 70,4 % des HDL (17,54  $\pm$  19,45 vs 59,2  $\pm$  7,2 ; p < 0,01) et une augmentation de 35,1 % du taux des VLDL–LDL (67,92  $\pm$  31,33 vs 50,27  $\pm$  7,2).

Chez les animaux soumis à l'injection de méthionine, nous avons noté l'apparition de la lipoprotéine a.

L'hyperhomocystéinémie altère l'équilibre lipoprotéique en augmentant les fractions VLDL-LDL et en diminuant la fraction HDL avec l'apparition de la Lp a.

#### V. Evolution de la protéinémie

Le taux de protéines plasmatiques totales ou protéinémie, déterminé par la méthode de Biuret est rapporté dans la figure 32.



Figure 32 : Evolution de la protéinémie chez *Psammomys* témoins et soumis à la méthionine.

Chez les animaux témoins, la protéinémie diminue de façon non significative pendant les 6 mois de l'expérimentation. Chez les animaux Hhcy, le taux de protéines plasmatiques augmente d'environ 21 % (p <0,01) au  $3^{eme}$  mois et d'environ 12 % en fin d'expérimentation par rapport à la protéinémie à T0.

# Ces résultats montrent que l'administration chronique de méthionine a un effet positif sur la protéinémie des rats des sables.

### VI. Evolution de l'acide urique plasmatique

L'acide urique plasmatique a été déterminé (Fig. 33) chez les animaux témoins et chez les animaux soumis à une injection intrapéritonéale de méthionine (70 mg/Kg poids corporel/jour).



Figure 33 : Evolution de l'acide urique plasmatique chez *Psammomys* témoins et soumis à la méthionine.

Nous avons noté que le taux d'acide urique plasmatique reste stable chez les *Psammomys* témoins et ceci pendant toute la durée de l'expérimentation. Alors que chez les *Psammomys* soumis à la méthionine, nous avons enregistrés des fluctuations de ce paramètre, avec une augmentation significative d'un pourcentage de 77 % (p <0,01) au terme de l'expérimentation.

L'administration chronique de méthionine affecte le taux d'acide urique plasmatique chez les rats des sables.

L'administration de méthionine à des rats des sables pendant 6 mois a perturbé l'homéostasie plasmatique. Les variations enregistrées concourent vers l'installation de l'athérosclérose. En effet, ces perturbations sont marquées par une augmentation de la glycémie, de l'urémie, des lipides plasmatiques et des lipoprotéines. Les variations de ces dernières caractérisent l'athérosclérose avec une diminution du taux des HDL et une augmentation des lipoprotéines athérogènes, LDL-VLDL. Il est également à signaler l'apparition de la lipoprotéine (a), hautement athérogène. L'hyperhomocystéinémie induite par l'excès de méthionine est également accompagnée d'une diminution du poids corporel.

# PARTIE II

EFFETS DELETERES DE L'HYPERHOMOCYSTEINEMIE SUR LES STRUCTURES TISSULAIRES, CELLULAIRES ET VASCULAIRES DU FOIE, DU CŒUR ET DE L'AORTE Nous avons, via une approche histologique et histochimique, analysé l'impact de l'hyperhomocystéinémie sur la structure du foie.

# I. Impact de l'hyperhomocystéinémie sur le foie

L'analyse morphologique du foie de *Psammomys* témoin montre, qu'il est formé d'un grand nombre d'unités fonctionnelles, les lobules, de forme hexagonale dont leur centre est constitué par la veine centro-lobulaire entourée par du parenchyme hépatique (Pl. I : Fig. A, B et C). Aux angles de contact des lobules biliaires, se situent les espaces portes, petits amas conjonctifs qui contiennent les vaisseaux sanguins et les voies excrétrices biliaires (Pl. I : Fig. D).

Un espace porte contient toujours quatre structures typiques qui forment la tétrade portale (Pl. I : Fig. D, E et F), et qui sont :

- une branche de la veine porte qui est bien large, sa paroi est très fine comparativement à sa lumière,
- une branche de l'artère hépatique,
- des capillaires lymphatiques,
- et un canal biliaire, présentant un épithélium cubique bas entouré d'une étroite zone de tissu conjonctif.

Les hépatocytes sont des cellules polyédriques et parfois cubiques (Pl. I : Fig. G et H), avec un cytoplasme granuleux, et sont de deux types, mononucléés et binucléés. Les noyaux sont arrondis, plus ou moins volumineux. Ces derniers sont caractérisés par un ou plusieurs nucléoles bien visibles. Du matériel conjonctif essentiellement les collagènes fibrillaires (Pl. I : Fig. G), les protéoglycannes (Pl. I : Fig. H), et les glycoprotéines sont observés au niveau des espaces intercellulaires (Pl. I : Fig. I et J). L'APS qui colore le glycogène hépatique en rose, permet de mieux visualiser la richesse des hépatocytes en glycogène (Pl. I : Fig. I et J). Ce dernier s'accumule dans un pôle cellulaire, donnant l'image dite en « nids d'hirondelles ».

Autour de la veine centro-lobulaire (Pl. I : Fig. A et B), les cellules hépatiques se disposent en files radiaires, appelées travées de Remak. Entre ces lames cellulaires, anastomosées, se situent les capillaires sinusoïdes. Ils amènent le sang des espaces portes et débouchent dans la veine centro-lobulaire. Ces capillaires sinusoïdes contiennent des cellules à caractère macrophagique, appelées cellules de Kupffer (Pl. I : Fig. A), grosses cellules placées en position endothéliale, à contours plus au moins géométriques. Ces capillaires contiennent également d'autres cellules du type leucocytaire, essentiellement les lymphocytes (Pl. I : Fig. C).

Chez les rats des sables hyperhomocystéinémiques, l'observation et l'analyse de la structure du foie a mis en évidence de profondes altérations caractérisées par la présence d'hépatocytes avec des noyaux pycnotiques (Pl. II : Fig. D), une accumulation de composants du tissu conjonctif, notamment les collagènes fibrillaires (Pl. II : Fig. A et D), les glycoprotéines (Pl. II : Fig. B), et les protéoglycannes (Pl. II : Fig. C) entre les hépatocytes et autour des vaisseaux. Cette accumulation provoque un épaississement de leurs parois conduisant ainsi à une fibrose périvasculaire. Outre ces altérations, l'hyperhomocystéinémie

induite par la méthionine a entraîné un véritable état de stéatose hépatique (Pl. II : Fig. E) avec la majorité des hépatocytes gorgés de gouttelettes lipidiques (Pl. II : Fig. F) donnant au foie un aspect spongieux, de couleur claire par rapport à la teinte brune d'un foie normal.

# Planche I Histologie du foie de *Psammomys* témoin

### Figure A et B :

Ces figures montrent, autour de la veine centro-lobulaire (VCL), les cellules hépatiques (H) se disposant en files radiaires, appelées travées de Remak. Entre ces lames cellulaires, anastomosées, se situent les capillaires sinusoïdes (CS) qui sont bordés par des cellules endothéliales (flèches noires, Fig. B).

Ces capillaires contiennent des cellules à caractère macrophagique, appelées cellules de Kupffer (cercle jaune). Ce sont des grosses cellules placées en position endothéliale, à contours plus au moins géométriques (Fig. A).

Coloration : trichrome de Masson (Fig. A), bleu alcian (Fig. B), Gr obj x 100.

# Figure C :

La lumière de la veine centro-lobulaire (VCL) est bordée par un épithélium pavimenteux simple (tête de flèche noire), qui est en continuité avec l'endothélium des capillaires sinusoïdes. Ces derniers contiennent des cellules sanguines du type leucocytaire (flèches noires).

Coloration : Acide Périodique Schiff, Gr obj x 100.

# Figure D, E, F :

Ces figures sont centrées sur un espace porte typique contenant les quatre structures principales : la veine porte (VP) dont la paroi est très fine est bordée par des cellules endothéliales aplaties. Les vaisseaux de plus petit diamètre à paroi épaisse ont la structure caractéristique de vaisseau lymphatique (VL) et de branche terminale de l'artère hépatique (AH), à la périphérie de l'espace porte s'observent les canaux biliaires (CB).

Coloration : trichrome de Masson (Fig. D), bleu alcian (Fig. E), APS (Fig. F) ; Gr obj x 40.

# Figure G et H :

Le tissu hépatique est constitué de lobules comportant des hépatocyte mononuclés (Hm) et binucléés (Hb). Ces cellules entourées par du tissu conjonctif sont anastomosées par des capillaires sinusoïdes (CS).

Le cytoplasme des cellules hépatiques présente un aspect granuleux. Le noyau (n) apparaît arrondi, plus ou moins volumineux, en périphérie avec un ou plusieurs nucléoles.

Coloration : trichrome de Masson, Gr obj x 100 (Fig. G) ; bleu alcian, Gr obj x 40 (Fig. H).

# Figure I, J :

La coloration au APS met en évidence la richesse des hépatocytes en glycogène (Gly). Ce dernier s'accumulant dans un pôle cellulaire, donne ces images dites en « nids d'hirondelles ». Coloration : Acide Périodique Schiff ; Gr obj x 40 (Fig. I), Gr obj x 100 (Fig. J).

AH : artère hépatique	Gly : glycogène	TC : tissu conjonctif
CB : canal biliaire	H : hépatocyte	VCL : veine centrolobulaire
Cep : cellule épithéliale	Hb : hépatocyte binucléé	VL : vaisseau lymphatique
CS : capillaire sinusoïde	Hm : hépatocyte mononuclé	VP : veine porte
cyt : cytoplasme	n : noyau	

# С В VCL-A VCL H F F D СВ СВ VP VP ٧P AH AH CB Н G Hm CS Hb Hb 0 J L o n Hm cyt Gly Hb

Planche I
# Planche II

# Histologie du foie de *Psammomys* soumis à la méthionine pendant 6 mois.

## Figure A :

Observation d'une fibrose périvasculaire, caractérisée par un épaississement de la paroi de la veine centro-lobulaire (flèches noires), marquée par un dépôt du tissu conjonctif essentiellement les collagènes fibrillaires.

Coloration : trichrome de Masson, Gr obj x 100.

## Figure B :

Du matériel APS+ est important, non seulement au niveau des parois vasculaires (flèches noires), mais aussi au niveau du parenchyme hépatique (H). Coloration : Acide Périodique Schiff, Gr obj x 100.

## Figure C :

Mise en évidence d'un dépôt de protéoglycannes (PG) à trois niveaux : paroi de la veine centro-lobulaire (VCL), parenchyme hépatique (H) et capillaires sinusoïdes (CS). Coloration : bleu alcian, Gr obj x 100.

#### Figure D :

Cette figure montre des hépatocytes dont les noyaux (NP) présentent une forme dentelée entourés par un espace vide, ainsi que l'apparition des vacuoles lipidiques (étoiles rouges) au niveau du cytoplasme.

Nous remarquons également une augmentation du taux de collagènes au niveau du parenchyme hépatique, indiquant l'installation d'une fibrose (FR). Coloration : trichrome de Masson, Gr obj x 100.

#### Figure E :

Cette figure montre un dépôt important du matériel APS+ au niveau des parois des vaisseaux hépatiques (étoile noire). Un taux élevé de vacuoles lipidiques est observé autour de cette veine.

Coloration : Acide Périodique Schiff, Gr obj x 40.

#### Figure F :

Présence de lipides au niveau du cytoplasme des hépatocytes (flèches vertes) indiquant l'installation d'une stéatose hépatique. Les noyaux hépatocytaires apparaissent clairs. Coloration : noir soudan, Gr obj x 100.

- GP A В AH Н VCL VP С D PG VCL NP CS Č. Ε F VCL ×
- Planche II

Nous avons, via une approche histologique, histochimique et morphométrique, analysé l'impact de l'hyperhomocystéinémie sur certains éléments du système cardio-vasculaire à savoir le cœur et l'aorte. Nous avons complété cette dernière approche par une étude *in vitro* concernant les cellules musculaires lisses, principales cellules de la média.

# II. Impact de l'hyperhomocystéinémie sur l'appareil cardio-vasculaire

# 1. Cœur de Psammomys

Les coupes histologiques transversales du cœur (ventricule gauche) réalisées chez *Psammomys obesus* témoins, ont permis de distinguer de l'intérieur vers l'extérieur ses trois couches différentes.

L'endocarde : couche la plus interne, constituée d'une assise de cellules endothéliales dont les noyaux sont imprégnés d'hématoxyline et d'une couche sous endothéliale très réduite contenant peu de matériel conjonctif (Pl. III : Fig. A).

Le myocarde : couche moyenne, richement vascularisée constituée de cardiomyocytes à orientation transversale ou longitudinale (Pl. III : Fig. C et D). Les cardiomyocytes sont des cellules musculaires striées à propriété contractile, avec un noyau unique volumineux ovalaire et un cytoplasme abondant (Pl. III : Fig. C). Outre ces cellules, le myocarde contient d'autres types cellulaires comme les fibroblastes, logée entre les travées des myocytes cardiaques assurant la synthèse du matériel conjonctif (Pl. III : Fig. C et D). Le noyau des fibroblastes prend une forme allongée avec un aspect très dense (Pl. III : Fig. C).

L'épicarde : couche la plus externe, de nature conjonctive contenant des fibroblastes (Pl. III : Fig. E et F).

L'hyperhomocystéinémie médiée par la méthionine a entraîné un épaississement significatif des trois couches du cœur (Tableau I), et a révélé plusieurs altérations cellulaires et tissulaires.

Chez les rats des sables hyperhomocystéinémiques, l'épaisseur de l'endocarde augmente de 249,13 %, celle du myocarde de 59,46 % et celle du péricarde de 994,06 % (Tab. IX).

L'endocarde : présente une hypertrophie des cellules endothéliales et des microthrombus sur la surface luminale (Pl. IV : Fig. A), un dépôt important de matériel conjonctif essentiellement les collagènes fibrillaires (Pl. IV : Fig. B), les protéoglycannes avec l'apparition d'une protubérance du côté luminale (Pl. IV : Fig. C et D) et les glycoprotéines (Pl. IV : Fig. E et F).

Le myocarde : subit une désorganisation marquée par un dépôt important de matériel conjonctif essentiellement les glycoprotéines (Pl. V : Fig. A), les collagènes fibrillaires (Pl. V : Fig. B) et les protéoglycannes (Pl. V : Fig. C) indiquant la présence d'une fibrose interstitielle. Les cardiomyocytes présentent un espace périnucléaire bien développé avec des noyaux pycnotiques (Pl. V : Fig. D et E), il s'agit probablement d'un état apoptotique ou nécrotique. Le myocarde des animaux Hhcy présente une désorganisation myofilamentaire (Pl. V : Fig. F), des espaces intercellulaires très élargis correspondant probablement à des œdèmes (Pl. V : Fig. F); une infiltration cellulaire entre les travées cardiomyocytaires

(Pl. VI : Fig. A et B). Une fibrose périvasculaire marquée par une accumulation de collagènes fibrillaires est observée (Pl. VI : Fig. C).

L'épicarde : l'augmentation de son épaisseur semble être secondaire à la présence des œdèmes (Pl. VI : Fig. D).

**Tableau I** : Epaisseur de la paroi cardiaque ( $\mu$ m) chez *Psammomys* témoins et soumis à la méthionine.

Epaisseur (µm)	Témoins	Met
Endocarde	$1,16 \pm 0,40$	4,05 ± 1,59 ****
Myocarde	$1468,\!89\pm 360,\!95$	2298,22 ± 306,07 ****
Epicarde	$3,54 \pm 1,97$	$38,73 \pm 26,95 ****$

Met : avec méthionine

Les valeurs notées correspondent aux moyennes affectées de leurs SEM.

Epaisseur du cœur des *Psammomys* soumis à la méthionine vs des témoins \*\*\*\* p < 0,0001 (n = 5, 6 sections par animal).

# Planche III Structure histologique du cœur de *Psammomys* témoins.

# Figure A :

L'endocarde est formé de cellules endothéliales (Ne) et de tissu conjonctif lâche (Tc) reposant sur la couche myocardique (My).

Coloration : trichrome de Masson ; Gr obj x 100.

# Figure B :

Le myocarde est constitué de cardiomyocytes longitudinaux (CL) et transversaux (CT), irrigué par des vaisseaux. Coloration : trichrome de Masson ; Gr obj x 40.

## Figure C :

Détail des cardiomyocytes, communiquant par les stries scalariformes (Ss), comportant un noyau ovalaire (n) et des myofilaments (mf). Entre les cardiomyocytes, se trouve du matériel de nature conjonctive

Coloration : trichrome de Masson ; Gr obj x 100.

#### Figure D :

Mise en évidence des protéoglycannes (PG) entre les travées myocardiques. Coloration : bleu alcian ; Gr obj x 40.

#### Figure E :

L'épicarde (Ep) de nature conjonctif recouvre extérieurement le myocarde richement vascularisé

Coloration : trichrome de Masson ; Gr obj x 40.

#### Figure F :

Grossissement de la figure E, présence de fibroblastes (nF). Coloration : trichrome de Masson ; Gr obj x 100.

L : lumière, Ne : noyau endothélial, Sg : sang.



# **Planche IV**

# Structure histologique du cœur de *Psammomys* soumis à la méthionine pendant 6 mois. Effet de la méthionine sur l'endocarde.

# Figure A :

Elle représente l'hypertrophie de l'endocarde marquée par l'augmentation du volume des noyaux endothéliaux (flèches rouges) et l'apparition des microthrombus (Mt). Coloration : trichrome de Masson ; Gr obj x 100.

# Figure B :

Mise en évidence d'un dépôt du tissu conjonctif (Tc) particulièrement les collagènes au niveau de l'endocarde d'où son épaississement. Coloration : trichrome de Masson ; Gr obj x 100.

# Figure C :

Mise en évidence d'un dépôt des protéoglycannes au niveau de l'endocarde (End), et l'apparition d'une protubérance du côté luminale (flèche orange). Coloration : bleu alcian ; Gr obj x 40.

# Figure D :

Mise en évidence d'un dépôt du matériel conjonctif particulièrement les protéoglycannes (PG) au niveau de l'endocarde, ainsi que l'apparition importante des œdèmes (Oe). Coloration : bleu alcian ; Gr obj x 40.

# Figure E :

Montre un dépôt important des chaines glucidiques (étoile jaune) au niveau de l'endocarde (End).

Coloration : Acide Périodique Schiff ; Gr obj x 40.

# Figure F :

Montre un dépôt important des chaines glucidiques (étoile jaune) au niveau de l'endocarde (End) et le myocarde (My).

Coloration : Acide Périodique Schiff ; Gr obj x 100.

eic : espace intercellulaire, L : lumière, Ne : noyau endothélial,



# **Planche V**

# Structure histologique du cœur de *Psammomys* soumis à la méthionine pendant 6 mois. Effet de la méthionine sur le myocarde.

# Figure A :

Mise en évidence d'un dépôt glycoprotéique entre les travées cardiomyocytaires (flèches vertes).

Coloration : Acide Périodique Schiff ; Gr obj x 40.

# Figures B :

Mise en évidence d'une agrégation sanguine (Sg), ainsi qu'un dépôt de matériel conjonctif (TC) non seulement au niveau de l'endocarde mais aussi entre les travées cardiomyocytaires. Coloration : trichrome de Masson ; Gr obj x 40

# Figure C :

Mise en évidence d'une désorganisation du myocarde (My) marquée par un dépôt important de protéoglycannes (PG) et un élargissement des espaces entre les travées cardiomyocytaires, Coloration : bleu alcian ; Gr obj x 40.

# Figures D et E :

Cardiomyocytes à orientation longitudinale (Fig. D) et transversale (Fig. E). Leurs noyaux présentent une forme dentelée et une chromatine dense (flèches rouges), avec un espace périnucléaire optiquement vide.

Coloration : trichrome de Masson ; Gr obj x 100.

# Figure F :

Destruction des cardiomyocytes représentée par des désorganisations des myofilaments (flèches noires) avec présence d'œdèmes (oe).

Coloration : trichrome de Masson ; Gr obj x 100.











# Planche VI Structure histologique du cœur de *Psammomys* soumis à la méthionine pendant 6 mois.

Effet de la méthionine sur le myocarde et l'épicarde.





# Figure A et B :

Elargissement des espaces intercellulaires (flèches rouges) (Fig. F), et une infiltration cellulaire entre les travées cardiomyocytaires (flèche orange) (Fig. F et H). Coloration : trichrome de Masson et Acide Périodique Schiff ; Gr obj x 40





# Figure C :

Fibrose périvasculaire, caractérisée par un dépôt de matériel conjonctif (TC) essentiellement les collagènes fibrillaires.

Coloration : trichrome de Masson ; Gr obj x 100.

# Figure D :

Epaississement de l'épicarde (flèche jaune) marqué par la présence d'espaces vides correspondant probablement à des œdèmes.

Coloration : trichrome de Masson ; Gr obj x 40.

# 2. Aorte de Psammomys

# Aorte de Psammomys témoins

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

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

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

L'intima : est formée de deux composants :

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

La limitante élastique interne, limitant l'intima, continue et très ondulée est nettement observée (Pl. VII : Fig. A et B).

La média : est organisée en espaces interlamellaires délimités par des lames élastiques (au nombre de 7 en moyenne) concentriques très ondulées. Ces espaces contiennent des cellules musculaires lisses dont les noyaux de forme ovalaire sont denses.

La coloration au vert lumière permet d'observer du collagène non seulement au niveau des espaces interlamellaires mais également sur le pourtour des lames élastiques (Pl. VII : Fig. A).

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

# Planche VII Histologie de l'aorte de *Psammomys obesus* témoin.

# Figure A et B :

Ces figures mettent en évidence les trois couches de l'aorte : intima, média et adventice. Nous observons quelques noyaux d'endothélium (flèche noire), des lames élastiques ondulées (flèches jaunes) au niveau de la média délimitant des espaces interlamellaires contenant les noyaux fusiformes des CMLs, cette couche est délimitée par les limitantes élastiques interne et externe. L'adventice, la couche la plus externe est constituée de faisceaux de collagènes.

Coloration : trichrome de Masson (Fig. A), Acide Périodique Schiff (Fig. B), Gr obj x 100.





A : Adventice ; CML : cellule musculaire lisse ; En : endothélium ; I : Intima ; Eil : espace interlamellaire ; L : Lumière ; Le : lame élastique ; lee. : limitante élastique externe ; lei. : limitante élastique interne ; Me : Média.

## Aorte de Psammomys soumis à la méthionine

Sur l'ensemble des observations réalisées, nous avons noté la présence, sur la face luminale de l'endothélium, d'agrégats sanguins ou microthrombus (Pl. VIII : Fig. A et B).

L'intima présente des altérations focalisées touchant l'endothélium et le sous endothélium. En effet nous avons observé, en certains points, une hypertrophie des cellules endothéliales (Pl. VIII : Fig. A). Par ailleurs, le sous-endothélium apparaît nettement sur certaines préparations avec un aspect fibreux, épaissi par un dépôt de matériel conjonctif (Pl. VIII : Fig. C).

L'observation de la limitante élastique interne permet de noter la présence de zones de dédoublement (Pl. VIII : Fig. D) et à certains endroits, de ruptures (Pl. VIII : Fig. F). Au niveau de ces dernières, nous observons du matériel de nature conjonctive.

La média est le siège de nombreuses altérations touchant tous ses constituants. Les colorations au trichrome de Masson et à l'Acide Périodique Schiff que nous avons réalisé, ont permis de mettre en évidence des amincissements (Pl. VIII : Fig. E) et des ruptures des lames élastiques (Pl. VIII : Fig. F). Ces dernières paraissent également beaucoup moins ondulées que celles observées dans une aorte normale (Pl. VIII : Fig. E). Une accumulation de collagènes fibrillaires est observée non seulement à la périphérie des lames élastiques mais aussi au niveau des espaces interlamellaires (Pl. VIII : Fig. F et G), entraînant une augmentation significative de ces espaces (23,84 %, p < 0,01). Cet effet prélude probablement à l'installation d'une fibrose.

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

Sur quelques préparations, nous avons observé au niveau de la média, une petite zone qui apparaît optiquement vide (Pl. VIII : Fig. I). Cet espace pourrait correspondre à un dépôt calcique, car il semble comblé par des structures hyalines de forme polygonale ressemblant fortement à des cristaux.

Une dissection aortique ou encore appelée anévrisme disséquant a été observé chez *Psammomys* Hhcy (Pl. IX : Fig. A). Au niveau de la média, une zone caractérisée par une accumulation de collagènes ou fibrose confère aux espaces interlamellaires un aspect très dense. De plus, nous avons observé, en son centre une importante agrégation sanguine, issue d'une déchirure ou porte d'entrée, par laquelle le sang sous pression entre et décolle les feuillets superposés qui constituent la paroi élastique de l'aorte. Cette zone semble proliférer vers l'adventice qui a subi une déformation d'aspect protubérant vers l'extérieur.

Une seconde anomalie de structure aortique a été observée chez un rat des sables présentant une hyperhomocystéinémie après 6 mois d'expérimentation. La paroi aortique présente au même endroit, une altération de ses 3 couches marquée par une destruction de l'intima, une fibrose au niveau de la média et un épaississement de l'adventice sous forme de protubérance (Pl. IX : Fig. B). A ce niveau, nous avons noté la présence de nombreux fibroblastes, de nombreux faisceaux collagéniques et de macrophages. Il s'agit de l'installation d'un anévrysme du coté adventitiel et début de formation d'une plaque d'athérome du coté luminal. Cette dernière a subi une rupture profonde par la suite (Pl. II : Fig. C et D).

Tableau II : Effet d'une surcharge de la méthionine (70 mg/k	(g/j) pendant 6 mois sur les
paramètres morphométriques de la paroi aortique.	

Paramètres morphologiques	Témoins	Met
Epaisseur de la paroi artérielle (µm)	119,8 ± 15,95	144,94 ± 57,86 **
Epaisseur de l'adventice (μm)	$30,25 \pm 16,14$	43,48 ± 59,38
Epaisseur de la média (µm)	87,75 ± 8,43	100,30 ± 24,53 ***
Epaisseur de l'intima (μm)	2,13 ± 0,58	2,87 ± 1,25 ***
Epaisseur de l'espace interlamellaire (μm)	$7,\!55\pm2,\!97$	9,35 ± 3,77 **
Longueur noyau CML (µm)	$8,03 \pm 2,80$	6,58±2,14 ***
Largeur noyau CML (µm)	$3,28 \pm 1,15$	$3,33 \pm 1,12$
Nombre noyaux des CMLs (par 5625 µm <sup>2</sup> )	$11,32 \pm 3,29$	15,06 ± 3,34 ****
Nombre de lames élastiques	$7,\!48 \pm 0,\!91$	$7,34 \pm 1,04$

Met : avec méthionine

Les valeurs notées correspondent aux moyennes affectées de leurs SEM.

Paramètres morphométriques de la paroi artérielle du *Psammomys* soumis à la méthionine *vs* des témoins \*\* p < 0,001; \*\*\* p < 0,001; \*\*\* p < 0,001; \*\*\* p < 0,001 (n = 5; 10 sections par animal).

