



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abbès Laghrou Khenchela
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de biologie moléculaire et cellulaire

MEMOIRE

Présenté Pour l'obtention du Diplôme de
MASTER ACADIMIQUE

FILIERE : Sciences biologiques
OPTION : Biologie Moléculaire et Génie Génétique

Thème

**Hyperhomocystéinémie :
Étude génétique, biochimique et histologique**

Présenté par :

Boutarfa Roumissa

Sahraoui Amina

Soutenu le : 05 /06 / 2016

Jury de soutenance

Présidente : Mme Merabti Ryma MCB Université Abbès Laghrou Khenchela
Encadreur : Mme Derouiche Faouzia MCB Université Abbès Laghrou Khenchela
Examinatrice: Mme Bouhalit Samira MAA Université Abbès Laghrou Khenchela

Année universitaire 2015 -2016

Laboratoire où le travail a été réalisé :
Service Anapathologie hôpital Ahmed Benbella Khenchela.
Laboratoire pédagogique de l'université Abbès Laghrou Khenchela. |



Remerciements



*En premier lieu, nous tenons à remercier notre DIEU,
Notre créateur pour nous avoir donné la force pour
Accomplir ce travail.*

*Nous désirons exprimer nos profonds remerciements et notre vive
reconnaissance à notre encadreur,*

Mme .Derouiche Fouzia.

*Pour nous avoir proposé ce sujet intéressant et qui a mis toute sa
compétence à notre disposition, Merci également pour votre
encadrement, votre disponibilité et votre gentillesse.*

*Nos remerciements au Dr.Riche pour son soutien et ses remarques
pendant Toute la période du stage, et à l'équipe de laboratoire
d'anapathologie qui nous 'a accueilli au début de ce stage.*

*Je tiens à remercier aussi Mme MERABTI.R d'avoir accepté de
présider ce travail, ainsi que Mme BOUHALIT. S d'avoir accepté
d'être examinatrice. Veuillez trouver ici le témoignage de notre
respect le plus profond.*

*Nos remerciements vont aussi à tous nos enseignants et toutes les
personnes qui nous soutenus jusqu'au bout, et qui n'ont pas cessé de
nous donner des conseils très importants en signe de reconnaissance.*



Roumïssa et Amïna





Je dédie ce modeste travail :

*A l'âme de mon cher père **Abd El wahed Boutarfa**, Qu'il est à jamais
parti...*

*Personne ici ne l'a oublié, Chaque jours il est au cœur de mes
pensées. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour,*

L'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu

Pour vous. J'espère que tu habites les paradis.

*A celle qui m'a transmis la vie, l'amour, le courage, à toi chère
Maman toutes mes joies, mon amour et ma reconnaissance.*

*Mon frère **Abd el ghafour** et tous **mes sœurs** qui n'ont cessé d'être
pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.*

*A tous mes amis avec lesquels j'ai partagé mes moments de joie et de
bonheur*

*Que toute personne m'ayant aidé de près ou de loin, trouve ici
l'expression de ma reconnaissance*





Que ce travail témoigne de mes respects :

A mes parents :

**Djamel sahraoui* ET *Nacira mebarki*.*

Grâce à leurs tendres encouragements et leurs grands sacrifices, ils ont pu créer le climat affectueux et propice à la poursuite de mes études. Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes profonds sentiments envers eux. Je prie le bon Dieu de les bénir, de veiller sur eux, en espérant qu'ils seront toujours fiers de moi.

*A mes sœurs *Rabab. Amel. Aya.* et à mon frère*Ahmed amine* à l'esprit pur de ma petite Sœur *Innés* Dieu ait son âme et paradis papillotes.*

A la famille SAHRAOUI et MEBARKI

Ils vont trouver ici l'expression de mes sentiments de respect et de Reconnaissance pour le soutien qu'ils n'ont cessé de me porter.

A tous mes amis et mes collègues :

Ils vont trouver ici le témoignage d'une fidélité et d'une amitié infinie.



Amína



Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau 1	Classification des hyperhomocystéinémies	2
Tableau 2	Principales causes de l'HHcy	5
Tableau 3	Variant MTHFR et diminution de l'activité enzymatique associée	14
Tableau 4	Les exemples et les conséquences de la protéine S-homocystéinylation	26

Liste des Abréviations

AD	Adénosine
ALP	Alcaline phosphatase
ATF	Activating Transcription Factor
BE	Bilan enzymatique
BHMT	Bétaïne Homocystéine Méthyltransférase
BL	Bilan lipidique
Cbl	Cobalamine
CBS	Cystathionine-Beta-Synthetase
CML	Cellule musculaire lisse
CT	Cholestérol total
CS	Cellule spumeuse
CV	Cardiovasculaire
Cys	Cystéine
DG	Dégénération des glomérules
DETR	Dégénération de l'épithélium des tubes rénaux
DO	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
DTNB	Dithio-bis-2-nitrobenzoïque
EB	Espace de Bowman
EDRF	Endothelium Derived Releasing Factor
EF	Fibre élastique
ENDI	Endothélium intact
ENDL	Endolyse
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FMCI	Fibre musculaire cardiaque intacte
FMN	Flavine Mononucléotide
GK	Glycérol kinase
GPO	Glycérol-3-phosphate oxydase
GPX	Glutathion Peroxydase
GRP	Glucose Régulage Protéine
GSH	Glutathione
H	Hépathocyte
HA	Acide homocystéique

Hb	Hémoglobines
HCT	Homocystéine Totale
HDL-C	High density lipoprotein
HHcy	Hyperhomocystéinémie
IRC	Insuffisance rénale chronique
L	Lumière
L	Lyse
LDL-C	Low density lipoprotein
LFMC	Lyse de la fibre musculaire cardiaque
LPL	Lipoprotéine lipase
MTHFR	Methylene Tetrahydrofolate Reductase
MS	Méthionine Synthase
MSR	Methionine Synthase Reductase
MA	Maladie d'Alzheimer
MPTP	Méthyl Phényl Tetrahydropyridine
MCP	Monocyte Chimio Protéine
MP	Maladie de Parkinson
MPTP	Méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MDA	Malondialdéhyde
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF	Noyau fusiforme
NFB	Noyau du fibroblaste
NFMC	Noyau de la fibre musculaire cardiaque
NMDA	N-Méthyl-D-Asparate
NO	Noyau ovale
PL	Pyridoxal
PLP	Phosphate de pyridoxal
PM	Pyridoxamine
PMP	Pyridoxamine Phosphate
PN	Pyridoxine
PNP	Pyridoxine Phosphate
POD	Peroxydase
RE	Réticulum Endoplasmique
S	Sinusoïde

SAH	S-adenosyl-L-homocystéine
SAM	Activateur allostérique de la protéine
SNP	Single nucléotide polymorphisme
SOD	Superoxyde Dismutase
T	Témoins
TBA	Acide thiobarbiturique
TC	Tissu conjonctif.
TCM	Test de charge en méthionine
TCN	Transcobalamine
TG	Triglycéride
TGO	Transaminase glutamate oxaloacétique
TGP	Transaminase glutamate pyruvate
THcy	Homocystéine Total
tHcy	Traités par l'homocystéine
THF	Tétra Hydro Folate
TPA	Activateur Plasminogène Tissulaire
TPA	Activateur plasminogène tissulaire
TR	Tube renal
UPR	Unfolded Protein Response
VC	Veine centrale
VLDL	Very low density lipoprotein

Liste des figures

Figure	Titre	Page
Figure 1	Métabolisme de l'homocystéine	3
Figure 2	Différentes formes de l'homocystéine dans le plasma humain	4
Figure 3	structure de l'acide folique	6
Figure 4	Folate et synthèse de l'ADN	7
Figure 5	Cycle des folates	8
Figure 6	Structures chimiques des différentes cobalamines	8
Figure 7	Gènes des enzymes intervenant dans le métabolisme de l'homocystéine	12
Figure 8	Localisation du gène MTHFR sur le chromosome 1	13
Figure 9	Mutations possibles pour le gène MTHFR	14
Figure 10	Localisation du gène MTR	16
Figure 11	Rôle de la méthionine synthase réductase (MTRR) dans le métabolisme de l'homocystéine	17
Figure 12	Organisation génomique du gène CBS humaine	18
Figure 13	formation de l'homocystéine-thiolactone	27
Figure 14	Influence de l'homocystéine sur la coagulation du sang et la fibrinolyse	29
Figure 15	Action de l'Hcy dans l'athérombose	30
Figure 16	Taux d'homocystéine plasmatique total chez les rats témoins et traités	40
Figure 17	Taux des paramètres lipidiques plasmatiques chez les rats témoins et traités par Hcy	40
Figure 18	Taux des enzymes sériques chez les rats témoins et traités par l'homocystéine	41
Figure 19	Taux en malondialdéhyde (MDA) du plasma chez les rats traités et témoins	41
Figure 20	Taux en glutathion (GSH) du plasma chez les rats traités et témoins	42
Figure 21	Micrographies du myocarde en coupe histologique longitudinale des rats témoins et traités. Coloration hématoxyline éosine (HE)(G×1000).	42
Figure 22	Micrographies de l'aorte abdominale en coupe histologique longitudinale des rats témoins et traités. Coloration hématoxyline éosine (HE) (G×1000).	43
Figure 23	Micrographies du foie en coupe histologique longitudinale des rats témoins et traités. Coloration hématoxyline éosine (HE) (G×1000).	44
Figure 24	Micrographies du rein en coupe histologique longitudinale des rats témoins traités. Coloration hématoxyline éosine (HE) (G×1000).	44

Table de matières

Résumé	I
Liste des abréviations	II
Liste des figures	V
Liste des tableaux	VI
Table de matières	VII
I. Introduction	1
Chapitre I : Hyperhomocystéinémie	
I.1.Définition Hyperhomocystéinémie.....	2
I.2. Classification.....	2
I.3. Métabolisme d l'homocystéine.....	2
I.3.1. Voies de synthèse et de dégradation.....	2
I.3.1.1. La voie de méthylation.....	2
I.3.1.2. Potentiel de méthylation.....	3
I.3.1.3. La voie de transsulfuration.....	3
I.4. Les différentes formes de l'homocystéine circulante.....	4
I.5. Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie.....	5
I.5.1. Les facteurs nutritionnels.....	6
I.5.1.1. Les folates ou vitamine B9.....	6
a. Caractéristiques générales.....	6
b. Fonctions physiologiques.....	6
c. Réduction de l'acide folique.....	7
d.Méthylation du THF.....	7
e.Déméthylation du 5-MTHF.....	7
I.5.1.2. La vitamine B12.....	8
a. Métabolisme.....	9
I.5.1.3. La vitamine B6.....	9
I.5.1.4. La vitamine B2.....	9
I.5.2. Facteurs environnementaux.....	10
I.5.2. 1. Age et sexe.....	10
I.5.2.2. Toxiques: alcool, tabac et café	10
I.5.2.3. Iatrogénie.....	11
I.5.2.4. Pathologies somatiques.....	11
I.5.3. Les facteurs génétiques.....	11
Chapitre II : Génétique de l'hyperhomocystéinémie	
II.1.Facteurs génétiques.....	12
II .2.Gène de la MTHFR et hyperhomocystéinémie.....	12
II. 2.1. Localisation et structure du gène MTHFR.....	13
II.2.2. Mutations du gène MTHFR.....	13
II.2.3. Mutation C677T.....	14
II.2.4. ADNc et structure génomique de MTHFR.....	15
II.2.4.1.Clonage de la séquence codante de MTHFR.....	15

II.2.4.2. Produits de transcription et promoteurs.....	15
II.3. Gène de la méthionine synthase MS ou MTR.....	15
I I.3.1. Polymorphisme MTR A2756G.....	16
II.4. Gène de la méthionine synthase réductase MSR ou MTRR.....	16
I I.4.1. Polymorphismes du gène MTRR A66G.....	17
II.5. Gène de la cystathionine -synthase CBS.....	17
II.5.1. Polymorphismes du gène CBS T833C et G919A.....	18
II.6. Gène de la transcobalamine TCN II.....	18
II.6.1. Polymorphismes du gène TCN C776G.....	19
II.7. Autres polymorphismes.....	19
Chapitre III. Physiopathologie de l'hyperhomocystéinémie	
III.1. Hyperhomocystéinémie et maladies cardiovasculaires.....	20
III.1.1. L'athérosclérose.....	20
III.1.2. La thrombose.....	20
III.2. Hyperhomocystéinémie et maladie d'Alzheimer.....	21
III.3. Maladie de Parkinson.....	21
III.4. Hyperhomocystéinémie et insuffisance rénale.....	21
III.5. Hyperhomocystéinémie et diabète.....	22
III.6. Hyperhomocystéinémie et cancer.....	22
III.7. Production d'un stress oxydatif.....	23
III.7.1. Définition du stress oxydatif.....	23
III.7.2. Méthodes d'évaluation du stress oxydatif.....	24
III.8. Homocystéine et dysfonction endothéliale.....	24
III.8.1. La relaxation vasculaire.....	24
III.8.2. La modification de la protéine.....	25
III.8.3. Coagulation.....	28
III.8.4. L'inflammation.....	29
III.8.5. L'apoptose.....	30
III.9. Stress du réticulum endoplasmique et unfolded protein response.....	30
III.10. Matrice extracellulaire.....	31
Chapitre IV. Diagnostic et traitement	
IV.1. Diagnostic.....	32
IV.2. Traitement de L'hyperhomocystéinémie et affections cardiovasculaires.....	32
IV.3. Diminution de risque cardiovasculaire.....	33
IV.4. Diminution de risque, de fracture, de dégénérescence musculaire.....	33
IV.5. Diminution le risque de cancer.....	34
Matériel et méthodes	
1. Matériel biologique et lieu d'étude.....	35
2. Dosages biochimiques.....	35
2.1. Dosage de l'homocystéine.....	35
2.2. Dosages des paramètres du stress oxydatif.....	36
2.2.1. Dosage du malondialdéhyde ou MDA.....	36
2.2.2. Dosage du glutathion ou GSH.....	36
2.3. Dosages des paramètres lipidiques.....	37
2.3.1. Dosage du cholestérol total ou CT.....	37

2.3.2. Dosage des HDL.C et LDL.C.....	37
2.3.3. Dosage des triglycérides ou TG.....	39
2.4. Dosage des enzymes sériques.....	39
2.4.1. Dosage de TGO	39
2.4.2. Dosage de TGP	40
2.4.3. Dosage d'ALP.....	40
3. Coupes histologiques.....	41
4. Analyse statistique des résultats.....	41
Résultats	
1. Valeurs d'homocystéine plasmatique total chez les rats témoins et traités.....	42
2. Bilan oxydatif chez les rats témoins et traités par l'homocystéine.....	42
2.1. Teneur en malondialdéhyde (MDA).....	42
2.2. Teneur en glutathion (GSH).....	43
3. Bilan lipidique (BL) chez les rats témoins et traités par l'homocystéine.....	43
4. Bilan enzymatique(BE) chez les rats témoins et traités par l'homocystéine.....	44
5. Histologie des organes.....	44
5.1. Histologie du cœur.....	44
5.2. Histologie de l'aorte abdominale.....	45
5.3. Histologie du foie.....	45
5.4. Histologie du rein.....	45
Discussion	47
Conclusion	49
Références	50
Annexe	
Abstract	X
.....	XI

Introduction

L'hyperhomocystéinémie (HHcy), désigne l'augmentation de l'homocystéine (Hcy) totale plasmatique, un acide aminé soufré provenant de la méthionine apportée par les protéines alimentaires [1]. Elle est causée par des facteurs génétiques, nutritionnels et environnementaux et elle est également associée à plusieurs pathologies, telles que le diabète, l'insuffisance rénale, plusieurs troubles psychiatriques et neurodégénératifs liés au vieillissement, certains types de cancer et les maladies cardiovasculaires [2].

Plusieurs polymorphismes ou variants génétiques des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine qui affectent le statut en Hcy [3]. Il s'agit principalement de variantes génétiques des enzymes 5,10- Méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR C677T, A1298C), Méthionine synthase (MTR A2756G), Méthionine synthase réductase (MTRR A66G) [245, 242]. Aussi une variante génétique portant sur une protéine de transport de la vitamine B12, la transcobalamine (TCN C776G), a été rapporté [3].

Les mécanismes moléculaires impliqués dans sa pathogénicité sont multiples, et il est bien établi que l'homocystéine augmente d'une part le stress oxydatif et d'autre part la dysfonction endothéliale [4]. L'analyse de ces mécanismes ouvre des perspectives pour la prévention de la toxicité de l'Hcy sur la fonction vasculaire tant sur le plan de la normalisation de taux d'homocystéinémie que sur celui de la protection des cibles moléculaires de l'homocystéine [4].

Il est clairement admis que le traitement vitaminique combiné (acide folique et vitamines du groupe B) fait chuter le taux d'homocystéine mais le bénéfice en termes de diminution de sa pathogénicité n'est pas connu à ce jour [5,6].

Dans ce travail, nous avons exposé une bibliographie sur l'hyperhomocystéinémie et en particulier les causes génétiques de cette pathologie et les mécanismes de sa physiopathologie en relation avec diverses maladies ainsi que le diagnostic, le traitement possible et la prévention. La partie expérimentale est menée chez un modèle animal de rat rendu hyperhomocystéinémique dont les travaux expérimentaux sont apportés dans un premier temps sur le dosage de l'homocystéine et quelques paramètres du stress oxydatif, et paramètres biochimiques plasmatiques puis dans un deuxième temps nous avons réalisé des coupes histologiques de certains organes pour montrer l'effet pathologique de l'hyperhomocystéinémie.

Chapitre I
Hyperhomocystéinémie

I.1. Définition Hyperhomocystéinémie

Dans les conditions physiologiques, un équilibre entre la formation et la dégradation d'Hcy est présent et environ 50% de l'Hcy est reméthylé en méthionine. En cas d'excès d'Hcy, cette dernière passe dans la circulation sanguine, causant ainsi une augmentation du taux plasmatique d'Hcy et c'est l'hyperhomocystéinémie (HHcy), ou encore une élévation du taux d'Hcy dans les urines et on parle dans ce cas de l'hyperhomocystinurie [7].

I.2. Classification

Les valeurs normales de l'homocystéine totale varient en fonction de la technique de dosage employée [8]. Elles se situent aux alentours de 9 $\mu\text{mol/l}$. Le seuil à partir duquel l'homocystéinémie est considérée comme anormale varie de 11 à 15 $\mu\text{mol/l}$ selon la population à l'étude et selon la méthodologie [9]. En prenant 12 $\mu\text{mol/l}$ comme valeur seuil de l'homocystéinémie, les hyperhomocystéinémies peuvent être classées en trois catégories comme au (tableau 1)[10].

Tableau 1. Classification des hyperhomocystéinémies [10].