L'état d'hyperhomocystéinémie a engendré chez le Psammomys des altérations structurales sévères au niveau des trois organes, marquées essentiellement par une hypertrophie de la paroi cardiaque et artérielle, une modulation de la composition biochimique de la MEC permettant l'installation d'une fibrose interstitielle et périvasculaire, une stéatose hépatique et une apparition d'un anévrisme. L'ensemble de ces altérations caractérise le remodelage cardiovasculaire et hépatique induit par l'Hhcy.

# **Planche VIII**

# Histologie de l'aorte de Psammomys obesus hyperhomocystéinémique.

# Figure A :

Cette figure montre une hypertrophie des noyaux des cellules endothéliales (flèches rouges). Coloration : trichrome de Masson, Gr obj x 100.

## Figure B :

Cette figure montre une agrégation sanguine sous forme microthrombus (MT), avec une condensation des noyaux des cellules endothéliales (flèches rouges). Coloration : trichrome de Masson, Gr obj x 100.

## Figure C :

Cette figure montre un épaississement du sous endothélium marqué par l'accumulation du tissu conjonctif spécialement les collagènes (flèche rouge). Coloration : trichrome de Masson, Gr obj x 100.

## Figure D1 et D2 :

Ces figures montrent un dédoublement de la limitante élastique interne délimitant du matériel conjonctif.

Coloration : trichrome de Masson (Fig. D1 et D2), Gr obj x (40 et 100).

## Figure E1 et E2 :

Ces figures révèlent des amincissements des lames élastiques au niveau de la média (flèches noires). Coloration : Acide Périodique Schiff (Fig. E1 et E2), Gr obj x (100 et 40).

# Figure F :

Cette figure révèle un important dépôt de collagènes fibrillaires dans les espaces interlamellaires (têtes de flèche jaune) et autour des lames élastiques (flèches jaunes), ainsi que des ruptures des lames élastiques à quelques endroits (flèches noires). Coloration : trichrome de Masson, Gr obj x 100.

#### Figure G :

Cette partie de la paroi d'aorte montre une zone d'espaces interlamellaires élargis et clairs au niveau desquels les CMLs sont orientées perpendiculairement à l'axe de l'aorte et semblent migrer (flèche rose). Une importante masse de collagènes délimite de part et d'autre les lames élastiques (flèches jaunes). Coloration : trichrome de Masson, Gr obj x 100.

#### Figure H :

Cette figure révèle que les lames élastiques présentent des ruptures (têtes de flèches jaunes), entre ces lames, se trouve une zone de prolifération des CML ; 4 à 5 noyaux de CML (flèche blanche) au niveau de la média, ces lames sont entourées de part et d'autres par du matériel conjonctif (étoiles blanches). Coloration : trichrome de Masson, Gr obj x 100.

#### Figure I :

Cette illustration révèle un dépôt calcique (flèche orange) délimité par des lames élastiques. Coloration : trichrome de Masson, Gr obj x 100.

Planche VIII



# **Planche IX**

# Histologie de l'aorte de *Psammomys* soumis à la méthionine pendant 6 mois.

# Figure A :

Cette illustration présente une lésion de la paroi d'aorte correspondant à un anévrisme disséquant, révélée par la destruction de l'intima, l'absence d'espaces interlamellaires et la présence d'un important dépôt de collagènes au niveau de la média, un important épaississement de l'adventice. La média et l'adventice sont séparées par un espace interlamellaire très large occupé par une importante agrégation sanguine (flèche orange). Coloration : trichrome de Masson, Gr obj x 40.

## **Figure B :**

Cette figure présente une lésion marquée par la destruction de l'intima (flèche noire), une fibrose révélée au niveau de la média (Me) et un épaississement de l'adventice (Ad). Avec une installation d'un anévrysme (flèche orange).

Coloration : trichrome de Masson, Gr obj x 100.

## Figure C et B :

Ces figures présentent une rupture importante de la paroi aortique (flèches rouges). Coloration : trichrome de Masson, Gr obj x 100.

# Planche IX









# III. Effets de la méthionine sur les cellules musculaires lisses aortiques (CMLs) en culture

Après 72 h d'incubation en présence de méthionine (50 mM), les cultures secondaires (7<sup>ème</sup> passage) de CMLs présentent deux phénotypes : les CMLs contractiles quiescentes fusiformes (Fig. 34C) et CMLs prolifératives synthétiques polygonales (Fig. 34D). Cependant, la quantification du taux de prolifération des CMLs n'a montré aucune augmentation significative de la prolifération des cellules après supplémentation de la méthionine par rapport aux cellules témoins (Fig. 34E), alors que l'évaluation des protéines totales dans le compartiment extracellulaire a été significativement augmentée après l'ajout de méthionine suggérant une augmentation de la sécrétion protéiques par les CMLs (0,13  $\pm$  0,02  $\nu s$  0,07  $\pm$  0,01 µg/mL, p <0,001) (Fig. 34F).

De plus, les CMLs des deux sous-populations sont devenues significativement plus grandes après 72 h d'addition de méthionine, de 44,72 % (p <0,0001) dans les CML contractiles (Fig. 34C) et de 18,12 % (p <0,001) dans les CML synthétiques (Fig. 34D ; Tableau XII). Les noyaux des CMLs ont également augmenté de manière significative en taille, de 22,98 % (p <0,0001) dans les CMLs contractiles et de 16,11 % (p <0,0001) dans les CMLs synthétiques (Tableau XI). En plus de la plus grande taille, les noyaux des CMLs synthétiques (Tableau XI). En plus de la plus grande taille, les noyaux des CMLs synthétiques ont montré un nombre accru de nucléoles par rapport aux témoins correspondants ( $3,4 \pm 0,97$  vs 2,92  $\pm 0,67$ , p < 0,01) (Tableau III).



Figure 34 : Cellules musculaires lisses aortique (CMLs) chez *Psammomys obesus* témoins (A, B) et soumis à la méthionine 50 mM (C, D) pendant 72 heures.

	CMLs contractiles		CMLs synthétiques	
Paramètres morphométriques	Témoins	Met	Témoins	Met
Grand axe cellulaire (µm)	$72,18 \pm 15,82$	104,46 ± 29,08****	$46,02 \pm 9,10$	$54,36 \pm 12,74^{***}$
Grand axe nucléaire (µm)	15,66 ± 2,66	$19,26 \pm 3,98^{****}$	$14,52 \pm 2,02$	16,86 ± 2,9****
Petit axe nucléaire (μm)	$7,62 \pm 1,51$	9,87 ± 2,57 <sup>****</sup>	$12,72 \pm 1,55$	$13,59 \pm 2,09^*$
Axe noyau / axe cellule	$0,22 \pm 0,05$	$0,19 \pm 0,05^{***}$	$0,33 \pm 0,07$	$0,32 \pm 0,08$
Nombre de nucléoles	$2,56 \pm 0,97$	$2,64 \pm 0,90$	$2,92 \pm 0,67$	$3,4 \pm 0,97^{**}$

**Tableau III :** Etude morphométrique des cellules musculaires lisses aortiques (CMLs) en culture, CMLs contractiles et synthétiques, témoins et soumis à la méthionine.

Met : avec méthionine 50 mM pendant 72 heures.

Les valeurs notées correspondent aux moyennes affectées de leurs SEM.

Paramètres morphométriques des CMLs soumis à la méthionine vs des témoins p < 0.05; p < 0.01;

\*\*\*p < 0,001 et \*\*\*\*p < 0,0001, respectivement (n = 2; 6 sections par animal).

L'étude in vitro réalisée confirme la modulation phénotypique et la prolifération des CMLs précédemment observées sur nos préparations histologiques.

# DISCUSSION

#### Induction de l'Hhcy par la méthionine

Les maladies cardiovasculaires augmentent dans la population à forte consommation de viande (Chaturvedi et *al.*, 2016). La viande rouge, composant de l'alimentation courante, contenant une grande quantité de méthionine (Met) est absorbée très efficacement, et pénètre dans le plasma jusqu'à ce qu'elle soit éliminée et métabolisée par les différents tissus (Chaturvedi et *al.*, 2016). La question qui peut être posée est la suivante : la méthionine estelle impliquée directement ou par l'intermédiaire de ses métabolites dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires ? Etant donné que la méthionine est un acide aminé soufré, il a été démontré qu'un excès de méthionine (donneur de groupes méthyle) dans le contenu de l'alimentation modifie les niveaux de méthylation de l'ADN, altérant ainsi l'expression des gènes (Park et *al.*, 2008). Plus important encore, l'accumulation d'homocystéine, métabolite dérivé de la méthionine, à l'origine d'une hyperhomocystéinémie, est considérée comme facteur de risque des maladies cardiovasculaires (Steed et Tyagi, 2011 ; Chaturvedi et *al.*, 2016 ; Reis, 2022).

De nombreuses données expérimentales ont indiqué que l'hyperhomocystéinémie peut résulter d'une supplémentation en homocystéine (Miller et *al.*, 2000 ; Akasaka et *al.*, 2005 ; Joseph et *al.*, 2008 ; Yang et *al.*, 2018) ou en méthionine (Sharma et *al.*, 2007 ; *Kirac* et *al.*, 2013 ; Rahimi et *al.*, 2021).

Dans notre modèle, nous avons induit une hyperhomocystéinémie chronique par une injection intrapéritonéale de méthionine à la dose de 70 mg/kg de poids corporel/jour chez *Psammomys obesus* pendant 6 mois. Notre résultat est en accord avec ceux rapportés par de nombreuses études antérieures (Charpiot et *al.*, 1998; Hidiroglou et *al.*, 2004 ; Kirac et *al.*, 2013 ; Othmani Mecif et *al.*, 2017) qui ont montré qu'un régime enrichi en méthionine induit une Hhcy modérée chez différents modèles animaux (porc, gerbille, rat et lapin). Chez le rat Wistar, espèce connue comme athérorésistante, l'administration d'une forte dose de méthionine (200 mg/kg/j) pendant une longue période (6 mois) est nécessaire pour induire une Hhcy (Raaf et *al.*, 2011 ; Ghoul et *al.*, 2017). Chez des lapines non gestantes, Othmani-Mecif et *al.* (2017) ont enregistré une Hhcy après 3 mois d'administration de Met à la dose de 500 mg/Kg/j. Selon Yefsah-Idres et *al.* (2016), cette Hhcy pourrait s'expliquer par une diminution de l'activité de la CβS et de la SAHH hépatiques.

Dans notre laboratoire, une étude publiée en 2019, a rapporté l'installation d'une Hhcy modérée chez *Psammomys obesus* induite par une forte dose de méthionine (300 mg/kg/j) administrée pendant 28 jours (Chaouad et *al.*, 2019).

Notre modèle actuel, contrairement aux modèles précédents utilisant une forte dose de méthionine pendant une courte période, montre que l'administration d'une faible dose de méthionine (70 mg/kg/j) pendant une longue période (6 mois), est suffisante pour induire une Hhcy modérée chez *Psammomys obesus*, et ainsi, mieux reproduire la lenteur d'apparition progressive de la maladie en pathologie humaine.

# Impact de l'hyperhomocystéinémie sur le poids corporel et sur certains paramètres biochimiques plasmatiques

Nous avons suivi l'évolution du poids corporel des animaux mensuellement et ce pendant les 6 mois d'administration de méthionine. Nous avons noté une diminution significative à partir du 2<sup>ème</sup> mois jusqu'à la fin de l'expérimentation. Une diminution du poids corporel de 7,54% est observée chez les *Psammomys* Hhcy en fin d'expérimentation. Nos résultats sont en accord avec ceux de Zhou et *al.* (2001) chez les souris ApoE<sup>-/-</sup> soumises à un régime riche en Met (33 g/kg d'aliment) pendant 8 mois. Cette réduction du poids corporel final par rapport au groupe témoin est également mentionnée par Becker et *al.* (2005) et Ghoul et *al.* (2017) chez des rats soumis à un excès de Met dissous dans l'eau de boisson à dose et temps différents (9 g/L pendant 9 semaines et 200 mg/kg/j pendant 6 mois, respectivement), et par Chaouad et *al.* (2019) chez *Psammomys* recevant une injection intrapéritonéale de la méthionine (300 mg/kg/j) pendant 28 jours.

Cependant, d'autres travaux ont mentionné que le poids corporel ne semble pas être affecté chez les gerbilles (Hidiroglou et *al.*, 2004) et les rats (Sharma et *al.*, 2007) par l'Hhcy induite par la méthionine. Selon Vijayan et *al.* (2013), cette diminution du poids corporel pourrait être expliquée, par une diminution de la masse osseuse. Elle pourrait également être associée à une diminution de la masse adipeuse ou musculaire. Il est possible que les variations de la dose de méthionine, la durée et le mode d'administration puissent jouer un rôle dans ces réponses différentes.

Dans notre modèle, l'Hhcy induite par la méthionine est associée à une hyperglycémie significative, à une augmentation de la concentration d'acide urique et à une dyslipidémie. Tous ces paramètres sont inclus dans le phénotype du syndrome métabolique humain et sont impliqués dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires. Certaines de ces altérations, notamment l'hyperglycémie et l'augmentation de l'acide urique, n'ont pas été observées chez différents modèles comme le porc, le rat et *Psammomys* (Rolland et *al.*, 1995; Sharma et *al.*, 2007; Raaf et *al.*, 2011; Chaouad et *al.*, 2019). Alors que d'autres travaux dont ceux de Cohen et *al.* (2015), Zhao et *al.* (2018) et Kim et *al.* (2020), signalent une corrélation positive entre l'Hhcy et l'acide urique. Ce dernier possède des propriétés pro-oxydantes et anti-oxydantes selon Kawamoto et *al.* (2019).

La méthionine de par son rôle précurseur de l'homocystéine est un acide aminé essentiel pour le métabolisme chez l'homme (Block, 1943) et chez les mammifères en général (Eagle, 1955). Cet acide aminé protéinogène est impliqué dans la biosynthèse des protéines de l'organisme. De ce fait, nous avons déterminé la concentration en protéines totales au niveau plasmatique. Nos résultats ont montré que l'administration chronique de méthionine engendre, en fin d'expérimentation (T6 *vs* T0), une augmentation significative de la protéinémie chez *Psammomys*. Ces résultats expliqueraient que l'administration de méthionine serait en partie orientée vers la voie de biosynthèse des protéines et participerait à l'installation de l'Hhcy. De même, Hamdis (2011) a enregistré chez les rats soumis à différentes doses de méthionine (300, 400, 500 mg), pendant 3 mois, une protéinémie plus élevée chez tous les rats hyperhomocystéinémiques par rapport aux rats témoins. Nos résultats rejoignent ceux obtenus par d'autres chercheurs de notre équipe chez le lapin domestique. En effet, Othmani-Mecif et *al.* (2006) ont montré qu'un régime enrichi en méthionine entraine

une augmentation de la protéinémie chez les lapines non gestantes et une légère augmentation chez les lapines gestantes. Par contre Chaouad et *al.* (2019), ont noté que la protéinémie diminue de 14 % environ en fin d'expérimentation, chez *Psammomys* soumis à un excès de méthionine (300 mg/kg/j) pendant 28 jours.

De plus, nous avons constaté une augmentation de la triglycéridémie et de la cholestérolémie chez les Psammomys Hhcy, associées à un déséquilibre des lipoprotéines marqué par une diminution du taux plasmatique des lipoprotéines cardioprotectrices (HDLs) et une augmentation de la concentration plasmatique des lipoprotéines athérogènes (LDL-VLDL), et l'apparition de la lipoprotéine (a). Liao et *al.* (2006) ont montré chez la souris C $\beta$ S<sup>-</sup> <sup>/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>, qu'une hyperhomocystéinémie inhibe le transport inverse du cholestérol d'où son augmentation dans le plasma, en réduisant le taux des HDL circulants, et ceci par l'inhibition de la synthèse de l'apolipoprotéine A-1 (apo A-1) dans les hépatocytes. De même Hidiroglou et al. (2004), ont rapporté que l'addition de méthionine à un régime à base de caséine a eu comme conséquence, chez les gerbilles, une augmentation significative de la cholestérolémie avec une diminution des HDLs et une augmentation des LDLs. Ghoul (2009), a rapporté que l'administration de méthionine (200 mg/kg/j) pendant 6 mois, a engendré chez le rat Wistar des fluctuations de la cholestérolémie et de la triglycéridémie avec une diminution des HDLs et une augmentation des VLDL-LDL semblables à celles obtenues dans nos travaux. Par contre d'autres auteurs, n'ont noté aucune corrélation entre l'Hhcy et les paramètres lipidiques plasmatiques (Othmani-Mecif et al., 2006; Chaouad et al., 2019). Selon Sharma et al. (2007), la corrélation positive entre l'Hhcy et les paramètres lipidiques plasmatiques est en relation avec l'administration de la méthionine dose/temps dépendant.

Woo et *al.* (2006) ont montré que l'hyperhomocystéinémie est responsable de l'activation du facteur de transcription CREB hépatocytaire par la voie de signalisation AMPc/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.

des études cliniques et épidémiologiques Chez l'homme, ont montré qu'une hyperhomocystéinémie peut augmenter les perturbations des profils lipidiques au niveau des vaisseaux sanguins par de multiples voies, augmentant ainsi le risque des maladies cardiovasculaires chez les patients atteints de dyslipidémie (Xiao et al., 2011 ; Ghasemzadeh et al., 2016; Niu et al., 2021). Par ailleurs, l'Hhcy est également corrélée (i) positivement à l'hypertriglycéridémie, autre facteur de risque d'athérosclérose, chez des patients atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique (Fimognari et al., 2009) et (ii) négativement aux concentrations plasmatiques de HDLs et d'ApoAI, principal constituant des HDLs, chez des patients avant subi une angiographie coronarienne (Xiao et al., 2011). De même, les niveaux circulants d'Hcy, de LDLs et de LDLs oxydés de patients présentant une athérosclérose sont plus élevés que ceux de sujets sains, tandis que l'inverse est observé pour les niveaux de folates, de HDLs et d'Apo AI. Le niveau de vitamine B12 est en revanche similaire dans les 2 groupes (Seo et al., 2010). Des résultats similaires ont été rapportés chez des modèles animaux d'Hhcy. Ainsi, Mikael et al. (2009) ont montré que l'Hhcy chez des souris MTHFR<sup>+/-</sup> est corrélée à une hypertriglycéridémie due à une diminution de la concentration d'Apo AI. Des études réalisées sur des cellules endothéliales en culture et sur le plasma humain ont, de plus, montré que l'Hcy peut se fixer sur les Apo B (Zinellu et al., 2009). Cette

homocystéinylation des apolipoprotéines peut induire un stress oxydant, une altération des LDLs et un dysfonctionnement endothélial.

Mezdour et *al.* (1990), ont rapporté que la lipoprotéine a (Lp a) serait un marqueur additionnel de l'athérosclérose. Aasvee et *al.* (2006) ont démontré qu'un taux élevé de Lp (a) est associé à une augmentation du risque de maladies cardiovasculaires. La présence de Lp (a) dans le plasma sanguin de *Psammomys* Hhcy, confirme encore la pertinence de notre modèle dans l'évaluation des mécanismes physiopathologiques des maladies cardiovasculaires impliquant le stress oxydatif (Au-Yeung et *al.*, 2004) et le processus inflammatoire (Lazzerini et *al.*, 2007) et dans l'efficacité des nouvelles thérapies dirigées contre l'Hhcy et les maladies cardio-vasculaires.

#### Hyperhomocystéinémie et stéatose hépatique

L'hyperhomocystéinémie bien connue comme facteur de risque indépendant des maladies cardiovasculaires (Maron et Loscalzo, 2009 ; Škovierová et *al.*, 2016), est également proposée comme facteur de risque potentiel de la stéatose hépatique non alcoolique (Dai et *al.*, 2016 ; Stojanović et *al.*, 2018).

La stéatose hépatique, caractérisée par l'accumulation de lipides dans les hépatocytes, est due soit à une augmentation de leur absorption et leur biosynthèse ou d'une altération de l'exportation des lipides en plus de l'oxydation des acides gras dans les mitochondries. Fait intéressant, notre étude a montré que l'Hhcy médiée par la méthionine a induit une stéatose hépatique profonde marquée par des hépatocytes gorgés de gouttelettes lipidiques et d'une accumulation du tissu adipeux dans les espaces interstitiels et périvasculaires. En accord avec nos résultats, Ai et al. (2017) ont démontré qu'une alimentation riche en méthionine (2% de méthionine) pendant 16 semaines, chez des souris C57BL/6J, augmente le taux plasmatique d'Hcy conduisant à l'installation d'une stéatose hépatique. Les mêmes résultats ont été observés chez des rats avant reçu un régime riche en méthionine (500 mg/kg/jour) pendant trois mois (Yefsah-Idres et al., 2016). La stéatose hépatique peut également, être la conséquence d'une anomalie génétique conduisant à la déplétion de certaines enzymes telles que la CBS, la MTHFR, la MAT... Ces enzymes ont toutes en commun, le fait d'intervenir dans le métabolisme de l'homocystéine, ce qui établit clairement un lien entre le cycle de la reméthylation et la stéatose hépatique (Kaplan et al., 2020). Elle peut, également, être due à une carence vitaminique. En effet, des souris nourries à l'aide d'un régime carencé en folates peuvent développer une stéatose et présenter une augmentation significative de l'Hcy plasmatique simultanément à une diminution significative de la concentration hépatique en bétaine (Christensen et al., 2010). Une carence en choline ou bétaine conduirait également à une stéatose en diminuant la synthèse de la phosphatidylcholine présente dans les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) dont le rôle est de transporter les lipides du foie (Polyzos et al., 2012).

Woo et *al.* (2006) ont rapporté que l'hyperhomocystéinémie induite, chez des rats, par un régime riche en méthionine pendant 4 semaines, pourrait provoquer une augmentation significative des niveaux d'AMPc hépatique, de l'activité de la protéine kinase A (PKA) et une

activation de CREB, nécessaire à l'expression de la HMG CoA réductase et à l'augmentation de la biosynthèse du cholestérol hépatique. L'incubation de cellules HepG2 en présence d'Hcy (50 à 100 µmol/L) a considérablement amélioré la phosphorylation de CREB et par conséquent a augmenté l'activité de liaison CREB/ADN. La PKA a été activée dans les cellules soumises à l'Hcy en raison de l'augmentation du niveau d'AMPc cellulaire. L'inhibition de l'adénylate cyclase a non seulement, réduit les taux intracellulaires d'AMPc élevés par l'Hcy, mais a également inhibé l'activation de la PKA et empêché la phosphorylation de CREB induite par l'Hcy (Woo et *al.*, 2006).

Outre l'accumulation lipidique, la pathogenèse des maladies du foie dans le cas de l'hyperhomocystéinémie, pourrait être due à la génération excessive d'espèces réactives de l'oxygène (Robert et *al.*, 2003 ; Luo et *al.*, 2014). En effet, certaines études portant sur le foie de rat ont montré qu'un régime riche en méthionine augmente la peroxydation des lipides hépatiques (Lynch et Strain, 1989 ; Mori et Hirayama, 2000), et diminue l'activité antioxydante (Tamanna et *al.*, 2019). Enfin, un traitement avec la SAM, les folates, la vitamine B12 ou la bétaine pourrait atténuer les lésions hépatiques, possiblement via un effet protecteur passant par une réduction du stress oxydant, de l'inflammation et de l'apoptose (Yagisawa et *al.*, 2004; Purohit et *al.*, 2007 ; Martinez, 2015; Talari et *al.*, 2022).

Nos résultats montrent également que l'Hhcy médiée par la méthionine, a engendré chez *Psammomys*, une fibrose interstitielle et périvasculaire hépatique. Un résultat similaire a été observé chez les rats ayant subi une injection d'homocystéine (0,6 µmol Hcy/g/j) pendant 28 jours (Matté et *al.*, 2009). Torres et *al.* (1999), suggèrent que l'homocystéine peut modifier l'homéostasie de la matrice extracellulaire du foie avec pour résultat une fibrose hépatique, et qu'elle est capable d'induire l'expression et la synthèse de l'inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases-1 (TIMP-1) qui dégradent les collagènes au niveau des hépatocytes via l'activation de la liaison à la protéine-1 (AP-1).

Lv et ses collaborateurs (2021), ont noté chez 1582 sujets, l'existence d'une forte association entre la concentration plasmatique d'Hcy et la concentration des biomarqueurs sériques de la fibrose hépatique (ALAT et ASAT). Ils ont, en outre, signalé que plus la concentration plasmatique d'Hcy est élevée, plus le degré de la fibrose hépatique est évident.

Selon Roblin et ses collaborateurs (2007), l'homocystéine a une action directe au niveau hépatique (voir Fig. 7). Elle permet la surexpression de SREBP-1 (Sterol Regulatory Element Binding Proteins), qui favorise la stéatose. Elle stimule la sécrétion de cytokines proinflammatoires, probablement en activant le facteur transcriptionnel NF- $_kB$ , augmentant ainsi le risque de stéatose hépatique non alcoolique. Enfin, l'homocystéine, en stimulant l'inhibiteur de métalloprotéinase TIMP-1, pourrait favoriser la fibrogenèse hépatique.

#### Hyperhomocystéinémie et altérations cardiovasculaires

Les altérations structurelles du cœur, de l'aorte chez les animaux *Psammomys obesus* que nous avons soumis à une administration de méthionine à raison de 70 mg/kg/j pendant 6 mois caractérisent davantage le phénotype d'athérosclérose induit par Hhcy-médiée par la Met. En effet, l'Hhcy modérée (20 µM) induite par la méthionine a exercé des effets

angiotoxiques sur le cœur et l'aorte caractérisés par la présence de microthrombus, de plaques athéromateuses, de fibrose interstitielle et périvasculaire, ainsi que de profondes altérations du myocarde. Des altérations similaires ont déjà été observées après un traitement à la méthionine chez différents modèles animaux, notamment *Psammomys obesus* ; cependant, les doses de méthionine utilisées dans ces travaux sont 2,5 à 4 fois plus élevées que dans notre étude (Devi et *al.*, 2006 ; Raaf et *al.*, 2011 ; Yefsah-Idres et *al.*, 2016 ; Othmani Mecif et *al.*, 2017 ; Chaouad et *al.*, 2019). De plus, dans l'étude précédente réalisée par Chaouad et *al.* (2019) chez *Psammomys obesus*, l'administration d'une dose élevée de méthionine (300 mg/kg/j) pendant une courte période (28 jours), a engendré un état d'Hhcy modérée à l'origine d'un remodelage de la couche myocardique.

L'observation de plusieurs coupes de ventricule gauche et d'aorte de *Psammomys* Hhcy, a montré sur la face luminale, la présence d'agrégations sanguines ou microthrombus. Ces derniers sont révélés également au niveau de la lumière intimale des artères coronaires chez des souris apo  $E^{-/-}$  soumises à la méthionine ou l'homocystéine (Zhou et *al.*, 2001).

Des expérimentations chez l'animal ont permis de vérifier l'hypothèse d'un effet procoagulant de l'Hcy. Ainsi dans l'étude de Jacobs et *al.* (2011), des souris CBS<sup>+/-</sup> présentent un état pro-coagulant et un risque thrombotique réduit après la diminution de l'homocystéinémie. Cet effet proviendrait de la capacité de l'Hcy en excès, à activer certains facteurs de la coagulation. L'Hhcy induite par une déficience nutritionnelle en folates chez le rat, est associée à une augmentation de la vitesse de coagulation, de la taille du caillot sanguin et de l'activité fonctionnelle du facteur VIII. En revanche, l'activité des facteurs XII, X et II est réduite alors que celle du facteur VII reste inchangée. Une supplémentation en folates chez ces animaux a permis de normaliser l'homocystéinémie et d'inverser les effets observés sur la coagulation et ses facteurs (Ebbesen and Ingerslev, 2005). De même, un traitement de 3 mois folique annihile avec 5 mg/j d'acide le statut pro-coagulant de patients hyperhomocystéinémiques atteints de maladies des artères périphériques, en diminuant et augmentant, respectivement, leurs concentrations plasmatiques en fibrinogène et en plasminogène (Mayer et al., 2002). L'Hcy augmente donc l'expression et l'activité de certains facteurs de coagulation et diminuerait la fibrinolyse, expliquant ainsi son rôle dans le développement de thrombose (Martinez, 2015).

Notre étude a mis en évidence un fait intéressant à savoir que l'installation d'une fibrose interstitielle et périvasculaire dans le myocarde, est due à l'accumulation de collagènes fibrillaires. Un résultat similaire a été observé chez des rats Wistar-Kyoto soumis, pendant 10 semaines, à un régime alimentaire contenant 9 g/kg d'Hcy (Joseph et *al.*, 2003), et des rats Sprague-Dawley soumis au même régime alimentaire pendant 20 semaines (Devi et *al.*, 2006). Cette fibrose impliquerait un stress oxydatif selon Joseph et *al.* (2008).

Selon Ricard-Blum et *al.* (2018), la fibrose myocardique résulte d'un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation des éléments de la matrice extracellulaire en particulier les collagènes de type I et III. Dans un précédent travail, nous avons montré que les collagènes impliqués dans ce remodelage matriciel sont de type I et III, et que cette accumulation est associée à un déséquilibre entre l'expression accrue de métalloprotéinase MMP-9 et son inhibiteur tissulaire TIMP-2 et la diminution de l'expression de MMP-2 et TIMP-1 (Chaouad et *al.*, 2019). Raaf et ses collaborateurs (2011), ont précisé que l'accumulation de collagènes I

et III au niveau cardiaque chez les rats Hhcy, est également associée à une augmentation de l'expression du TGF- $\beta$ 1 et à l'activation de JNK. Chez des souris CBS<sup>-/-</sup> connues comme modèle d'Hhcy, Kar et *al.* (2019) ont noté un important dysfonctionnement et remodelage cardiaque chez ces dernières.

Le remodelage matriciel constitue un processus physiologique nécessaire pour la morphogenèse des tissus et la réparation cellulaire et entraîne une dégradation de la MEC. Cette dégradation est hautement régulée et dépendante des métalloprotéinases (MMPs) et des TIMPs leurs inhibiteurs (Raeeszadeh-Sarmazdeh et *al.*, 2020). Les MMPs sont des marqueurs de l'altération de la MEC : leur expression, généralement faible dans les tissus sains, augmente lors des processus de remodelage tissulaire physiopathologique via l'action des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK). L'Hcy à une concentration de 0,3 mM, induit une augmentation de l'abondance et de l'activité de la MMP-9 dans des macrophages péritonéaux de souris en culture (Lee et *al.*, 2012). De plus, l'Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK), membre de la famille des MAPK, jouerait un rôle prépondérant dans l'induction de la MMP-9 par l'Hcy. Il a aussi été montré que la SAH pouvait augmenter la quantité de MMP-2 dans des cellules microgliales (Lin et *al.*, 2009).

Les espaces élargis entre les travées myocytaires observés sur nos préparations, peuvent être expliqués par une stimulation des enzymes de dégradation des molécules matricielles à savoir les métalloprotéases (Bescond et *al.*, 1999). En effet, Holven et ses collaborateurs (2006) ont signalé qu'une perturbation de la balance MMP-9/TIMP-1 au niveau des monocytes en culture provenant d'individus hyperhomocystéinémiques, suggère une dégradation de la MEC augmentant le risque d'accident cardiovasculaire. L'infiltration cellulaire et l'élargissement des espaces observés au niveau du myocarde du cœur de *Psammomys* soumis à une surcharge de méthionine, sont en accord avec ceux rapportés par Chaouad et *al.* (2019) et Hamdis (2011) chez le rat des sables, *Psammomys obesus* et les rats Wistar rendus hyperhomocystéinémiques respectivement.

De plus, nos résultats montrent une infiltration cellulaire entre les travées cardiomyocytaires, suggérant la présence d'une inflammation. En effet, dans un précédent travail, nous avons noté une augmentation du taux plasmatique de la CRP chez *Psammomys obesus* soumis à une forte dose de méthionine pendant un 28 jours (Chaouad et *al.*, 2019). Il a également été rapporté que ce marqueur inflammatoire est augmenté de manière dose- et durée dépendante chez les rats soumis à la méthionine (Sharma et *al.*, 2007).

Par ailleurs, nous avons également noté la présence de noyaux de type apoptotique et nécrotique des cardiomyocytes. Un résultat similaire a été observé par Hamdis (2011). Chaouad et *al.* (2019) ont noté que les altérations matricielles sont médiées par une augmentation de l'immunoexpression myocardique du TGF- $\beta$ 1, principal médiateur profibrotique, et par un phénomène d'apoptose. En effet, l'Hhcy provoque une mort cellulaire des cardiomyocytes et des fibroblastes cardiaques par apoptose, en augmentant l'expression de la caspase 3 activée, acteur essentiel du processus apoptotique (Raaf et *al.*, 2011; Chaouad et *al.*, 2019). L'induction de l'apoptose (via l'activation de la caspase 3) par des concentrations physiopathologiques d'Hcy (30 et 50  $\mu$ M, respectivement) a également été observée dans la lignée de cellules hépatiques Sk-Hep-1 et des cellules endothéliales HUVEC (Birch et *al.*, 2009). Ces derniers auteurs rapportent qu'une pré-incubation en présence de

certaines formes de la cobalamine peut freiner non seulement le processus d'apoptose, mais aussi la nécrose de ces cellules.

Yalçinkaya et *al.* (2009) suggèrent qu'un état hyperhomocystéinémique est capable d'induire l'expression du facteur pro-apoptotique Bax et d'inhiber l'expression du facteur antiapoptotique augmentant ainsi le nombre de cellules apoptotiques au niveau du foie. Par ailleurs, Sharma et *al.* (2006), rajoutent que l'homocystéine pourrait déclencher l'apoptose via l'activation de la protéine kinase P53. Selon Majumder et ses collaborateurs (2019), le dysfonctionnement des cellules musculaires striées médié par l'Hhcy, est la conséquence d'une réponse au stress oxydatif, l'inflammation, l'apoptose et l'inhibition de l'angiogenèse. L'ensemble de ces évènements peut entraîner une atrophie musculaire à la suite de l'activation de la JNK combinée à la voie PI3K/AKT.

Sur nos préparations, nous avons enregistré un épaississement de l'épicarde dans le groupe *Psammomys* Hhcy, 11 fois supérieur à la valeur enregistrés dans le groupe témoin; il pourrait être dû soit à la présence d'œdèmes ou à l'accumulation de tissu adipeux. Balcioğlu et *al.* (2014), ont rapporté l'existence d'une forte corrélation entre l'épaisseur du tissu adipeux épicardique et les niveaux d'Hcy chez des sujets présentant un syndrome métabolique mais en absence de maladie coronarienne. Ces auteurs ont également mentionné que, pour chaque augmentation de 1 mm de l'épaisseur du tissu adipeux épicardique, une augmentation de 3,51 µmol/L du taux plasmatique d'Hcy est notée.

L'aorte est la structure vasculaire principale après le cœur. L'Hhcy que nous avons induite par un excès de méthionine a engendré des altérations profondes au niveau l'aorte, notamment un épaississement de l'intima, accompagné d'une hypertrophie et une hyperplasie des cellules endothéliales. Ces résultats corroborent ceux de Murthy et *al.* (2005), ces derniers mentionnent l'apparition d'une hyperplasie intimale chez les rats, avec une épaisseur totale 4 fois supérieure à celle de l'intima aortique des rats témoins. Chai et *al.* (2009), ont également observé cette hyperplasie intimale au niveau la carotide des souris soumises à l'homocystéine (14,5 mM) pendant 8 semaines. Les agrégations sanguines et l'épaississement intimal suggèrent un dysfonctionnement endothélial qui, selon McDowell et Lang, (2000), concernerait plusieurs niveaux.

Par ailleurs, l'épaississement de l'espace sous-endothélial par la présence de matériel conjonctif spécialement les collagènes fibrillaires indiquent la formation d'une jeune plaque d'athérome, alors que les lésions endothéliales et les ruptures de la lame élastique interne observées, augmenteraient la perméabilité intimale aux macromolécules permettant leur accumulation au niveau de l'intima (Zhou et *al.*, 2001). Des études antérieures ont montré que ces altérations sont associées à une augmentation des molécules d'adhésion exprimées dans la paroi aortique telles que ICAM-1, la sélectine E et la sélectine P (Wang et *al.*, 2002 ; Zhang et *al.*, 2004 ; Dayal et *al.*, 2006 ; Balcioğlu et *al.*, 2014). Il a été démontré que l'augmentation de ces molécules induit par la suite, une adhésion accrue des monocytes à l'endothélium aortique (Wang et *al.*, 2002 ; Zhang et *al.*, 2004 ; Dayal et *al.*, 2006 ; Benavides et *al.*, 2007). Il serait intéressant d'analyser ces molécules d'adhérence dans nos conditions expérimentales.

Conformément aux résultats d'Augier et ses collaborateurs (1997), nous avons observé chez *Psammomys* Hhcy, un amincissement de la trame élastique aortique ainsi qu'une perte d'ondulation, une désorganisation, et une perturbation des lames élastiques reflétant un remodelage vasculaire et un endommagement de tout le réseau élastique aortique. Des études, dont celle de Hill et *al.* (2002), suggèrent qu'un taux élevé de méthionine ou de ses métabolites, perturbe la configuration normale des microfibrilles, menant ainsi à une désorganisation de la trame élastique. Certains auteurs ont suggéré que ces dommages associés aux fragments courts d'élastine pourraient résulter de l'augmentation de l'activité de type élastase dépendante des métalloprotéinases (Chaussalet et *al.*, 2004 ; Othmani Mecif et *al.*, 2017). Par ailleurs, les taux pathologiques d'homocystéine induisent une dégradation de la trame élastique de la paroi artérielle, en augmentant la sécrétion des métalloprotéinases élastolytiques de type 2 et 9 (Chaussalet et *al.*, 2004 ; Othmani-Mecif et *al.*, 2006 ; 2017).

Rolland et ses collaborateurs (1995), ont rapporté que l'hyperhomocystéinémie chez le porc, a eu comme conséquence des troubles fibro-élastiques et une prolifération prononcée des CMLs vasculaires. Il est important de noter que l'Hhcy a induit chez le rat des sables, *Psammomys obesus*, la prolifération et la migration des CMLs dans certaines zones, accompagnées par une désorganisation complète de la matrice extracellulaire et une accumulation de collagènes. En effet, à partir d'un phénotype contractile quiescent des CMLs aortiques observé chez *Psammomys* témoins, les CMLs des animaux Hhcy présentent un phénotype synthétique prolifératif. De même l'étude *in vitro* de ces dernières en présence de méthionine que nous avons réalisée, a confirmé la modulation phénotypique. La transition des CMLs entre les deux phénotypes s'est avérée associée à la pathologie de l'athérosclérose humaine (Bennett et *al.*, 2016). De plus, des études antérieures *in vivo* et *in vitro* ont montré qu'une administration de méthionine ou d'homocystéine induit la prolifération et la migration des CMLs, en partie en raison de l'activation de la p38 ou d'une augmentation de l'expression de l'ARN messager codant pour la cycline A et la cycline D1 (Tsai et *al.*, 1996 ; Tyagi, 1998 ; Akasaka et *al.*, 2005 ; Murthy et *al.*, 2005).

Selon Zou et *al.* (2010), l'homocystéine a induit la phosphorylation de la protéine kinase p38 (p38-MAPK), conduisant à sa translocation du cytoplasme vers la membrane cellulaire et qui va activer à son tour les NADPH oxydases en induisant la phosphorylation de p47phox, ayant pour résultat la génération des ROS. Les ROS vont induire la phosphorylation d'Akt, qui est probablement responsable de la prolifération des CMLs vasculaires. Ces résultats démontrent que l'homocystéine induit une augmentation de l'activité de NADPH oxydases dans les CMLs vasculaires par l'activation de la p38-MAPK et la phosphorylation de la p47phox.

Nos résultats montrent aussi que l'Hhcy a engendré chez *Psammomys* un anévrisme disséquant. C'est une affection rare et grave caractérisée par l'irruption de sang à l'intérieur de la paroi séparant les différentes couches constituant la paroi élastique de l'aorte. La dissection de ces feuillets peut s'étendre sur une longue portion de l'aorte ascendante, la crosse aortique et/ou l'aorte descendante. Elle constitue une urgence chirurgicale chez l'homme.

Nous avons, par ailleurs, observé la présence d'une altération adventitielle marquée par un important dépôt de collagènes (nouvellement synthétisés probablement) formant une sorte de plaque au niveau de laquelle sont observés des macrophages, cellules spécialisées dans la phagocytose. Chez ce même animal, la paroi aortique présente un début de formation d'une jeune plaque athérome du coté intimal qui évoluera vers une importante rupture. Des lésions athérosclérotiques ont aussi été observées dans un modèle de lapins nourris avec un régime enrichi en méthionine (Zulli and Hare, 2009).

Yao et Sun (2014) ont démontré que l'incubation de fibroblastes adventitiels aortiques de rat en présence d'Hcy augmente significativement l'expression du collagène de type 1 et de l'AT1R (récepteur de type 1 de l'angiotensine II), suggérant que ces fibroblastes adventitiels pourraient jouer un rôle important dans l'accumulation de la matrice extracellulaire et le remodelage adventitiel vasculaire. Liu et *al.* (2012), ont rapporté que l'administration de l'Hcy (8 g/L) par voie *per os*, induit la formation d'un anévrisme de l'aorte abdominale chez les souris ApoE<sup>-/-</sup> infusées d'angiotensine II, via l'activation de la NADPH oxydase des fibroblastes adventitiels.

Takagi et Umemoto (2005) ont rapporté l'existence d'une association entre la présence d'un anévrisme de l'aorte abdominale et des taux plasmatiques élevés d'homocystéine, bien que l'hypertension systémique chronique soit le facteur le plus courant prédisposant l'aorte à la dissection. Ces auteurs ont rapporté, en outre, que l'hyperhomocystéinémie n'a jamais été connue comme facteur de risque de dissection aortique, sauf dans le cas du syndrome de Marfan.

**CONCLUSION ET PERSPECTIVES** 

L'athérosclérose et l'infarctus du myocarde fréquemment observées dans les pathologies cardiovasculaires, sont marqués essentiellement par une hypertrophie ventriculaire et des dépôts lipidiques au niveau vasculaire.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet de l'hyperhomocystéinémie médiée par la méthionine sur certains marqueurs plasmatiques et structuraux des maladies cardiovasculaires. L'administration chronique de méthionine a induit chez le rat des sables, *Psammomys obesus*, un état hyperhomocystéinémique modéré accompagné d'une diminution de son poids corporel. Cet état est corrélé positivement avec l'augmentation des concentrations plasmatiques de glucose et d'acide urique et des paramètres lipidiques et l'apparition de la lipoprotéine (a) dans le plasma, considérée comme marqueur de l'athérosclérose.

L'hyperhomocystéinémie médiée par la méthionine est également corrélée positivement au remodelage tissulaire et cellulaire des trois organes ciblés de *Psammomys*, à savoir le cœur, l'aorte et le foie. Ce remodelage est marqué essentiellement par une accumulation des composants de la matrice extracellulaire, comme les collagènes fibrillaires, les glycoprotéines et les protéoglycanes, dans les espaces interstitiels et périvasculaires conduisant ainsi à l'installation d'une fibrose; une dégradation des composants essentiellement élastique. Des altérations cellulaires cardiaques et aortiques touchant de nombreuses cellules (cellules endothéliales, CMLs, cardiomyocytes, fibroblastes), sont marquées par une hypertrophie, une prolifération, une apoptose et/ou nécrose, un changement phénotypique. L'ensemble de ces altérations cardiovasculaires, l'Hhcy est à l'origine de l'installation d'une stéatose hépatique chez *Psammomys*.

En résumé, nous avons mis en évidence que l'administration prolongée (6 mois) de méthionine à faible dose (70mg/kg/j) chez *Psammomys obesus*, a pu induire un état hyperhomocystéinémique modéré associée à un phénotype de maladies cardiovasculaires et hépatiques. Par conséquent, nous suggérons que le rat des sables, *Psammomys obesus*, pourrait représenter un excellent modèle d'études concernant les mécanismes pathogéniques des maladies cardiovasculaires d'une part et tester de nouvelles thérapies de ces maladies.

Ce travail mériterait d'être complété par :

- La quantification des marqueurs cardiaques (CK-MB, troponine), et thrombotiques, fréquemment exigée par différents médecins spécialistes pour le suivi de la pathologie,
- La quantification et la détermination des MMPS impliquées et de leurs inhibiteurs. L'étude de la balance MMP/TIMP est un excellent marqueur du remodelage matriciel,

- La détermination de la balance oxydants/antioxydants, le stress oxydant étant un des mécanismes impliqués dans toutes les pathologies,
- L'évaluation de certaines cytokines pro-inflammatoires et inflammatoires (IL-8, IL-10) impliquées dans l'inflammation associée au processus d'athérosclérose,
- La détermination de certains marqueurs confirmant l'apoptose / nécrose à l'échelle moléculaire ,
- L'étude de l'effet d'une supplémentation en vitamines, tels que les vitamines B12,
  B6 ou l'acide folique, sur la réduction des effets causés par l'hyperhomocystéinémie,
- L'étude de l'effet d'un extrait d'une plante médicinale sur la réduction de maladies cardiovasculaires causées par l'hyperhomocystéinémie.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**
Aasvee, K. *et al.* (2006) 'Determinants of risk factors of atherosclerosis in the postinfarction period: The Tallinn MI Study', *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 66(3), pp. 191–199. doi: 10.1080/00365510600564881.

Abecassis, L. *et al.* (2004) 'Homocysteine and diagnostic tests for thrombophilias', *Immuno-Analyse et Biologie Specialisee*, 19(2), pp. 83–88. doi: 10.1016/j.immbio.2004.03.001.

Abu-Lebdeh, H. S. *et al.* (2006) 'Effects of insulin deprivation and treatment on homocysteine metabolism in people with type 1 diabetes', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(9), pp. 3344–3348. doi: 10.1210/jc.2006-0018.

Ai, Y. *et al.* (2017) 'Homocysteine induces hepatic steatosis involving ER stress response in high methionine diet-fedmice', *Nutrients*, 9(4), pp. 1–10. doi: 10.3390/nu9040346.

Akasaka, K. *et al.* (2005) 'Homocysteine promotes p38-dependent chemotaxis in bovine aortic smooth muscle cells', *Journal of Vascular Surgery*, 41(3), pp. 517–522. doi: 10.1016/j.jvs.2004.12.043.

Al-Shaer, M. H. *et al.* (2005) 'Effect of hyperhomocysteinemia induced by methionine administration on flow-mediated dilatation of the brachial artery in healthy subjects', *American Journal of Cardiology*, 95(3), pp. 428–430. doi: 10.1016/j.amjcard.2004.09.052.

Allain, C. C. *et al.* (1974) 'Enzymatic determination of total serum cholesterol', *Clinical Chemistry*, 20(4), pp. 470–475. doi: 10.1093/clinchem/20.4.470.

Anamnart, C. and Kitjarak, R. (2021) 'Effects of vitamin B12, folate, and entacapone on homocysteine levels in levodopa-treated Parkinson's disease patients: A randomized controlled study', *Journal of Clinical Neuroscience*. Elsevier Ltd, 88, pp. 226–231. doi: 10.1016/j.jocn.2021.03.047.

Anderson, M. E. (1998) 'Glutathione: An overview of biosynthesis and modulation', *Chemico-Biological Interactions*, 111–112, pp. 1–14. doi: 10.1016/S0009-2797(97)00146-4.

Aouichat Bouguerra, S. *et al.* (2004) 'Effect of high glucose concentration on collagen synthesis and cholesterol level in the phenotypic modulation of aortic cultured smooth muscle cells of sand rat (Psammomys obesus)', *Experimental Diabesity Research*, 5(3), pp. 227–235. doi: 10.1080/15438600490489793.

Arnadottir, M. *et al.* (1996) 'Hyperhomocysteinemia in cyclosporine-treated renal transplant recipients.', *Transplantation.*, 61(3), pp. 509–512. doi: 10.1097/00007890-199602150-00034.

Atar, I. *et al.* (2005) 'Beta blocker effects on plasma homocysteine levels in patients with hypertension', *Atherosclerosis*, 181(2), pp. 399–402. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.01.035.

Au-Yeung, K. K. W. *et al.* (2004) 'Hyperhomocysteinemia Activates Nuclear Factor-κB in Endothelial Cells via Oxidative Stress', *Circulation Research*, 94(1), pp. 28–36. doi: 10.1161/01.RES.0000108264.67601.2C.

Augier, T. *et al.* (1997) 'Medial elastic structure alterations in atherosclerotic arteries in minipigs: Plaque proximity and arterial site specificity', *Matrix Biology*, 15(7), pp. 455–467. doi: 10.1016/S0945-053X(97)90019-6.

Balcioğlu, A. S. *et al.* (2014) 'Epicardial adipose tissue thickness and plasma homocysteine in patients with metabolic syndrome and normal coronary arteries', *Diabetology and Metabolic Syndrome*, 6(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/1758-5996-6-62.

Barroso, M. *et al.* (2016) 'S-adenosylhomocysteine induces inflammation through NFkB: A possible role for EZH2 in endothelial cell activation', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier B.V., 1862(1), pp. 82–92. doi:

10.1016/j.bbadis.2015.10.019.

Baszczuk, A. and Kopczyński, Z. (2014) 'Hyperhomocysteinemia in patients with cardiovascular disease', *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 68, pp. 579–589. doi: 10.5604/17322693.1102340.

Bayés, B. *et al.* (2001) 'Homocysteine and lipid peroxidation in haemodialysis: Role of folinic acid and vitamin E', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 16(11), pp. 2172–2175. doi: 10.1093/ndt/16.11.2172.

Becher, P. M. *et al.* (2018) 'Role of Toll-like receptors and interferon regulatory factors in different experimental heart failure models of diverse etiology: IRF7 as novel cardiovascular stress-inducible factor', *PLoS ONE*, 13(3), pp. 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0193844.

Becker, J. S. *et al.* (2005) 'Hyperhomocysteinemia, a cardiac metabolic disease role of nitric oxide and the p22phox subunit of NADPH oxidase', *Circulation*, 111(16), pp. 2112–2118. doi: 10.1161/01.CIR.0000162506.61443.15.

Benavides, M. A. *et al.* (2007) 'Methionine inhibits cellular growth dependent on the p53 status of cells', *The American Journal of Surgery*, 193, pp. 274–283. doi: 10.1016/j.amjsurg.2006.07.016.

Bennett, M. R., Sinha, S. and Owens, G. K. (2016) 'Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis', *Circulation Research*, 118(4), pp. 692–702. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306361.

Berdja, S. *et al.* (2012) 'Impact of glucotoxicity induced in vivo and in vitro in Psammomys obesus', *Journal of Diabetes Mellitus*, 02(01), pp. 59–71. doi: 10.4236/jdm.2012.21010.

Berdja, S. *et al.* (2016) 'Glucotoxicity induced oxidative stress and inflammation in vivo and in vitro in psammomys obesus: Involvement of aqueous extract of brassica rapa rapifera', *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, pp. 1–14. doi: 10.1155/2016/3689208.

Bescond, A. *et al.* (1999) 'Influence of homocysteine on matrix metalloproteinase-2: Activation and activity', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 263(2), pp. 498–503. doi: 10.1006/bbrc.1999.1391.

Birch, C. S. *et al.* (2009) 'A novel role for vitamin B12: Cobalamins are intracellular antioxidants in vitro', *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc., 47(2), pp. 184–188. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.04.023.

Block, R. J. (1943) 'The Essential Amino Acid Requirements of Man.', *The Yale journal of biology and medicine*, 15(5), pp. 723–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21434105%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/artic lerender.fcgi?artid=PMC2601297.

Bodamer, O. A. *et al.* (2005) 'Creatine metabolism in combined methylmalonic aciduria and homocystinuria', *Annals of Neurology*, 57(4), pp. 557–560. doi: 10.1002/ana.20419.

Boubekri, A. and Gernigon, T. (2013) 'Influence des saisons sur la biologie de la reproduction du rat des sables du Sud-ouest Algérien Seasonal influence on the reproductive biology of the sand rats from the South west of Algeria', *Journal of Mammalogy*, 81(2), pp. 586–594.

Bouderba, S. *et al.* (2012) 'Hepatic mitochondrial alterations and increased oxidative stress in nutritional diabetes-prone Psammomys obesus model', *Experimental Diabetes Research*, 2012, pp. 1–8. doi: 10.1155/2012/430176.

Bradford, M. M. (1976) 'A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding', ANALYTICAL

BIOCHEMISTRY, 72, pp. 248-254. doi: doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Brew, K. and Nagase, H. (2010) 'Biochimica et Biophysica Acta The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity', *BBA - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V., 1803(1), pp. 55–71. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.01.003.

Brosnan, J. T. *et al.* (2004) 'Methylation demand: A key determinant of homocysteine metabolism', *Acta Biochimica Polonica*, 51(2), pp. 405–413. doi: 10.18388/abp.2004\_3580.

Buchman, A. L. (2009) 'The Addition of Choline to Parenteral Nutrition', *Gastroenterology*. Elsevier Inc., 137(5 SUPPL), pp. S119–S128. doi: 10.1053/j.gastro.2009.08.010.

Butz, L. W. and du Vigneaud, V. (1932) 'the Formation of a Homologue of Cystine By the Decomposition of Methionine With Sulfuric Acid', *Journal of Biological Chemistry*.  $\hat{A}$ <sup>©</sup> 1932 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 99(1), pp. 135–142. doi: 10.1016/s0021-9258(18)76074-2.

Cagnacci, A. *et al.* (2004) 'Comparison of the effect of oral and transdermal hormone therapy on fasting and postmethionine homocysteine levels', *Fertility and Sterility*, 81(1), pp. 99–103. doi: 10.1016/j.fertnstert.2003.05.026.