Classe	[Hcy] ($\mu\text{mol/l}$)
HHcy modérée	12 – 30
HHcy intermédiaire	31 – 100
HHcy sévère ou majeure	> 100

I.3. Métabolisme d'homocystéine (figure1)

I.3.1. Voies de synthèse et de dégradation

I.3.1.1. Voie de méthylation

La reméthylation de l'Hcy pour former la méthionine se fait selon deux réactions enzymatiques distinctes. La principale réaction fait intervenir deux enzymes : la MTHFR et la MTR. Cette dernière enzyme est présente dans tous les organismes cellulaires, mais chez les procaryotes, la MTR est Cbl –indépendante [1]. Chez les eucaryotes, en revanche,

la MTR requiert pour son activité un cofacteur enzymatique, la MeCbl, forme active de la vitamine B12 [3]. Ce transfert du groupe méthyle, permet la synthèse de la méthionine, n'est donc possible qu'en présence de MeCbl ; d'où la synergie d'action entre la vitamine B9 et la vitamine B12 [11]. La deuxième réaction se déroule en grande partie au niveau du foie. Elle est de faible activité et fait intervenir une enzyme hépatique, la bêtaïne-homocystéine méthyltransférase (BHMT), la bêtaïne étant la molécule donneuse de groupement méthyle [11].

I.3.1.2. Potentiel de méthylation

Comme cela a été évoqué précédemment, l'Hcy est un précurseur des réactions de méthylation qui débutent par la production de méthionine pour aboutir finalement à la synthèse de SAM. L'Hcy est un facteur limitant dans la synthèse de SAM et peut conditionner directement sa production. C'est donc un déterminant de la disponibilité en substrat méthyle pour les différentes méthyltransférases cellulaires (ADN méthyltransférases, Phosphatidyléthanolamine méthyltransférases, etc.) [12].

I.3.1.3. Voie de transsulfuration

Il n'existe qu'une seule voie de catabolisme de l'Hcy chez les mammifères, c'est celle de la transsulfuration qui est amorcée de manière irréversible par la CBS, une enzyme cytosolique, Phosphate de pyridoxal-dépendante (PLP, dérivé de la vitamine B6) [11].

Biologiquement, la CBS est principalement impliquée dans les réactions de condensation de sérine sur l'Hcy [1].

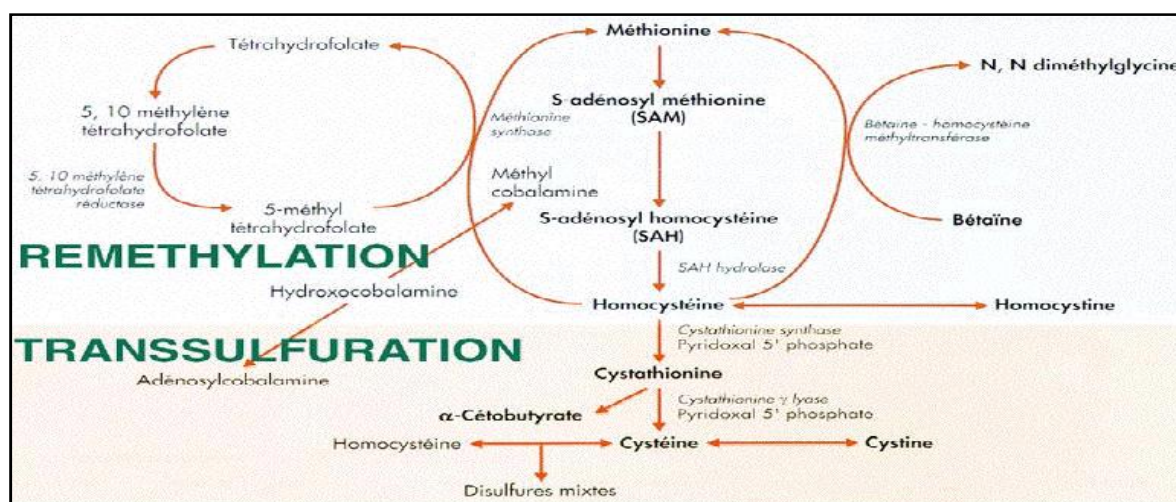


Figure 1. Métabolisme de l'homocystéine [11].

I.4. Différentes formes de l'homocystéine circulante

L'homocystéine libre ne compose que 1 à 2% de l'homocystéine totale (tHcy). Les formes oxydées représentent habituellement 98 à 99% de tHcy dans le plasma humain [13,14]. L'Hcy peut également se lier aux protéines par liaison amide (N-Hcy-protéine). N-Hcy-hémoglobine et NHcy- albumine constituent respectivement 75% et 22% de N-Hcy-protéine totale [2]. L'homocystéine thiolactone (HTL), un thioester cyclique de l'Hcy représente 0,3% et 28% de l'Hcy totale, respectivement dans le plasma et l'urine [2]. Lorsqu'on mesure la concentration de l'Hcy, tous les ponts disulfures sont réduits par un agent réducteur et toutes les Hcy sous forme de ponts disulfures passeront sous forme libre. Donc le terme homocystéine totale est la somme de l'Hcy libre et celle liée par ponts disulfures [15]. Par contre, HTL et N-Hcy-protéine, dont les liaisons résistent au réactif réducteur, ne sont pas prises en compte par le dosage [15](figure2).

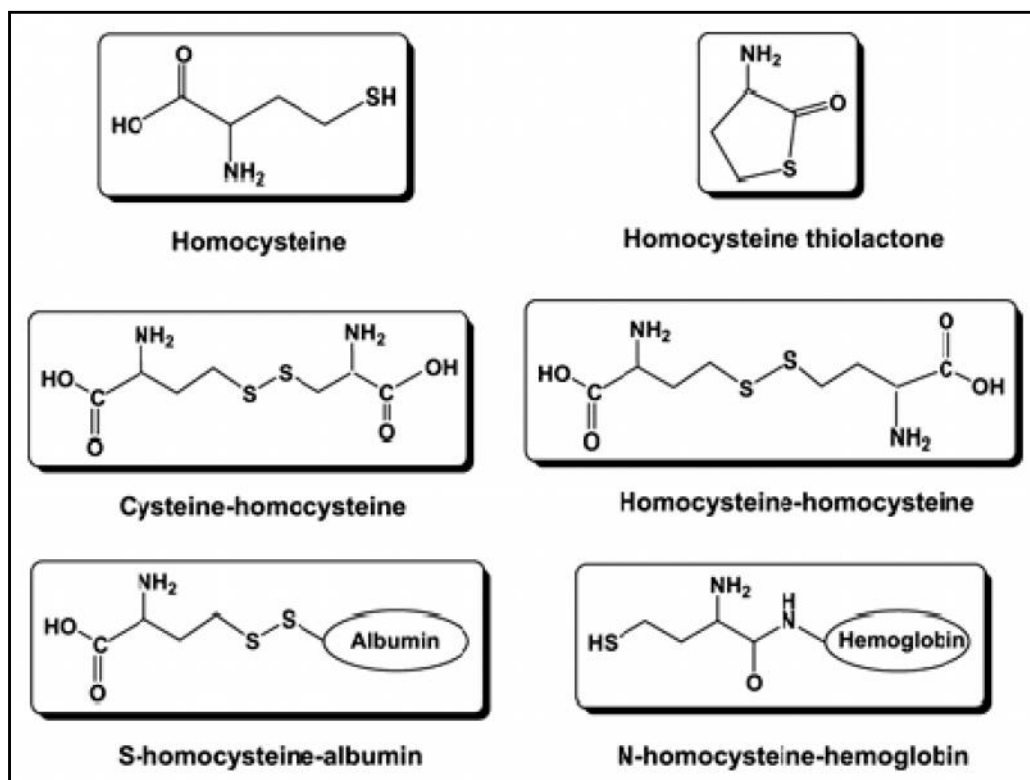


Figure 2 : Différentes formes de l'homocystéine dans le plasma humain [16].

I.5. Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie (tableau 2)

Les déterminants de l'homocystéine totale plasmatique sont complexes et impliquent des facteurs environnementaux, nutritionnels et génétiques [17].

Tableau 2. Principaux causes de l'HHcy [3.8].

	HHcy modérée	HHcy intermédiaire	HHcy sévère
Concentration sanguine	12-30 µmol/L	31-100 µmol/L	>100 µmol/L
Nutrition	Carence en folate, B12, B6, choline et sérine Apport élevé en méthionine Alcool Café	Carence en folate, B12, B6, choline et sérine Abus d'alcool	Carence sévère en folate, B12, B6, choline et sérine
Mutations et polymorphisme	Mutation hétérozygote de la MTHFR Mutation hétérozygote de la CBS Mutation de la transcobalamine Atteintes rénales Anémie pernicieuse Hypothyroïdisme Plusieurs cancers Psoriasis Diabète	Mutation hétérozygote de la MTHFR Carence en B12 due à une mutation génétique	Mutation homozygote de la MTHFR Mutation homozygote de la CBS
Médicaments	Antagonistes de folate Antagonistes de B6	Antagonistes de folate	
Autres	Tabac Ménopause Sexe masculin Age		

I.5.1. Facteurs nutritionnels

De nombreuses études ont montré que des déficiences nutritionnelles en B12 ou en B9 conduisent à une élévation modérée ou intermédiaire de l'homocystéine dans les conditions basales, seule une déficience sévère et prolongée en vitamine B6 aurait une incidence sur l'homocystéine basale [18].

I.5.1.1. Folates ou vitamine B9

La vitamine B9 ou folacine, est aussi appelée acide folique pour la forme synthétisée servant de supplément et folate pour celle présente naturellement dans les aliments. La vitamine B9, comme toutes les vitamines du groupe B, est hydrosoluble [19].

a. Caractéristiques générales

L'ensemble des composés dans lesquels l'acide ptéroïque est lié à une ou plusieurs molécules de glutamate, se rassemble sous le terme de (folates) (ou folacine ou vitamine B9) (Figure 3). La plus grande partie de l'acide folique est présente dans les aliments sous forme de polyglutamates (entre 1 et 7 résidus glutamates reliés en chaîne au glutamyl constitutif) [20].

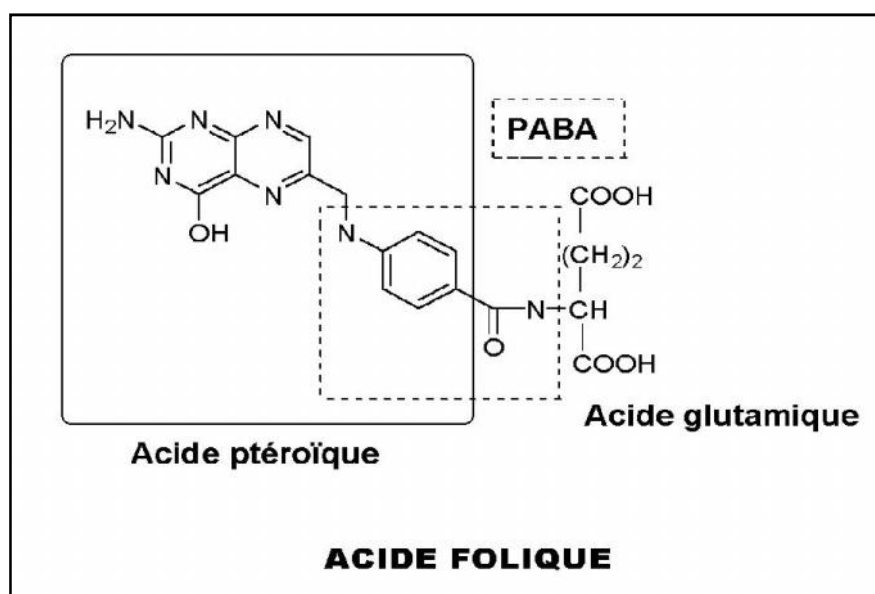


Figure 3 .Structure de l'acide folique [20].

b. Fonctions physiologiques

Le transfert des unités mono carbonées à partir de multiples biomolécules vers de nombreuses réactions biosynthétiques telles que la synthèse de purine et de pyrimidine, la synthèse de la méthionine à partir de l'Hcy est facilitée par les folates. Un apport adéquat en folates est essentiel pour la division cellulaire et l'homéostasie, en produisant de l'ADN, [21] (Figure 4).

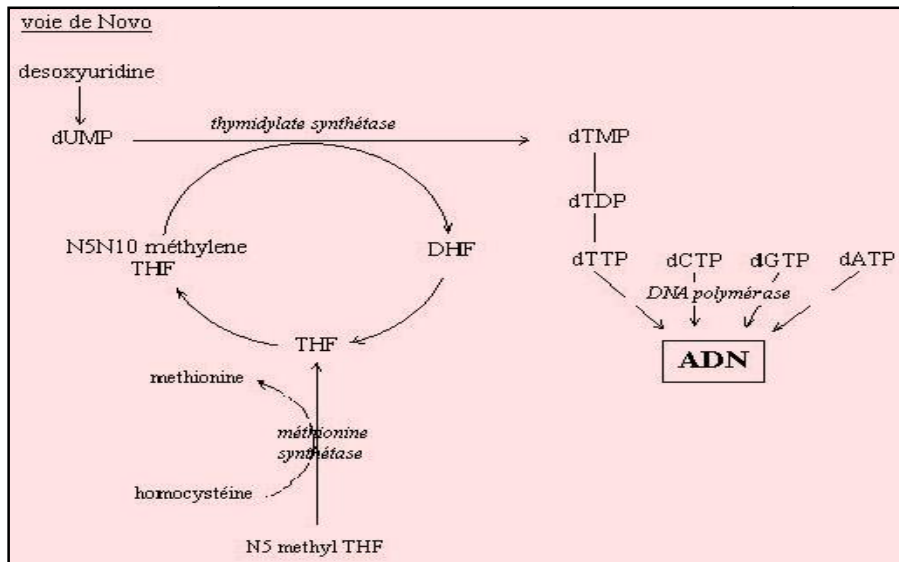


Figure 4. Folate et synthèse de l'ADN [22].

c. Réduction de l'acide folique

La molécule doit être réduite par une enzyme, pour être métaboliquement active, cette enzyme, la dihydrofolate réductase fixe d'abord 2, puis 4 atomes d'hydrogène sur la molécule, ce qui explique sa grande sensibilité à l'oxydation [23]. Ainsi, le ptéroylglutamate subit une double réduction en THF (TétraHydroFolate) [23].

d. Méthylation du THF

La fixation des groupements mono carbonés en 5 et 10, conduit aux formes circulantes et actives (5,10-MTHF et 5-MTHF) [22].

e. Déméthylation du 5-MTHF

La molécule de 5-MTHF véhiculée par le sérum doit être déméthylée pour intégrer le cycle folique cellulaire, et ce transfert de méthyle qui permet la synthèse de la méthionine, nécessite la MTHFR et son cofacteur enzymatique, la méthylcobalamine. C'est en tant que donneur de méthyle que l'acide folique joue un rôle fondamental dans le métabolisme de l'Hcy et, par voie de conséquence, dans le métabolisme cérébral et nerveux [23] (figure 5).

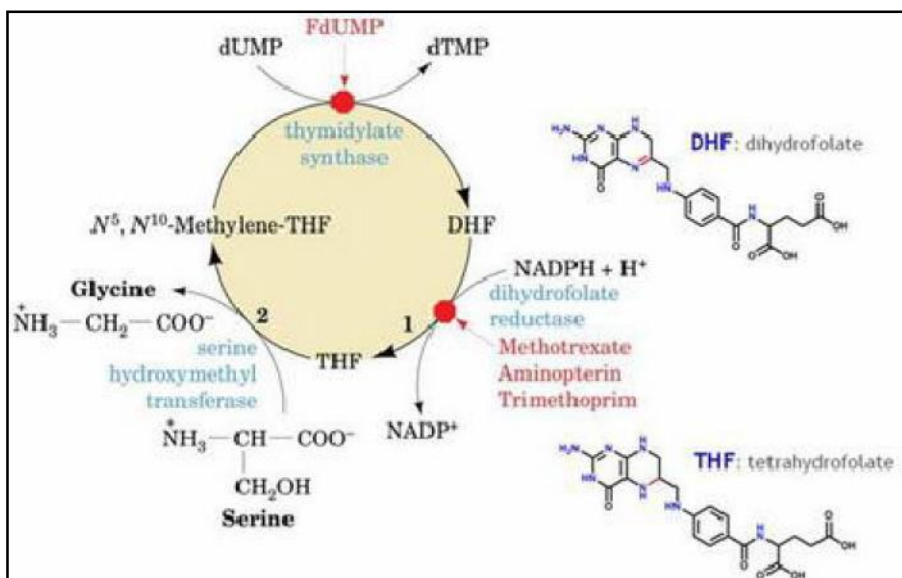


Figure 5. Cycle des folates [24].

I.5.1.2. Vitamine B12

La vitamine B12 ou cobalamine (Cbl) a été la dernière vitamine à être découverte en 1948 car elle ne se trouve pas dans les végétaux mais est uniquement synthétisée par les microorganismes. La vitamine B12 appartient à une classe de composés appelés corrinoides. Elle est constituée d'un noyau corrine et d'un ribonucléotide reliés entre eux par un pont amino 2-propanol [25] (figure 6).

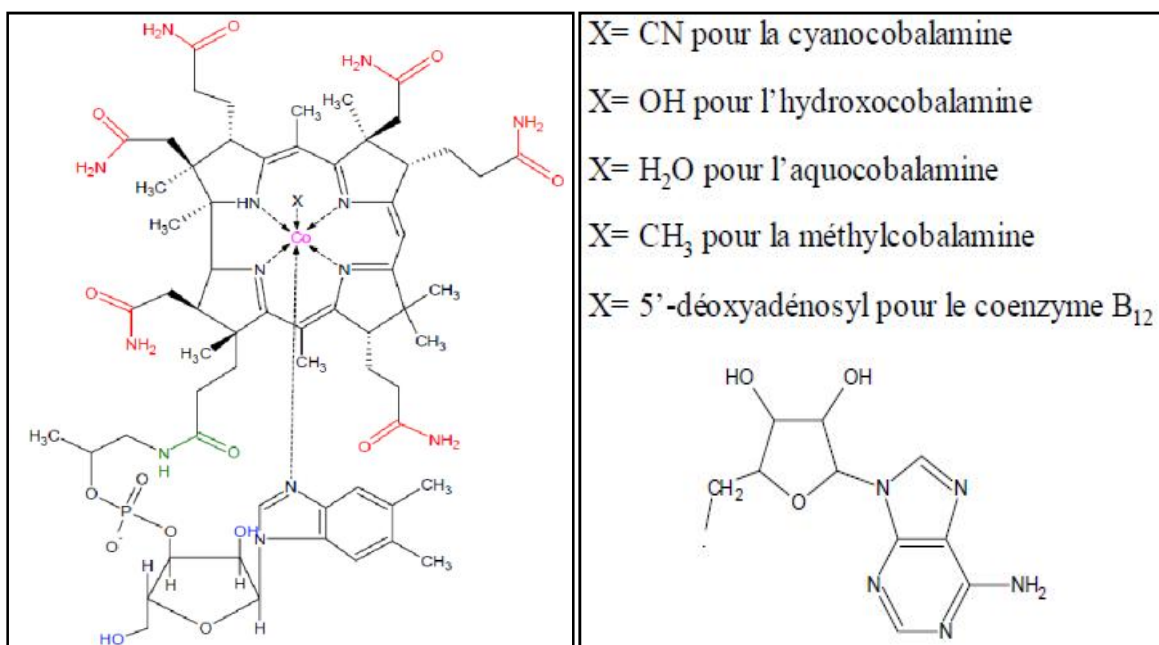


Figure 6. Structures chimiques des différentes cobalamines [25].

a. Métabolisme

La vitamine B12 est exclusivement synthétisée par des bactéries et est présente dans les aliments d'origine animale. Liée aux protéines, sous l'effet du pH acide elle est libérée du support alimentaire dans l'estomac. L'absorption digestive (iléon) nécessite la liaison à une protéine, le facteur intrinsèque synthétisé par les cellules pariétales gastriques. Des transporteurs spécifiques, assurent le transport des transcobalamines I, II, III [23].

I.5.1.3. Vitamine B6

En tant que cofacteur de la CBS (voie de trans-sulfuration), La vitamine B6 est un important modulateur des taux plasmatiques d'Hcy. Le terme « vitamine B6 » désigne 6 composés: le pyridoxal (PL), la pyridoxine (PN), la pyridoxamine (PM), et leurs dérivés phosphorylés respectifs, le pyridoxal 5'-phosphate (PLP), la pyridoxamine 5'-phosphate (PMP), et la pyridoxine 5'-phosphate (PNP). Nous nous intéresserons seulement au phosphate de pyridoxal ou PLP [9].

I.5.1.4. Vitamine B2

La vitamine B2 ou la riboflavine est le précurseur de la flavine mono nucléotide (FMN) et de la flavine adénine di nucléotide (FAD) intervenant dans les réactions d'oxydoréductions cellulaires. La riboflavine pourrait intervenir dans la voie du métabolisme de l'homocystéine dans la réduction du méthylèneTHF en méthylTHF par la MTHFR ou la réduction de la cobalamine II en cobalamine I par la méthionine synthase réductase (MTRR) nécessaire au maintien de l'activité de la MTR. Hustad S et al ont mis en évidence une association entre le taux de riboflavine et le taux d'homocystéine plasmatique dans une étude transversale portant sur 423 adultes sains. Cette association est modifiée par le polymorphisme de la MTHFR [26]. Dans une étude de cohorte de Framingham portant sur 450 adultes sains. Il a été montré que le taux de riboflavine est associé au taux d'homocystéine plasmatique, néanmoins cette association n'existe que chez les sujets dont la concentration de folates est inférieure à 12,5 nmol/L et le génotype de MTHFR est 677TT [27]. De même, Moat SJ et al, ont montré que l'association entre le taux de la riboflavine et le taux d'homocystéine est influencée par le taux de folates[28].

I.5.2. Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux entraînent habituellement une HHcy modérée.

I.5.2. 1. Age et sexe

L'homocystéinémie augmente avec l'âge et chez le sexe masculin comparativement au sexe féminin après l'âge de 10 ans et continue d'augmenter graduellement tout au long de la vie sans nécessairement atteindre des taux anormaux élevés, ceci pourrait être lié au déclin de la fonction rénale avec l'âge et également à la baisse du statut en vitamine B chez les personnes âgées [29]. Les taux d'Hcy élevés chez les hommes s'expliquent par la différence dans la masse musculaire, les hormones et le statut en vitamines [6]. Chez les femmes, une augmentation d'homocystéinémie est observée après la ménopause et peut rejoindre celle des hommes [6].

I.5.2.2. Toxiques: alcool, tabac et café

Certaines habitudes peuvent augmenter le taux de l'homocystéine incluent l'usage de tabac, café, alcool et l'activité physique. La relation entre l'HHcy et la consommation d'alcool a fait l'objet de plusieurs études épidémiologiques. Toutefois, leurs résultats étaient néanmoins controversés [30]. Certaines études ont démontré une relation positive entre l'HHcy et la consommation d'alcool [31], d'autres ont révélé une relation négative de l'Hcy avec la consommation d'alcool [25], alors que d'autres encore n'ont observé aucune relation [32]. L'alcool est un antagoniste du métabolisme des folates [33], d'autant plus qu'il pourrait entraver l'absorption intestinale et le métabolisme de la vitamine B12 [34].

Une étude d'intervention a reporté que l'homocystéinémie augmentait après une consommation de vin rouge et de spirituels et non pas après une consommation de bière; cela serait dû aux taux élevés de folates et de vitamines B6 par rapport à leurs taux négligeables dans le vin rouge et les spirituels [35]. Dans une autre étude chez des femmes post-ménopausées, une consommation quotidienne, même modérée de 5 ou 15 g d'alcool, était associée à une diminution de 5 % de la concentration sérique de vitamine B12 et à une augmentation d'Hcy sérique de l'ordre de 3 % en allant de 0 g à 30 g par jour [34].

Des études d'interventions avaient montré qu'une consommation de grande doses de café (6 tasses) augmentait de 10 à 20 % le taux moyen plasmatique d'Hcy chez des sujets sains [36]. Une étude norvégienne avait démontré une relation positive entre l'homocystéinémie et la consommation de différents types de café, alors qu'aucune relation significative entre l'Hcy et l'abstinence au café n'avait été trouvée [37].

I.5.2.3. Iatrogénie

Plusieurs médicaments tels que les antis foliques (methotrexate et anticonvulsants tels que la carbamazépine et la phénytoïne), anti B6 (isoniazide, cyclosérine, azaurinidine, procarbazine), anti B12 (oxyde nitreux) interfèrent avec l'absorption du folate et des vitamines B6 et B12 et provoquent une augmentation modérée de l'homocystéinémie [9]. Il a été démontré qu'une interaction "gène-médicament" pouvait aggraver l'HHcy, par exemple dans le cas de sujets homozygotes pour la mutation TT vs CC du MTHFR, traités pour des pathologies rhumatologiques ou convulsives. Certains auteurs ont évoqué que cette interaction constitue un facteur pharmacogénétique [8].

I.5.2.4. Pathologies somatiques

Une hyperhomocystéinémie modérée est ainsi observée chez des patients atteints de maladies comme l'arthrite rhumatoïde, l'insuffisance rénale [9], l'hypothyroïde, les maladies inflammatoires chroniques et neurodégénératives et certains cancers [23].

I.5.3. Facteurs génétiques

Il existe plusieurs polymorphismes des enzymes intervenant dans le cycle des folates et la reméthylation de l'homocystéine. Il s'agit principalement de variants génétiques des enzymes 5,10-Méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR C677T, A1298C), Méthionine synthase (MTR A2756G), Méthionine synthase réductase (MTRR A66G) [38]. De plus, un polymorphisme portant sur une protéine de transport de la vitamine B12, la transcobalamine (TCN C776G), a été rapporté et également s'associer à HHcy relative [39].

Chapitre II
Génétique de l'hyperhomocystéinémie

II. Génétique de l'hyperhomocystéinémie

II. 1. Facteurs génétiques

Les polymorphismes ou variant génétiques du génome sont la conséquence de mutations qui sont le plus souvent des mutations uniques ou SNP (single nucléotide polymorphisme). Tout déficit portant sur l'un des systèmes enzymatiques impliqués dans le métabolisme de l'Hcy entraîne une augmentation de ses concentrations cellulaires [40]. Les cinq polymorphismes les plus communs des gènes impliqués dans le métabolisme des folates/homocystéine sont : Le méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR), la méthionine synthase (MTR), la méthionine synthase réductase (MTRR) sur une protéine de transport de la vitamine B12, la cystathionine -synthase (CBS), la transcobalamine (TCN II) a été rapportée et peut également s'associer à une hyperhomocystéinémie relative [41] (figure 7).

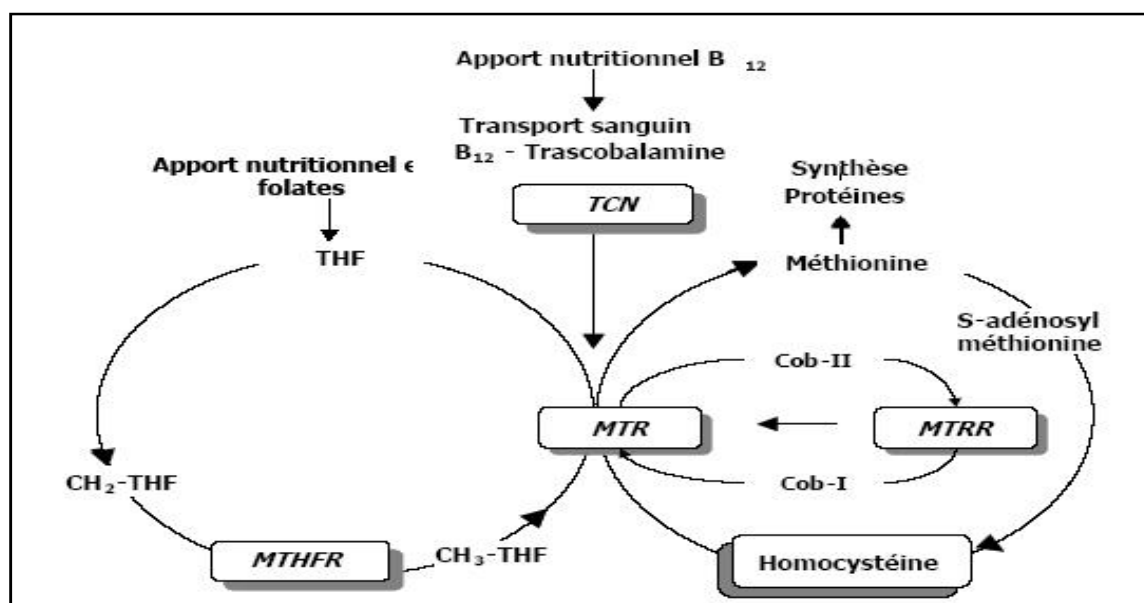


Figure 7. Gènes des enzymes intervenant dans le métabolisme de l'homocystéine [25].

II.2. Gène de la MTHFR et hyperhomocystéinémie

La 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) intervient dans le métabolisme de l'homocystéine. Il catalyse la réduction irréversible du 5,10-méthylène tétrahydrofolate (CH₂THF) en 5-méthyl-tétrahydrofolate (CH₃THF) [41]. Il est décrit que le polymorphisme C677T du gène de la MTHFR est associé à des concentrations élevées d'Hcy [42], dans la voie de la reméthylation de l'Hcy, le groupement méthyle est apporté par le 5, méthylène tétrahydrofolate qui est sous la dépendance de la 5,10MTHFR [40]. La mutation C677T du gène MTHFR engendre une diminution de l'activité enzymatique et une augmentation de la thermolabilité de la protéine MTHFR et ainsi perturbe l'apport du

groupement méthyle ; nécessaire pour la reméthylation de l'Hcy en méthionine et donc sera responsable d'une augmentation des taux d'Hcy. La forme hétérozygote s'observe chez 43 % de la population et s'accompagne d'une hyperhomocystéinémie modérée ou de degré intermédiaire [41]. La forme homozygote (677TT) s'observe chez 10% de la population et entraîne une HHcy sévère et des complications vasculaires redoutables [41].

I. 2.1. Localisation et structure du gène MTHFR

Le gène de la MTHFR est localisé sur le bras court (p) du chromosome 1 en position 36.3. Plus précisément le gène est localisé dans la région des paires de bases 11.769.246 jusqu'à 11.788.568 du chromosome 1 [42] (figure 8). Le ADNc de ce gène fait approximativement 2.2 kilo base de longueur et est constitué de 13 exons rangés selon leur taille de 103 paires de bases jusqu'à 432 paires de bases. Les tailles des introns sont rangées de 250 paires de bases jusqu'à 1.5 kilo base avec une exception d'un intron de 4.2 kilo base [39]. Le promoteur du gène ne contient pas de TATA box, mais contient des îlots CpG, une région CAAT et des sites de liaison pour les différents facteurs de transcription tels que le multiple potentiel SP1, AP1 et AP2 [39].

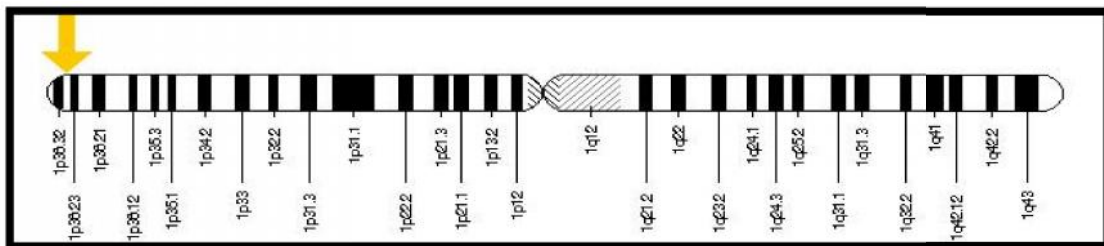


Figure 8 : Localisation du gène MTHFR sur le chromosome 1 [43].

(Paire de base de 11, 769,246 jusqu'à 11, 788,568)

II.2.2. Mutations du gène MTHFR

Il existe deux polymorphismes courants et bien décrits du gène MTHFR, il s'agit du Polymorphisme C677T et C1298A responsables de la synthèse d'une forme thermolabile de la protéine MTHFR. Le variant génétique C677T est associé à des maladies cardiovasculaires, à des anomalies de la coagulation et à des malformations congénitales [58]. Plusieurs autres mutations rares ont été associées à une déficience sévère de l'enzyme MTHFR [67]. Ces derniers polymorphismes sont moins courants que les deux premiers et leur rôle n'est pas encore bien élucidé [39] (figure 9).

Gene	😊😊	😊😱	😱😱
MTHFR-677CC (MTHFR-C)	CC	CT	TT
MTHFR-1298AA (MTHFR-A)	AA	AC	CC

Figure 9. Mutations possibles pour le gène MTHFR [44].

II.2.3. Mutation C677T

En 1988 Kang et al ont identifié un variant thermolabile du gène MTHFR corrélé avec des concentrations modérément élevées de l'homocystéine [45]. En 1995 Frost et al ont démontré que ce variant est dû à la mutation C677T du gène MTHFR qui correspond à une conversion d'une cytosine en une thymine au niveau de l'exon 4 du gène MTHFR, transmise de façon autosomique récessive [44]. Cette mutation se traduit par une substitution d'une alanine en une valine en position 222 de la protéine MTHFR et se situe dans le domaine catalytique de l'enzyme au niveau du site de liaison avec le cofacteur Flavine Adénine Di nucléotide (FAD) [41]. La protéine résultante de ce polymorphisme présente une activité enzymatique réduite à 37°C et plus, pour cela la protéine est souvent appelée thermolabile. In vitro il à été démontré que la mutation C677T réduit l'activité enzymatique de la protéine MTHFR jusqu'à 70% chez les individus homozygotes (TT) et 40% chez les individus hétérozygotes (CT) [41] (tableau 3).

Tableau 3 : Variant MTHFR et diminution de l'activité enzymatique associée [41]

Genotype	677CC 2 normal 677s	6T7CT heterozygous one 677 variant	677TT homozygous two 677 variants
1298AA two normal 1298s	100% enzyme acitivity	66% enzyme acitivity	25% enzyme acitivity
1298AC heterozygous one 1298 variant	83% enzyme acitivity	48% enzyme acitivity	not analyzed
1298CC homozygous two 1298 variants	61% enzyme acitivity	not analyzed	not analyzed

II.2.4. ADNc et structure génomique de MTHFR**II.2.4.1. Clonage de la séquence codante de MTHFR**

Un ADNc de 90 Pb fut amplifié par RT-PCR à partir d'ARN de porc Cet impliquons a été utilisé pour sonder une banque d'ADNc humains, ce qui a permis d'obtenir un ADNc de 1,3 kpb. Une autre banque d'ADNc a été criblée pour découvrir la portion carboxy-terminale de la séquence codante [46]. L'ADNc ainsi déduit représentait 2,2 kpb et comprenait 11 exons [42]. La MTHFR est un dimère de 150 kDa comprenant deux isoformes de tailles variables : 77 kDa et 70 kDa. L'expression de l'ADNc humain de 2,2 kpb donne une protéine de 70 kDa [14]. Le site de démarrage de la traduction de l'isoforme de 77 kDa permet l'ajout de codons additionnels en amont de la séquence de l'isoforme de 70 kDa [47].

II.2.4.2. Produits de transcription et promoteurs

Plusieurs sites d'amorce de la transcription, d'épissage alternatif et de polyadénylation ont été observés pour MTHFR et Mthfr [47]. Les sites de début de la transcription sont localisés dans deux régions et deux promoteurs ont été caractérisés. Leur efficacité relative dépend du type cellulaire [42].

II.3. Gène de la méthionine synthase MS ou MTR

L'augmentation du niveau d'Hcy peut aussi résulter du dysfonctionnement de la MTR. Le substrat de cette enzyme est le 5-méthylène tetrahydrofolate qui est produit par les réactions catalysées via la MTHFR. Le cofacteur de la méthionine synthase est la cobalamine qui participe au transfert du groupe méthyle de la 5-méthylène tetrahydrofolate à l'Hcy. Les produits de cette réaction sont la méthionine et le tetrahydrofolate qui entrent encore dans le cycle des folates. La liaison de la cobalamine avec l'enzyme peut prendre trois formes : la première est le (cob (I) alanine) qui peut être oxydée en (cob(II) alanine), menant à l'inactivation de l'enzyme. L'activation de l'enzyme dépend des réactions de méthylation, qui produit la forme active de la cobalamine (cob(III) alanine). Le donneur du groupe méthyle dans ces réactions est le SAM, les électrons proviennent du NADPH et tout le processus est catalysé par la MTR. [48].

II.3.1. Polymorphisme MTR A2756G

La reméthylation de l'homocystéine en méthionine nécessite une enzyme, la 5- méthyltétrahydrofolate-homocystéine S-méthyltransférase, mieux connue sur le nom de méthionine synthase (MS). Cette enzyme a comme cofacteur la vitamine B12. En 1996, Li et al. ont isolé et caractérisé le gène humain de la MS (MTR dans la nomenclature des gènes). Comme pour MTHFR, le gène codant pour l'enzyme se trouve dans le chromosome 1 (1q43) [39] (figure 10). Les mutations de MTR peuvent produire une diminution de l'activité de l'enzyme et par conséquent une élévation de l'Hcy. Le polymorphisme A2756G (substitution d'un résidu d'acide aspartique par la glycine) a été décrit par Chen LH [49]. La diminution de l'activité enzymatique joue un rôle dans la tumorigénèse et dans le retard mental. Ce polymorphisme a donc été étudié principalement dans les anomalies du tube neural et Syndrome de Down. La relation entre ce polymorphisme et les MCV a été étudiée plus récemment [39].