Campos-Mota, G. P. *et al.* (2017) 'Role of ERK1/2 activation and nNOS uncoupling on endothelial dysfunction induced by lysophosphatidylcholine', *Atherosclerosis*. Elsevier Ltd, 258, pp. 108–118. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.11.022.

Carnagarin, R. *et al.* (2021) 'Homocysteine predicts vascular target organ damage in hypertension and may serve as guidance for first-line antihypertensive therapy', *Journal of Clinical Hypertension*, 23(7), pp. 1380–1389. doi: 10.1111/jch.14265.

Carson, N. A. J. and Neill, D. W. (1962) 'Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland', *Archives of Disease in Childhood*, 37(195), pp. 505–513. doi: 10.1136/adc.37.195.505.

Carvajal, J. A. *et al.* (2000) 'Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation', *Journal of Cellular Physiology*, 184(3), pp. 409–420. doi: 10.1002/1097-4652(200009)184:3<409::AID-JCP16>3.0.CO;2-K.

Catargi, B. *et al.* (1999) 'Homocysteine, hypothyroidism, and effect of thyroid hormone replacement', *Thyroid*, 9(12), pp. 1163–1166. doi: 10.1089/thy.1999.9.1163.

Chai, H. *et al.* (2009) 'Ginsenoside Rb1 Attenuates Homocysteine-Augmented Guidewire Injury-Induced Intimal Hyperplasia in Mice', *Journal of Surgical Research*. Elsevier Ltd, 157(2), pp. 193–198. doi: 10.1016/j.jss.2008.07.005.

Chaouad, B. *et al.* (2019) 'Hyperhomocysteinemia and myocardial remodeling in the sand rat , Psammomys obesus', *Acta Histochemica*, 121(July), pp. 823–832. doi: 10.1016/j.acthis.2019.07.008.

Charfeddine, S. *et al.* (2022) 'Associated factors and sub-clinical myocardial dysfunction in obese patients with masked hypertension', *Annales de Cardiologie et d'Angeiologie*, 71(1), pp. 6–10. doi: 10.1016/j.ancard.2021.05.005.

Charpiot, P. *et al.* (1998) 'Hyperhomocysteinemia induces elastolysis in minipig arteries: Structural consequences, arterial site specificity and effect of captopril-hydrochlorothiazide', *Matrix Biology*, 17(8–9), pp. 559–574. doi: 10.1016/S0945-053X(98)90108-1.

Chaturvedi, P. *et al.* (2016) 'High Methionine Diet Poses Cardiac Threat: A Molecular Insight', *Journal of Cellular Physiology*, 231(7), pp. 1554–1561. doi: 10.1002/jcp.25247.

Chaussalet, M. *et al.* (2004) 'Homocysteine modulates the proteolytic potential of human vascular endothelial cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316(1), pp. 170–176. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.02.027.

Chauveau, P. et al. (1992) 'Increased plasma homocysteine concentration in patients with chronic renal failure.', *Miner Electrolyte Metab.*, 18(2), pp. 196-198.

Chauveau, P. *et al.* (1993) 'Hyperhomocysteinemia, a risk factor for atherosclerosis in chronic uremic patients.', *Kidney Int Suppl.*, 41, pp. S72-577.

Chen, M. (2009) Influence des donneurs de méthyle et du métabolisme de l'homocystéine dans la physiopathologie des MICI : études de population et modèle expérimental chez le raton carencé. UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ - NANCY I - FRANCE.

Chiang, P. et al. (1996) 'S-Adenosylmethionine and methylation.', FASEB J., 10(4), pp. 471–80.

Chinbo, M. *et al.* (2015) 'Rôle du monoxyde d' azote dans l' athérosclérose Nitric oxide role in atherosclerosis', *Journal de Biologie Médicale*, 1(3), pp. 133–137. doi: 10.13140/RG.2.1.2085.9607.

Christensen, B. *et al.* (1991) 'Homocysteine Export From Cells Cultured in the Presence of Physiological or Superfluous levels of Methionine: Methionine Loading of Non-Transformed, Transformed, Proliferahg, and Quiescent Cells in Culture', *JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY*, (146), pp. 52–62. doi: 10.1002/jcp.1041460108.

Christensen, K. E. *et al.* (2010) 'Steatosis in mice is associated with gender, folate intake, and expression of genes of one-carbon metabolism', *Journal of Nutrition*, 140(10), pp. 1736–1741. doi: 10.3945/jn.110.124917.

Cohen, E. *et al.* (2015) 'Assessment of a possible link between hyperhomocysteinemia and hyperuricemia', *Journal of Investigative Medicine*, 63(3), pp. 534–538. doi: 10.1097/JIM.00000000000152.

Colleran, K. M., Ratliff, D. M. and Burge, M. R. (2003) 'Potential association of thyrotoxicosis with vitamin B and folate deficiencies, resulting in risk for hyperhomocysteinemia and subsequent thromboembolic events', *Endocrine Practice*, 9(4), pp. 290–295. doi: 10.4158/ep.9.4.290.

Cook, R. J. and Wagner, C. (1984) 'Glycine N-methyltransferase is a folate binding protein of rat liver cytosol', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(12 I), pp. 3631–3634. doi: 10.1073/pnas.81.12.3631.

Dai, Y. *et al.* (2016) 'Association of homocysteine level with biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease: A meta-analysis', *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 58(1), pp. 76–83. doi: 10.3164/jcbn.15-54.

Daly, M. and Daly, S. (1973) 'ON THE FEEDING ECOLOGY OF PSAMMOMYS OBESUS (RODENTIA, GERBILLIDAE) IN THE WADI SAOURA, ALGERIA M.', *Mammalia*, 37(4), pp. 545–561. doi: doi:10.1515/mamm.1973.37.4.545.

Dayal, S. *et al.* (2006) 'Enhanced susceptibility to arterial thrombosis in a murine model of hyperhomocysteinemia', *Blood*, 108(7), pp. 2237–2243. doi: 10.1182/blood-2006-02-005991.

Dedoussis, G. V. Z. *et al.* (2005) 'An association between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation and inflammation markers related to cardiovascular disease', *International Journal of Cardiology*, 100(3), pp. 409–414. doi: 10.1016/j.ijcard.2004.08.038.

den Dekker, W. K. et al. (2010) 'Toll like receptor 4 in atherosclerosis and plaque

destabilization', *Atherosclerosis*. Elsevier Ireland Ltd, 209(2), pp. 314–320. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.09.075.

Demuth, K. *et al.* (2000) 'Hyperhomocystéinémie et athérosclerose.', *Médecine sciences*, 16, pp. 1081–1090.

Denolle, T. *et al.* (2017) 'Control of cardiovascular risk factors in coronary patients one year after cardiac rehabilitation', *Annales de Cardiologie et d'Angeiologie*. Elsevier Masson SAS, 66(3), pp. 135–139. doi: 10.1016/j.ancard.2017.04.005.

Devi, S. *et al.* (2006) 'Effect of long-term hyperhomocysteinemia on myocardial structure and function in hypertensive rats', *Cardiovascular Pathology*, 15(2), pp. 75–82. doi: 10.1016/j.carpath.2005.11.001.

Devlin, A. M. and Lentz, S. R. (2006) 'ApoA-I: A missing link between homocysteine and lipid metabolism?', *Circulation Research*, 98(4), pp. 431–433. doi: 10.1161/01.RES.0000214406.87060.e0.

Dietrich-Muszalska, A. *et al.* (2012) 'The oxidative stress may be induced by the elevated homocysteine in schizophrenic patients', *Neurochemical Research*, 37(5), pp. 1057–1062. doi: 10.1007/s11064-012-0707-3.

Djuric, D. et al. (2018) 'Overview of the Roles in the Pathology of the Cardiovascular', Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 96, pp. 991–1003.

Doronzo, G. *et al.* (2010) 'Role of NMDA receptor in homocysteine-induced activation of Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphatidyl Inositol 3-Kinase pathways in cultured human vascular smooth muscle cells', *Thrombosis Research*. Elsevier Ltd, 125(2), pp. e23–e32. doi: 10.1016/j.thromres.2009.08.015.

Doumas, B. T. *et al.* (1981) 'A candidate reference method for determination of total protein in serum. I. Development and validation', *Clin. Chem.*, 27, pp. 1642–1650.

Dubey, G. P. *et al.* (2022) 'Homocysteine metabolism in health and disease.', in *Springer*, p. 285. doi: 10.1007/978-981-16-6867-8.

Eagle, H. (1955) 'The specific amino acid requirements of a mammalian cell (strain L) in tissue culture.', *The Journal of biological chemistry*. © 1955 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 214(2), pp. 839–852. doi: 10.1016/s0021-9258(18)70932-0.

Ebbesen, L. S. and Ingerslev, J. (2005) 'Folate deficiency-induced hyperhomocysteinemia attenuates, and folic acid supplementation restores, the functional activities of rat coagulation factors XII, X, and II', *J. Nutr.*, 135, pp. 1836–1840. doi: 10.1093/jn/135.8.1836.

Ebrahimpour, A. *et al.* (2018) 'Direct correlation between serum homocysteine level and insulin resistance index in patients with subclinical hypothyroidism: Does subclinical hypothyroidism increase the risk of diabetes and cardio vascular disease together?', *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*. Diabetes India, 12(6), pp. 863–867. doi: 10.1016/j.dsx.2018.05.002.

Esse, R. *et al.* (2019) 'The contribution of homocysteine metabolism disruption to endothelial dysfunction: State-of-the-art', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), pp. 1–24. doi: 10.3390/ijms20040867.

Essouma, M. and Noubiap, J. J. N. (2015) 'Therapeutic potential of folic acid supplementation for cardiovascular disease prevention through homocysteine lowering and blockade in rheumatoid arthritis patients', *Biomarker Research*. Biomarker Research, 3, p. 24. doi: 10.1186/s40364-015-0049-9.

Falcon, C. R. *et al.* (1994) 'High prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with juvenile venous thrombosis', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 14(7), pp. 1080–1083. doi: 10.1161/01.ATV.14.7.1080.

Fimognari, F. L. *et al.* (2009) 'Hyperhomocysteinaemia and poor vitamin B status in chronic obstructive pulmonary disease', *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. Elsevier Ltd, 19(9), pp. 654–659. doi: 10.1016/j.numecd.2008.12.006.

Finkelstein, J. D. and Martin, J. J. (2000) 'Homocysteine', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 32, pp. 385–389. doi: 10.1016/s1357-2725(99)00138-7.

Fossati, P. and Prencipe, L. (1982) Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide, Clinical Chemistry. doi: 10.1093/clinchem/28.10.2077.

Frantzen, F. *et al.* (1998) 'Enzyme conversion immunoassay for determining total homocysteine in plasma or serum', *Clinical Chemistry*, 44(2), pp. 311–316. doi: 10.1093/clinchem/44.2.311.

Fu, Y. F., Xiong, Y. and Fu, S. H. (2003) 'Captopril restores endothelium-dependent relaxation of rat aortic rings after exposure to homocysteine', *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 42(4), pp. 566–572. doi: 10.1097/00005344-200310000-00016.

Fu, Y. F., Xiong, Y. and Guo, Z. (2005) 'A reduction of endogenous asymmetric dimethylarginine contributes to the effect of captopril on endothelial dysfunction induced by homocysteine in rats', *European Journal of Pharmacology*, 508(1–3), pp. 167–175. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.11.063.

Ganji, V. and Kafai, M. R. (2003) 'Demographic, health, lifestyle, and blood vitamin determinants of serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994.', *The American journal of clinical nutrition*, 77(4), pp. 826–833. doi: 10.1093/ajcn/77.4.826.

Ghasemzadeh, Z. *et al.* (2016) 'Divergent pathway of lipid profile components for cardiovascular disease and mortality events: Results of over a decade follow-up among Iranian population', *Nutrition and Metabolism*. Nutrition & Metabolism, 13(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s12986-016-0102-1.

Ghoul, A. (2009) 'Hyperhomocystéinémie et remodelage de la matrice extracellulaire testiculaire, épididymaire et vésiculaire chez le rat Wistar, Rattus norvegicus.', in *Thèse de Magister*. USTHB. Alger., p. 125.

Ghoul, A. *et al.* (2017) 'The role of homocysteine in seminal vesicles remodeling in rat', *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 55(2), pp. 62–73. doi: 10.5603/FHC.a2017.0010.

Giltay, E. J. *et al.* (1998) 'Effects of sex steroids on plasma total homocysteine levels: A study in transsexual males and females', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(2), pp. 550–553. doi: 10.1210/jcem.83.2.4574.

Girs, N. and Giet, D. (2006) 'Le dosage de l'homocystéine intéresse-T-il le médecin généraliste?', *Revue Medicale de Liege*, 61(5–6), pp. 352–361.

Goksel, B. K. *et al.* (2007) 'Subclinical hypothyroidism, hyperhomocysteinemia and dyslipidemia: Investigating links with ischemic stroke in Turkish patients', *Neurological Research*, 29(8), pp. 871–876. doi: 10.1179/016164107X181833.

Goulopoulou, S., McCarthy, C. G. and Clinton Webb, R. (2016) 'Toll-like receptors in the vascular system: Sensing the dangers within', *Pharmacological Reviews*, 68(1), pp. 142–167. doi: 10.1124/pr.114.010090.

Govindaraju, V. and Rao, H. (2011) 'Hyperhomocysteinemia and atherosclerosis - An overveiw', *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(4), pp. 348–354.

Guieu, R., Ruf, J. and Mottola, G. (2022) 'Hyperhomocysteinemia and cardiovascular diseases', *Ann Biol Clin*, 80(1), pp. 7–14. doi: 10.1684/abc.2021.1694.

Guilland, J. C., Favier, A., De Courcy, G. P., *et al.* (2003) 'L'hperhomocystéinémie: Facteur de risque cardiovasculaire ou simple marqueur? 2. Données épidémiologiques', *Pathologie Biologie*, 51(2), pp. 111–121. doi: 10.1016/S0369-8114(03)00105-6.

Guilland, J. C., Favier, A., Potier de Courcy, G., *et al.* (2003) 'L'hyperhomocystéinémie: Facteur de risque cardiovasculaire ou simple marqueur? 1. Données fondamentales', *Pathologie Biologie*, 51(2), pp. 101–110. doi: 10.1016/S0369-8114(03)00104-4.

van Guldener, C., Gans, R. O. and ter Wee, P. M. (1995) 'Constant infusion clearance is an inappropriate method for accurate assessment of an impaired glomerular filtration rate.', *Nephrol Dial Transplant.*, 10(1), pp. 47–51.

Guo, G. *et al.* (2018) 'Comparison of oxidative stress biomarkers in hypertensive patients with or without hyperhomocysteinemia', *Clinical and Experimental Hypertension*. Taylor & Francis, 40(3), pp. 262–266. doi: 10.1080/10641963.2017.1368535.

Gursu, M. F. *et al.* (2002) 'Insulin increases homocysteine levels in a dose-dependent manner in diabetic rats', *Archives of Medical Research*, 33(3), pp. 305–307. doi: 10.1016/S0188-4409(01)00379-4.

Guttormsen, A. B. *et al.* (1997) 'Kinetic basis of hyperhomocysteinemia in patients with chronic renal failure', *Kidney International*, 52(2), pp. 495–502. doi: 10.1038/ki.1997.359.

Hamdis, N. (2011a) 'Remodelage de la matrice extracellulaire cardiaque induit par différentes doses de méthionine chez le Rat Wistar, Rattus norvegicus.', in *Thèse de Magister. USTHB. Alger.*, p. 65.

Hamdis, N. (2011b) 'Remodelage de la matrice extracellulaire cardiaque induit par différentes doses de méthionine chez le Rat Wistar, Rattus norvegicus.', in *Thèse de Magister. USTHB. Alger.*, p. 65.

Hamidatou Khati, W. *et al.* (2023) 'Progress in research on the reproductive function in the sand rat (Psammomys obesus): A review', *General and Comparative Endocrinology*. Elsevier Inc., 331(June 2022), p. 114161. doi: 10.1016/j.ygcen.2022.114161.

Hamlat, N. *et al.* (2010) 'Lipogenesis in arterial wall and vascular smooth muscle cells of Psammomys obesus: Its regulation and abnormalities in diabetes', *Diabetes and Metabolism*. Elsevier Masson SAS, 36(3), pp. 221–228. doi: 10.1016/j.diabet.2010.01.003.

Han, X., Eggett, D. L. and Parker, T. L. (2018) 'Evaluation of the Health Benefits of a Multivitamin, Multimineral, Herbal, Essential Oil–Infused Supplement: A Pilot Trial', *Journal of Dietary Supplements*. Taylor & Francis, 15(2), pp. 153–160. doi: 10.1080/19390211.2017.1331943.

Harma, Muge *et al.* (2005) 'Intranasal 17β-estradiol treatment and Vitamin B12, folate and homocysteine in menopause', *Maturitas*, 50(4), pp. 353–358. doi: 10.1016/j.maturitas.2004.09.002.

Harrison, M. J. G. and Ross Russell, R. W. (1972) 'Effect of dexamethasone on experimental cerebral infarction in the gerbil', *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 35(4), pp. 520–521. doi: 10.1136/jnnp.35.4.520.

Hasan, T. et al. (2019) 'Disturbed homocysteine metabolism is associated with cancer', *Experimental and Molecular Medicine*. Springer US, 51(2), p. 21. doi: 10.1038/s12276-019-

0216-4.

Herrmann, W. *et al.* (2005) 'Disturbed homocysteine and methionine cycle intermediates S-adenosylhomocysteine and S-adenosylmethionine are related to degree of renal insufficiency in type 2 diabetes', *Clinical Chemistry*, 51(5), pp. 891–897. doi: 10.1373/clinchem.2004.044453.

Herrmann, W. *et al.* (2007) 'Homocysteine, brain natriuretic peptide and chronic heart failure: A critical review', *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 45(12), pp. 1633–1644. doi: 10.1515/CCLM.2007.360.

Hidiroglou, N. *et al.* (2004) 'The influence of dietary vitamin E, fat, and methionine on blood cholesterol profile, homocysteine levels, and oxidizability of low density lipoprotein in the gerbil', *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(12), pp. 730–740. doi: 10.1016/j.jnutbio.2004.04.009.

Holven, K. B. *et al.* (2003) 'Hyperhomocysteinemic subjects have enhanced expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in mononuclear cells', *J Nutr*, 133(11), pp. 3588–3591. doi: 10.1093/jn/133.11.3588.

Holven, K. B. *et al.* (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(7), pp. 1731–1736. doi: 10.1161/01.STR.0000226465.84561.cb.

Hortin, G. L., Seam, N. and Hoehn, G. T. (2006) 'Bound homocysteine, cysteine, and cysteinylglycine distribution between albumin and globulins', *Clinical Chemistry*, 52(12), pp. 2258–2264. doi: 10.1373/clinchem.2006.074302.

House, J. D., Brosnan, M. E. and Brosnan, J. T. (1998) 'Renal uptake and excretion of homocysteine in rats with acute hyperhomocysteinemia', *Kidney International*, 54(5), pp. 1601–1607. doi: 10.1046/j.1523-1755.1998.00144.x.

Hu, R. *et al.* (2005) 'Smoking, homocysteine and degree of arteriolar retinopathy', *Atherosclerosis*, 183(1), pp. 95–100. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.01.053.

Hu, Y., Xu, Y. and Wang, G. (2019) 'Homocysteine levels are associated with endothelial function in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus patients', *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 17(6), pp. 323–327. doi: 10.1089/met.2019.0011.

Huang, P. *et al.* (2015) 'Homocysteine and the risk of age-related macular degeneration: A systematic review and meta-analysis', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 5(April), pp. 1–9. doi: 10.1038/srep10585.

Hubmacher, D. *et al.* (2011) 'Homocysteine Modifies Structural and Functional Properties of Fibronectin and Interferes with the Fibronectin À Fibrillin-1 Interaction', *Biochemistry*, 50(23), pp. 5322–5332.

Hung, J. *et al.* (2003) 'Folate and vitamin B-12 and risk of fatal cardiovascular disease: Cohort study from Busselton, Western Australia', *British Medical Journal*, 326(7381), pp. 131–134. doi: 10.1136/bmj.326.7381.131.

Inoue, K. *et al.* (2020) 'Association of Subclinical Hypothyroidism and Cardiovascular Disease with Mortality', *JAMA Network Open*, 3(2), pp. 1–12. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2019.20745.

Jacobs, F. *et al.* (2011) 'Correction of endothelial dysfunction after selective homocysteine lowering gene therapy reduces arterial thrombogenicity but has no effect on atherogenesis', *Journal of Molecular Medicine*, 89(10), pp. 1051–1058. doi: 10.1007/s00109-011-0778-7.

Jacques, P. *et al.* (1996) 'Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations.', *Circulation.*, 93(1), pp. 7–9. doi: 10.1161/01.cir.93.1.7.

Jacques, P. F. *et al.* (2003) 'Effects of polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase on total plasma homocysteine in the NHLBI Family Heart Study', *Atherosclerosis*, 166(1), pp. 49–55. doi: 10.1016/S0021-9150(02)00204-6.

Jakubowski, H. (2002) 'Homocysteine is a protein amino acid in humans: Implications for homocysteine-linked disease', *Journal of Biological Chemistry*, 277(34), pp. 30425–30428. doi: 10.1074/jbc.C200267200.

Jencks, D. A. and Mathews, R. G. (1987) 'Allosteric inhibition of methylenetetrahydrofolate reductase by adenosylmethionine. Effects of adenosylmethionine and NADPH on the equilibrium between active and inactive forms of the enzyme and on the kinetics of approach to equilibrium.', *J Biol Chem*, 26(2), pp. 2485–2493.

Jenkins, D. J. A. *et al.* (2002) 'Effects of high- and low-isoflavone soyfoods on blood lipids, oxidized LDL, homocysteine, and blood pressure in hyperlipidemic men and women', *American Journal of Clinical Nutrition*, 76(2), pp. 365–372. doi: 10.1093/ajcn/76.2.365.

Jeremic, N. *et al.* (2017) 'Ablation of Toll-like receptor 4 mitigates central blood pressure response during hyperhomocysteinemia', *Journal of Hypertension*, 35(11), pp. 2226–2237. doi: 10.1097/HJH.00000000001460.

Jeremic, N., Weber, G. J. and Tyagi, S. C. (2017) 'Ablation of Toll-like Receptor 4 Mitigates Cardiac Mitochondrial Dysfunction in Hyperhomocysteinemia', *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 95(11), pp. 1369–1375. doi: 10.1139/cjpp-2016-0744.

Joseph, J. *et al.* (2003) 'Hyperhomocysteinemia leads to pathological ventricular hypertrophy in normotensive rats', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 285(2 54-2), pp. 679–686. doi: 10.1152/ajpheart.00145.2003.

Joseph, J. *et al.* (2008) 'Effect of Anti-oxidant Treatment on Hyperhomocysteinemia-induced Myocardial Fibrosis and Diastolic Dysfunction', *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 27(11), pp. 1237–1241. doi: 10.1016/j.healun.2008.07.024.

Jungers, P. *et al.* (1997) 'Incidence and risk factors of atherosclerotic cardiovascular accidents in predialysis chronic renal failure patients: A prospective study', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 12(12), pp. 2597–2602. doi: 10.1093/ndt/12.12.2597.

Kaplan, P. *et al.* (2020) 'Homocysteine and mitochondria in cardiovascular and cerebrovascular systems', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), pp. 1–19. doi: 10.3390/ijms21207698.

Kar, S. *et al.* (2019) 'Hydrogen sulfide ameliorates homocysteine-induced cardiac remodeling and dysfunction', *Frontiers in Physiology*, 10(MAY). doi: 10.3389/fphys.2019.00598.

Kawakami, K. *et al.* (1989) 'A rapid electrophoretic method for the detection of serum Lp(a) lipoprotein', *Clinica Chimica Acta*, 185(2), pp. 147–155. doi: 10.1016/0009-8981(89)90037-5.

Kawamoto, R. *et al.* (2019) 'Diabetes & Metabolic Syndrome : Clinical Research & Reviews Serum uric acid to creatinine ratio is a useful predictor of renal dysfunction among diabetic persons', *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. Elsevier Ltd, 13(3), pp. 1851–1856. doi: 10.1016/j.dsx.2019.04.023.

Kenny, H. C. and Abel, E. D. (2019) 'Heart Failure in Type 2 Diabetes Mellitus: Impact of Glucose-Lowering Agents, Heart Failure Therapies, and Novel Therapeutic Strategies', *Circulation Research*, 124(1), pp. 121–141. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.311371.

Kharbanda, K. K. *et al.* (2005) 'A comparison of the effects of betaine and S-adenosylmethionine on ethanol-induced changes in methionine metabolism and steatosis in rat hepatocytes', *Journal of Nutrition*, 135(3), pp. 519–524. doi: 10.1093/jn/135.3.519.

Kim, H. J. *et al.* (2020) 'The different relationship between homocysteine and uric acid levels with respect to the MTHFR C677T polymorphism according to gender in patients with cognitive impairment', *Nutrients*, 12(4), pp. 1–13. doi: 10.3390/nu12041147.

Kirac, D., Negis, Y. and Ozer, N. K. (2013) 'Vitamin E attenuates homocysteine and cholesterol induced damage in rat aorta', *Cardiovascular Pathology*. Elsevier Inc., 22(6), pp. 465–472. doi: 10.1016/j.carpath.2013.03.007.

Kolling, J. *et al.* (2017) 'Severe Hyperhomocysteinemia Decreases Creatine Kinase Activity and Causes Memory Impairment: Neuroprotective Role of Creatine', *Neurotoxicity Research*. Neurotoxicity Research, 32(4), pp. 585–593. doi: 10.1007/s12640-017-9767-0.

Lai, C. H. *et al.* (2016) 'Toll-like receptor 4 is essential in the development of abdominal aortic aneurysm', *PLoS ONE*, 11(1), pp. 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0146565.

Lai, W. K. C. and Kan, M. Y. (2015) 'Homocysteine-induced endothelial dysfunction', *Annals of Nutrition and Metabolism*, 67(1), pp. 1–12. doi: 10.1159/000437098.

Lazzerini, P. E. *et al.* (2007) 'Hyperhomocysteinemia, inflammation and autoimmunity', *Autoimmunity Reviews*, 6(7), pp. 503–509. doi: 10.1016/j.autrev.2007.03.008.

Lee, S. J. *et al.* (2012) 'Homocysteine enhances MMP-9 production in murine macrophages via ERK and Akt signaling pathways', *Toxicology and Applied Pharmacology*. Elsevier Inc., 260(1), pp. 89–94. doi: 10.1016/j.taap.2012.01.026.

Lerman, R. H. *et al.* (2014) 'A Phytochemical-rich Multivitamin-multimineral Supplement is Bioavailable and Reduces Serum Oxidized Low-density Lipoprotein, Myeloperoxidase, and Plasminogen Activator Inhibitor-1 in a Four-week Pilot trial of Healthy Individuals', *Global Advances in Health and Medicine*, 3(2), pp. 34–39. doi: 10.7453/gahmj.2013.098.