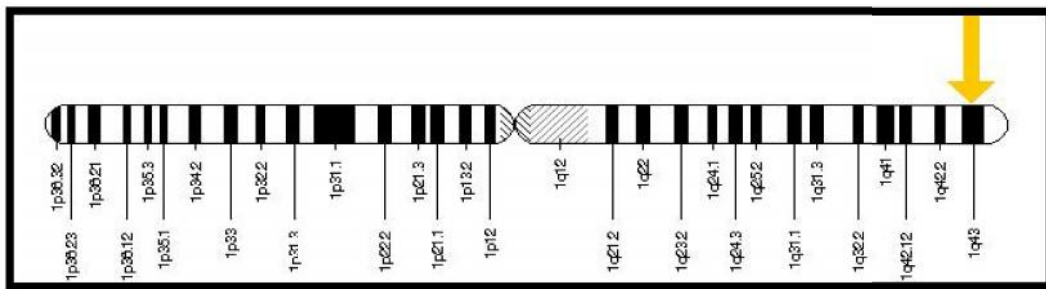


Figure 10. Localisation du gène MTR [50].

(Le gène est situé sur la longueur (q) du chromosome 1 à la position 43.)

II.4. Gène de la méthionine synthase réductase MSR ou MTRR

La MTR est responsable de la régulation de la MS par méthylation. La MTRR est un membre de la famille des transférases d'électrons et possède trois sites caractéristiques qui lient le FMN, le FAD et le NADPH. Le gène de la MTRR a été localisé sur le chromosome 5 (5p15.3- p15.2), c'est un gène de ménage car son niveau d'expression est bas et presque le même dans les tissus examinés. Le gène est composé de 15 exons et sa région promotrice ne contient pas de TATA box [48]. Le polymorphisme le plus commun dans le gène de la MTRR est la substitution A66G menant à une substitution de l'isoleucine par la méthionine (figure 11). MTRR 66GG peut théoriquement influencer le métabolisme de la vitamine B12 [51].

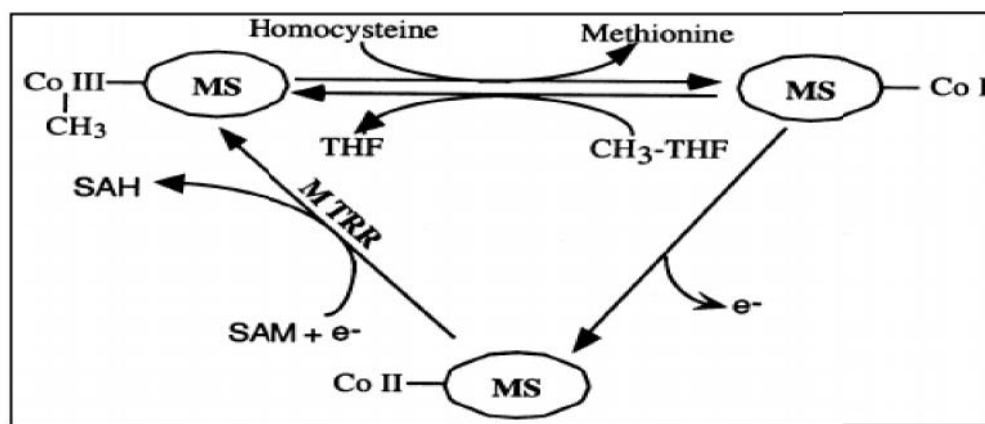


Figure 11. Rôle de la méthionine synthase réductase (MTRR) dans le métabolisme de l'homocystéine [50].

Les cycles cobalamine cofacteur entre cob (I) alanine et méthylcobalamine. Le groupe méthyle de la méthylcobalamine est transféré à l'homocystéine au cours de la méthionine synthase (MS) déméthylation catalysée. Cob (I) alanine, le produit de cette réaction est habituellement méthyle à la méthylcobalamine par transfert d'un groupe méthyle à partir méthyltetrahydrofolate (CH₃ -THF) [50].

II.4.1. Polymorphismes du gène MTRR A66G

La reméthylation de l'homocystéine en méthionine nécessite la MTR dont le cofacteur est le cob (I) alanine, ensuite le cob (I) est oxydé en cob (II) alanine, ce qui rend la MTR inactive. La méthionine synthase réductase (MTRR) régénère la forme active de la cobalamine. Un polymorphisme du gène de la MTRR A66G se traduit par une substitution d'une isoleucine par une méthionine. Ce polymorphisme est associé à une élévation de la concentration de l'Hcy [74]. Il est aussi rapporté en 2000 que cette mutation était associée au risque de maladie coronaire [52].

II.5. Gène de la cystathionine -synthase CBS

La CBS catalyse la condensation de la serine et de l'Hcy pour former la cystathionine. C'est une protéine cytoplasmique formée de quatre monomères identiques. Chaque sous unité peut lier le phosphate de pyridoxal (PLP) dérivé de la vitamine B6), la molécule de SAM (un activateur allostérique de la protéine) et la molécule de l'hème. Le gène qui code pour la CBS a été localisé sur le chromosome 21 (21q22.3) dans la région correspondante au phénotype du syndrome de Down. Ce gène est constitué de 23 exons mais seulement les exons 1, 14 et 16 codent pour la séquence peptidique de 551 acides amines [53]. Environ 100 mutations dans le gène de la CBS associées à l'homocystéinurie ont été identifiées. Les deux mutations les plus fréquentes se trouvent sur l'exon 8, représentent 55% des

mutations recensées : une transition T833C qui conduit à une substitution de l'isoleucine à la thréonine (I278T) et une transition G919A qui conduit à la substitution G307S [50].

La variation la plus courante dans le gène de la CBS consiste en une insertion de 68 pb (844ins68) dans la région codante pour l'exon 8 et devrait conduire à une enzyme ayant une activité plus importante par rapport à l'enzyme normale (figure 12). La fréquence de ce polymorphisme est de 5 à 10% chez les caucasiens. Il est absent chez les asiatiques et a une large prédominance chez les noirs (37,7% d'hétérozygotes et 4% d'homozygotes) [51].

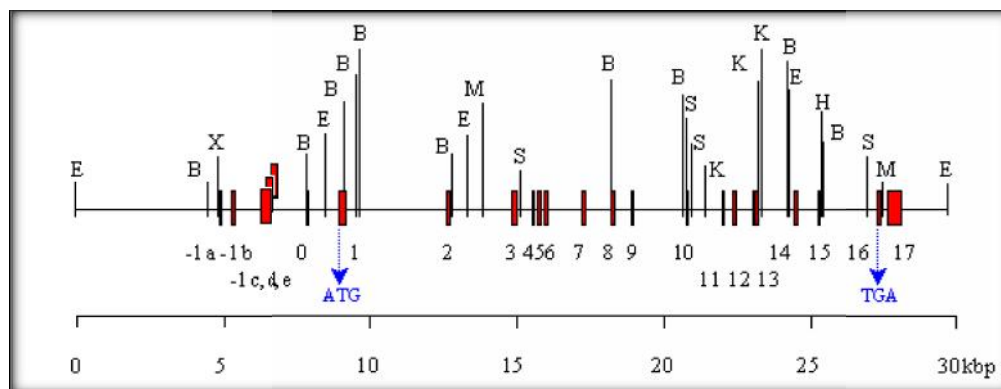


Figure 12. Organisation génomique du gène CBS humaine [54].

II.5.1. Polymorphismes du gène CBS T833C et G919A

La mutation homozygote du gène CBS favorise l'apparition d'une homocystinurie, qui est associée souvent à une hyperhomocystéinémie sévère, une thromboembolie et un retard mental. Il s'agit d'une maladie à transmission autosomique récessive pour laquelle de nombreuses mutations du gène ont été identifiées [55]. Environ une soixantaine de mutations différentes ont été décrites dont les plus communes sont la T833C et G919A [56]. Le polymorphisme T833C est le plus répandu et les individus homozygotes pour cette mutation ont souvent des problèmes de thromboses [53]. La fréquence de ce déficit est très faible (1/200000). Les patients homozygotes présentent des homocystéinémies pouvant aller jusqu'à 400 μ M, associées à une hyperméthioninémie et une cystéinémie normale [15]. Les patients hétérozygotes ont une activité CBS normale ou légèrement diminuée [57].

II.6. Gène de la transcobalamine TCN II

La transcobalamine II (TCN II) est une globuline plasmatique de transport de la vitamine B12. Son absence provoque une anémie mégaloblastique sévère détectée dès l'enfance [15]. Le gène de la TCN II localise sur le chromosome 22 (22q12.q13) et composé de 9 exons et 8 introns, peut présenter plusieurs polymorphismes à l'origine de modifications de la concentration plasmatique en Hcy [50]. La mutation la plus commune correspond à la

substitution d'une base cytosine par une base guanine en position 776 (C776G). La conséquence au niveau protéique est le remplacement d'une arginine par une proline en position 259 [50]. L'allèle TCN 776G diminue la transcription de la TCII et il existe par conséquent une diminution de la concentration plasmatique en TCII. L'influence faible de l'allèle TCN 776G sur la concentration de l'Hcy a été documentée dans des populations caucasiennes. Par contre, L'association des formes mutées de la MTHFR et de la TCN favorise l'apparition d'une hyperhomocystéinémie sévère chez l'embryon et augmente le risque d'avortement spontané. [51].

II.6.1. Polymorphismes du gène TCN C776G

La mutation la plus commune correspond à la substitution d'une base cytosine en guanine en position 776 (C776G). La conséquence au niveau protéique est le remplacement d'un acide aminé arginine au profit d'une proline (codon 259) [4]. La fréquence de l'allèle TCN 776G est variable : la plus haute est 60,7% dans des populations chinoises, la plus basse est 17,8% dans des populations africaines. Une association entre ce polymorphisme et la concentration de l'homocystéine n'est observée que dans la population française et mexicaine, deux populations dont la fréquence de la carence en vitamine B12 [56]. Les cas les plus sévères d'hyperhomocystéinémie sont associés à des déficits homozygotes des gènes codant pour les enzymes des voies de la reméthylation ou de la trans-sulfuration. La concentration sérique en homocystéine est très élevée (supérieure à 80µM) si bien qu'une grande partie est excrétée et retrouvée dans l'urine : on parle alors d'homocystinurie. Les hyperhomocystéinémies modérées, beaucoup plus fréquentes, sont liées à des déficits hétérozygotes pour ces mêmes enzymes [58].

II.7. Autres polymorphismes

Une soixantaine de polymorphismes de MTHFR ont été identifiés [42]. Les substitutions aux bases 677 et 1298 ont un effet sur l'activité de l'enzyme [42], mais le mutant 1298A C n'a fait l'objet que d'un nombre restreint d'études. L'enzyme mutée à la base 1298 n'est pas thermolabile. En présence de 1298A C (E429A), l'activité de l'enzyme est diminuée de 30 % ; en comparaison, l'allèle 677T en décroît l'activité d'environ 55 %. Les allèles 677T et 1298C sont rarement en configuration cis .Les répercussions fonctionnelles des autres polymorphismes ont été peu caractérisées ou demeurent inconnues [42].

Chapitre III

Physiopathologie de l'hyperhomocystéinémie

Physiopathologie de l'hyperhomocystéinémie

Plusieurs études ont montré qu'une élévation des taux plasmatiques d'Hcy est associée à l'apparition de plusieurs maladies comme les maladies cardiovasculaires, troubles psychiatriques et neurodégénératifs tels que les troubles schizophréniques, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la dépression, l'insuffisante rénale, le diabète et certains types de cancer [25].

III.1. Hyperhomocystéinémie et maladies cardiovasculaires

Depuis l'observation de Mac Cully en 1969 rapportant, chez deux enfants atteints d'homocystinurie, la survenue d'une athérombose sévère et précoce, de nombreuses études ont été consacrées à la relation existant entre Hcy et risque vasculaire [14]. Les études épidémiologiques transversales ou prospectives ont clairement démontré qu'une hyperhomocystéinémie, même modérée, constituait un marqueur de risque indépendant d'athérombose. Les données épidémiologiques sont corroborées par les résultats des études expérimentales. L'hyperhomocystéinémie, qu'elle soit d'origine génétique ou environnementale, apparaît comme un facteur de risque modifiable, accessible dans la majorité des cas à une simple substitution vitaminique. Cela renforce l'intérêt suscité par ce nouveau facteur de risque [14].

III.1.1. Athérosclérose

Est une maladie inflammatoire chronique, où des cytokines pro inflammatoires jouent un rôle très important. La possibilité d'un rôle de l'Hcy dans l'athérosclérose a été pour la première fois évoquée après la découverte de l'homocystinurie, maladie rare, chez des enfants souffrant d'un retard mental en Irlande du Nord [59]. Deux hypothèses ont été formulées pour expliquer l'athérogénicité de l'HHcy [40]. L'hypothèse lipidique, selon laquelle l'altération du métabolisme des lipoprotéines, essentiellement les LDL sous l'action des groupements thiol de l'Hcy, induit secondairement une atteinte de la paroi vasculaire. L'homocystéine peut se lier aux lipoprotéines et augmente ainsi leur capacité de liaison à la fibrine, potentialisant le risque athérogène [14].

III.1.2. Thrombose

Une grande partie des études ont montré que l'hyperhomocystéinémie est associée à un risque de thromboses veineuses et artérielles [60]. Une méta-analyse a montré qu'une augmentation de tHcy plasmatique de 5 $\mu\text{mol/L}$ était associée à un risque plus élevé de thromboses veineuses de 27% [61]. Les mécanismes par lesquels l'hyperhomocystéinémie est associée à une thrombose sont encore mal connus.

III.2. Hyperhomocystéinémie et maladie d'Alzheimer

L'augmentation du taux d'Hcy plasmatique a été associée à l'apparition de la maladie d'Alzheimer, mais les mécanismes de sa pathogénie demeurent encore mal connus [62]. Hasegawa T et al ont émis l'hypothèse que ce serait l'acide homocystéique (HA), un produit d'oxydation de l'Hcy, qui jouerait un rôle dans la pathogénèse de la MA par une régulation positive de la production du peptide b-amyloïde (Ab42) [62]. Les dépôts extracellulaires d'agrégats font partie des principaux diagnostics pour la MA mais l'Ab42 peut être particulièrement cytotoxique quand il s'accumule à l'intérieur des neurones [62].

III.3. Maladie de Parkinson

Plusieurs études ont montré une corrélation entre l'apparition de la Maladie de Parkinson et une augmentation de l'Hcy plasmatique. Une hyperhomocystéinémie a été observée chez les patients atteints de MP présentant une mutation (C677T) de la MTHFR. La baisse de donneurs de méthyles à l'origine d'une hyperhomocystéinémie pourrait accélérer le processus de neurodégénérescence, Liu et Duan (2002) ont montré sur un modèle de souris MP (après administration de 1-méthyl-4-phényl-1, 2, 3,6-tetrahydropyridine, MPTP), qu'une déplétion en folates ou une administration d'Hcy augmentait la perte des neurones dopaminergiques [63].

III.4. Hyperhomocystéinémie et insuffisance rénale

Selon Arnadottir M et al, des concentrations plasmatiques élevées d'Hcy ont été retrouvées de façon constante dans toutes les séries [64]. L'Hcy n'est pas le seul acide amine soufre dont la concentration plasmatique augmente au cours de l'IRC. D'autres acides amines soufres comme la cystéine, la cystéinyl-glycine, la cystine sont également régulièrement augmentés chez les patients en IRC suggérant des anomalies complexes et diffuses de leur métabolisme au cours de l'IRC. Les mécanismes de l'accumulation d'Hcy au cours de l'IRC ne sont pas parfaitement élucidés. Plusieurs hypothèses [65] font intervenir soit un déficit vitaminique B soit des anomalies du métabolisme ou de l'élimination rénale de l'Hcy. La carence en vitamine B6 peut être attribuée soit à une insuffisance d'apport associée à une malnutrition, soit à une augmentation de la clairance dialytique de cette vitamine notamment sous hémodialyse à haute performance. La serine est une acide amine nécessaire à la fois à la transsulfuration et à la reméthylation de l'Hcy. Les concentrations de serine sont souvent diminuées au cours de l'IRC. Cependant, la correction de ce déficit n'améliore pas les valeurs d'Hcy. En fait, l'accumulation d'Hcy au cours de l'IRC correspond à une altération du métabolisme rénal de l'Hcy. En effet, 85% de l'Hcy filtrée

est réabsorbée dans le tubule rénal chez l'urémique contre 99% dans les conditions normales [64].

III.5. Hyperhomocystéinémie et diabète

Des patients ayant un diabète de type 2 (Insulinorésistant) développent des maladies coronariennes qui ne sont pas toujours liées à une dyslipidémie. L'insulinorésistance et l'hyper insulinémie sont reconnus comme étant des facteurs de risque impliqués dans l'athérosclérose [67]. Munshi ML et al ont montré, dans une étude comparative entre les diabétiques de type 1 et de type 2, que seul le type 2 est associé à une hyperhomocystéinémie [68]. Dans ce cas, les patients développent plus vite des maladies macro vasculaires. D'autres études ont également montré une augmentation de l'homocystéinémie chez les patients diabétiques qui développent une athérosclérose ou une insuffisance rénale [69]. Cependant, bien qu'il existe une corrélation négative entre insuline et homocystéine chez des patients obèses diabétiques, il n'y en a aucune entre homocystéine et l'indice de masse corporelle [66]. Le rôle de ces anomalies métaboliques dans l'étiologie du diabète reste assez flou.

Des études récentes suggèrent que l'homocystéine pourrait induire une insulinorésistance par sa forme toxique, l'homocystéine thiolactone, qui provoque des altérations dans les structures protéiques, notamment sur les récepteurs à l'insuline [70]. Le stress oxydant généré par l'homocystéine thiolactone conduit à une inhibition de l'activité Tyrosine kinase des récepteurs à l'insuline, résultant en une diminution de l'activité Phosphatidylinositol 3-kinase, une inhibition de la synthèse de glycogène et aussi d'une inhibition par l'insuline, de la stimulation d'ADN et de la synthèse peptidique [70].

III.6. Hyperhomocystéinémie et cancer

L'hypométhylation de l'ADN serait une (caractéristique) des cancers, or le génotype MTHFR C677T (TT) (protecteur de certains cancers) s'associe chez l'homme à une hypométhylation de l'ADN génomique des leucocytes. Les cellules cancéreuses présentent une anomalie fréquente du métabolisme de la méthionine dénommée méthionine dépendance. Ces cellules sont incapables de proliférer dans un milieu où la méthionine est remplacée par l'Hcy, alors que les cellules normales peuvent dans ces conditions réaliser une synthèse endogène de méthionine à partir d'Hcy [71].

Les cellules cancéreuses présentent un déséquilibre entre consommation et formation de méthionine :

1. une transméthylation S-adenosyl methionine-dépendante accrue.
2. une reméthylation réduite du fait d'un déficit relatif en méthyle cobalamine, cofacteur de la MS (Méthionine Synthase).
3. une exportation vers le milieu extracellulaire d'Hcy. La carence en méthionine provoquée sur des tumeurs méthionine- dépendantes permet d'obtenir un effet anti tumoral potentialise par des analogues de la méthionine et peut sensibiliser des tumeurs réfractaires a la chimiothérapie [6].

III.7. Production d'un stress oxydatif

L'homocystéine possède in vitro une action pro-oxydante, son groupe thiol étant oxydé pour former des espèces réactives de l'oxygène ou ROS qui sont responsables de lésions et de dysfonctionnement cellulaires, essentiellement par l'oxydation des protéines, de l'ADN ou des lipides [72]. De nombreuses études ont rapportés qu'un taux élevé d'homocystéine est à l'origine de la survenue des lésions tissulaires cardiaques et aortiques de rats hyperhomocystéinémiques, ainsi que la réduction de défenses anti oxydantes [73, 74]. Hcy conduit à la dysfonction des cellules endothéliales et induit leur apoptose via les ROS produits par les cellules enthéliales et les cellules musculaires lisses (CML) [75]. Les ROS peuvent contribuer à la dépolymérisation de protéines comme le collagène ou l'élastine et encore altérer la fluidité membranaire en agissant au niveau des acides gras polyinsaturés et des phospholipides membranaires et participent à la peroxydation lipidique Une hyperhomocystéinémie pourrait limiter le potentiel antioxydant de certaines cellules [74].

III.7.1. Définition du stress oxydatif

Le stress oxydatif est une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux libres oxygénés (RLO) toxiques, appelées aussi espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou réactive oxygènespecies (ROS), situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humanises. Ces radicaux libres (RL) sont produits par divers mécanismes physiologiques et sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable et éventuellement contrôlés par différents systèmes antioxydants de l'organisme [73].

III.7.2. Méthodes d'évaluation du stress oxydatif

Il existe diverses techniques pour évaluer le stress oxydatif. Ces techniques se basant sur la mesure de la production de radicaux (statut pro oxydant), la mesure des capacités de défenses (statut antioxydant) et la mesure de l'étendue des désordres biochimiques spécifiques résultant d'un déséquilibre entre la balance antioxydants/pro oxydants [76].

III.8. Homocystéine et dysfonction endothéliale

Le terme « dysfonction endothéliale » signifie l'altération des propriétés homéostatiques de l'endothélium vasculaire, qui incluent la régulation endothélium dépendante du tonus vasculaire, l'hémostase, et l'inflammation [77]. Plusieurs études sur des modèles animaux et humains ont démontré que l'Hcy induit une dysfonction endothéliale [78].

III.8.1. Relaxation vasculaire

Une hyperhomocystéinémie chez l'homme est associée à l'altération de la fonction de relaxation endothélium-dépendante. La dysfonction endothéliale est généralement détectée par l'altération de la fonction de relaxation endothélium-dépendante des vaisseaux sanguins, elle est prédictive en outre des évènements cardiovasculaires [79]. L'homocystéine peut changer certaines propriétés des cellules endothéliales par l'altération de la production ou de la disponibilité biologique des médiateurs vaso-actifs comme l'endothéline 1 [40], l'oxyde nitrique (NO) et la prostacycline [80]. L'incubation des cellules endothéliales avec Hcy (0,05-1 mM) produit moins d'endothéline et cet effet est médié par des produits oxydatifs [81]. L'exposition de cellules endothéliales en culture à de l'homocystéine a un effet bi phasique sur la production de monoxyde d'azote (NO). Dans un premier temps, ils ont observé un relâchement de NO, de S-nitroso-thiols et de S-nitroso homocystéine, puis la poursuite de l'exposition entraîne un stress oxydant prédominant qui diminue la production de NO [82]. C'est pourquoi l'exposition de cellules endothéliales à l'homocystéine durant 15 minutes augmente la sécrétion d'endothélium-derived releasing factor (EDRF) et de S-nitroso-homocystéine, alors qu'une exposition supérieure à trois heures diminue cette sécrétion [82]. La S-nitroso-homocystéine, qui se forme lors d'expositions de courte durée, a une action très différente de l'homocystéine, étant anti-agrégante et ne générant pas H₂O₂. Sa formation diminue réciproquement la toxicité du NO et de l'homocystéine qui ne peuvent plus produire de radicaux oxygénés par oxydation. L'homocystéine augmente d'ailleurs la synthèse de NO induite par l'interleukine 1 sur des cellules musculaires lisses de vaisseaux, en activant le gène de NO synthase par un mécanisme médié par H₂O₂ car inhibé par les scavengers, sans doute par

activation de NF- κ B [60]. Dans les conditions normales, l'endothélium vasculaire joue un rôle important dans la prévention de l'athérosclérose en produisant du NO [81]. Sur le plan expérimental, l'homocystéine provoque une atteinte des cellules endothéliales freine la libération de NO et affecte la vasomotricité dépendant du flux sanguin [82]. Plusieurs études utilisant des tissus vasculaires ont montré que l'Hcy provoque une production intracellulaire de super oxyde et par conséquent une altération de la relaxation [83]. Le super oxyde est censée réagir avec le NO au peroxy-nitrite, limitant de ce fait la réponse vasodilatatrice normale [81].

III.8.2. Modification de la protéine

L'homocystéine porte un groupement thiol réactif, qui peut former des ponts disulfures avec les résidus réactifs de la cystéine. L'homocystéine est détectée dans plusieurs protéines, qui incluent albumine, fibronectine, transthyrétine, facteur V et annexine II [84]. Le groupement thiol de la protéine intervient dans la fonction de nombreuses protéines. L'interaction avec ces protéines pourrait altérer ses fonctions et perturber le métabolisme cellulaire [85] (Tableau 4). L'homocystéine pourrait également induire la modification de protéines *via* un autre mécanisme médié par un thioester cyclique de l'homocystéine (homocystéine thiolactone). La formation de l'homocystéine-thiolactone est une conséquence d'une réaction d'erreur-édition de méthionyl-tRNA synthase. Dans la synthèse peptidique, l'homocystéine pourrait poser un problème à cause de sa similarité avec la méthionine [84]. L'homocystéine peut s'insérer par erreur la première étape de la synthèse peptidique et former Hcy-AMP avec méthionyl-tRNA synthase. Ensuite cette erreur est corrigée par la conversion d'homocystéine en homocystéine-thiolactone. La chaîne latérale d'Hcy, qui ne comporte pas de groupement méthyle de la méthionine, réagit moins efficacement avec le résidu spécifique de la méthionyl-tRNA synthase. Ceci permet à la chaîne latérale d'Hcy de se déplacer au résidu thiol-liant, qui favorise la synthèse du pont de thioester [85] (Figure 14).

Tableau 4. Exemples et conséquences de la protéine S-homocystéinylation [85].

Protéine	Position d'incorporation d'Hcy	Fonction de protéine	Effet de S-homocystéinylation
Annexine II	Cys9	Récepteur pour l'activateur de plasminogène tissulaire	Inhibition du récepteur de l'activateur de plasminogène tissulaire
Fibronectine	5 molécules d'homocystéine par dimère de fibronectine, principalement dans la région C-terminale, dans et en adjacent du domaine de fixation de fibrine	Adhésion et migration cellulaires, embryogenèse, hémostase, thrombose, remodelage tissulaire	Affaiblir l'interaction fibronectine-fibrine
Transthyretine	Cys10	Fixation et transport des hormones thyroïdiennes	Rôle pathologique possible dans les maladies d'amyloïdes
Facteur Va	Cys539, Cys585, Cys1085, Cys1960, Cys2113	Cofacteur essentiel pour le complexe de prothrombine, qui convertit la prothrombine en thrombine	Inhibition du facteur Va inactivé par la protéine C activée

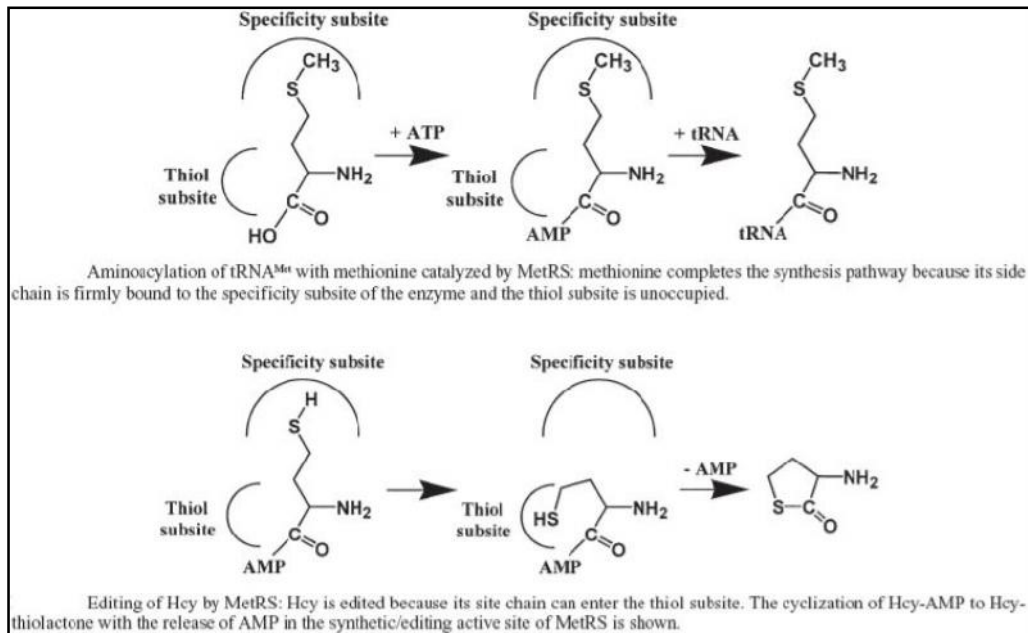


Figure 13. Formation de l'homocystéine-thiolactone [2].

Les ponts thioamides de l'Hcy sont susceptibles de se lier avec les groupes amines des chaînes latérales de lysines protéiques (Hcy-e-N-Lys-protéine). L'Hcy-N-protéine représente 0,3%-0,23% de l'homocystéine totale plasmatique. Dans la majorité des échantillons du sérum examinés, les niveaux d'Hcy-N-protéine sont directement proportionnels à la teneur en homocystéine totale, et sont inversement proportionnels à la teneur en méthionine, folates et HDL [2]. Une étude récente a montré que les niveaux d'Hcy-N-protéine et d'Hcy-S-protéine sont plus élevés chez les patients ayant une urémie élevée que chez les sujets sains. Une supplémentation en folates normalise les niveaux d'Hcy-N-protéine et diminue, mais ne normalise pas les niveaux d'Hcy-S-protéine [86]. [87]. ont montré que les niveaux d'Hcy-N-protéine plasmatiques sont plus élevés chez les patients atteints de maladie coronaire que chez les sujets sains. Pourtant, ils n'ont pas trouvé une corrélation entre les niveaux d'Hcy-N-protéine et les niveaux d'Hcy plasmatique [86].

Cette modification par l'homocystéine-thiolactone provoque des dommages sur sa structure et une perte de fonction. Les formes liées aux hémoglobines (Hcy-N-Hb) et albumines (Hcy-N-albumine) sont les plus courantes. L'homocystéine pourrait se lier par des résidus amide aux autres protéines, qui incluent les LDL, HDL, antitrypsine, transferrine et fibrinogène [2]. Les protéines modifiées par l'homocystéine-thiolactone sont délétères et induisent une réponse immune anormale [2]. Il existe chez l'homme des anticorps qui vont reconnaître spécifiquement les Hcy-e-N-Lys-protéine sur les protéines modifiées par l'homocystéine-thiolactone. 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 rétinolique) et le super oxyde, sous contrôle de la thyroxine et de l'hormone de croissance. Ce dernier stimule la production de sulfates à partir de l'homocystéine thiolactone [14].

III.8.3. Coagulation

Des travaux semblent indiquer que l'hyperhomocystéinémie peut perturber la coagulation par l'action sur des étapes multiples de la voie de coagulation:

- Altération de la capacité de la protéine C d'inactiver ses substrats principaux, facteur V *via* une réaction de S-thiolation [84]. Cependant, l'importance patho-physiologique de cette réaction est incertaine, parce que la sensibilité apparente normale du facteur V à la protéine C activée a été démontrée chez l'homme et chez les singes avec une hyperhomocystéinémie modérée, et chez la souris avec une hyperhomocystéinémie sévère [88]. Deux autres études cliniques n'ont pas démontré non plus d'association entre hyperhomocystéinémie et résistance à la protéine C [89]. Par ailleurs, les résultats expérimentaux suggèrent que l'hyperhomocystéinémie puisse favoriser la thrombose vasculaire par l'induction des pro coagulants. Des cultures de cellules endothéliales humaines exposées à l'homocystéine présentent l'activation du facteur tissulaire et du facteur endogène V de la coagulation [90].

Inhibition de l'expression et de l'activité de la thrombomoduline à la surface des cellules endothéliales, qui permet l'activation de la protéine C, un des puissants anticoagulants naturels. Une diminution de l'activité de thrombomoduline a été observée sur des modèles animaux d'hyperhomocystéinémie [88]. Inhibition des anticoagulants naturels. Dans une autre étude, [91] ont rapporté que l'incubation des cellules endothéliales aortiques porcines avec l'Hcy cause la perte de leur capacité à lier et activer l'antithrombine III, par une diminution de l'expression de sulfate d'héparine à la surface de cellules endothéliales [88]. Diminution de l'activité fibrinolytique. L'Hcy peut former un pont désulfite avec un résidu cystéine dans le domaine terminal aminé de l'annexine II, un récepteur pour l'activateur plasminogène tissulaire (TPA) et plasminogène [92].

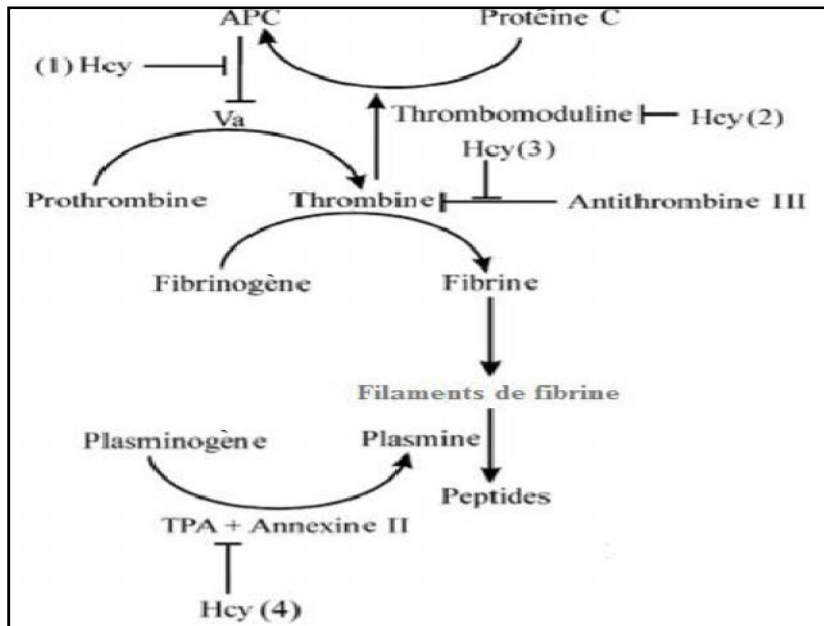


Figure 14. Influence de l'homocystéine sur la coagulation du sang et la fibrinolyse [93].

III.8.4. Inflammation

L'hypothèse inflammatoire, selon laquelle il y a une agression directe des cellules et du tissu conjonctif vasculaire, notamment, la prolifération des cellules du muscle lisse vasculaire, l'activation des plaquettes et des facteurs de coagulation et la dysfonction endothéliale [94]. L'exposition à l'Hcy pourrait induire une augmentation de cytokines pro inflammatoires. Podda G et al ont montré que l'homocystéine augmentait l'expression MCP-1 (monocyte chimio attractant protéine 1) et de IL-8 dans les cultures humaines de cellules endothéliales [89]. Il suggère que l'Hcy pourrait influencer les maladies vasculaires par l'augmentation de l'attachement des monocytes à l'endothélium et à leur recrutement à l'espace sous-endothélial. L'augmentation de l'expression de MCP-1 est également observée dans les cultures humaines de cellules musculaires lisses et dans les monocytes traités avec de l'homocystéine [80]. L'augmentation de l'expression de MCP-1 et d'IL-8, en présence de l'Hcy, est médiée par l'activation du NF-KB, facteur de transcription impliqué dans la régulation en aval du processus inflammatoire [80]. L'homocystéine initie aussi la production de TNF- et de nombreux signaux cellulaires impliqués dans le processus inflammatoire [95].

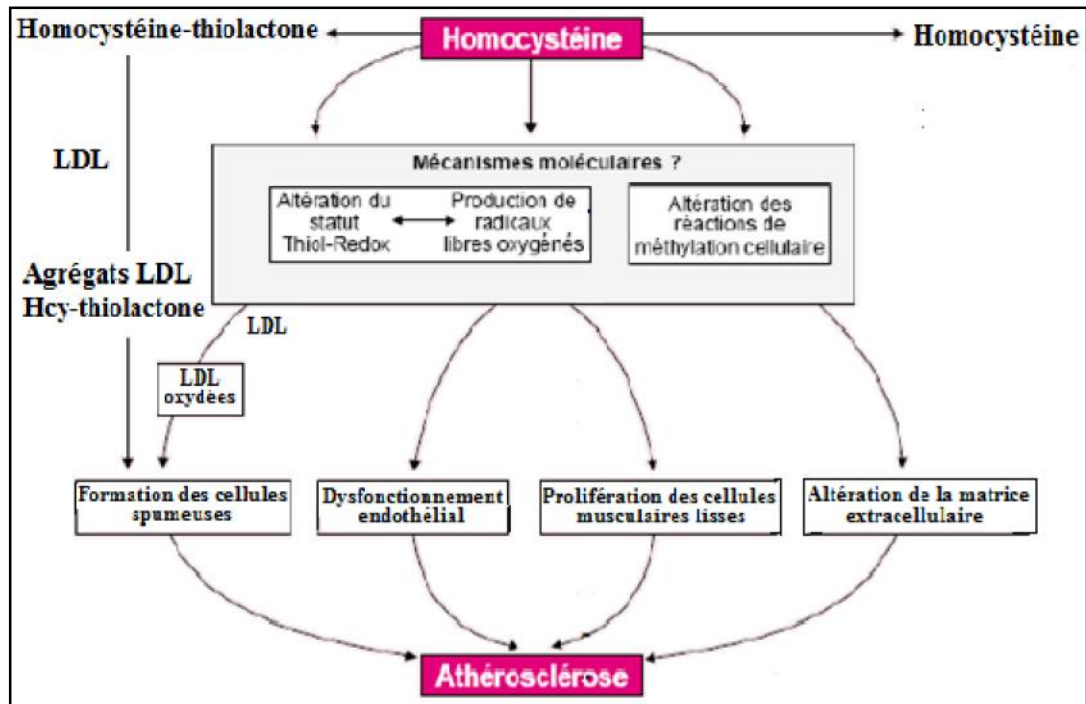


Figure 15. Action de l'Hcy dans l'athéromatose [40].