Lévy, J. (2020) Intérêt de l'homocystéine dans l'évaluation du risque cardiovasculaire au CHRU de Nancy. Médecine humaine et pathologie.

Li, N., Chen, Y. F. and Zou, A. P. (2002) 'Implications of hyperhomocysteinemia in glomerular sclerosis in hypertension', *Hypertension*, 39(2 II), pp. 443–448. doi: 10.1161/hy02t2.102992.

Liao, D. *et al.* (2006) 'Hyperhomocysteinemia decreases circulating high-density lipoprotein by inhibiting apolipoprotein A-I protein synthesis and enhancing HDL cholesterol clearance', *Circulation Research*, 99(6), pp. 598–606. doi: 10.1161/01.RES.0000242559.42077.22.

Lin, H. C., Song, T. Y. and Hu, M. L. (2009) 'S-Adenosylhomocysteine promotes the invasion of C6 glioma cells via increased secretion of matrix metalloproteinase-2 in murine microglial BV2 cells', *Toxicological Sciences*, 112(2), pp. 322–330. doi: 10.1093/toxsci/kfp218.

Liu, L. *et al.* (2015) 'Up-regulated TLR4 in cardiomyocytes exacerbates heart failure after long-term myocardial infarction', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(12), pp. 2728–2740. doi: 10.1111/jcmm.12659.

De Luis, D. A. *et al.* (2005) 'Total homocysteine levels relation with chronic complications of diabetes, body composition, and other cardiovascular risk factors in a population of patients with diabetes mellitus type 2', *Journal of Diabetes and its Complications*, 19(1), pp. 42–46. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2003.12.003.

Luo, X. et al. (2014) 'Homocysteine downregulates gene expression of heme oxygenase-1 in

hepatocytes', Nutrition and Metabolism, 11(1), pp. 1-10. doi: 10.1186/1743-7075-11-55.

Lussier-Cacan, S. *et al.* (1996) 'Plasma total homocysteine in healthy subjects: sex-specific relation with biological traits', *Am J Clin Nutr*, 64(4), pp. 587–593. doi: 10.1093/ajcn/64.4.587.

Lv, D. *et al.* (2021) 'Plasma levels of homocysteine is associated with liver fibrosis in health check-up population', *International Journal of General Medicine*, 14, pp. 5175–5181. doi: 10.2147/IJGM.S329863.

Lynch, S. M. and Strain, J. J. (1989) 'Increased hepatic lipid peroxidation with methionine toxicity in the rat', *Free Radical Research*, 5(4–5), pp. 221–226. doi: 10.3109/10715768909074704.

Ma, S. C. *et al.* (2017) 'Homocysteine-induced oxidative stress through TLR4/NF- $\kappa$ B/DNMT1-mediated LOX-1 DNA methylation in endothelial cells', *Molecular Medicine Reports*, 16(6), pp. 9181–9188. doi: 10.3892/mmr.2017.7753.

Majumder, A. *et al.* (2019) 'Restoration of skeletal muscle homeostasis by hydrogen sulfide during hyperhomocysteinemia-mediated oxidative/ER-stress condition', *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 97, pp. 1–46. doi: 10.1139/cjpp-2018-0501.

Marchesoni, D. *et al.* (2003) 'Menopause rather than estrogen modifies plasma homocysteine levels', *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 81(3), pp. 293–297. doi: 10.1016/S0020-7292(03)00005-5.

Maron, B. A. and Loscalzo, J. (2009) 'The treatment of hyperhomocysteinemia', *Annual Review of Medicine*, 60, pp. 39–54. doi: 10.1146/annurev.med.60.041807.123308.

Marsh, E. (1999) 'Coenzyme B12 (cobalamin)-dependent enzymes.', *Essays Biochem.*, 34, pp. 139-154. doi: 10.1042/bse0340139.

Martinez, E. (2015) *Etude des mécanismes contribuant aux effets des variations de l'apport en précurseurs de méthyles sur le protéome cardiaque.* 

Martoja, R. and Martoja, M. (1967) Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et.

Massy, Z. A. *et al.* (1994) 'Hyperhomocysteinaemia: A significant risk factor for cardiovascular disease in renal transplant recipients', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 9(8), pp. 1103–1108. doi: 10.1093/ndt/9.8.1103.

Matté, C. *et al.* (2009) 'Homocysteine induces oxidative stress, inflammatory infiltration, fibrosis and reduces glycogen/glycoprotein content in liver of rats', *International Journal of Developmental Neuroscience*, 27(4), pp. 337–344. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2009.03.005.

Mayer, O. *et al.* (2002) 'Treatment of hyperhomocysteinemia with folic acid: Effects on homocysteine levels, coagulation status, and oxidative stress markers', *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 39(6), pp. 851–857. doi: 10.1097/00005344-200206000-00010.

McCully, K. (1969) 'Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis.', *Am J Pathol*, 56(1), pp. 111–128.

McCully, K. S. (1975) 'Growth disorders and homocysteine metabolism.', Ann. Clin. Lab. Sci., 5, pp. 147-152.

McCully, K. S. (2016) 'Homocysteine metabolism, atherosclerosis, and diseases of aging', *Comprehensive Physiology*, 6(1), pp. 471–505. doi: 10.1002/cphy.c150021.

McDowell, I. F. W. and Lang, D. (2000) 'Homocysteine and endothelial dysfunction: A link

with cardiovascular disease', Journal of Nutrition, 130(2 SUPPL.), pp. 369–372. doi: 10.1093/jn/130.2.369s.

Mezdour, H. *et al.* (1990) 'Lipoprotein (a). An additional marker of atherosclerosis', *Ann Biol Clin*, 48(3), pp. 139-153.

Mikael, L. G. *et al.* (2009) 'Hyperhomocysteinemia is associated with hypertriglyceridemia in mice with methylenetetrahydrofolate reductase deficiency', *Molecular Genetics and Metabolism.* Elsevier Inc., 98(1–2), pp. 187–194. doi: 10.1016/j.ymgme.2009.05.011.

Miller, A. *et al.* (2000) 'Hyperhomocyst(e)inemia induces multiorgan damage', *Heart and Vessels*, 15(3), pp. 135–143. doi: 10.1007/s003800070030.

Miller, W. *et al.* (1992) 'Effect of vitamin B-6 deficiency on fasting plasma homocysteine concentrations', *Am J Clin Nutr*., 55(6), pp. 1154–1160.

Miner, S. E. S., Evrovski, J. and Cole, D. E. C. (1997) 'Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: An update', *Clinical Biochemistry*, 30(3), pp. 189–201. doi: 10.1016/S0009-9120(96)00172-5.

Molina-López, J. *et al.* (2016) 'Pyridoxal-5'-phosphate deficiency is associated with hyperhomocysteinemia regardless of antioxidant, thiamine, riboflavin, cobalamine, and folate status in critically ill patients', *Clinical Nutrition*, 35(3), pp. 706–712. doi: 10.1016/j.clnu.2015.04.022.

Mori, N. and Hirayama, K. (2000) 'Long-term consumption of a methionine-supplemented diet increases iron and lipid peroxide levels in rat liver', *Journal of Nutrition*, 130(9), pp. 2349–2355. doi: 10.1093/jn/130.9.2349.

Mudd, S. H. *et al.* (1964) 'HOMOCYSTINURIA: AN ENZYMATIC DEFECT', *Science*, 143, pp. 1443-1445. doi: 10.1126/science.143.3613.1443.

Mudd, S. H. *et al.* (2000) 'Homocysteine and Its Disulfide Derivatives', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(7), pp. 1704–1706. doi: 10.1161/01.atv.20.7.1704.

Mudd, S. H., Ebert, M. H. and Scriver, C. R. (1980) 'Labile methyl group balances in the human: The role of sarcosine', *Metabolism: Clinical and Experimental*, 29(8), pp. 707–720. doi: 10.1016/0026-0495(80)90192-4.

Mudd, S. H. and Poole, J. R. (1975) 'Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens', *Metabolism*, 24(6), pp. 721–735. doi: 10.1016/0026-0495(75)90040-2.

Mursleen, M. T. and Riaz, S. (2017) 'Implication of homocysteine in diabetes and impact of folate and vitamin B12 in diabetic population', *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*. Diabetes India, 11, pp. S141–S146. doi: 10.1016/j.dsx.2016.12.023.

Mursu, J. *et al.* (2005) 'The effects of coffee consumption on lipid peroxidation and plasma total homocysteine concentrations: A clinical trial', *Free Radical Biology and Medicine*, 38(4), pp. 527–534. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.11.025.

Murthy, S. N. *et al.* (2005) 'Rosiglitazone reduces serum homocysteine levels, smooth muscle proliferation, and intimal hyperplasia in Sprague-Dawley rats fed a high methionine diet', *Metabolism: Clinical and Experimental*, 54(5), pp. 645–652. doi: 10.1016/j.metabol.2004.12.008.

Nair, C. P., Viswanathan, G. and Noronha, J. M. (1994) 'Folate-mediated incorporation of ring-2-carbon of histidine into nucleic acids: influence of thyroid hormone', *Metabolism*, 43(12), pp. 1575–1578. doi: 10.1016/0026-0495(94)90019-1.

Naruszewicz, M. et al. (2007) 'Hyperhomocysteinemia in patients with symptomatic chronic heart failure: Prevalence and prognostic importance-pilot study', *Atherosclerosis*, 194(2), pp.

408-414. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.08.014.

Nesher, R. *et al.* (1999) 'Interaction between genetic and dietary factors determines  $\beta$ -cell function in Psammomys obesus, an animal model of type 2 diabetes', *Diabetes*, 48(4), pp. 731–737. doi: 10.2337/diabetes.48.4.731.

Niu, X. *et al.* (2021) 'A Cross-sectional Study on the Relationship Between Homocysteine and Lipid Profiles Among Chinese Population from Hunan', *Lipids*, 56(1), pp. 93–100. doi: 10.1002/lipd.12279.

Olszewski, A. J. and McCully, K. S. (1993) 'Homocysteine metabolism and the oxidative modification of proteins and lipids', *Free Radical Biology and Medicine*, 14(6), pp. 683–693. doi: 10.1016/0891-5849(93)90151-J.

Van Oort, F. V. A. *et al.* (2003) 'Folic acid and reduction of plasma homocysteine concentrations in older adults: A dose-response study', *American Journal of Clinical Nutrition*, 77(5), pp. 1318–1323. doi: 10.1093/ajcn/77.5.1318.

Othmani-Mecif, K. *et al.* (2006) 'Variations in plasma matrix metalloproteinases and placental pregnancy-associated glycoproteins during gestation in rabbits (Oryctolagus cuniculus)', *World Rabbit Science*, 14(1), pp. 39–50.

Othmani Mecif, K., Bouguerra, S. A. and Benazzoug, Y. (2017) 'Plasma and Aorta Biochemistry and MMPs Activities in Female Rabbit Fed Methionine Enriched Diet and Their Offspring', *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2017, p. 17. doi: 10.1155/2017/2785142.

Paganelli, F. *et al.* (2021) 'Hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease: Is the adenosinergic system the missing link?', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), pp. 1–20. doi: 10.3390/ijms22041690.

Palmer, J. L. and Abeles, R. H. (1979) 'The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase.', *Journal of Biological Chemistry*.  $\hat{A}$ <sup>©</sup> 1979 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 254(4), pp. 1217–1226. doi: 10.1016/s0021-9258(17)34190-x.

Panagiotakos, D. B. *et al.* (2005) 'The association between lifestyle-related factors and plasma homocysteine levels in healthy individuals from the "ATTICA" Study', *International Journal of Cardiology*, 98(3), pp. 471–477. doi: 10.1016/j.ijcard.2003.12.036.

Pang, X. *et al.* (2014) 'Homocysteine induces the expression of C-reactive protein via NMDAr-ROS-MAPK-NF-κB signal pathway in rat vascular smooth muscle cells', *Atherosclerosis*, 236(1), pp. 73–81. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.06.021.

Park, C. M. *et al.* (2008) 'Methionine supplementation accelerates oxidative stress and nuclear factor kb activation in livers of C57BL/6 mice', *Journal of Medicinal Food*, 11(4), pp. 667–674. doi: 10.1089/jmf.2007.0146.

Perła-Kaján, J., Twardowski, T. and Jakubowski, H. (2007) 'Mechanisms of homocysteine toxicity in humans', *Amino Acids*, 32(4), pp. 561–572. doi: 10.1007/s00726-006-0432-9.

Perna, A. F. *et al.* (2006) 'Increased plasma protein homocysteinylation in hemodialysis patients', *Kidney International*, 69(5), pp. 869–876. doi: 10.1038/sj.ki.5000070.

Polyzos, S. A. *et al.* (2012) 'Serum homocysteine levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease', *Annals of Hepatology*. Elsevier, 11(1), pp. 68–76. doi: 10.1016/s1665-2681(19)31488-7.

Postea, O. et al. (2006) 'Stereospecific and redox-sensitive increase in monocyte adhesion to endothelial cells by homocysteine', Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology,

26(3), pp. 508-513. doi: 10.1161/01.ATV.0000201039.21705.dc.

Profitlich, L. E. *et al.* (2009) 'High prevalence of structural heart disease in children with cblC-type methylmalonic aciduria and homocystinuria', *Molecular Genetics and Metabolism*. Elsevier Inc., 98(4), pp. 344–348. doi: 10.1016/j.ymgme.2009.07.017.

Purohit, V. *et al.* (2007) 'Role of S-adenosylmethionine, folate, and betaine in the treatment of alcoholic liver disease: Summary of a symposium', *American Journal of Clinical Nutrition*, 86(1), pp. 14–24. doi: 10.1093/ajcn/86.1.14.

Raaf, L. *et al.* (2011) 'Myocardial fibrosis and TGFB expression in hyperhomocysteinemic rats', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 347(1–2), pp. 63–70. doi: 10.1007/s11010-010-0612-5.

Raeeszadeh-Sarmazdeh, M., Do, L. D. and Hritz, B. G. (2020) 'Metalloproteinases and Their Inhibitors: Potential for the Development of New Therapeutics', *Cells*, 9(5), pp. 1–34. doi: 10.3390/cells9051313.

Rahimi, A. *et al.* (2021) 'Curcumin can prevent the loss of sinoatrial node cells in methioninetreated rats: A stereological study', *Saudi Journal of Biological Sciences*. The Author(s), 28(6), pp. 3448–3452. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.02.088.

Rampersaud, G. C., Kauwell, G. P. A. and Bailey, L. B. (2003) 'Folate: A Key to Optimizing Health and Reducing Disease Risk in the Elderly', *Journal of the American College of Nutrition*, 22(1), pp. 1–8. doi: 10.1080/07315724.2003.10719270.

Refsum, H. (1998) 'Hyperhomocysteinemia in terms of steady-state kinetics', *European Journal of Pediatrics, Supplement*, 157(2), pp. 45–49. doi: 10.1007/pl00014303.

Refsum, H., Helland, S. and Ueland, P. M. (1985) 'Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine', *Clinical Chemistry*, 31(4), pp. 624–628. doi: 10.1093/clinchem/31.4.624.

Reis, R. P. (2022) 'Homocysteinemia and vascular disease: Where we stand in 2022', *Cardiology*, 41, pp. 821–822.

Ricard-Blum, S., Baffet, G. and Théret, N. (2018) 'Molecular and tissue alterations of collagens in fibrosis', *Matrix Biology*. Elsevier B.V, 68–69, pp. 122–149. doi: 10.1016/j.matbio.2018.02.004.

Robert, K. *et al.* (2003) 'Altered gene expression in liver from a murine model of hyperhomocysteinemia', *Journal of Biological Chemistry*, 278(34), pp. 31504–31511. doi: 10.1074/jbc.M213036200.

Roblin, X., Pofelski, J. and Zarski, J.-P. (2007) 'Rôle de l'homocystéine au cours de la stéatose hépatique et de l'hépatite chronique C', *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 31(4), pp. 415–420. doi: 10.1016/s0399-8320(07)89402-4.

Roblin, X., Pofelski, J. and Zarski, J. (2007) 'Rôle de l'homocystéine au cours de la stéatose hépatique et de l'hépatite chronique C', *Gastroenterol Clin Biol*, 31, pp. 415–420.

Rodriguez-Portelles, A. and Rodriguez-Leyva, D. (2019) 'Endothelial and left ventricular diastolic function in young adults exposed to tobacco', *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 97(10), pp. 1006–1011. doi: 10.1139/cjpp-2019-0187.

Rolland, P. H. *et al.* (1995) 'En effet, à partir d'un phénotype contractile quiescent chez les animaux témoins, les CMLs isolées des animaux administrés à la méthionine ont montré un changement d'orientation présentant un phénotype synthétique prolifératif.', *Circulation.*, 91(4), pp. 1161–1174. doi: 10.1161/01.cir.91.4.1161.

Ross, R. (1971) 'The smooth muscle cell: II. Growth of smooth muscle in culture and

formation of elastic fibers', Journal of Cell Biology, 50(1), pp. 172–186. doi: 10.1083/jcb.50.1.172.

Rucklidge, G. J. *et al.* (1992) 'Turnover rates of different collagen types measured by isotope ratio mass spectrometry', 1156, pp. 57–61.

Sahraoui, A. *et al.* (2016) 'Myocardial structural and biological anomalies induced by high fat diet in Psammomys obesus gerbils', *PLoS ONE*, 11(2), pp. 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0148117.

Santilli, F., Davì, G. and Patrono, C. (2015) 'Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase, folate status and atherothrombosis: A mechanistic and clinical perspective', *Vascular Pharmacology*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.vph.2015.06.009.

Sardharwalla, I. B. *et al.* (1974) 'Detection of heterozygotes for homocystinuria: Study of sulphur-containing amino acids in plasma and urine after L-methionine loading', *Archives of Disease in Childhood*, 49(7), pp. 553–559. doi: 10.1136/adc.49.7.553.

Satoh, S. *et al.* (2016) 'Toll-like receptor-4 is upregulated in plaque debris of patients with acute coronary syndrome more than Toll-like receptor-2', *Heart and Vessels*, 31(1), pp. 1–5. doi: 10.1007/s00380-014-0565-9.

Selhub, J. (1999) 'Homocysteine metabolism', Annu. Rev. Nutr., 19, pp. 217–246. doi: DOI: 10.1146/annurev.nutr.19.1.217.

Selhub, J. and Miller, J. W. (1992) 'The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine', *Am J Clin Nutr*, 55, pp. 131–138. doi: 10.1093/ajcn/55.1.131.

Sengupta, S. *et al.* (2001) 'Relative Roles of Albumin and Ceruloplasmin in the Formation of Homocystine, Homocysteine-Cysteine-mixed Disulfide, and Cystine in Circulation', *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), pp. 46896–46904. doi: 10.1074/jbc.M108451200.

Seo, H. *et al.* (2010) 'Contribution of dietary intakes of antioxidants to homocysteine-induced low density lipoprotein (LDL) oxidation in atherosclerotic patients', *Yonsei Medical Journal*, 51(4), pp. 526–533. doi: 10.3349/ymj.2010.51.4.526.

Sharifi, M. *et al.* (2019) 'Polygenic Hypercholesterolemia and Cardiovascular Disease Risk', *Current Cardiology Reports*. Current Cardiology Reports, 21(6). doi: 10.1007/s11886-019-1130-z.

Sharma, M. *et al.* (2007) 'Effect of hyperhomocysteinemia on cardiovascular risk factors and initiation of atherosclerosis in Wistar rats', *European Journal of Pharmacology*, 574(1), pp. 49–60. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.07.022.

Sharma, P. *et al.* (2006) 'Mining literature for a comprehensive pathway analysis: A case study for retrieval of homocysteine related genes for genetic and epigenetic studies', *Lipids Health Dis*, 5, pp. 1–19. doi: 10.1186/1476-511X-5-1.

Škovierová, H. *et al.* (2016) 'The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), pp. 1–18. doi: 10.3390/ijms17101733.

Smach, M. A. *et al.* (2013) 'Homocystéine, vitamine B12 et acide folique dans le déclin cognitif chez les personnes âgées', *Pathologie Biologie*, 61(5), pp. 184–192. doi: 10.1016/j.patbio.2012.04.003.

Smolders, R. G. V. *et al.* (2005) 'Oral estradiol decreases plasma homocysteine, vitamin B6, and albumin in postmenopausal women but does not change the whole-body homocysteine remethylation and transmethylation flux', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*,

90(4), pp. 2218–2224. doi: 10.1210/jc.2004-1021.

Stamler, J. S. *et al.* (1993) 'Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen', *Journal of Clinical Investigation*, 91(1), pp. 308–318. doi: 10.1172/JCI116187.

Stead, L. M. *et al.* (2001) 'Methylation demand and homocysteine metabolism: Effects of dietary provision of creatine and guanidinoacetate', *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 281(5 44-5), pp. 1095–1100. doi: 10.1152/ajpendo.2001.281.5.e1095.

Steed, M. M. and Tyagi, S. C. (2011) 'Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia', *Antioxidants and Redox Signaling*, 15(7), pp. 1927–1943. doi: 10.1089/ars.2010.3721.

Stojanovic, M. *et al.* (2016) 'The role of hydrogen sulfide in homocysteine-induced cardiodynamic effects and oxidative stress markers in the isolated rat heart', *Acta Physiologica Hungarica*, 103(4), pp. 428–438. doi: 10.1556/2060.103.2016.4.3.

Stojanović, M. *et al.* (2018) 'Subchronic methionine load induces oxidative stress and provokes biochemical and histological changes in the rat liver tissue', *Molecular and Cellular Biochemistry*. Springer US, 448(1–2), pp. 43–50. doi: 10.1007/s11010-018-3311-2.

Sundström, J. *et al.* (2003) 'Plasma Homocysteine, Hypertension Incidence, and Blood Pressure Tracking: The Framingham Heart Study', *Hypertension*, 42(6), pp. 1100–1105. doi: 10.1161/01.HYP.0000101690.58391.13.

Sundström, J. *et al.* (2004) 'Relations of plasma homocysteine to left ventricular structure and function: The Framingham Heart Study', *European Heart Journal*, 25(6), pp. 523–530. doi: 10.1016/j.ehj.2004.01.008.

Sundström, J. and Vasan, R. S. (2005) 'Homocysteine and heart faiure: A review of investigations from the Framingham Heart Study', *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 43(10), pp. 987–992. doi: 10.1515/CCLM.2005.173.

Takagi, H. and Umemoto, T. (2005) 'Homocysteinemia is a risk factor for aortic dissection', *Medical Hypotheses*, 64(5), pp. 1007–1010. doi: 10.1016/j.mehy.2004.10.017.

Talari, H. R. *et al.* (2022) 'The effects of vitamin B12 supplementation on metabolic profile of patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK, 12(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41598-022-18195-8.

Tamanna, N. *et al.* (2019) 'The effect of short-term methionine restriction on glutathione synthetic capacity and antioxidant responses at the whole tissue and mitochondrial level in the rat liver', *Experimental Gerontology*. Elsevier, 127(April), p. 110712. doi: 10.1016/j.exger.2019.110712.

Tonstad, S., Refsum, H. and Ueland, P. M. (1997) 'Association between plasma total homocysteine and parental history of cardiovascular disease in children with familial hypercholesterolemia', *Circulation*, 96(6), pp. 1803-1808. doi: 10.1161/01.cir.96.6.1803.

Torres, L. *et al.* (1999) 'Induction of TIMP-1 expression in rat hepatic stellate cells and hepatocytes: A new role for homocysteine in liver fibrosis', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1455(1), pp. 12–22. doi: 10.1016/S0925-4439(99)00049-6.

Torres, N., Torre-Villalvazo, I. and Tovar, A. R. (2006) 'Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders', *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(6), pp. 365–373. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.11.005.

Toya, T. et al. (2020) 'Elevated plasma homocysteine levels are associated with impaired

peripheral microvascular vasomotor response', *IJC Heart and Vasculature*. The Authors, 28, p. 100515. doi: 10.1016/j.ijcha.2020.100515.

Trinder, P. (1969) 'Determination of Glucose in Blood Using Glucose Oxidase with an Alternative Oxygen Acceptor', *Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry and laboratory medicine*, 6(1), pp. 24–27. doi: 10.1177/000456326900600108.

Tsai, J. C. *et al.* (1994) 'Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: A link to atherosclerosis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(14), pp. 6369–6373. doi: 10.1073/pnas.91.14.6369.

Tsai, J. C. *et al.* (1996) 'Induction of cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells', *Journal of Clinical Investigation*, 97(1), pp. 146–153. doi: 10.1172/JCI118383.

Tyagi, S. C. (1998) 'Homocysteine redox receptor and regulation of extracellular matrix components in vascular cells', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 274(2 43-2), pp. 396–405. doi: 10.1152/ajpcell.1998.274.2.c396.

Udovcic, M. *et al.* (2017) 'Hypothyroidism and the heart', *Methodist Debakey Cardiovasc J*, 13(2), pp. 55-59. doi: 10.14797/mdcj-13-2-55.

Ueland, P. M. *et al.* (1993) 'Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications.', *Clin Chem.*, 39(9), pp. 1764-1779.

Vatsalya, V. *et al.* (2021) 'Characterization of early-stage alcoholic liver disease with hyperhomocysteinemia and gut dysfunction and associated immune response in alcohol use disorder patients', *Biomedicines*, 9(1), pp. 1–13. doi: 10.3390/biomedicines9010007.

Venn, B. J. *et al.* (2003) 'Comparison of the effect of low-dose supplementation with L-5methyltetrahydrofolate or folic acid on plasma homocysteine: A randomized placebocontrolled study', *American Journal of Clinical Nutrition*, 77(3), pp. 658–662. doi: 10.1093/ajcn/77.3.658.

Vijayan, V. *et al.* (2013) 'Homocysteine alters the osteoprotegerin/RANKL system in the osteoblast to promote bone loss: Pivotal role of the redox regulator forkhead O1', *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier, 61, pp. 72–84. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.004.

Vizzardi, E. *et al.* (2009) 'Homocysteine and heart failure: An overview', *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery*, 4(1), pp. 15–21. doi: 10.2174/157489009787259991.

Voutilainen, S. *et al.* (1999) 'Enhanced in vivo lipid peroxidation at elevated plasma total homocysteine levels', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(5), pp. 1263–1266. doi: 10.1161/01.ATV.19.5.1263.

Wang, G. *et al.* (2002) 'Increased monocyte adhesion to aortic endothelium in rats with hyperhomocysteinemia: Role of chemokine and adhesion molecules', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(11), pp. 1777–1783. doi: 10.1161/01.ATV.0000035404.18281.37.

Wang, H. *et al.* (2003) 'Hyperhomocysteinemia accelerates atherosclerosis in cystathionine  $\beta$ -synthase and apolipoprotein E double knock-out mice with and without dietary perturbation', *Blood*, 101(10), pp. 3901–3907. doi: 10.1182/blood-2002-08-2606.

Welch, G. N. and Loscalzo, J. (1998) 'HOMOCYSTEINE AND ATHEROTHROMBOSIS', *The New England Journal of Medicine*, 338(15), pp. 1042–1050. doi: 10.1056/NEJM199804093381507.

Wiley, V. C., Dudman, N. P. B. and Wilcken, D. E. L. (1988) 'Interrelations between plasma

free and protein-bound homocysteine and cysteine in homocystinuria', *Metabolism*, 37(2), pp. 191–195. doi: 10.1016/S0026-0495(98)90017-8.

Wolters, M., Hermann, S. and Hahn, A. (2003) 'B vitamin status and concentrations of homocysteine and methylmalonic acid in elderly German women', *American Journal of Clinical Nutrition*, 78(4), pp. 765–772. doi: 10.1093/ajcn/78.4.765.

Wolters, M., Ströhle, A. and Hahn, A. (2004) 'Cobalamin: A critical vitamin in the elderly', *Preventive Medicine*, 39(6), pp. 1256–1266. doi: 10.1016/j.ypmed.2004.04.047.

Woo, C. W. H., Siow, Y. L. and Karmin, O. (2006) 'Homocysteine Activates cAMP-response Element Binding Protein in HepG2 Through cAMP / PKA Signaling Pathway', *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 26, pp. 1043-1050. doi: 10.1161/01.ATV.0000214981.58499.32.

Xiao, Y. *et al.* (2011) 'Relationship between lipid profiles and plasma total homocysteine, cysteine and the risk of coronary artery disease in coronary angiographic subjects', *Lipids in Health and Disease*, 10, pp. 1–7. doi: 10.1186/1476-511X-10-137.

Yagisawa, M. *et al.* (2004) 'Effects of intravenous betaine on methionine-loading-induced plasma homocysteine elevation in rats', *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(11), pp. 666–671. doi: 10.1016/j.jnutbio.2004.05.004.

Yalçinkaya, S. *et al.* (2009) 'Oxidative and nitrosative stress and apoptosis in the liver of rats fed on high methionine diet: Protective effect of taurine', *Nutrition*, 25(4), pp. 436–444. doi: 10.1016/j.nut.2008.09.017.

Yamada, K. *et al.* (2006) 'Human methionine synthase reductase is a molecular chaperone for human methionine synthase', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(25), pp. 9476–9481. doi: 10.1073/pnas.0603694103.

Yan, J. *et al.* (2021) 'The outcomes of acute myocardial infarction patients comorbidity with hypertension and hyperhomocysteinemia', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK, 11(1), pp. 1–7. doi: 10.1038/s41598-021-02340-w.

Yang, A. *et al.* (2018) 'Homocysteine activates autophagy by inhibition of CFTR expression via interaction between DNA methylation and H3K27me3 in mouse liver', *Cell Death and Disease*. Springer US, 9(2). doi: 10.1038/s41419-017-0216-z.

YANG, F., Hong-Mei, T. and Hong, W. (2005) 'Hyperhomocysteinemia and atherosclerosis', *Acta Physiologica Sinica*, 57(2), pp. 103–114.

Yao, D. and Sun, N. L. (2014) 'Hyperhomocysteinemia accelerates collagen accumulation in the adventitia of balloon-injured rat carotid arteries via angiotensin II type 1 receptor', *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11), pp. 19487–19498. doi: 10.3390/ijms151119487.

Yefsah-Idres, A. *et al.* (2016) 'Hepatoprotective effects of lycopene on liver enzymes involved in methionine and xenobiotic metabolism in hyperhomocysteinemic rats', *Food and Function*. Royal Society of Chemistry, 7(6), pp. 2862–2869. doi: 10.1039/c6fo00095a.

Yuyun, M. F., Ng, L. L. and Ng, G. A. (2018) 'Endothelial dysfunction, endothelial nitric oxide bioavailability, tetrahydrobiopterin, and 5-methyltetrahydrofolate in cardiovascular disease. Where are we with therapy?', *Microvascular Research*. Elsevier Inc, 119(2017), pp. 7–12. doi: 10.1016/j.mvr.2018.03.012.

Zaric, B. L. *et al.* (2019) 'Homocysteine and Hyperhomocysteinaemia.', *Curr Med Chem.*, 26(16), pp. 2948-2961. doi: 10.2174/0929867325666180313105949.

Zerrouk, F. et al. (2010) 'Impact d'une hyperhomocystéinémie sur les lipoprotéines plasmatiques et sur la structure hépatique du Rat des sables, Psammomys obesus', Revue

*Synthèse*, 22, pp. 23–36.

Zhang, R. *et al.* (2004) 'Mild Hyperhomocysteinemia Induced by Feeding Rats Diets Rich in Methionine or Deficient in Folate Promotes Early Atherosclerotic Inflammatory Processes 1', *J. Nutr.*, 134(December 2003), pp. 825–830.

Zhao, J. *et al.* (2017) 'Role of Hyperhomocysteinemia and Hyperuricemia in Pathogenesis of Atherosclerosis', *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. Elsevier Inc., 26(12), pp. 2695–2699. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.10.012.

Zhao, T. *et al.* (2018) 'Ligustrazine suppresses neuron apoptosis via the Bax/Bcl-2 and caspase-3 pathway in PC12 cells and in rats with vascular dementia', *IUBMB Life*, 70(1), pp. 60–70. doi: 10.1002/iub.1704.

Zhou, J. *et al.* (2001) 'Dietary supplementation with methionine and homocysteine promotes early atherosclerosis but not plaque rupture in apoE-deficient mice', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21(9), pp. 1470–1476. doi: 10.1161/hq0901.096582.

Zinellu, A. *et al.* (2009) 'S-homocysteinylated LDL apolipoprotein B adversely affects human endothelial cells in vitro', *Atherosclerosis*, 206(1), pp. 40–46. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.01.035.

Zou, T. *et al.* (2010) 'Homocysteine enhances cell proliferation in vascular smooth muscle cells: Role of p38 MAPK and p47phox', *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 42(12), pp. 908–915. doi: 10.1093/abbs/gmq102.

Zulli, A. and Hare, D. L. (2009) 'High dietary methionine plus cholesterol stimulates early atherosclerosis and late fibrous cap development which is associated with a decrease in GRP78 positive plaque cells', *International Journal of Experimental Pathology*, 90(3), pp. 311–320. doi: 10.1111/j.1365-2613.2009.00649.x.

# **INDEX**

Index des figures

\_

\_

Figure	Titre	Page
1	Formules chimiques de l'homocystéine et de ses formes circulantes	5
2	Métabolisme de l'homocystéine	7
3	Régulation du métabolisme de l'homocystéine	8
4	Déficits en MTHFR et carences en folates	12
5	Mutations de la cobalamine et carences en vitamine B12	12
6a	Déficit homozygote de la Cystathionine β-Synthase	13
6b	Déficit hétérozygote de la C $\beta$ S et carence en vitamine B6	14
7	Mécanisme d'action de l'homocystéine dans la genèse de la stéatohépatite	18
8	Facteurs affectant le métabolisme de l'Hcy et ses effets sur la santé humaine	19
9	Les adduits protéiques de l'Hcy avec des protéines plasmatiques	20
10	Hyperhomocystéinémie et stress oxydatif	21
11	Schéma d'implication de l'Hhcy dans le dysfonctionnement endothélial et les maladies cardiovasculaires	23
12	Hyperhomocystéinémie et athérothrombose	24
13	Homocystéine et formation de la plaque d'athérome	25
14	Influence de l'homocystéine sur la coagulation du sang et la fibrinolyse	26
15	Mécanismes et voies impliqués des effets délétères induits par l'homocystéine sur le système cardiovasculaire	29
16	Mécanismes de l'homocystéine dans l'insuffisance cardiaque	30
17	Mécanismes expliquant les maladies cardiovasculaires liées à l'Hhcy	31
18	Psammomys obesus au laboratoire	33
19	Représentation d'une plaque de lipidogramme après coloration	39
20	Exemple d'un profil électrophorétique normal chez l'homme	39
21	Diagramme représentant les étapes de la culture des cellules musculaires lisses aortiques	42
22	Protocole expérimental utilisé pour les CMLs incubées en présence /absence de	43
	méthionine	
23	Mesure d'épaisseur de l'épicarde en coupe histologique transversale	44
24	Mesure des grands axes d'une CML de phénotype synthétique en culture	44
25	Approche méthodologique utilisée pour la réalisation des objectifs fixés	46
26	Homocystéine plasmatique chez les <i>Psammomys</i> témoins et soumis à la méthionine	49
27	Evolution pondérale des Psammomys témoins et soumis à la méthionine	50
28	Evolution de la glycémie chez Psammomys témoins et soumis à la méthionine	5
29	Evolution de la triglycéridémie chez <i>Psammomys</i> témoins et soumis à la méthionine	51

30	Evolution de la cholestérolémie chez <i>Psammomys</i> témoins et soumis à la méthionine	52
31	Profils électrophorétiques des lipoprotéines plasmatiques chez <i>Psammomys obesus</i> témoins et soumis à la méthionine	52
32	Evolution de la protéinémie chez Psammomys témoins et soumis à la méthionine	53
33	Evolution de l'acide urique plasmatique chez <i>Psammomys</i> témoins et soumis à la méthionine	54
34	Cellules musculaires lisses aortique (CMLs) chez <i>Psammomys obesus</i> témoins (A, B) et soumis à la méthionine 50 mM (C, D) pendant 72 heures	72

# Index des tableaux

Tab	Titre	Page
Ι	Epaisseur de la paroi cardiaque (µm) chez <i>Psammomys</i> témoins et soumis à la méthionine.	61
II	Effet d'une surcharge de la méthionine (70 mg/kg/j) pendant 6 mois sur les paramètres morphométriques de la paroi aortique.	69
III	Etude morphométrique des cellules musculaires lisses aortiques (CMLs) en culture, CMLs contractiles et synthétiques, témoins et soumis à la méthionine.	73

# Index des planches

Pl	Titre	Page
Ι	Histologie du foie de Psammomys témoin	58
II	Histologie du foie de <i>Psammomys</i> soumis à la méthionine pendant 6 mois.	59
III	Structure histologique du cœur de Psammomys témoins.	62
IV	Structure histologique du cœur de <i>Psammomys</i> soumis à la méthionine pendant 6 mois. Effet de la méthionine sur l'endocarde.	63
V	Structure histologique du cœur de <i>Psammomys</i> soumis à la méthionine pendant 6 mois. Effet de la méthionine sur le myocarde.	64
VI	Structure histologique du cœur de <i>Psammomys</i> soumis à la méthionine pendant 6 mois. Effet de la méthionine sur le myocarde et l'épicarde.	65
VII	Histologie de l'aorte de Psammomys obesus témoin.	67
VIII	Histologie de l'aorte de Psammomys obesus hyperhomocystéinémique.	70
IX	Histologie de l'aorte de Psammomys soumis à la méthionine pendant 6 mois.	71

# ANNEXES

# **ANNEXE 1 : COMPOSITION DES PLANTES CHENOPODIACES**

Eau	82.0 %
Protides	5.3 %
Calcium	110.0 mg
Phosphore	95.0 mg
Fer	3.5 mg
Potassium	730.0 mg
Magnésium	66.0 mg
Vitamine A	3160.0 Ul
Vitamine C	184.0 mg.

# **ANNEXE 2 : TECHNIQUE HISTOLOGIQUE ET HISTOCHIMIQUE**

Fixateur Bouin aqueux	
Solution aqueuse saturée d'acide picrique	30 ml
Formol commercial	10 ml
Acide acétique	02 ml
Fixer 3 jours, puis laver dans l'eau courante (48 h).	

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

Déparattinage	
Hydratation dans l'alcool (100°, 90°, 70°, 50°).	
Coloration nucléaire à l'hématoxyline de Groat	1 min 15 s
Lavage à l'eau courante	1 min
Coloration à la fuschine-ponceau	1 min 30 s
Rinçage à l'eau acétifiée	
Coloration à l'orangé G molybdique	1 min 30 s
Rinçage à l'eau acétifiée	
Coloration au vert lumière	1 min 15 s
Rinçage à l'eau acétifiée	
Déshydratation dans l'alcool (50°, 70°, 90°, 100°)	
Montage au baume de Canada	
Les lames sont lavées à l'eau acétifiée jusqu'à l'élimination du	colorant

#### **Coloration au APS** Déparaffinage

Deparannage	
Hydratation dans l'alcool (100°, 90°, 70°, 50°)	
Traitement à l'acide périodique	10 min
Lavage à l'eau courante	10 min
Coloration au réactif de Schiff	20 min à l'obscurité
Rinçage à l'eau distillée	
Déshydratation dans l'alcool (50°, 70°, 90°, 100°)	
Montage au baume de Canada	

## **Coloration au Bleu alcian**

DéparaffinageHydratation dans l'alcool (100°, 90°, 70°, 50°)Coloration au bleu alcian2 hLavage à l'eau distillée1 minColoration nucléaire à l'hématoxyline de Groat1 min 15 sLavage à l'eau courante1 minDéshydratation dans l'alcool (50°, 70°, 90°, 100°)1 minMontage au baume de Canada1

### **Coloration au Noir soudan**

Déparaffinage Hydratation dans l'alcool (70°, 50°) Coloration nucléaire à l'hématoxyline de Groat Lavage à l'eau courante Coloration au noir soudan Lavage à l'eau distillée Déshydratation dans l'alcool (70°, 50°) Montage au baume de Canada

1 min 30 s 2 min 2 à 5 h 1 min

# **ANNEXE 3 : TECHNIQUE IN VITRO**

## LES BESOINS DES CELLULES EN CULTURE

## 1. Milieu de culture

Les besoins des cellules en culture sont couverts par les milieux de culture qui ont pour le but de reproduire aussi fidèlement que possible, *in vitro*, les conditions d'environnement que la cellule trouve *in vivo*.

Pour notre étude, nous avons utilisé comme milieu de culture, le milieu essentiel minimum d'Eagle, modifié par Dulbecco (DMEM) Sigma dont la composition est donnée en annexe 5.

## 2. Complément à ajouter extemporanément

**Mélange d'antibiotiques :** Au taux final de 1 % de streptomycine 50 µg/ml, pénicilline 50 UI /mL (SIGMA).

Glutamine à 200 mM : acide aminé instable, il est ajouté au milieu à raison de 1,2 %.

#### Sérum de veau fœtal (SVF)

La prolifération et l'expression des différentes fonctions cellulaires en culture nécessitent l'addition d'une certaine concentration de sérum au milieu synthétique de base car le déclenchement de la division cellulaire n'est possible qu'en présence d'un certain nombre de facteurs mitogènes, le plus souvent fournis par le sérum.

Le pourcentage de sérum additionné au milieu de base varie de 1.5 à 20 %. Sont utilisés des sérums d'origine animale d'individus jeunes sachant que l'effet cytostimulant global du sérum est inversement proportionnel à l'âge du donneur. Les plus fréquemment retrouvés sont le sérum de veau, le sérum de veau nouveau-né et le sérum de veau fœtal (SVF). Le sérum est un mélange de composition complexe qui contient :

- Des facteurs de croissance cellulaires (EGF, FGF, PDGF.....)
- Des facteurs de différenciation comme la fibronectine (ancrage des cellules)
- Des inhibiteurs : Alpha1 antitrypsine qui neutralise l'action enzymatique de la trypsine. Le SVF (Sigma) doit être au préalable décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes et puis filtré à l'aide de membranes à 0,45 μm.

# **3.** Solutions salines

L'emploi des solutions salines concerne toutes les étapes de la culture cellulaire, notamment pour le rinçage des cellules et la préparation des solutions enzymatiques qui s'effectuent en milieu salin tamponné, afin de préserver la survie des cellules pendant de brèves périodes. La solution saline utilisée au cours de nos opérations est le sérum physiologique tampon phosphate Dulbecco (PBS : 1X, dilué à partir d'une solution 20X).

# 4. L'environnement durant l'incubation

Il Respecte certains paramètres physico-chimiques nécessaires à la culture cellulaire notamment :

- La température qui doit être maintenue à 37°C
- L'hygrométrie (84 à 85 % d'humidité)
- Le pH : ce dernier doit correspondre au pH sanguin, entre 7,2 et 7,4 grâce au système tampon. Les variations de ce dernier sont contrôlées par un indicateur de pH inclus dans le milieu de culture, le rouge de phénol. Ainsi le milieu est
  - Rose à pH=7,4
  - Violet si alcalinisation (infection fongique)
  - Jaune si acidification (contamination bactérienne, mort cellulaire ou excès de CO2)
- L'atmosphère enrichie de 5% de CO2.

## **CULTURE PRIMAIRE**

La trypsine (0,1 %, Gibco) est utilisée pour détacher les cellules musculaires lisses (CMLs) de leur support. Une suspension cellulaire est obtenue après :

- Élimination du milieu des explants.
- Rinçage des CMLs au PBS 1X (3 fois) pour enlever toute trace de SVF qui entrave l'action de la trypsine.
- Dépôt de 1 à 1,2 ml de la solution de trypsine sur la surface cellulaire pendant 1 minute.
- Élimination de la solution de trypsine.
- Inactivation de l'action de la trypsine par ajout de 2 à 3 ml de DMEM 10 % SVF, une série d'aspiration et refoulement prolongé est réalisée pour détacher des cellules.

100  $\mu$ l de la suspension cellulaire sont prélevés afin d'effectuer une numération cellulaire. Les cellules sont ensemencées par la suite dans des flasks, le premier passage est ainsi réalisé.

## **CONTROLE ET SUIVI DES CULTURES**

## Aspect macroscopique

Observation du milieu de culture qui doit être limpide et rose/orange pouvant devenir trouble et/ou rouge ou jaune, signe de contamination.

La périodicité du changement de milieu dépend de la densité cellulaire, mais en règle générale, elle ne peut être supérieure à quatre jours. La plupart des cellules exigent un pH neutre. En dessous de 6,5, la viabilité est menacée. Il est facile de repérer une modification du pH puisque les milieux de culture contiennent tous des indicateurs colorés. La fréquence de changement de milieu doit être telle que le pH reste le plus stable possible. Lorsque la concentration des cellules augmente, le milieu a une tendance à l'acidification.

# Aspect microscopique

La viabilité ainsi que les modifications morphologiques peuvent être observées au microscope inversé.

Le contrôle de l'état de confluence doit être fait tous les deux jours. Cela permet de détecter des changements dus à la souffrance cellulaire ; ces signes sont la vacuolisation des cellules, leur détachement du support (cellules arrondies en suspension), la présence de granules dans le cytoplasme. Il permet également le contrôle bactérien et fongique.

### COMPOSITION DU MILIEU ESSENTIEL MINIMUM D'EAGLE, MODIFIE PAR DULBECCO (DMEM) SIGMA

**Sels inorganiques :** CaCl<sub>2</sub> (200mg/L), Fe(NO<sub>3</sub>)3, 9H<sub>2</sub>O (0,1mg/L), KCl (400g/L), MgSO<sub>4</sub> (200mg/L), NaCl (6400mg/L), NaHCO<sub>3</sub> (3700mg/L), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O (145mg/L).

Acides aminés essentiels : L arginine-HCl (84mg/l), L cystine (48mg/l), L glutamine (584mg/L), L histidine-HCl,H<sub>2</sub>O (42mg/L), L isoleucine (105mg/L), L leucine (105mg/L), L lysine-HCl (146mg/L), L méthionine (30mg/L), L phénylalanine (66mg/L), L thréonine (96mg/L), L thryptophane (16mg/L), L tyrosine (72mg/L), L valine (94mg/L).

Acides aminés non essentiels : Glycine (30mg/L), L sérine (42mg/L).

**Vitamines et autres cofacteurs :** D pantothénate de Ca (4mg/L), Choline-HCl (4mg/L), Acide folique (4mg/L), Inositol (7,2mg/L), Nicotinamide (4mg/L), Pyridoxal HCl (4mg/L), Riboflavine (0,4mg/L), Thiamine chlorhydrate (4mg/L).

Autres composants : D glucose (4500mg/L), Pyruvate de Na (110mg/L).

# ABSTRACT

## Abstract

During the last decades, several clinical and epidemiological studies have shown that hyperhomocysteinemia (Hhcy) is associated with cardiovascular diseases and could therefore represent a risk factor.

An experimental Hhcy was induced, in the sand rat *Psammomys obesus*, by a daily intraperitoneal injection of 70 mg/kg/day of methionine for 6 months. We analyzed the impact of Hhcy on certain plasma biochemical parameters and on the cellular structures of the three organs (heart, aorta and liver). The cellular and matrix alterations of the organs were analyzed by histo-morphometric techniques. Additionally, we treated primary cultures of aortic smooth muscle cells (SMCs) with high concentration of methionine to investigate the effects of methionine at the cellular level.

Our results show that Hhcy impairs not only plasma homeostasis but also structural alterations marked by a significant increase in extracellular matrix components particularly collagens which accumulated in the interstitial and perivascular spaces in the studied organs indicating a developing fibrosis. A liver steatosis was also observed following methionine treatment. Further analysis of the aorta showed that Hhcy also induced vascular alterations including SMCs reorientation and proliferation associated with aneurysm formation.

Our results show for the first time that Hhcy can induce a cardiovascular and liver diseases phenotype in *Psammomys obesus*, a species previously shown to be a good model for the studies of diabetes and other metabolism-related pathologies.

**Keywords:** Cardiovascular diseases; Hyperhomocysteinemia; Liver; Methionine; Psammomys obesus; SMCs.

ملخص

خلال العقود الماضية، أظهرت العديد من الدراسات السريرية والوبائية أن فرط الهوموسستئين في الدم (Hhcy) يرتبط بأمراض القلب والأوعية الدموية وبالتالي يمكن أن يمثل عامل خطر.

تم تحريض Hhcy التجريبية، في الجردان الرملية Psammomys obesus، عن طريق الحقن اليومي بالمثيونين داخل الصفاق بجرعة 70 مجم / كجم / يوم لمدة 6 أشهر. قمنا بتحليل تأثير Hhcy على بعض المعايير البيوكيميائية للبلازما وعلى الهياكل الخلوية للأعضاء الثلاثة (القلب والشريان الأورطي والكبد). تم تحليل التعديلات الخلوية والمصفوفة للأعضاء من خلال تقنيات هيستومور فومترية. بالإضافة إلى ذلك، تعاملنا مع الثقافات الأولية لخلايا العضلات الملساء الأبهرية (SMCs) مع تركيز عالٍ من الميثيونين للتحقيق في تأثيرات الميثيونين على المستوى الخلوي.

تظهر نتائجنا أن Hhcy لا يضعف فقط التوازن في البلازما ولكن أيضًا التغيرات الهيكلية التي تتميز بزيادة كبيرة في مكونات المصفوفة خارج الخلية وخاصة الكولاجين التي تراكمت في الفراغات الخلالية وحول الأوعية الدموية في الأعضاء المدروسة مما يشير إلى تطور تليف كما لوحظ حدوث تنكس دهني في الكبد بعد العلاج بالميثيونين. أظهر تحليل إضافي للشريان الأورطي أن Hhcy تسبب أيضًا في حدوث تغييرات في الأوعية الدموية بما في ذلك إعادة توجيه والانتشار خلايا العضلات الملساء (SMCs) المرتبط بتكوين تمدد الأوعية الدموية.

تظهر نتائجنا لأول مرة أن Hhcy يمكن أن يحفز النمط الظاهري لأمراض القلب والأوعية الدموية والكبد في Psammomys obesus، وهو نوع سبق أن أظهر أنه نموذج جيد لدراسات مرض السكري والأمراض الأخرى المرتبطة بعملية التمثيل الغذائي

الكلمات المفتاحية . أمر اض القلب والأوعية الدموية. خلايا العضلات الملساء، فرط الهوموسستنين في الدم. الكبد؛ ميثيونين. Psammomys obesus?

# A chronic moderate methionine administration induced hyperhomocysteinemia associated with cardiovascular disease phenotype in the sand rat *Psammomys obesus*

#### Fouzia Zerrouk<sup>1</sup>, Billel Chaouad<sup>1</sup>, Adel Ghoul<sup>1</sup>, Naima Chalour<sup>2</sup>, Anissa Moulahoum<sup>1</sup>, Zineb Khiari<sup>1</sup>, Mohamed El Hadi Cherifi<sup>3</sup>, Souhila Aouichat<sup>4</sup>, Karim Houali<sup>5</sup>, Yasmina Benazzoug<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Biochemistry and Remodeling of the Extracellular Matrix, Faculty of Biological Sciences, Houari Boumediene University of Science and Technology (USTHB), Bab Ezzouar, Algiers, Algeria

<sup>2</sup>Laboratory of Physiology of Organisms, Faculty of Biological Sciences, Houari Boumediene University of Science and Technology (USTHB), Bab Ezzouar, Algiers, Algeria

<sup>3</sup>Central Laboratory of Biology, EPH Bologhine Ibn Ziri, Algiers, Algeria

<sup>4</sup>Laboratory of Physiology of Organisms, Team of Cellular and Molecular Physiopathology, Faculty of Biological Sciences, Houari Boumediene University of Science and Technology (USTHB), Bab Ezzouar, Algiers, Algeria

<sup>5</sup>Laboratory of analytic biochemistry research and biotechnology, Faculty of Biological Sciences and Agronomic Sciences, Mouloud Mammeri University, Tizi-Ouzou, Algeria

#### Abstract

**Introduction.** Cardiovascular diseases were defined as coronary artery, cerebrovascular, or peripheral arterial disease. Hyperhomocysteinemia (Hhcy) is an independent risk factor of cardiovascular diseases, including atherosclerosis. Our previous studies demonstrated the involvement of Hhcy in cardiovascular remodeling in the sand rat *Psammomys obesus*.

**Material and methods.** An experimental Hhcy was induced, in the sand rat *Psammomys obesus*, by a daily intraperitoneal injection of 70 mg/kg of methionine for a total duration of 6 months. The impact of Hhcy on the cellular and matrix structures of the heart, aorta and liver was analyzed using histological techniques. Additionally we treated primary cultures of aortic smooth muscle cells (SMCs) with high concentration of methionine to investigate the effects of methionine at the cellular level.

**Results.** A moderate Hhcy induced a significant increase in the extracellular matrix components particularly collagens which accumulated in the interstitial and perivascular spaces in the studied organs indicating a developing fibrosis. A liver steatosis was also observed following methionine treatment. Further analysis of the aorta showed that Hhcy also induced vascular alterations including SMCs reorientation and proliferation associated with aneurysm formation.

Correspondence address: Fouzia Zerrouk Biochemistry and Remodeling of the Extracellular Matrix, Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Houari Boumediene University of Science and Technology (USTHB), Bab Ezzouar, El Alia, 16111, Algiers, Algeria phone : 21321247913 e-mail: fouzia.zerrouk@gmail.com **Conclusions.** Our results show for the first time that Hhcy can induce a cardiovascular and liver diseases phenotype in *Psammomys obesus*, a species previously shown to be a good model for the studies of diabetes and other metabolism-related pathologies. (*Folia Histochemica et Cytobiologica 2022, Vol. 60, No. 2, 111–124*)

This article is available in open access under Creative Common Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) license, allowing to download articles and share them with others as long as they credit the authors and the publisher, but without permission to change them in any way or use them commercially.

©Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry Folia Histochem Cytobiol. 2022 10.5603/FHC.a2022.0013 ISSN 0239-8508, e-ISSN 1897-5631



Keywords: Cardiovascular diseases; Hyperhomocysteinemia; Liver; Methionine; *Psammomys obesus*; SMCs

#### Introduction

Cardiovascular diseases are complex pathologies with multiple risk factors including genetic predispositions and environmental factors such as diet. These diseases are thus becoming among the leading causes of death and stressors on the healthcare management in these countries [1].

Homocysteine (Hcy) is a highly reactive sulfhydryl-containing amino acid and an intermediate in methionine metabolism. It is produced *via* the demethylation of dietary methionine, which is abundant in animal protein [2]. For instance, an excessive methionine intake in mice and rats animal models leads to a high plasma concentration of Hcy known as hyperhomocysteinemia (Hhcy) [3–5].

In humans, plasma Hcy concentrations ranging from 12 and 100  $\mu$ mol/L are considered to be indicative of clinically relevant Hhcy [2]. In 1964, Gibson and collaborators reported for the first time the presence of vascular anomalies in patients with homocystinuria (elevated concentration of Hcy in both plasma and urine) [6]. A few years later, in 1969 McCully introduced his Hcy hypothesis which connected Hhcy to an increased risk of atherosclerosis [7]. To date, Hhcy has become an established risk factor for coronary artery diseases, peripheral vascular diseases, myocardial infarction [8], and liver disease [9].

Indeed, decades of investigation in human patients have established a close correlation between Hhcy and cardiovascular diseases and subsequent complications such as heart attacks and strokes have been described previously [10]. Moreover, a diet rich in methionine has been shown to induce cardiovascular system damage through oxidative stress, inflammation, and extracellular matrix remodeling [3, 5].

*Psammomys obesus* usually lives on a low energy diet (plants mainly rich in water and minerals) in a natural desert habitat, however, when kept in laboratory conditions fed with a rich diet, the animals show metabolic disorders related to high carbohydrates intake [11, 12]. It is an atherosensitive animal which would thus constitute an ideal model for the study of cardiovascular diseases [11, 12]. We previously showed Hhcy to induce a myocardial remodeling including extracellular matrix in *Psammomys obesus* [13], but we did not address the effects of Hhcy on the other components of the cardiovascular system.

Our current work aims to establish a new model for cardiovascular and liver diseases in *Psammomys* 

*obesus*. Indeed, *Psammomys obesus* administrated with methionine (Met) induced an Hhcy associated with vascular and liver alterations reproducing cardiovascular and liver pathologies phenotype.

#### Material and methods

**Biological material and experimental protocol.** Our study was conducted on an experimental model of gerbillid class (*Psammomys obesus*), gopher, a deserticolous rodent from the region of Beni-Abbes, southwest of Algeria, in the city of Bechar (30°7 northern latitude and 2°10 western longitude). In its natural environment, this gerbil eats halophilic Chenopodiaceae poor in calories (0.4 kcal/g for *Salsola foetida*). The Chenopodiaceae are very rich in water and mineral salts, especially sodium carbonate. *Psammomys* is an animal primarily diurnal, living alone or in small groups in burrows offering shelter from external temperature with high moisture (50–80%) [14].

After familiarization time (25°C with 12-hour light/dark cycles), female animals were divided into two pools, one for control and another experimental: a control pool (n = 5 animals) with a mean bodyweight of 93 g receiving 50 g of halophilic plants daily, and an experimented pool (n = 5 animals) with a mean bodyweight of 96 g receiving daily 50 g of halophilic plants with methionine (Sigma-Aldrich, 64340, St. Louis, MO, USA), previously dissolved in physiological water, at a dose of 70 mg/kg of body weight/day for the treated lot. During the 6 months experiment, the animals were weekly weighted. All experiments were carried out in accordance with the Algerian legislation (Law number 12-235/2012) relating to animal protection, the recommendations of the Algerian Association of Experimental Animal Sciences (AASEA 45/DGLPAG/DVA/SDA/14), and the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments.

Blood samples were collected at the beginning (T0) and at the end (T6) of the experiment from the retro-orbital sinus of the eyes using a previously heparinized Pasteur pipette [15]. Blood collected on heparinized tubes was centrifuged at 3000 g for 10 min. The collected plasma was stored at  $-80^{\circ}$ C for the determination of some biochemical plasma parameters.

Determination of total plasma homocysteine. The quantitative determination of total plasma homocysteine was performed by the Architect Homocysteine assay kit (Axis-Shield Diagnostics Ltd, Dundee, UK) using CMIA (chemiluminescent microparticle immunoassay) technology. The oxidized form of homocysteine present in the sample was reduced to free homocysteine by the action of dithiothreitol [16]. Total free homocysteine was transformed into S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) by recombinant SAH-hydrolase in the presence of adenosine in excess. SAH and S-adenosyl-L-cysteine labeled with acridinium competed to fill the binding sites on the anti-SAH monoclonal antibody. After

<sup>©</sup>Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry Folia Histochem Cytobiol. 2022 10.5603/FHC.a2022.0013 ISSN 0239-8508, e-ISSN 1897-5631

washing, magnetic separation, and triggering reactions, the light emitted by the acridinium was measured in relative units of light by the optical system of the Architect analyzer. An indirect relationship exists between the homocysteine present in the sample and the amount of light emitted.

**Determination of biochemical plasma parameters.** Different plasma parameters were quantified by the enzymatic colorimetric method (glucose, triglycerides, cholesterol, total proteins, and uric acid) by using Spinreact kits. Plasma was collected for the measurement of lipoprotein on agarose gel by the method of Kawakami *et al.* (1989).

Histological and histochemical analyses. At the end of the experiment, animals were sacrificed after anesthesia by intraperitoneal injection of urethane 25%. The organs (heart, aorta, and liver) removed were quickly fixed in two different fixing solutions (Bouin's solution and 10% buffered formalin), for 3 days and then dehydrated in ascending series of ethanol. The organs were then cleared in 2 butanol baths and embedded in paraffin. The 5  $\mu$ m-thick sections were spread on Superfrost-plus glass slides. The slides were subjected to topographic staining (Masson Trichrome method) and selective histochemical staining of collagens and elastin fibrillar (light green), proteoglycans (Alcian blue), glycoproteins (Periodic Acid Schiff), and lipid deposits (Sudan Black) according to described methods [18].

Culture of aortic smooth muscle cells. The SMCs were cultured by the explant technique [19]. The control aorta was removed and immediately plunged in a Petri dish containing Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% fetal calf serum (FCS) supplemented with 1% antibiotics (streptomycin 50 mg/mL, penicillin 50 IU/mL, Sigma), 1.2% glutamine (Sigma) and 5% HEPES to maintain Ph of 7.4. The aortic lumen was then emptied of blood. The aorta was incubated for 20 min at 37°C in 0.1% collagenase I (Sigma) in a serum-free medium to remove the endothelium and facilitate the separation of adventitia and media and cut into 1 mm explants. 8-10 explants were placed in culture 25 cm3 flasks and incubated in the presence of DMEM containing 20% FCS, 1.2% glutamine, and 1% antibiotics and placed in the incubator at 37°C under a humidified atmosphere with 95% air and 5% CO2. The cultivation of explants is the primary culture.

On the second culture passage and at the 7<sup>th</sup> passage and at a confluence, the cells were resuspended after trypsinization. They have seeded in 6-well plates at a rate of  $0.8 \times 10^6$  cells/ /mL/well in DMEM supplemented with 10% FCS, 1.2% glutamine, and 1% antibiotics and incubated in the presence of 50 mM methionine for 72 h [20]. At confluence, the medium was removed; the control SMCs and SMCs cultured with methionine were reincubated in 1.5 mL DMEM without FCS for 24 h. The mediums were used for the determination of total protein [21].

Quantification of aortic smooth muscle cells proliferation rate. The SMCs were seeded in 6-well plates at a rate of  $0.8 \times 10^6$  cells/mL/well in DMEM supplemented with 10% FCS, 1.2% glutamine, 1% antibiotics. Six SMCs plated well were treated with 50 mM of methionine and incubated for 72 h [20]. Another six SMCs plated wells were incubated without methionine and used as control. The cell proliferation rate was then performed on  $100 \ \mu$ L cell suspension in the presence of trypan blue by counting in Malassez chamber.

Morphometric analyses of heart and aorta. The morphometric study of the organ's structure was performed, using a Zeiss-type micrometer. For each of the parameters studied, we carried out 50 measurements on different fields of several histological sections, corresponding to the different control and treated animals. The microphotographs were made with Zeiss Primo Star type photomicroscope.

In the heart, we determined the thickness of the endocardium, myocardium, and pericardium. In the aorta, we measured thickness (arterial wall, intima, media, adventitia, and interlamellar spaces), number of elastic laminae, number of SMCs nuclei, and the dimensions of SMCs nuclei (length of their major and minor axes).

Morphometry of cultured aortic smooth muscle cells. To analyze the effect of methionine on SMCs (7<sup>th</sup> passage), the cells were plated in 6-well plates at 0.8 x 10<sup>6</sup> cells/mL/well in the presence of methionine (50 mM) for 72 h. After this period the *milieu* was removed, and the cells were washed once in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in Bouin's fixative for 30 min. After rinsing with PBS and ethanol (96%), the cells were stained for 10 min with a solution of Giemsa (1% in methanol) and May Grunwald (0.7g/L) (V/V, 1:1) stains, diluted to 1/3 in distilled water. The excess of stain was removed by washing with PBS.

In order to assess the phenotypic state of SMCs (synthetic and contractile) subjected to methionine, we carried out 25 measurements concerning certain cellular and nuclear parameters, namely, cellular major axis, major and small nuclear axes, number of nucleoli in each nucleus and nuclear major axis/cellular major axis ratio of SMCs. Each parameter was measured in different fields of view and in several wells.

Statistical analysis. Quantitative results were analyzed by GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). The values were expressed as a mean and mean's standard error (SEM). The Mann-Whitney test was used to evaluate the difference between the parameters of control and treated animals. Student's *t*-paired test was used for SMCs culture study. When the values of P were

lower than 0.05, the difference was considered statistically significant.

#### Results

#### Chronic methionine administration induced hyperhomocysteinemia in Psammomys obesus

We first sought to determine whether daily methionine treatment over 6 months induced Hhcy in Psammomys obesus. The Hcy concentration was measured, using chemiluminescent microparticle immunoassay, at day 1 before any injection of methionine to determine the baseline value of homocysteinemia of Psammomys obesus and 6 months later at the end of the experiment to assess the final homocysteinemia state.

A daily intraperitoneal injection of 70 mg/kg of methionine induced a large and significant increase of 529.93% (P < 0.001) in plasma homocysteinemia after 6 months. From 3.24  $\pm$  0.84  $\mu$ mol/L at day 1, homocysteinemia raised to  $20.41 \pm 5.39 \,\mu$ mol/L which is considered being a moderate range of Hhcy (Fig. 1).

#### Methionine-mediated hyperhomocysteinemia induced an increase of atherogenic lipoproteins in plasma of Psamomomys obesus

Atherosclerosis is among the most prevalent cardiovascular pathologies, which is related to lipid deposits in the wall of arteries. We next investigated the effect on atherosclerosis plasma markers and risk factors of methionine-mediated Hhcy at 6 months. Methionine treatment induced a significant increase in plasma glucose and uric acid concentrations (increases of 32.78% and 105.6%, respectively) (Table 1). The treatment with methionine also induced a large increase in triglyceridemia (307.36%; P < 0.001), whereas the increase in cholesterolemia by 45.37% was not significant (Table 1). The methionine treatment induced a decrease in the HDL-lipoproteins



Figure 1. Plasma homocysteine concentrations in the control and methionine-administered (Met) female sand rats, after 6 months of the experiment's duration. Data are presented as mean ± SD \*\*\* statistically significant differences between the control (n = 5) and methionine (n = 5) group, P < 0.001

level (70.4%; P < 0.01) and a tendency to an increase in the atherogenic lipoproteins LDL-VLDL plasma concentration (35.1%; P > 0.05) (Table 1). Moreover, we detected the presence of lipoprotein (a), a highly atherogenic LDL. Methionine-induced Hhcy was also accompanied by a decrease in bodyweight (Table 1).

#### Histological alterations of organ structure induced by methionine-mediated hyperhomocysteinemia The heart

The methionine-mediated Hhcy resulted in the significant thickening of Psammomys obesus heart's endocardium, myocardium, and pericardium (Table 2 and Figs. 2C, E, F, K).

Table 1. Evolution of body w	veight and biochemical plasma	parameters in control and	methionine-treated sand rats
------------------------------	-------------------------------	---------------------------	------------------------------

Parameters	Time 0 values	After 6 months of methionine (Met) administration at a dose of 70 mg/kg/day	
		Control group $(n = 5)$	Met group (n = 5)
Body weight (g)	94.75 ± 18.58	$105.5 \pm 3.97$	88.63 ± 5.94*
Glycemia (mg/dL)	$77.14 \pm 11.77$	$48.42 \pm 9.37$	$102.43 \pm 29.62^*$
Triglyceridemia (mg/dL)	$48.05 \pm 19.41$	$54.9 \pm 32.22$	195.74 ± 90.82***
Cholesterolemia (mg/dL)	$49.67 \pm 7.47$	$52.2 \pm 17.71$	$72.21 \pm 47.02$
HDL (mg/dL)	414016366401001001661101258.004	59.2 ± 7.2	17.54 ± 19.45**
LDL-VLDL (mg/dL)		50.27 ± 7.2	67.92 ± 31.33
Lipoprotein (a) (mg/dL)		Not detectable	14.58 ± 15.33
Proteinemia (mg/dL)	$64.37 \pm 19.08$	$48.8 \pm 2.59$	$73.4 \pm 9.82$
Uric acid (mg/dL)	$6.6 \pm 2.19$	$5.84 \pm 2.06$	$13.57 \pm 4.8^{***}$

Data are presented as mean ± SD. \*\*\*\*\*\* statistically significant differences between the control and methionine group, P < 0.05, P < 0.01 and P < 0.001, respectively. Plasma levels of HDL, LDL-VLDL and Lp (a) were not measured at time 0.

©Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry Folia Histochem Cytobiol. 2022 10.5603/FHC.a2022.0013 ISSN 0239-8508, e-ISSN 1897-5631

#### A chronic moderate methionine administration induced hyperhomocysteinemia

Table 2. Morphometric parameters of the heart wall layers in control and methionine-treated (Met) sand rats

Morphometric parameters	Control group	Met group
Endocardium thickness (µm)	$1.16 \pm 0.40$	4.05 ± 1.59****
Myocardium thickness (µm)	1468.89 ± 360.95	2298.22 ± 306.07****
Pericardium thickness (µm)	3.54 ± 1.97	38.73 ± 26.95****

Data are presented as mean  $\pm$  SD. \*\*\*\*statistically significant differences between the control and Met- group after 6 months of the experiment's duration; P < 0.0001 (n = 5; 6 sections per animal).

However, while the increase in endocardium and myocardium thickness was associated with an accumulation of connective tissue components (Figs. 2C, H, I), the increase in epicardium thickness seems to be secondary to an edema formation (Fig. 2K). Moreover, the endocardium exhibited endothelial cells hypertrophy and microthrombi on the luminal surface (Fig. 2B). The myocardium layer appeared disorganized with enlarged intercellular spaces with a cellular infiltration between the cardiomyocytes' fibers (Fig. 2F) and some cardiomyocytes exhibiting a pyknotic nucleus (Fig. 2E).

#### The aorta

Similarly, to the observations in the cardiac tissue, the methionine-mediated Hhcy caused significant alterations in the three layers of the aortic wall (intima, media, and adventitia) at both cellular and matrix levels. The thickness of the aortic wall increased significantly in the methionine-treated animals compared to the control group with an intima increase of 34.74% (P < 0.001) (Table 3). In addition, methionine treatment-induced microthrombi formation on the luminal surface (Fig. 3B), endothelial cell hypertrophy (Fig. 3B), stronger staining of the internal elastic lamina (Figs. 3C1, C2), and the remodeling of the extracellular matrix of the aortic wall (Figs. 3D, E, F, H).

The media layer of the aorta of methionine-treated animals presented thinner elastic laminas with a much less "wavy aspect" and focal ruptures (Figs. 3D, E). Moreover, collagen accumulated both at the periphery of the elastic lamina and in the interlamellar spaces (Figs. 3E, F) resulting in a significant increase in these spaces (23.84%, P < 0.01). Interestingly, the SMCs of methionine-treated animals exhibited two different phenotypes: proliferative SMCs (Fig. 3G) and reoriented SMCs (Fig. 3F) with a significant decrease in the major axis compared to the control group (Table 3). Methionine-induced Hhcy in *Psanmomys obesus* also led to aneurysms' formation that was marked by large fibrosis in the media and adventitia which increased their thickness (Fig. 3H).

#### The liver

Similarly to cardiovascular structural alterations observed in methionine-treated animals, the liver's structure showed deep alterations characterized by

©Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry Folia Histochem Cytobiol. 2022 10.5603/FHC.a2022.0013 ISSN 0239-8508, e-ISSN 1897-5631 the presence of hepatocytes with pycnotic nuclei (Fig. 4F), an accumulation of connective tissue components including collagens (Fig. 4C), glycoproteins (Fig. 4D), and proteoglycans (Fig. 4E) between the hepatocytes (Fig. 4F) and around the vessels causing a thickening of their walls and forming perivascular fibrosis. In addition to these alterations, methionine-induced Hhcy resulted in a true hepatic steatosis state (Fig. 4F, G) with the majority of the hepatocytes stuffed with lipids droplets (Fig. 4H) giving the liver a spongy aspect, light in color compared to the brown shade of a normal liver.

# Effects of methionine on cultured aortic smooth muscle cells

After 72 h of incubation with methionine (50 mM), the SMCs primary cultures exhibited the two phenotypes: fusiform contractile quiescent SMCs (Fig. 5C) and polygonal synthetic proliferative state (Fig. 5D). However, the quantification of the proliferation rate of SMCs showed no significant increase in the proliferation of the cells after methionine treatment compared to control cells (Fig. 5E; Table 4) while the assessment of the total protein in the extracellular compartment was significantly increased after methionine treatment suggesting an increase in protein secretion by SMCs (0.13  $\pm$  0.02 *vs.* 0.07  $\pm$  0.01 µg/mL, P < 0.001) (Fig. 5F).

In addition, the SMCs of the two subpopulations became significantly larger after 72 h of methionine treatment, by 44.72% (P < 0.0001) in contractile SMCs (Fig. 5C), and 18.12% (P < 0.001) in synthetic SMCs (Fig. 5D; Table 4). The SMCs nuclei also significantly increased in size, by 22.98% (P < 0.0001) in contractile SMCs and 16.11% (P < 0.0001) in synthetic SMCs (Table 4). In addition to the bigger size, the nuclei of the synthetic SMCs showed an increased number of nucleoli compared to corresponding controls ( $3.4 \pm 0.97$  vs.  $2.92 \pm 0.67$ , P < 0.01) (Table 4).

#### Discussion

Red meat, a component of the routine diet, contains high methionine level which is absorbed very efficiently and enters the plasma until removed and metabo-



**Figure 2.** Heart morphology of the control (A, D, G, J) and methionine-administered (Met) female sand rats (B, E, F, H, I, K), after 6 months of the experiment's duration; **A.** Endocardium of control sand rat; **B.** Endocardium of rat from Met group: hypertrophy of endothelial cells (red arrow) and microthrombus on the luminal surface; **C.** Endocardium of rat from methionine group: deposition of extracellular matrix material (proteoglycans) (black arrow), appearance of a protuberance on the luminal side (orange arrow); **D. G.** Myocardium of control rat: cardiomyocytes surrounded by weakly vascularized connective tissue composed of a few collagen fibers and many cardiac fibroblast; **E.** Myocardium of methionine group: a jagged shape of cardiomyocytes' nuclei with dense chromatin (black arrows); **F.** Myocardium of methionine-treated group; an enlargement of the intercellular spaces (red arrow), cellular infiltration between the cardiomyocytic trabeculae (blue circle); **H, I.** Myocardium of methionine group; interstitial and perivascular fibrosis; **J.** Epicardium of control sand rat: it covers the myocardium on the outside (black arrow); **K.** Epicardium of methionine group is characterized by a thickening (red arrow) marked by the presence of empty spaces. Abbreviations: L — lumen; eN — endothelial cell nucleus; My — myocardium; MT — microthrombus; CM — cardiomyocytes; CT — connective tissue; CF — cardiac fibroblasts. Sections were stained with Masson trichrome except for section C stained with alcian blue. Scale bars: 50  $\mu$ m (A, B, C, D and E); 20  $\mu$ m (F, G, I, J and K); 5  $\mu$ m (H).

©Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry Folia Histochem Cytobiol. 2022 10.5603/FHC.a2022.0013 ISSN 0239-8508, e-ISSN 1897-5631

#### A chronic moderate methionine administration induced hyperhomocysteinemia

Table 3. Morphometric parameters of the aortic wall layers in control and methionine-treated (Met) sand rats

Morphometric parameters	Control group	Met group
Wall thickness (µm)	119.8 ± 15.95	144.94 ± 57.86**
Adventitia thickness (µm)	30.25 ± 16.14	43.48 ± 59.38
Media thickness (µm)	87.75 ± 8.43	100.30 ± 24.53***
Intimal thickness (µm)	2.13 ± 0.58	2.87 ± 1.25***
Interlamellar space thickness (µm)	7.55 ± 2.97	9.35 ± 3.77 **
Major axis of SMCs (µm)	8.03 ± 2.80	6.58 ± 2.14***
Small axis of SMCs (µm)	3.28 ± 1.15	$3.33 \pm 1.12$
Number of nuclei of SMCs (per 5625 $\mu$ m <sup>2</sup> )	11.32 ± 3.29	15.06 ± 3.34****
Number of elastic laminas	7.48 ± 0.91	7.34 ± 1.04



Figure 3. Aorta histology of the control (A) and methionine-administered (Met) female sand rats (B, C, D, E, F, G, H, I), after 6 months of the experiment's duration; A. Aorta of control sand rat; B. Aorta of Met group; microthrombus and hyperplasia of endothelial cells (black arrow); C. Increased spaces in the intima probably reflecting local edema (C1) and duplication of internal elastic lamina (C2); D. Undulation shape loss, thinning of the elastic laminas; E. Breakage of elastic laminas (black arrow); F. Accumulation of collagen (yellow arrow); F. SMCs migration (pink arrow); G. SMCs proliferation (white arrow); H. Fibrosis in the media and the adventitia, installation of the aneurysm. Abbreviations: L — lume; I — intima; E n — endothelium; Ile — internal elastic lamina; Ad — adventitia; MT — microthrombus. Sections were stained with Masson's trichrome except for section D with PAS staining. Scale bars:  $50 \,\mu$ m.

©Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry Folia Histochem Cytobiol. 2022 10.5603/FHC.a2022.0013 ISSN 0239-8508, e-ISSN 1897-5631


**Figure 4.** Liver histology of the control (**A**, **B**) and methionine- administered female sand rats (**C–I**), after 6 months of the experiment's duration; **A**. A portal space in the hepatic tissue of control sand rat; **B**. The hepatic tissue is made up of lobules with mononuclear and binuclear hepatocytes; **C**. Accumulation of perivascular connective tissue in the liver of methionine group; **D**. Accumulation of glycoproteins; **E**. Accumulation of proteoglycans; **F**. Installation of interstitial fibrosis and vacuolation of the cytoplasm (\*); presence of hepatocytes with pyknotic nuclei; **G**. Installation of hepatic steatosis (black arrow); **H**. Lipid deposition (black arrow). Abbreviations: He — hepatocyte; bH — binucleated hepatocyte; CLV — sublobular vein; HA — hepatic artery; GP — glycoproteins; PG — proteoglycans; PN — pyknotic nuclei; FR — fibrosis. Stainings: A, B, C and F: Masson's trichrome method; D and G: PAS; E: alcian blue; H: Sudan Black. Scale bars:  $20 \,\mu$ m (A, C, D, E and G); 50  $\mu$ m (B, F and H).

©Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry Folia Histochem Cytobiol. 2022 10.5603/FHC.a2022.0013 ISSN 0239-8508, e-ISSN 1897-5631



**Figure 5.** *Psammomys obesus* aortic smooth muscle cells (SMCs) of control group (**A**, **B**) and SMCs treated with 50 mM methionine (**C**, **D**) for 72 hours; **A**. Contractile SMCs of control group; **B**. Synthetic SMCs of control group; **C**. Contractile SMCs of Met-group; **D**. Synthetic SMCs of Met-group; **E**. Proliferation SMCs Met-group *vs* control group; **F**. Total protein ( $\mu g/10^6$  cells) in the extracellular compartment of SMCs Met-group *vs* control group. Data are presented as mean  $\pm$  SD; \*\*\* statistically significant differences between the control and Methionine group; P < 0.001.

Table 4. Morphometric study of the cultured aortic smooth muscle cells (SMCs) of contractile and synthetic phenotypes, in control cells and methionine-treated cells

Morphometric parameters	Contractile SMCs		Synthetic SMCs	
	Control group	Methionine group	Control group	Methionine group
Cellular major axis (µm)	72.18 ± 15.82	$104.46 \pm 29.08^{****}$	46.02 ± 9.10	54.36 ± 12.74***
Nuclear major axis (µm)	15.66 ± 2.66	19.26 ± 3.98****	$14.52 \pm 2.02$	$16.86 \pm 2.9^{****}$
Nuclear small axis (µm)	7.62 ± 1.51	9.87 ± 2.57****	12.72 ± 1.55	13.59 ± 2.09*
Nuclear axis/cellular axis	$0.22 \pm 0.05$	$0.19 \pm 0.05^{***}$	$0.33 \pm 0.07$	$0.32 \pm 0.08$
Number of nucleoli	$2.56 \pm 0.97$	$2.64 \pm 0.90$	$2.92 \pm 0.67$	$3.4 \pm 0.97^{**}$

Data are presented as mean  $\pm$  SD. \*, \*\*\*\*\*\*statistically significant differences at the same time between the control and methionine-treated cells at 50 mM for 72 h; P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001 and P < 0.0001, respectively (n = 2; 6 sections per animal).

lized by the different tissues [3]. Since the cardiovascular disease increases in the population with high meat intake, the question is raised whether methionine directly or through its metabolites is implicated in the pathophysiology of cardiovascular diseases. For instance, given that methionine is a donor of methyl groups, it has been shown that excess of methionine in diet content alters the DNA methylation levels thus altering the gene expression [22]. More importantly,

©Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry Folia Histochem Cytobiol. 2022 10.5603/FHC.a2022.0013 ISSN 0239-8508, e-ISSN 1897-5631 the accumulation of Hcy, a methionine-derived metabolite, causing Hhcy has been demonstrated to be a cardiovascular disease risk [3, 23].