III.8.5. Apoptose

C. Zhang et al ont démontré que l'homocystéine induit la mort cellulaire par apoptose des cellules endothéliales humaines en culture par l'activation de l'UPR (Unfolded Protein Response) [75]. La voie de signalisation de l'UPR est régulée par une protéine kinase transmembranaire de type-I ER (IRE-1) et des agents d'induction du stress du réticulum endoplasmique. L'IRE-1 est responsable de la transduction du signal d'accumulation d'UPR. L'activation d'IRE-1 induite par l'Hcy provoque une activation rapide et soutenue des JNK-kinases [72]. Puisque l'activation persistante de JNK-kinases est associée à la mort par apoptose [49], il est possible que l'Hcy induise la mort cellulaire par un mécanisme UPR-dépendant. En outre, l'activation de la caspase 3 est essentielle pour l'apoptose induite par l'Hcy. Elle est impliquée dans l'apoptose des cellules HL-60, des cellules endothéliales et des cellules stromales humaines [96].

III.9. Stress du réticulum endoplasmique et unfolded protein response

Dans les cellules eucaryotes, le réticulum endoplasmique (RE) est le site principal de maturation des protéines transmembranaires, sécrétoires et résidentes [97]. Pour assurer le repliement correct des protéines récemment synthétisées, le RE contient de nombreuses molécules chaperonnes telles que la GRP78 (glucose regulated protein-78), la GRP 94, la calnexine, la calreticuline et la protéine bisulfure isomérase. Les protéines avec un mauvais repliement ou non repliées vont être dégradées par le protéasome cytoplasmique [98]. Le

stress du réticulum endoplasmique est une condition pathologique où des protéines « mal repliées » ou non repliées s'accumulent. Le stress du RE active le unfolded protein response (UPR), une voie de signalisation intracellulaire intégrée qui fait intervenir trois kinases RE-résidentes: le IRE-1 (A type-1 ER transmembranaire protéine kinase), ATF-6 (Activating transcription factor 6) et PERK (The PKR like ER kinase), et par conséquent, il existe une diminution de la traduction des protéines [97].

III.10. Matrice extracellulaire

L'hyperhomocystéinémie perturbe l'organisation des tissus conjonctifs entraînant un basculement du cristallin, une hyper laxité ligamentaire et un développement anormal des cartilages, retrouvés dans le syndrome de Marfan. Elle agirait sur les fibrillines, mais aussi sur le collagène en fixant sur les lysines de la tropoélastine empêchant la réticulation de cette molécule par formation de desmosine. Elle pourrait aussi perturber le métabolisme des protéoglycanes soufrés tels que le dermatane et l'héparane [99].

Chapitre IV
Diagnostic et traitement

IV.1. Diagnostic

Le diagnostic d'une hyperhomocystéinémie est fondé sur le dosage plasmatique de l'homocystéine totale (HCT) à jeun ou après charge en L-méthionine. À jeun, l'HCT est physiologiquement influencée par l'âge et le sexe [9]. Le taux habituel est de 9 à 12 $\mu\text{mol/L}$, plus élevé chez l'homme que chez la femme, et chez la femme ménopausée, plus que la femme jeune. Le test de charge en méthionine (TCM) peut être plus sensible pour dépister les troubles modérés de la transsulfuration, et permet d'identifier les patients ayant un trouble du métabolisme de l'homocystéine, malgré un taux normal à jeun. Si la dose de charge de 100 mg/kg semble unanimement adoptée, en revanche, le temps choisi pour le prélèvement après la charge est variable suivant les auteurs : 2 heures, 4 heures, ou 6 heures. L'hyperhomocystéinémie est habituellement définie par l'usage arbitraire de cut-off (95^e percentile, ou moyenne + 2DS). Le taux normal à jeun est souvent déterminé comme $< 15 \mu\text{mol/L}$ tous sexes et âges confondus, particulièrement dans les études de cohortes. Pour les diagnostics individuels il semble plus logique de considérer le sexe et l'âge [100].

Nous pensons qu'il serait nécessaire d'adopter une attitude consensuelle, à la fois pour l'exploration des hyperhomocystéinémies (TCM versus taux à jeun) et pour les valeurs de référence définissant l'hyperhomocystéinémie [100].

IV.2. Traitement de L'hyperhomocystéinémie et affections cardiovasculaires

De nombreuses études ont démontré l'effet de l'acide folique et des vitamines du groupe B sur la diminution du taux sanguin d'homocystéine [58]. Un apport d'acide folique provoque, en moyenne, une diminution de 25 % de l'homocystéinémie et que l'addition de cyanocobalamine (vitamine B12) abaisse l'homocystéinémie de 7 % supplémentaires. L'acide folique produit son effet maximum à 0,5 mg/j, mais une dose de 0,2 mg/j pourrait suffire chez certains patients. La vitamine B6 administrée seule n'a aucun effet sur l'hyperhomocystéinémie modérée détectée à jeun; par contre, combinée à l'acide folique, elle peut réduire l'homocystéinémie jusqu'à 53 % en cas d'hyperhomocystéinémie détectée par test de charge en méthionine [238]. Il a été aussi considéré qu'une dose quotidienne de 0,8 mg d'acide folique permet d'atteindre la réduction maximale du taux d'homocystéine [292]. Les posologies réputées efficaces rencontrées le plus fréquemment dans la littérature sont : acide folique : 0,5-5 mg/j; B12 orale : 0,5 mg/j; B6 : 16 mg/j [101]. La façon de traiter l'hyperhomocystéinémie demeure encore sujette à la controverse.

IV.3. Diminution de risque cardiovasculaire

L'acide folique était promis à un bel avenir : incorporé dans la fameuse polypill (un mélange d'aspirine, d'hypotenseur et de statine) censée diminuer de façon drastique les facteurs de risque CV l'acide folique diminue de façon efficace l'homocystéine [102]. Hélas, la plupart des études d'interventions (CHAOS, NORVIT, WAFACS, SEARCH, etc.) n'ont montré aucun bénéfice clinique de l'acide folique en général associé aux vitamines B6 et B12, malgré une diminution de plus de 20% des taux d'homocystéine. L'étude SEARCH par exemple, qui portait sur 12 000 patients ayant eu un infarctus dont la moitié a été traitée par 2 mg d'acide folique et 1 mg de B12, a eu des résultats négatifs. Sur plus de vingt études randomisées en prévention secondaire [103] dont dix-sept ont fait l'objet d'une récente méta-analyse trois seulement ont montré un effet bénéfique de l'acide folique l'une sur la resténose des coronaires chez des angoreux, après dilatation une plus récente sur la mortalité chez des coronariens et une autre sur le risque d'ictus ce qui est en partie confirmé par une méta-analyse [104]. Une autre méta-analyse de cinq études a montré une baisse de 27% de la morbidité CV sous l'effet de l'acide folique chez des dialysés alors qu'une récente étude randomisée a montré des résultats plus mitigés [105].

En conclusion, à l'exception des études revues ci-dessus, la plupart des études randomisées et des méta-analyses n'ont pu mettre en évidence d'effet bénéfique d'un traitement d'acide folique (associé aux vitamines B6 et B12) sur les différentes affections vasculaires [103]. Une revue *Cochrane* de base de données conclut à l'absence d'effet bénéfique de l'acide folique seul ou en association avec les vitamines B sur le risque CV [106]. Nous en analyserons plus loin les causes possibles.

IV.4. Diminution de risque, de fracture, de dégénérescence musculaire

Une étude a montré une diminution de 80% du risque de fracture chez des malades ayant eu un ictus, avec un NNT de 14 [107], mais une autre étude n'a pas confirmé ces résultats chez des ostéoporotiques ayant des taux d'homocystéine < 15 µmol/l [108]. Dans une autre étude, le risque de dégénérescence musculaire sous «trithérapie» (par acide folique (2,5 mg), vitamines B6 (50 mg) et B12 (1 mg)) a été diminué de 33% [109]. Une étude a montré une amélioration des fonctions cognitives chez des sujets âgés, ce qui n'a pas été confirmé par une revue *Cochrane* [110]. Cependant, une vitamino-B-thérapie a montré un ralentissement de l'atrophie cérébrale chez des sujets ayant un déficit cognitif modéré, en particulier ceux dont le taux d'homocystéine était > 13 µmol/l Enfin, une amélioration de la réponse aux antidépresseurs, notamment à la fluoxétine, a été démontrée lors de

l'adjonction d'acide folique, dont le taux est souvent abaissé chez les déprimés[111]. De plus, on a observé une baisse de 52% du risque de dépression chez 273 patients ayant eu un ictus traités par les vitamines B (2 mg d'acide folique, 25 mg de B6 et 0,5 mg de B12) pendant sept ans [112]. Cela augure bien des études en cours sur la prévention de la dépression par l'acide folique.

IV.5. Diminution le risque de cancer

L'acide folique est impliqué comme cofacteur dans la synthèse des purines. En permettant le transfert d'un atome de carbone, il favorise la formation de la méthionine et de la thymidine. Dans les cellules cancéreuses qui se divisent rapidement (par exemple : dans la leucémie), l'apport d'acide folique favorise leur prolifération. A l'inverse, l'absence d'acide folique ralentit la croissance des tumeurs (par diminution de la synthèse des nucléotides)[102]. C'est la base des traitements anti foliques tels que le méthotrexate dans le traitement de certains cancers (leucémie, lymphome). Il peut donc sembler paradoxal que de nombreuses études épidémiologiques montrent, contre toute attente, une *diminution* du risque de cancers du côlon, du sein et de la prostate en cas d'augmentation d'apport d'acide folique d'origine alimentaire[113]. L'apport d'acide folique permettrait en particulier d'atténuer l'augmentation du risque de cancers du sein et du côlon liée à la consommation d'alcool, qui interfère avec le métabolisme de l'acide folique [114].

De plus, il pourrait diminuer la résistance à l'insuline qui semble être un facteur de risque pour les cancers du côlon [115]. L'acide folique semble donc jouer un rôle antagoniste dans les cancers. D'une part, il protège contre la survenue de polypes et de cancer colique *avant* l'apparition de cellules néoplasiques (*prévention primaire*). [116].

D'autre part, il favorise la croissance de cellules pré néoplasiques en les alimentant en bases puriques et en favorisant la prolifération des cellules à division rapide. Cela expliquerait l'augmentation du risque de cancer de la prostate et d'adénome du côlon chez des patients déjà porteurs d'adénome (*prévention secondaire*) [117]. Or, 30% des sujets de plus de 60 ans sont porteurs d'adénomes coliques et le risque d'avoir un jour un cancer in situ de la prostate est de 40% pour un homme de 50 ans. On voit donc le danger oncologique pour les personnes âgées d'augmenter leur apport en acide folique bien que les résultats de l'étude SEARCH soient rassurants [118].

Matériel
Et
Méthodes

Matériel et méthodes

1. Matériel biologique et lieu d'étude

L'étude est réalisée sur des échantillons (sérum et plasma) conservés à -80°C et des fragments d'organes (cœur, aorte abdominale, foie et rein) conservés dans le formol à 10% à partir d'un modèle animal d'hyperhomocystéinémie réalisé par (Dr, F.Derouiche) à partir de 08 rats témoins et 08 rats traités par une dose intra péritonéale de la DL- homocystéine (Hcy)(0.6 -1.2 $\mu\text{M/g}$: poids corporel) pendant 03 semaines de rate Wistar albinos, provenant de l'Institut Pasteur d'Alger, âgés de 03 mois et d'un poids moyen de 240 ± 10 g. Les dosages biochimiques sont réalisés à la polyclinique Elmahmel et les coupes histologiques à service de l'Anapath de l'hôpital Ahmed Benbella Khenchela

2. Dosages biochimiques

2.1. Dosage de l'homocystéine Principe

Le dosage de l'homocystéine total (tHcy) plasmatique a été réalisé par technique immunoenzymatique en utilisant le Kit (Axis® Homocysteine EIA, IBL International, Germany).

Principe

Protein homocystéine liée est réduite à homocystéine libre et enzymatiquement convertie en S- adénosyl-L -homocystéine (SAH) dans une procédure séparée avant l'immunoassay. L'enzyme est spécifique de la forme L de l'homocystéine, qui est le seul formé présents dans le sang.

Réduction

Homocystéine, disulfures mélangés et liés aux protéines formes d'homocystéine dans l'échantillon sont réduit à homocystéine libre par l'utilisation de dithiothréitol (DTT)

Prot-SS-Hcy

*R1-SS-Hcy Hcy DDT Hcy

Hcy-SS-Hcy

Mode opératoire

Le SAH libéré est ensuite mesuré par test immunoenzymatique par compétition en phase solide avec le SAH immobilisé pour se lier à l'anticorps anti-SAH monoclonal. Après élimination de l'anti-SAH non lié, un anticorps secondaire rabbitanti-mouse marqué à la peroxydase (HRP) est couplé. L'activité peroxydase est mesurée dans l'échantillon par lecture de l'absorbance à 450 nm qui est inversement proportionnelle à la concentration

totale de l'homocystéine dans l'échantillon. Le Kit est spécifique pour le dosage quantitatif de la L-homocystéine, la seule forme présente dans le sang.

2.2. Dosages des paramètres du stress oxydatif

2.2.1. Dosage du malondialdéhyde ou MDA

Principe

Le malondialdéhyde est un produit métabolique résulté de l'attaque des lipides membranaire par les radicaux libres. La détermination de la concentration du malondialdéhyde est réalisée par la réaction de celui-ci avec deux molécules de l'acide Thio-barbiturique à une température de 95 C° pendant 45 minutes. La couleur rose est récupérée par le n-butanol, l'absorbance est réalisé sur deux longueurs d'onde différentes 535 et 520 nm .la concentration du MDA est estimée par la différence de l'absorbance entre les deux ondes [119].

Mode opératoire

On met 0.1ml de l'homogénat hépatique dans un tube de 10ml puis on ajoute 0.6 ml de l'acide ortho-phosphorique (1M) et 0.2 ml de 0.6% l'acide thiobarbiturique. Les tubes sont incubés dans un bain marie pendant 45 min à 95 C°. Après le refroidissement de ce mélange ,0.8 ml de n-butanol est ajouté à chaque tube. La phase butanolique (la partie supérieure) est récupérée par la centrifugation à 2000 rpm pour 10 min. La densité optique est mesurée à 535nm et 520nm. La différence de densité optique entre les deux longueurs d'onde est utilisée dans la mesuré de la concentration du MDA.

Calcul: $MDA]nmol/g \text{ poids net} = Ab/156 * 4/0.1 * 5 * 1000$

Ab: différence de l'absorbance. 4: volume de n-butanol. 0.1: volume de l'homogénat.

5: 20% de l'homogénat ajouté.

2.2.2. Dosage du glutathion ou GSH

Principe

Le glutathion (GSH) du plasma, est déterminé selon le principe du dosage est basé sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique qui résulte de la réduction de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion[120].

Mode opératoire

Ainsi 80 µl du plasma sont déprotéinisés sur glace avec 20 µl de la solution d'acide salicylique (0,25%) pendant 15 min pour conserver les groupements (-SH) du GSH, puis centrifugé à 1000 rpm pendant 5 min. Puis 50 µl de l'échantillon déprotéinisé sont mélangés avec 100 µl du tampon Tris, pH 8,5 puis incubé pendant 5min avec 2,5 µl de

l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB : 0,01 M). La densité optique est déterminée par lecture d'absorbance à 412 nm contre le blanc réactif. La concentration en glutathion GSH est exprimée en nmol / ml selon la formule suivante : $[GSH \text{ (nmol / ml)} = (DO \times 100 \times 152,5 / 13100 \times 80 \times 50) \text{ nmol / ml}]$. (où: DO: densité optique, 100: volume total d'homogénat déprotéinisé, 152,5: volume total d'échantillon à tester, 13100 : Coefficient d'absorbance du (-SH) à 412 nm, 80 : volume d'homogénat, 50 : volume d'échantillon déprotéinisé).

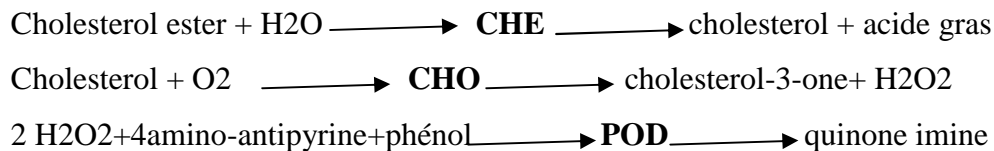
2.3. Dosages des paramètres lipidiques

Un bilan lipidique comprenant le dosage du cholestérol, triglycéride, Cholestérol HDL et Cholestérol LDL a été réalisé de la manière suivante :

2.3.1. Dosage du cholestérol total ou CT

Principe

L'estimation du Cholestérol est possible par l'oxydation et l'hydrolyse enzymatique. L'inducteur colorimétrique est le quinone-imine qui est généré de 4-aminoantipyrine et le phénol par le peroxyde d'hydrogène sous l'action catalytique du peroxydase (Réaction du Trinder) [121].



Mode opératoire

A 10 μl de surnageant, nous avons ajouté 1ml du réactif. Le mélange est maintenu 10 min dans la température ambiante 37°C. La densité optique des échantillons et calibrateur par rapport au blanc est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre à 500 nm

Calcul : $C \text{ chol mg/dl} = (A_{\text{echa}} / A_{\text{stand}}) * C_{\text{stand}}$

C chol: Concentration du cholestérol total, A_{echa}: Absorbance des échantillon.
A_{stand}: Absorbance du standard, C_{stand}: Concentration du standard.

2.3.2. Dosage des HDL.C et LDL.C

Le cholestérol-HDL est une lipoprotéine qui est considérée comme étant du bon cholestérol. Il est véhiculé vers le foie pour être métabolisé et excrété sous forme de sels biliaires. Il n'est pas athérogène par opposition au reste du cholestérol lié aux fractions VLDL-LDL.

Principe

Après avoir précipité par l'acide phosphotungstique, en présence d'ions magnésium, les chylomicrons et les lipoprotéines de faible densité (LDL) et de très faible densité (VLDL) contenus dans le sérum, on procède au dosage enzymatique des lipoprotéines de haute densité (HDL) contenues dans le surnageant obtenu après centrifugation.

Mode opératoire

Il faut s'assurer avant emploi que les réactifs et les échantillons sont à la température ambiante pendant 10 à 20 minutes.

- Longueur d'onde : 500 nm
- Température d'incubation : 37°C
- Zéro de l'appareil : blanc réactif
- Domaine de linéarité : Jusqu'à 2,75g/l
- Stabilité de la coloration : 30 minutes à 20°C-25°C ou 10 minutes à 37°C La méthode est linéaire jusqu'à 2,75g/l. Si la concentration en cholestérol-HDL est supérieure à cette valeur, il faut recommencer le dosage sur l'échantillon dilué au 1/2 avec une solution de NaCl à 9g/l; en n'oubliant pas de tenir compte de cette dilution avant de rendre le résultat qui sera multiplié par 2.

Précipitation de la fraction cholestérol-LDL

Le réactif précipitant est préparé en mélangeant 4 volumes d'acide phosphotungstique avec un volume de chlorure de magnésium.

Ech 500µl + Réactif précipitant 50µl

Il ne faut pas traiter l'étalon, bien mélanger et attendre 10 minutes puis centrifuger pendant 15 minutes à 5000 tr/mn. Séparer le surnageant limpide du précipité dans les 2 heures qui suivent la centrifugation.

Calcul : Choles+érol-HDL (g/l) DO échantillon x n/ DO étalon

n = Concentration de l'étalon cholestérol-HDL en g/l.

Il faut multiplier le résultat obtenu par 1,1 pour tenir compte de la dilution effectuée lors de la phase de précipitation.

Le taux de Cholestérol-LDL peut être calculé par la formule de Friedenwald :

Cholestérol -LDL== Cholestérol total- (Triglycérides/5 + Cholestérol-HDL)

Cette formule n'est applicable que lorsque la concentration de Triglycéride dans le sang ne dépasse pas 3g/l.

2.3.3. Dosage des triglycérides ou TG

Principe :

L'inducteur colorimétrique est le quinone-imine qui est généré de 4-aminoantipyrine et de 4-chlorophenole par le peroxyde d'hydrogène sous l'action catalytique de la peroxydase [122].

Triglyceride \longrightarrow LPL \longrightarrow glycerol + acide gras

Glycerol + ATP \longrightarrow GK \longrightarrow Glycerol-3-phosphate + ADP

Glycerol-3-phosphate + O₂ \longrightarrow GPO \longrightarrow Dihydroacétone phosphate

2H₂O₂ + 4-amino-antipyrine + 4-chlorophenol \longrightarrow POD \longrightarrow quinoneimine + HCl + 4 H₂O

Mode opératoire

A 10 µl de surnageant, nous avons ajouté 1ml du réagent. Le mélange est maintenue 10 min dans la température ambiante 37°C. La densité optique des échantillons et calibrator par rapport au blank est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre à 500 nm [123].

Calcul Triglycerides [mg/dl] = DA éch / DA stand * Cstand

DAéch: Différence de l'absorbance de l'échantillon. DAstand: Différence de l'absorbance du standard. Cstand: Concentration du standard.

2.4. Dosage des enzymes sériques

2.4.1. Dosage de TGO

Principe

La détermination de l'activité de l'ASAT Par la méthode cinétique se fait selon les réactions suivantes :

L-aspartate + alpha cétooglutarate $\xrightarrow{\text{ASAT}}$ oxaloacétate + L-glutamate

oxaloacétate + NADH + H⁺ $\xrightarrow{\text{MDH}}$ L-malate + NAD⁺

MDH= Malate déshydrogénase

Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité de l'ASAT [124].

Mode opératoire

Il faut s'assurer avant emploi que les réactifs et les échantillons (100µl) sont à la température ambiante pendant 10 à 20 minutes.

- longueur d'onde : 340nm
- Température d'incubation : 25°C-30°C-37°C
- Zéro de l'appareil : Eau distillée

Mélanger et lire les densités optiques après incubation de 1 minute à 30°C ou 37°C. Refaire la lecture au bout de chaque minute pendant 3 minutes. Calculer la moyenne des diminutions des DO par minute $\Delta DO/mn.$

Calcul : activité ALAT (U/L)=Facteur * $\Delta DO/mn$

2.4.2. Dosage de TGP

Principe

La détermination de l'activité de l'ALAT Par la méthode cinétique se fait selon les réactions suivantes :

L-alanine + alpha cétooglutarate \xrightarrow{ALAT} pyruvate + L-glutamate
Pyruvate + NADH + H⁺ \xrightarrow{LDH} L-lactate + NAD +LDH= lactate déshydrogénase
Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité de l'ALAT [124].

Mode opératoire

il faut s'assurer avant emploi que les réactifs et les échantillons (100µl) sont à la température ambiante pendant 10 à 20 minutes.

- longueur d'onde : 340nm
- Température d'incubation : 25°C-30°C-37°C*
- Zéro de l'appareil : Eau distillée

Mélanger et lire les densités optiques après incubation de 1 minute à 30°C ou 37°C. Refaire la lecture au bout de chaque minute pendant 3 minutes. Calculer la moyenne des diminutions des DO par minute $\Delta DO/mn.$

Calcul : activité ALAT (U/L)=Facteur * $\Delta DO/mn$

2.4.3. Dosage des phosphatases alcalines (ALP)

Principe

La détermination de l'activité des phosphates alcalines Par la méthode cinétique se fait selon les réactions suivantes :

p-nitrophénylphosphate+H₂O \xrightarrow{PAL} p-nitrophénol+phosphate la DO du p-nitrophénol libéré est proportionnel à l'activité des PAL [121].

Mode opératoire

il faut s'assurer avant emploi que les réactifs et les échantillons (20µl) sont à la température ambiante pendant 10 à 20 minutes.

- longueur d'onde : 405nm (400nm-420nm)*
- Température d'incubation : 25°C-30°C-37°C

- Zéro de l'appareil : Eau distillée

Mélanger et lire les densités optiques après incubation de 1 minute à 30°C ou 37°C. Refaire la lecture au bout de chaque minute pendant 3 minutes. Calculer la moyenne des diminutions des DO par minute $\Delta DO/mn$.

Calcul : activité PAL (U/L)=Facteur * $\Delta DO/mn$

3. Coupes histologiques

Les coupes histologiques ont été réalisées suivant la technique de [125]. Des fragments (cœur aorte abdominale, foie et rein (surface : 1 à 2 cm² et épaisseur : 1 mm de chaque rat témoin et traité (n= 5) par groupe ont été d'abord fixés dans le formol à 10% à fin d'immobiliser les structures cellulaires. Après une semaine de fixation, les fragments tissulaires (ou pièces) sont retirés du formol, rincés à l'eau distillée, puis placés dans des cassettes spéciales à inclusion. Les pièces sont ensuite déshydratées via un automate pendant 12 à 18 heures par le passage des tissus dans des bains d'éthanol à concentration croissante (70 %, 95 % et 100 %), puis dans des bains d'xylène pour l'éclaircissement. Pour l'inclusion dans la paraffine, les pièces sont prolongées dans des bains de paraffine liquide sous chaleur, puis enrobées de manière automatique par un appareil à inclusion dans des blocs de paraffine qui, une fois sont solidifiés vont permettre les coupes des tissus. Les blocs de paraffine sont coupés au moyen d'un microtome en pièces minces de 3 à 5 μm d'épaisseur, ensuite ces coupes sont étalées sur des lames et fixées par une eau gélatineuse chauffée à 40 °C, puis séchées pendant 1h à 100°C. Avant la coloration à hématoxyline-éosine (H-E), les coupes sont déparaffinées dans 2 bains successifs d'xylène pendant 20 min, ensuite sont passées dans un bain d'alcool absolu pendant 5 min pour 3 fois, puis rincées à l'eau distillée. Les coupes sont colorées par émergence dans un bain d'hématoxyline pendant 20 min, lavées à l'eau distillée et après sont plongées dans un bain d'éosine pendant 2 min, lavées à l'eau distillée et déshydratées dans l'alcool absolu et enfin passées dans un bain d'xylène pendant 10 min, lavées et séchées. L'échantillon coloré est placé entre lame et lamelle pour l'observation au microscope optique couplé à un appareil photo.

4. Analyse statistique des résultats

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SE. L'analyse statistique des données est conduite en utilisant le logiciel (MiniTab2013). Pour la comparaison des moyennes entre deux groupes le test t'Student est utilisé. Les différences sont considérées comme significatives lorsque $P < 0,05$.

Résultats

Résultats

1. Valeurs d'homocystéine plasmatique total chez les rats témoins et traités

Les résultats révèlent que le model d'hyperhomocystéinémie élaboré chez le rat Wistar albinos par l'administration de la DL-homocystéine (0.6 -1.2 μ M/g : poids corporel) pendant 03 semaines entraine une augmentation significative ($p < 0,05$) du taux d'Hcy plasmatique chez les groupes des rats traités par l'Hcy (tHcy) en comparaison aux rats témoins (figure 16).

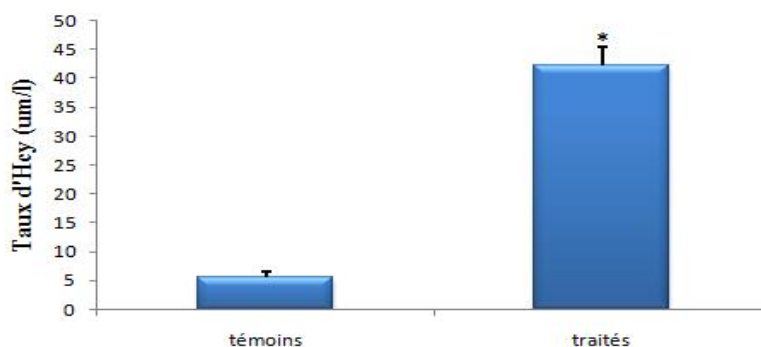


Figure 16. Taux d'homocystéine plasmatique total chez les rats témoins et traités

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SE de 8 rats par groupe. Les moyennes représentent respectivement les comparaisons (tHcy, versus T) et sont considérées significatives lorsque $*p < 0.05$ par le test t'Student (Minitab 2013). **T.** Témoins, **tHcy.** traités par l'Hcy.

4. Bilan oxydatif chez les rats témoins et traités par l'homocystéine

4.1. Teneur en malondialdéhyde (MDA)

La (Figure 19) illustre la teneur en malondialdéhyde (MDA), les résultats indiquent une augmentation significative ($p < 0.05$) chez les traités par l'homocystéine (t-Hcy) par rapport aux témoins (T).

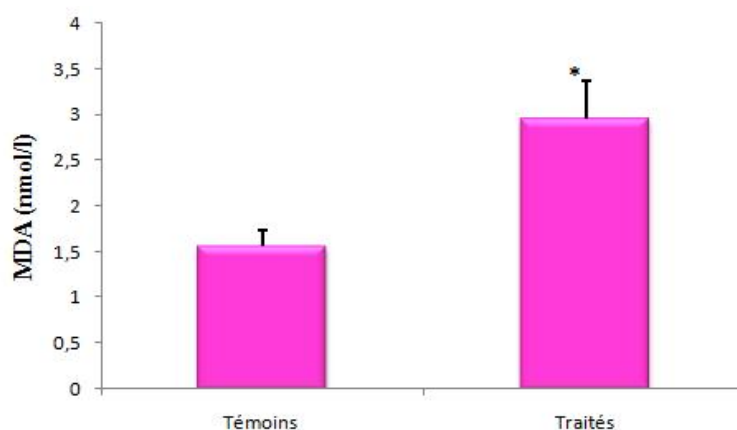


Figure 19. Taux en malondialdéhyde (MDA) du plasma chez les rats traités et témoins.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SE de 8 rats par groupe. Les moyennes représentent respectivement les comparaisons (tHcy, versus T) et sont considérées significatives lorsque $*p < 0.05$ par le test t'Student (Minitab 2013).

T. Témoins, **tHcy.** Traités par l'Hcy, **MDA.** malondialdéhyde.

4.2. Teneur en glutathion (GSH)

La teneur en glutathion (GSH) est diminuée d'une manière significative ($p < 0.05$) chez les rats traités par l'homocystéine (t-Hcy) par rapport aux témoins (T) (figure20).

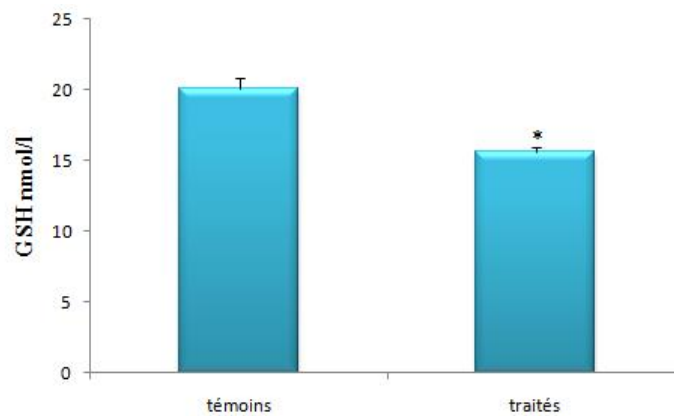


Figure 20. Taux en glutathion (GSH) du plasma chez les rats traités et témoins.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SE des 8 rats par groupe. Les moyennes représentent respectivement les comparaisons (tHcy, versus T) et sont considérées significatives lorsque $*p < 0.05$ par le test t'Student (Minitab 2013).

T. Témoins, **tHcy.** Traités par l'Hcy, **GSH.** Glutathion.

2. Bilan lipidique (BL) chez les rats témoins et traités par l'homocystéine

Les résultats révèlent une augmentation significative ($*p < 0.05$) en cholestérol (CT), Lipoprotéine de basse densité (LDL-C), triglycéride (TG) par contre une diminution significative ($*p < 0.05$) en Lipoprotéine de haute densité (HDL-C) chez les rats témoins (T) comparés aux traités par l'homocystéine (t-Hcy) (figure17).

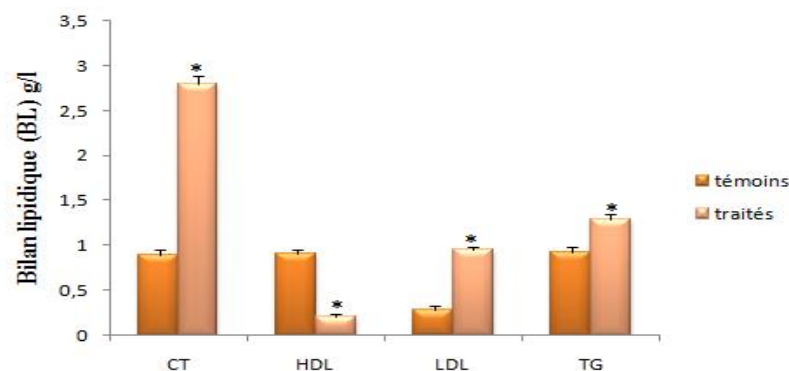


Figure 17. Taux des paramètres lipidiques plasmatiques chez les rats témoins et traités par l'homocystéine. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SE de 8 rats par groupe. Les moyennes représentent respectivement les comparaisons (tHcy, versus T) et sont considérées significatives lorsque $*p < 0.05$ par le test t'Student (Minitab 2013). **T.** Témoins, **tHcy.** traités par l'Hcy, **CT.** Cholestérol, **HDL-C.** Lipoprotéine de haute densité, **LDL-C.** Lipoprotéine de basse densité, **TG.** Triglycéride.

3. Bilan enzymatique (BE) chez les rats témoins et traités par l'homocystéine

Les résultats montrent une augmentation significative ($*p < 0.05$) des enzymes sériques transaminase glutamate oxaloacétique (TGO), transaminase glutamate pyruvate (TGP) et alcaline phosphatase (APL) chez les rats traités par l'homocystéine (tHcy). Comparés aux rats témoins (T) (figure 18).

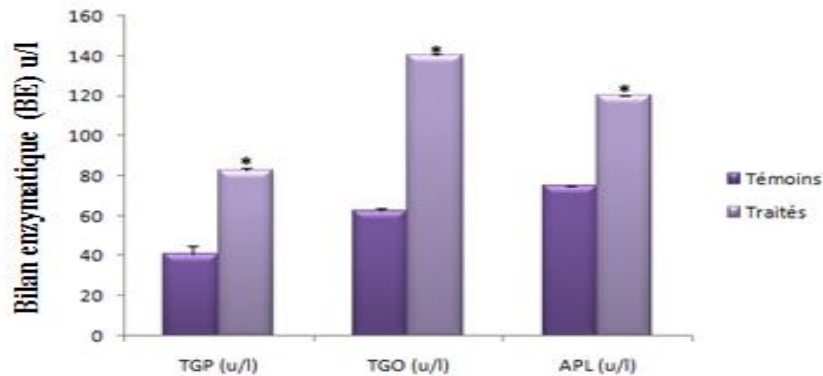


Figure 18. Taux des enzymes sériques chez les rats témoins et traités par l'homocystéine. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SE de 8 rats par groupe. Les moyennes représentent respectivement les comparaisons (tHcy, versus T) et sont considérées significatives lorsque $*p < 0.05$ par le test t'Student (Minitab 2013). **T.** Témoins, **tHcy.** traités par l'Hcy, **TGO.** Transaminase glutamate oxaloacétique, **TGP.** transaminase glutamate pyruvate, **APL.** Alcaline phosphatase.

5. Histologie des organes

5.1. Histologie du cœur

L'étude histologique du myocarde pour les rats témoins (T) montre une morphologie normale avec des fibres musculaires intactes (Figure 21. A). Par contre l'observation microscopique pour les traités par l'Hcy (tHcy) révèle une lyse dans la structure des fibres musculaires (Figure 21. B).