Numerous experimental data have indicated that Hhcy can result from either Hcy [24, 25] or methionine supplementation [26, 27]. In our model, we aimed to induce chronic moderate hyperhomocysteinemia with a daily methionine intraperitoneal injection at a dose of 70 mg/kg in *Psammomys obesus* for 6 months.

### Fouzia Zerrouk et al.

The treatment induced a moderate-level Hhcy  $(20.41 \pm 5.39 \,\mu \text{mol/L})$  considering the values reported in human plasma that ranges from  $12 \text{ to } 30 \,\mu\text{mol/L} [2]$ . However, to induce a moderate Hhcy in humans, only a single oral high dose of methionine was necessary (0.1 g/kg) [28]. Our result is in agreement with those reported by many previous studies that showed a methionine-enriched diet to induce a moderate Hhcy in different animal models (pig, gerbil, and rat) [27, 29, 30]. In the rat, a species known to be athero-resistant administration of a high dose of methionine (200 mg/ kg) for a long period (6 months) is necessary to induce Hhcy [31, 32]. In our laboratory, a study published in 2019, reported for the first time a moderate Hhcy in Psammomys obesus; however, the Hhcy was induced by a high dose of methionine (300 mg/kg) administered for 4 weeks [13]. Our current model, in contrast to the previous models using a high dose of methionine for a short period of time, shows that administration of a low dose of methionine for a long time is sufficient to induce Hhcy in Psammomys obesus and thus better reproduces the slow progressive disease occurrence in human pathology.

We first investigated the body weight of the animal every month during the 6 months of methionine administration and reported a significant decrease from the 2nd month to the end of the experiment. Similar results were reported by Ghoul and Zhou in rats and mice respectively [32, 33]. However, the bodyweight seems to be not always affected in rats and gerbils by methionine-induced Hhcy [26, 30, 31] and it is plausible that the variations in the dose of methionine and duration of its administration may play a role.

In our model, the methionine-induced Hhcy was associated with significant hyperglycemia increased uric acid concentration, and dyslipidemia all of which parameters are included in human metabolic syndrome phenotype and implicated in cardiovascular disease pathophysiology. Some of these alterations including hyperglycemia and uric acid increase were not observed in previous models [13, 29, 31]. Moreover, we found that a significant increase in triglyceridemia in the methionine-mediated Hhcy animals was associated with a misbalance between a decreased plasma cardioprotective lipoprotein HDL level and increased concentration of the plasma atherogenic lipoprotein LDL-VLDL including the lipoprotein a. Our results are in agreement with those observed in the wellknown atherosclerosis mouse model ApoE-/- in which the gene coding the CBS (cystathionine beta-synthase, the enzyme degrading Hcy) was also inactivated to induce Hhcy [34]. The presence in the blood plasma of lipoprotein a, considered a cardiovascular disease factor risk [35], and in methionine-induced Hhcy animals further confirms the relevance of our model to assess cardiovascular diseases pathophysiology mechanisms such as oxidative stress [36] and inflammation [37] and the efficiency of new therapies directed against homocysteinemia. This therapeutic target is underlined by findings that revealed that plasma Hcy level positively correlated with remodeling of extracellular matrix (ECM) of several tissues, including the heart, aorta, and liver [38, 39].

The structural alterations in the heart, aorta, and liver in Psammomys obesus animals administrated with 70 mg/kg of methionine for 6 months further characterized the atherosclerosis phenotype induced by Met-mediated Hhcy. Indeed, methionine-induced Hhcy exerted angiotoxic effects on the heart and aorta characterized by the presence of microthrombi, atheromatous plaques, interstitial and perivascular fibrosis in addition to deep alterations in the myocardium and liver steatosis. Similar alterations were previously observed after methionine treatment in different animal models including Psammomys obesus; however, the doses of methionine were 2.5 to 4 times higher than in the current study [4, 13, 31, 40, 41]. Moreover, in the previous study in Psammomys obesus, the high methionine administration was administrated for a short period (30 days) reproducing an acute Hhcy and its subsequent effects [13].

Interestingly, our current study showed that the interstitial and the perivascular fibrosis in the myocardium is due to the accumulation of collagen type I and type III confirming our previous results [13] that demonstrated this accumulation was associated with an imbalance between increased expression of MMP-9 metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (TIMP-2) and decreased expression of MMP-2 and TIMP-1. Moreover, the cellular infiltration between the cardiomyocytic trabeculae suggested the presence of inflammation. Indeed, we previously showed an increase in plasma CRP level in Psammomys obesus treated with a high dose of methionine for one month [13]. This inflammatory marker was also reported to be increased in a dose- and time-dependent manner in rats treated with methionine [26]. Furthermore, the thickening of the epicardium in the methionine-mediated Hhcy Psammomys obesus group suggested either edema or an accumulation of adipose tissue [42].

The aorta is the main vascular structure after the heart. Here we show that Met-mediated Hhcy induced deep alterations of the aorta including intima layer thickening and hyperplasia of the endothelial cells, which suggest subsequent vascular dysfunctions. Indeed, the thickening of the sub-endothelial space presents a fibrous material rich in collagen indicating

<sup>©</sup>Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry Folia Histochem Cytobiol. 2022 10.5603/FHC.a2022.0013 ISSN 0239-8508, e-ISSN 1897-5631

# A chronic moderate methionine administration induced hyperhomocysteinemia

the formation of young atheromatous plaques while the observed endothelial lesions and ruptures of *elastica interna* would increase the intimal permeability to macromolecules allowing their accumulation in the intima layer [33]. Previous studies showed these alterations to be associated with an increase in adhesion molecules expressed in the aorta wall such as ICAM-1, E-selectin, and P-selectin [42–45]. The increase in these molecules has been shown to subsequently induce an increased adhesion of monocytes to aortic endothelium [43–46].

Consistently with Augier and collaborators' results [47] we observed, in the methionine-mediated Hhcy, a thinning of the aortic media layer together with the loss of undulation, disorganization, and disruption of elastic laminas reflecting vascular remodeling and damage of elastic fibers' network. Some authors suggested this damage associated with short elastin fragments could result from the increase in elastase-like activity dependent on metalloproteinases [41, 48].

Importantly, methionine-mediated Hhcy induced the proliferation and migration of SMCs in some interlamellar space areas with complete disorganization of the matrix and collagen accumulation. Indeed, from a quiescent contractile phenotype in control animals, the SMCs isolated from methionine-treated animals showed synthetic or proliferative phenotypes. The transition of SMCs between the two phenotypes was shown to be associated with human atherosclerosis pathology [49]. Moreover, previous *in vivo* and *in vitro* studies have shown methionine or Hcy treatment to induce SMCs proliferation and migration, partially due to p38 activation or increased expression of *cyclin D1* and *cyclin A* mRNA transcripts [25, 50–52].

In the aortal adventitia, we noticed a matrix very rich in collagen probably synthesized by fibroblasts. Yao and Sun (2014) demonstrated that incubation of rat aortic adventitial fibroblasts with Hcy significantly increased collagen type 1 and AT1R (Angiotensin II Type 1 Receptor) expression [53], suggesting that adventitial fibroblasts may play an important role in the accumulation of the extracellular matrix and vascular adventitial remodeling. Our results also showed an association between increased levels of Hcy and the occurrence of an aneurysm. According to Liu *et al.* (2012), Hhcy induces abdominal aortic aneurysm formation in mice *via* activation of the adventitial fibroblast NADPH oxidase 4 [54].

Hhcy is well known as an independent risk factor for cardiovascular disease [8, 55], and has been proposed to be a potential risk factor for nonalcoholic fatty liver disease [5, 56]. Hepatic steatosis is due to

©Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry Folia Histochem Cytobiol. 2022 10.5603/FHC.a2022.0013 ISSN 0239-8508, e-ISSN 1897-5631 increased lipids' uptake, biosynthesis, or impaired lipids export in addition to fatty acids oxidation in mitochondria. Interestingly, our study showed methionine-mediated Hhcy to induce deep hepatic steatosis with the majority of hepatocytes packed with lipid droplets and adipose tissue accumulation in interstitial and perivascular spaces. In agreement with our results, Ai et al. (2017) demonstrated, that 16 weeks of high methionine diet feeding (2% of methionine) in C57BL/6J mice, increased plasma Hcy level and induced hepatic steatosis [57]. The same results were observed in rats administrated high methionine diet (500 mg/kg/day) for three months [4]. In addition to lipids accumulation, the pathogenesis of liver diseases in the case of hyperhomocysteinemia could be due to the excessive generation of reactive oxygen species [58, 59]. Indeed, some studies on rat liver have shown that a methionine-rich diet increases hepatic lipid peroxidation [60, 61], and decreases the antioxidant activity [62].

In summary, we found that prolonged methionine administration in *Psammomys obesus* induced hyperhomocysteinemia associated with an atherosclerosis phenotype including the typical alterations observed in the heart, aorta, and liver. Therefore, we suggest that our experimental model could be used for better understanding atherosclerosis pathomechanisms and also for testing anti-atherosclerotic therapies.

# **Financial disclosure**

This study was supported by the PRFU project D01N01UN160420180008 (DGRSDT-Ministry of Higher Education and Scientific Research. Algeria).

# **Conflicts of interest**

The authors declare no conflict of interest.

#### References

- Rabinovich-Nikitin I, Lieberman B, Martino TA, et al. Circadian-Regulated Cell Death in Cardiovascular Diseases. Circulation. 2019; 139(7): 965–980, doi: 10.1161/CIRCU-LATIONAHA.118.036550, indexed in Pubmed: 30742538.
- Guilland JC, Favier A, Courcy GP, et al. L'hyperhomocystéinémie : facteur de risque cardiovasculaire ou simple marqueur ? Pathologie Biologie. 2003; 51(2): 101–110, doi: 10.1016/s0369-8114(03)00104-4.
- Chaturvedi P, Kamat PK, Kalani A, et al. High Methionine Diet Poses Cardiac Threat: A Molecular Insight. J Cell Physiol. 2016; 231(7): 1554–1561, doi: 10.1002/jcp.25247, indexed in Pubmed: 26565991.

### Fouzia Zerrouk et al.

- Yefsah-Idres A, Benazzoug Y, Otman A, et al. Hepatoprotective effects of lycopene on liver enzymes involved in methionine and xenobicic metabolism in hyperhomocysteinemic rats. Food Funct. 2016; 7(6): 2862–2869, doi: 10.1039/ c6fo00095a, indexed in Pubmed: 27232443.
- Stojanović M, Todorović D, Šćepanović Lj, et al. Subchronic methionine load induces oxidative stress and provokes biochemical and histological changes in the rat liver tissue. Mol Cell Biochem. 2018; 448(1-2): 43–50, doi: 10.1007/s11010-018-3311-2, indexed in Pubmed: 29423685.
- Gibson JB, Carson NA, Neill DW. Pathological findings in homocystinuria. J Clin Pathol. 1964; 17: 427–437, doi: 10.1136/ jcp.17.4.427, indexed in Pubmed: 14195630.
- Yang F, Tan HM, Wang H. Hyperhomocysteinemia and atherosclerosis - An overview. Int J Pharma Bio Sci. 2011; 2: 348–354.
- Maron BA, Loscalzo J. The treatment of hyperhomocysteinemia. Annu Rev Med. 2009; 60: 39–54, doi: 10.1146/annurev. med.60.041807.123308, indexed in Pubmed: 18729731.
- Roblin X, Pofelski J, Zarski JP. Rôle de l'homocystéine au cours de la stéatose hépatique et de l'hépatite chronique C. Gastroentérologie Clinique et Biologique. 2007; 31(4): 415– -420, doi: 10.1016/s0399-8320(07)89402-4.
- Baszczuk A, Kopczyński Z. Hyperhomocysteinemia in patients with cardiovascular disease. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2014; 68: 579–589, doi: 10.5604/17322693.1102340, indexed in Pubmed: 24864108.
- Hamlat N, Negazzi S, Forcheron F, et al. Lipogenesis in arterial wall and vascular smooth muscle cells of Psammomys obesus: its regulation and abnormalities in diabetes. Diabetes Metab. 2010; 36(3): 221–228, doi: 10.1016/j.diabet.2010.01.003, indexed in Pubmed: 20303812.
- Berdja S, Smail L, Saka B, et al. Glucotoxicity induced oxidative stress and inflammation in vivo and in vitro in psammomys obesus: involvement of aqueous extract of brassica rapa rapifera. Evid Based Complement Alternat Med. 2016; 2016: 3689208, doi: 10.1155/2016/3689208, indexed in Pubmed: 27047569.
- Chaouad B, Moudilou EN, Ghoul A, et al. Hyperhomocysteinemia and myocardial remodeling in the sand rat, Psammomys obesus. Acta Histochem. 2019; 121(7): 823–832, doi: 10.1016/j.acthis.2019.07.008, indexed in Pubmed: 31377002.
- Daly M, Daly S. On the feeding ecology of psammomys obesus (rodentia, gerbillidae) in the wadi saoura, algeria. Mammalia. 1973; 37(4), doi: 10.1515/mamm.1973.37.4.545.
- Aouichat Bouguerra S, Benazzoug Y, Bekkhoucha F, et al. Effect of high glucose concentration on collagen synthesis and cholesterol level in the phenotypic modulation of aortic cultured smooth muscle cells of sand rat (Psammomys obesus). Exp Diabesity Res. 2004; 5(3): 227–235, doi: 10.1080/15438600490489793. indexed in Pubmed: 15512791.
- Frantzen F, Faaren AL, Alfheim I, et al. Enzyme conversion immunoassay for determining total homocysteine in plasma or serum. Clin Chem. 1998; 44(2): 311–316, indexed in Pubmed: 9474030.
- Kawakami K, Tsukada A, Okubo M, et al. A rapid electrophoretic method for the detection of serum Lp(a) lipoprotein. Clin Chim Acta. 1989; 185(2): 147–155, doi: 10.1016/0009-8981(89)90037-5, indexed in Pubmed: 2533887.
- Martoja R, Martoja M. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Paris: Masson.; 1967.
- Bouguerra SA, Bourdillon MC, Dahmani Y, et al. Non insulin dependent diabetes in sand rat (Psammomys obesus) and production of collagen in cultured aortic smooth muscle cells.

©Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry Folia Histochem Cytobiol. 2022 10.5603/FHC.a2022.0013 ISSN 0239-8508, e-ISSN 1897-5631 influence of insulin. Int J Exp Diabetes Res. 2001; 2(1): 37-46, doi: 10.1155/edr.2001.37, indexed in Pubmed: 12369725.

- Benavides MA, Oelschlager DK, Zhang HG, et al. Methionine inhibits cellular growth dependent on the p53 status of cells. Am J Surg. 2007; 193(2): 274–283, doi: 10.1016/j.amjsurg.2006.07.016, indexed in Pubmed: 17236862.
- Hildebrandt S, Steinhart H, Paschke A, et al. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72(3): 248–254, doi: 10.1006/abio.1976.9999, indexed in Pubmed: 942051.
- Park CM, Cho CW, Rosenfeld ME, et al. Methionine supplementation accelerates oxidative stress and nuclear factor kappaB activation in livers of C57BL/6 mice. J Med Food. 2008; 11(4): 667–674, doi: 10.1089/jmf.2007.0146, indexed in Pubmed: 19053858.
- Steed MM, Tyagi SC. Mechanisms of Cardiovascular Remodeling in Hyperhomocysteinemia. Antioxid Redox Signal. 2011; 15(7): 1927–1943, doi: 10.1089/ars.2010.3721, indexed in Pubmed: 21126196.
- Miller A, Mujumdar V, Shek E, et al. Hyperhomocyst(e) inemia induces multiorgan damage. Heart Vessels. 2000; 15(3): 135–143, doi: 10.1007/s003800070030, indexed in Pubmed: 11289502.
- Akasaka K, Akasaka N, Di Luozzo G, et al. Homocysteine promotes p38-dependent chemotaxis in bovine aortic smooth muscle cells. J Vasc Surg. 2005; 41(3): 517–522, doi: 10.1016/j. jvs.2004.12.043, indexed in Pubmed: 15838488.
- Sharma M, Rai SK, Tiwari M, et al. Effect of hyperhomocysteinemia on cardiovascular risk factors and initiation of atherosclerosis in Wistar rats. Eur J Pharmacol. 2007; 574(1): 49–60, doi: 10.1016/j.ejphar.2007.07.022, indexed in Pubmed: 17706635.
- Kirac D, Negis Y, Ozer NK. Vitamin E attenuates homocysteine and cholesterol induced damage in rat aorta. Cardiovasc Pathol. 2013; 22(6): 465–472, doi: 10.1016/j.carpath.2013.03.007, indexed in Pubmed: 23643071.
- Bellamy MF, McDowell IF, Ramsey MW, et al. Hyperhomocysteinemia after an oral methionine load acutely impairs endothelial function in healthy adults. Circulation. 1998; 98(18): 1848–1852, doi: 10.1161/01.cir.98.18.1848, indexed in Pubmed: 9799203.
- Charpiot P, Bescond A, Augier T, et al. Hyperhomocysteinemia induces elastolysis in minipig arteries: structural consequences, arterial site specificity and effect of captopril-hydrochlorothiazide. Matrix Biol. 1998; 17(8-9): 559–574, doi: 10.1016/s0945-053x(98)90108-1, indexed in Pubmed: 9923650.
- Hidiroglou N, Gilani GS, Long L, et al. The influence of dietary vitamin E, fat, and methionine on blood cholesterol profile, homocysteine levels, and oxidizability of low density lipoprotein in the gerbil. J Nutr Biochem. 2004; 15(12): 730–740, doi: 10.1016/j.jnutbio.2004.04.009, indexed in Pubmed: 15607646.
- Raaf L, Noll C, Cherifi ME, et al. Myocardial fibrosis and TGFB expression in hyperhomocysteinemic rats. Mol Cell Biochem. 2011; 347(1-2): 63–70, doi: 10.1007/s11010-010-0612-5, indexed in Pubmed: 20938722.
- Ghoul A, Moudilou E, Cherifi ME, et al. The role of homocysteine in seminal vesicles remodeling in rat. Folia Histochem Cytobiol. 2017; 55(2): 62–73, doi: 10.5603/FHC.a2017.0010, indexed in Pubmed: 28636071.
- 33. Zhou J, M ller J, Danielsen CC, et al. Dietary supplementation with methionine and homocysteine promotes early atherosclerosis but not plaque rupture in ApoE-deficient mice.

www.journals.viamedica.pl/folia\_histochemica\_cytobiologica

# 122

### A chronic moderate methionine administration induced hyperhomocysteinemia

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001; 21(9): 1470–1476, doi: 10.1161/hq0901.096582, indexed in Pubmed: 11557674.

- Liao D, Tan H, Hui R, et al. Hyperhomocysteinemia decreases circulating high-density lipoprotein by inhibiting apolipoprotein A-I Protein synthesis and enhancing HDL cholesterol clearance. Circ Res. 2006; 99(6): 598–606, doi: 10.1161/01. RES.0000242559.42077.22, indexed in Pubmed: 16931800.
- Aasvee K, Jauhiainen M, Kurvinen E, et al. Determinants of risk factors of atherosclerosis in the postinfarction period: the Tallinn MI study. Scand J Clin Lab Invest. 2006; 66(3): 191–199, doi: 10.1080/00365510600564881, indexed in Pubmed: 16714248.
- Au-Yeung KKW, Woo CWH, Sung FL, et al. Hyperhomocysteinemia activates nuclear factor-kappaB in endothelial cells via oxidative stress. Circ Res. 2004; 94(1): 28–36, doi: 10.1161/01.RES.0000108264.67601.2C, indexed in Pubmed: 14630727.
- Lazzerini PE, Capecchi PL, Selvi E, et al. Hyperhomocysteinemia, inflammation and autoimmunity. Autoimmun Rev. 2007; 6(7): 503–509, doi: 10.1016/j.autrev.2007.03.008, indexed in Pubmed: 17643940.
- Joseph J, Washington A, Joseph L, et al. Hyperhomocysteinemia leads to adverse cardiac remodeling in hypertensive rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002; 283(6): H2567–H2574, doi: 10.1152/ajpheart.00475.2002, indexed in Pubmed: 12388235.
- Matté C, Stefanello FM, Mackedanz V, et al. Homocysteine induces oxidative stress, inflammatory infiltration, fibrosis and reduces glycogen/glycoprotein content in liver of rats. Int J Dev Neurosci. 2009; 27(4): 337–344, doi: 10.1016/j. ijdevneu.2009.03.005, indexed in Pubmed: 19460627.
- Devi S, Kennedy RH, Joseph L, et al. Effect of long-term hyperhomocysteinemia on myocardial structure and function in hypertensive rats. Cardiovasc Pathol. 2006; 15(2): 75–82, doi: 10.1016/j.carpath.2005.11.001, indexed in Pubmed: 16533695.
- Othmani Mecif K, Aouichat Bouguerra S, Benazzoug Y. Plasma and aorta biochemistry and mmps activities in female rabbit fed methionine enriched diet and their offspring. J Nutr Metab. 2017; 2017: 2785142, doi: 10.1155/2017/2785142, indexed in Pubmed: 28133545.
- Balcio lu AS, Durako lugil ME, Ciçek D, et al. Epicardial adipose tissue thickness and plasma homocysteine in patients with metabolic syndrome and normal coronary arteries. Diabetol Metab Syndr. 2014; 6: 62, doi: 10.1186/1758-5996-6-62, indexed in Pubmed: 24872849.
- Wang G, Woo CWH, Sung FL, et al. Increased monocyte adhesion to aortic endothelium in rats with hyperhomocysteinemia: role of chemokine and adhesion molecules. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002; 22(11): 1777–1783, doi: 10.1161/01. atv.0000035404.18281.37, indexed in Pubmed: 12426204.
- Zhang R, Ma J, Xia M, et al. Mild hyperhomocysteinemia induced by feeding rats diets rich in methionine or deficient in folate promotes early atherosclerotic inflammatory processes. J Nutr. 2004; 134(4): 825–830, doi: 10.1093/jn/134.4.825, indexed in Pubmed: 15051832.
- Dayal S, Wilson KM, Leo L, et al. Enhanced susceptibility to arterial thrombosis in a murine model of hyperhomocysteinemia. Blood. 2006; 108(7): 2237–2243, doi: 10.1182/ blood-2006-02-005991, indexed in Pubmed: 16804115.
- Postea O, Krotz F, Henger A, et al. Stereospecific and redox-sensitive increase in monocyte adhesion to endothelial cells by homocysteine. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006; 26(3): 508–513, doi: 10.1161/01.ATV.0000201039.21705.dc, indexed in Pubmed: 16373615.

©Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry Folia Histochem Cytobiol. 2022 10.5603/FHC.a2022.0013 ISSN 0239-8508. e-ISSN 1897-5631

- Charpiot P, Bescond A, Augier T, et al. Medial elastic structure alterations in atherosclerotic arteries in minipigs: plaque proximity and arterial site specificity. Matrix Biol. 1997; 15(7): 455–467, doi: 10.1016/s0945-053x(97)90019-6, indexed in Pubmed: 9106157.
- Chaussalet M, Lamy E, Foucault-Bertaud A, et al. Homocysteine modulates the proteolytic potential of human vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 316(1): 170–176, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.02.027, indexed in Pubmed: 15003526.
- Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. Circ Res. 2016; 118(4): 692–702, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306361, indexed in Pubmed: 26892967.
- Tyagi SC. Homocysteine redox receptor and regulation of extracellular matrix components in vascular cells. Am J Physiol. 1998; 274(2): C396–C405, doi: 10.1152/ajpcell.1998.274.2.C396, indexed in Pubmed: 9486129.
- Tsai JC, Wang H, Perrella MA, et al. Induction of cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells. J Clin Invest. 1996; 97(1): 146–153, doi: 10.1172/ JCI118383, indexed in Pubmed: 8550827.
- Murthy SN, Obregon DF, Chattergoon NN, et al. Rosiglitazone reduces serum homocysteine levels, smooth muscle proliferation, and intimal hyperplasia in Sprague-Dawley rats fed a high methionine diet. Metabolism. 2005; 54(5): 645–652, doi: 10.1016/j.metabol.2004.12.008, indexed in Pubmed: 15877295.
- 53. Yao D, Sun NL. Hyperhomocysteinemia accelerates collagen accumulation in the adventitia of balloon-injured rat carotid arteries via angiotensin II type 1 receptor. Int J Mol Sci. 2014; 15(11): 19487–19498, doi: 10.3390/ijms151119487, indexed in Pubmed: 25350112.
- Liu Z, Luo H, Zhang Lu, et al. Hyperhomocysteinemia exaggerates adventitial inflammation and angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm in mice. Circ Res. 2012; 111(10): 1261–1273, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.270520, indexed in Pubmed: 22912384.
- Škovierová H, Vidomanová E, Mahmood S, et al. The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health. Int J Mol Sci. 2016; 17(10), doi: 10.3390/ ijms17101733, indexed in Pubmed: 27775595.
- Dai Y, Zhu J, Meng Di, et al. Association of homocysteine level with biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. J Clin Biochem Nutr. 2016; 58(1): 76–83, doi: 10.3164/jcbn.15-54, indexed in Pubmed: 26798201.
- Ai Y, Sun Z, Peng C, et al. Homocysteine induces hepatic steatosis involving ER stress response in high methionine diet-fed mice. Nutrients. 2017; 9(4), doi: 10.3390/nu9040346, indexed in Pubmed: 28368295.
- Robert K, Chassé JF, Santiard-Baron D, et al. Altered gene expression in liver from a murine model of hyperhomocysteinemia. J Biol Chem. 2003; 278(34): 31504–31511, doi: 10.1074/jbc.M213036200, indexed in Pubmed: 12799373.
- Luo X, Xiao L, Yang H, et al. Homocysteine downregulates gene expression of heme oxygenase-1 in hepatocytes. Nutr Metab (Lond). 2014; 11(1): 55, doi: 10.1186/1743-7075-11-55, indexed in Pubmed: 25520741.
- Lynch SM, Strain JJ. Increased hepatic lipid peroxidation with methionine toxicity in the rat. Free Radic Res Commun. 1989; 5(4-5): 221–226, doi: 10.3109/10715768909074704, indexed in Pubmed: 2707623.
- Mori N, Hirayama K. Long-term consumption of a methionine-supplemented diet increases iron and lipid peroxide levels in rat liver. J Nutr. 2000; 130(9): 2349–2355, doi: 10.1093/ jn/130.9.2349, indexed in Pubmed: 10958834.

## Fouzia Zerrouk et al.

 Tamanna N, Kroeker K, Braun K, et al. The effect of shortterm methionine restriction on glutathione synthetic capacity and antioxidant responses at the whole tissue and mitochondrial level in the rat liver. Exp Gerontol. 2019; 127: 110712, doi: 10.1016/j.exger.2019.110712, indexed in Pubmed: 31472257.

Submitted: 27 July, 2021 Accepted after reviews: 18 May, 2022 Available as AoP: 30 May, 2022

©Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry Folia Histochem Cytobiol. 2022 10.5603/FHC.a2022.0013 ISSN 0239-8508, e-ISSN 1897-5631

www.journals.viamedica.pl/folia\_histochemica\_cytobiologica

124