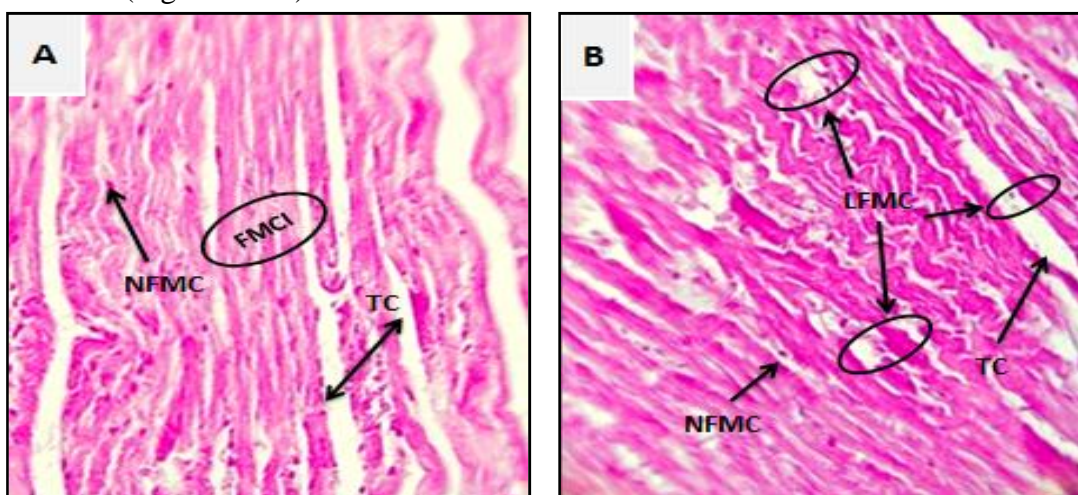


Figure 21. Micrographies du myocarde en coupe histologique longitudinale des rats témoins et traités. Coloration hématoxyline éosine (HE) (G \times 1000).

A: T, **B:** tHcy, **FMCI:** Fibre musculaire cardiaque intacte, **NFMC.** Noyau de la fibre musculaire cardiaque, **LFMC.** Lyse de la fibre musculaire cardiaque, **TC.** Tissu conjonctif.

5.2. Histologie de l'aorte abdominale

L'intima chez les rats témoins (T) au niveau abdominal (Figure 22. A) montre un endothélium intact et des noyaux fusiformes des cellules musculaires lisses dans la média. Par contre chez les rats traités par l'Hcy (tHcy) (Figure. 22 B), on observe une discontinuité de l'endothélium, une desquamation des cellules épithéliales. Un changement de l'aspect fusiforme du noyau des cellules musculaires vers un aspect arrondi, une formation des cellules spumeuses dans l'intima et la média et une lyse musculaire bien marquée.

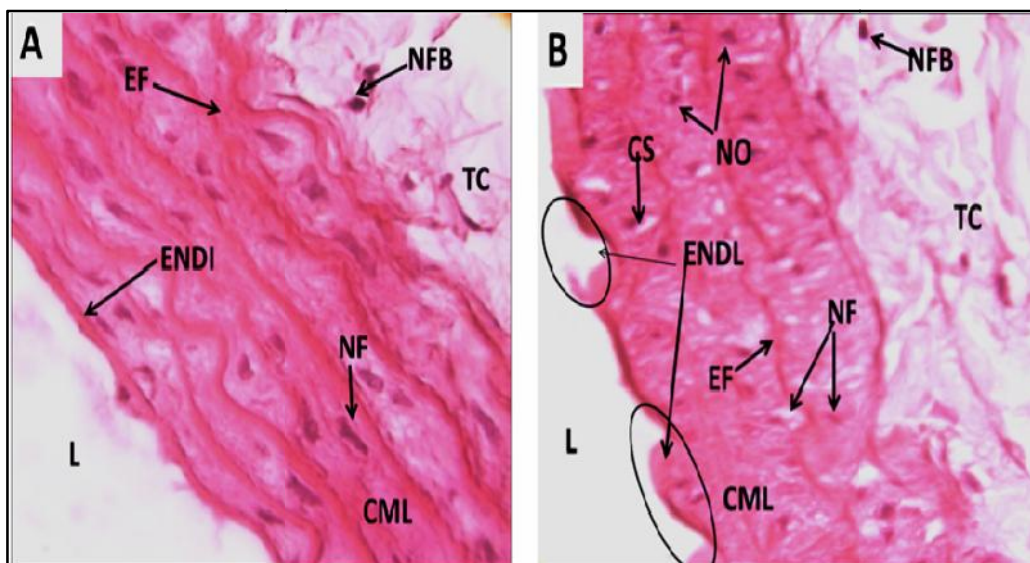


Figure 22. Micrographies de l'aorte abdominale encoupe histologique longitudinale des rats témoins et traités. Coloration hématoxyline éosine (HE) (G×1000).

A. T, B. tHcy, ENDI. Endothélium intact, **NF.** Noyau fusiforme, **NO.** Noyau ovale, **ENDL.** Endolyse, **CS.** Cellule spumeuse, **CML.** Cellule musculaire lisse, **EF.** Fibre élastique, **NFB.** Noyau du fibroblaste, **TC :** Tissu conjonctif, **L.** Lumière.

5.3. Histologie du foie

L'étude histologique du foie pour les rats témoins (T) montre une morphologie normale (Figure 23. A). Par contre l'observation microscopique pour les traités par l'Hcy (tHcy) révèle une altération de la structure tissulaire par formation d'endolyse, de lyse au niveau des hépatocytes (Figure 23. B).

5.4. Histologie du rein

L'étude histologique du rein pour les rats témoins (T) montre une morphologie normale (Figure 24. A). Par contre l'observation microscopique pour les traités par l'Hcy (tHcy) révèle altération de la structure tissulaire, on a observé une dégénération des glomérules, et de l'épithélium des tubes rénaux, avec présence des nécroses (Figure 24. B).

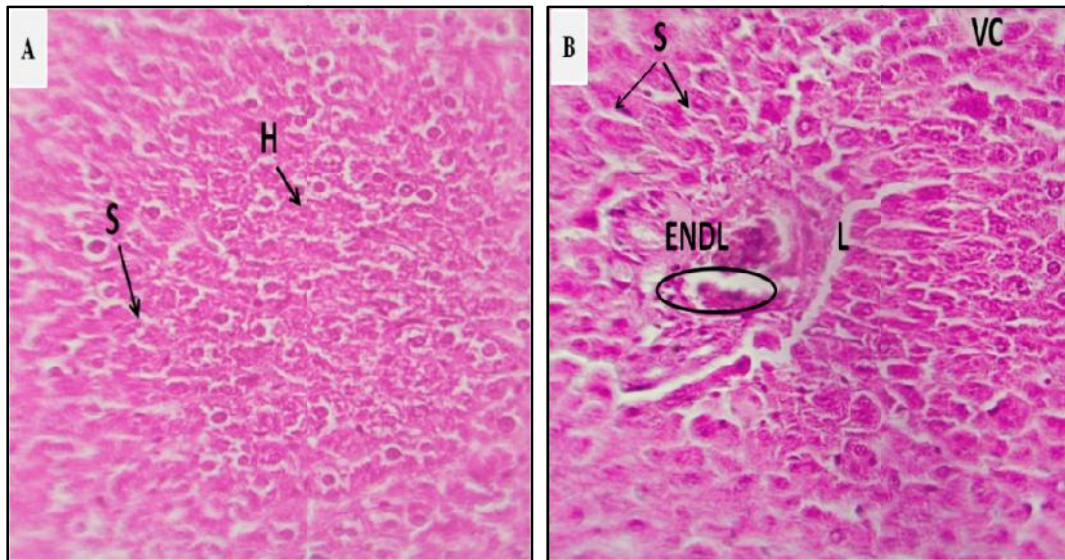


Figure 23. Micrographies du foie en coupe histologique longitudinale des rats témoins et traités. Coloration hématoxyline éosine (HE) (G×1000). A. T, B. tHcy. ENDL. Endolyse, L. Lyse, S. sinusöide, VC. Veine centrale, H. Hépatocyte.

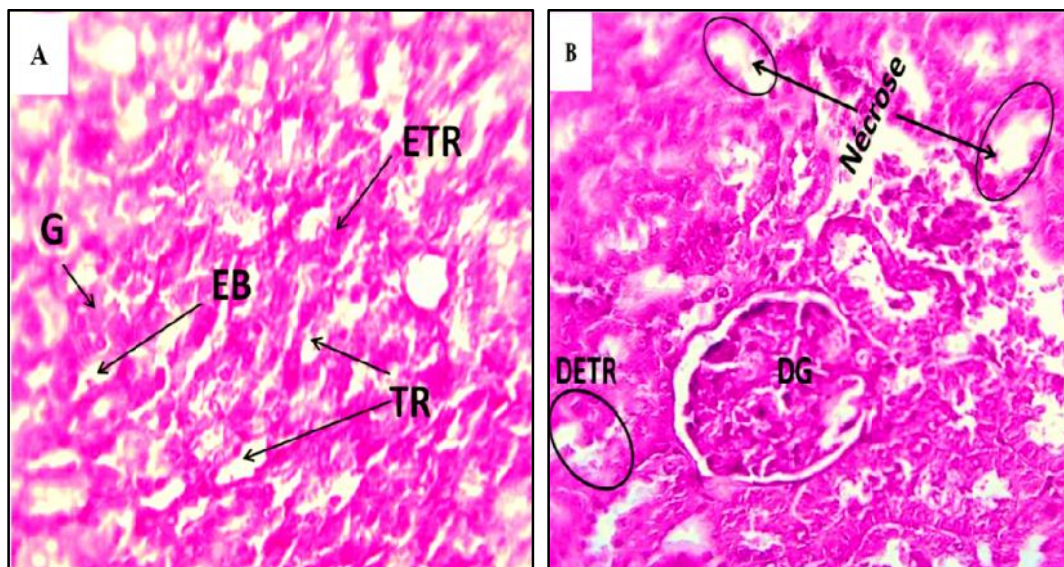


Figure 24. Micrographies du rein en coupe histologique longitudinale des rats témoins traités. Coloration hématoxyline éosine (HE) (G×1000). A. T, B. tHcy. G. Glomérule, TR. Tube rénal, EB. Espace de Bowman. DG. Dégénération des glomérules, DETR. Dégénération de l'épithélium des tubes rénaux.



Discussion

Discussion

Cette étude nous a permis sur le plan théorique de connaître les causes génétiques en terme de polymorphismes, et environnementales de l'hyperhomocystéinémie. Nous avons tenté dans le cadre de cette étude sur le plan pratique d'évaluer l'impact de l'hyperhomocystéinémie sur quelques paramètres biochimiques (cholestérol total, LDL, HDL, TG, TGO et TGP) en tant que marqueurs pour certaines maladies cardiaques, hépatiques et rénales et sur la structure histologique de certains organes en relation (le cœur, l'aorte abdominale, le foie et le rein) chez le rat Wistar albinos pour une meilleure compréhension des mécanismes biochimiques, et histologiques de la physiopathologie de l'HHcy.

Le modèle d'étude élaboré après une durée d'intervention de 3 semaines a conduit chez les traités (tHcy) par la DL-Hcy (0.6–1.2 $\mu\text{M/g}$ poids corporel) à une hyperhomocystéinémie intermédiaire, étant donné que le taux d'homocystéine total plasmatique a été élevé à une valeur qui est dans la gamme de concentrations intermédiaires physiopathologiques de l'HHcy (20- 60 μM [125].

Les résultats montrent que les paramètres enzymatiques et lipidiques ont été perturbés par cette augmentation significative du taux de l'Hcy plasmatique, en effet, nous avons enregistré l'augmentation significative des transaminases (TGP et TGO) et la phosphatase alcaline (PAL) dans le sérum des rats traités, du cholestérol total et des TG et des LDL et une diminution significative des HDL par comparaison avec le groupe témoin. Ces résultats sont associés à l'apparition d'altérations structurales des différents organes étudiés (cœur, aorte abdominale, foie et reins). L'augmentation du cholestérol total, des LDL et des TG et la diminution des HDL suggèrent une relation probable entre l'HHcy et l'hyperlipidémie. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études qui ont montré une corrélation positive entre l'Hcy et le profil des lipides (cholestérol total, LDL et TG) et une corrélation négative avec les HDL [127,128].L'augmentation des enzymes sériques indique une lésion hépatique et s'explique par la fuite des enzymes du tissu vers le plasma due à l'altération de la perméabilité membranaire [129].

Plusieurs études ont montré que l'homocystéine induisait un stress oxydatif [40,72] par ailleurs, nos résultats indiquent l'induction du stress oxydatif au niveau du plasma, par l'augmentation du MDA, un bio marqueur de la peroxydation lipidique et la diminution du GSH, le premier antioxydant de défense [73,74].

L'histologique du cœur et l'aorte abdominale a confirmé l'altération de la structure tissulaire par l'effet de l'homocystéine. En effet, une lyse de fibres musculaires cardiaques a été observée, ainsi qu'une desquamation de l'endothélium au niveau de l'aorte avec un changement de l'aspect fusiforme des noyaux des cellules musculaires lisses vers un aspect arrondi, et une formation des cellules spumeuses. Aussi dans le foie, nous avons constaté une lyse au sein du tissu hépatique, une formation d'endolyse et la présence de cellules avec un noyau clair sévère, de débris cellulaires dans la veine centrale et une vacuolisation cytoplasmique. L'histologie du rein révèle une dégénération des glomérules et de l'épithélium des tubes rénaux et une formation de nécrose

La présente étude a donc bien démontré l'induction du stress oxydatif dans ce modèle expérimental d'HHcy intermédiaire qui a abouti à l'altération des paramètres biochimiques et histologiques qui confirme sa physiopathologie.

Conclusion

Conclusion

Le rôle de l'hyperhomocystéinémie comme facteur de risque indépendant de maladies cardiovasculaires a fait couler beaucoup d'encre et sa relation directe à certaines affections vasculaires n'est plus à démontrer, ainsi que son association au diabète, insuffisance rénale ou autres.

Dans ce modeste travail nous avons démontré la réalité de cette pathologie chez le rat par l'administration d'une dose de la DL-Hcy qui a présenté énormément d'altérations non seulement au niveau de l'aorte et cœur mais aussi le foie et le rein accompagnées également au niveau du plasma des altérations du bilan lipidique et enzymatique qui sont les conséquences du stress oxydatif induit.

Cette étude nous a permis de se familiariser avec les techniques de dosages de l'homocystéine, des paramètres biochimiques lipidiques et enzymatiques différentes y compris les paramètres du stress oxydatif, ainsi que les coupes histologiques et les traitements statistiques.

Nous avons voulu tester cette pathologie chez des patients en relation avec les polymorphismes en cause, mais malheureusement cela n'était pas possible à cause de non disponibilité des moyens. Néanmoins, cette étude, ouvre des possibilités au futur pour mieux analyser et comprendre cette pathologie pour envisager un traitement efficace, vu que jusqu'à présent le folique acide et le groupe des vitamines B associés font chuter l'homocystéine, mais pas les conséquences sur les organes et d'autres maladies en relation.

En fin, nous recommandons une analyse plus approfondie de cette pathologie sur le plan génétique et biochimique en relation avec diverses maladies et en mettant les points sur les différents facteurs en cause.

*Références
bibliographique*

Références bibliographique

1. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr.*1999, 19: 217-46
2. Jakubowski H. Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *J Nutr.*2006, 136:1741S-1749S.
3. Bottiglieri T. Homocysteine and folate metabolism in depression. *Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry* 2005, 29: 1103-1112
4. Namour F, Olivier J, Abdelmouttaleb I, Adjalla C, Debard R, Salvat C, Gueant J. Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. *Blood.*2001,97:1092-1098.
5. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet.*1999, 354: 407-413.
6. Refsum H, Ueland M, Nygaard O. Homocysteine and cardiovascular disease. *Ann Rev Med.* 1998, 49: 31-62.
7. Trabetti E. Homocysteine, MTHFR gene polymorphisms, and cardiocerebrovascular risk. *J Appl Genet* 2008; 49:267-82.
8. Mouchabac S. Homocystéinémie, hyperhomocystéinémie et dépression. *Neuropsychiatrie : Tendances et Débats* 2008; 32 :9-18.
9. Guillard JC, Favier A, Potier de Courcy G, Galan P, L'hyperhomocystéinémie : facteur de risque cardiovasculaire ou simple marqueur ? 1. Données fondamentales. *Pathologie Biologie* 2003; 51:101-10.
10. Faeh D, Chiolerio A, Paccaud F. Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: should we (still) worry about it? *SWISS Med Wkly* 2006; 136:745-56.
11. Oltean S, Banerjee R. Nutritional modulation of gene expression and homocysteine utilization by vitamin B12. *J Biol Chem* 2003, 278:20778-20784.
12. Mato JM, Alvarez L, Ortiz P, Pajares MA S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacol Ther* 1997, 73:265-280.
13. <http://www.md.ucl.ac.be/entites/mint/intr/hainaut/mte/dossiermte/figure5c.html>
14. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56: 111-2.
15. Mudd SH, Finkelstein JD, Refsum H, Ueland PM, Malinow MR, Lentz SR, Jacobsen DW, Brattstrom L, Wilcken B, Wilcken DE, Blom HJ, Stabler SP, Allen RH, Selhub J, Rosenberg IH Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested consensus terminology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20:1704- 1706.

16. <http://www.karger.com/Article/Fulltext/110876>
17. Dierkes J and Westphal S. Effect of drugs on homocysteine concentrations. *Semin Vasc Med* 2005; 5: 124-39.
18. Malinow MR, Nie FJ, Kruger WD, et al. The effects of folic acid supplementation on plasma total homocysteine are modulated by multivitamin use and methylenetetrahydrofolate reductase genotypes. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*.1997; 17(6):1157-11 62.
19. Davis RE and Nicol DJ. Folic acid. *Int J Biochem* 1988; 20: 133-139.
20. Abdelmouttaleb I, Danchin N, Aimone-Gastin I, Namour F, Angioi M, Gelot MA, Bennani N, Lambert D, Jeandel C, Gueant JL. Homocysteine, vitamins B6, B12, folate, and risk of coronary artery disease in patients undergoing diagnostic coronary angiography. *Amino Acids* 2000; 18: 139-46.
21. Scott JM and Weir DG. Folic acid, homocysteine and one-carbon metabolism: a review of the essential biochemistry. *J Cardiovasc Risk* 1998; 5: 223–7.
22. De Bree A, Verschuren WM, Blom HJ, Kromhout D. Association between B vitamin intake and plasma homocysteine concentration in the general Dutch population aged 20-65 y. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 1027-33.
23. Allen LH. Folate and vitamin B12 status in the Americas. *Nutr Rev* 2004; 62: S29-33.
24. <http://guggiedaly.blogspot.com/2010/06/is-folic-acid-only-and-best-choice.html>
25. Chen P, Poddar R, Tipa EV, Dibello PM, Moravec CD, Robinson K, Green R, Kruger WD, Garrow TA, Jacobsen DW. Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. *Adv Enzyme Regul* 1999; 39: 93-109
26. Hustad S, Ueland PM, Vollset SE, Zhang Y, Bjorke-Monsen AL, Schneede J. Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine: effect modification by the methylenetetrahydro folate reductase C677T polymorphism. *Clin Chem* 2000; 46: 1065-71.
27. Jacques PF, Kalmbach R, Bagley PJ, Russo GT, Rogers G, Wilson PW, Rosenberg IH, Selhub J. The relationship between riboflavin and plasma total homocysteine in the Framingham Offspring cohort is influenced by folate status and the C677T transition in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *J Nutr* 2002;132: 283-8.
28. Moat SJ, Ashfield-Watt PA, Powers HJ, Newcombe RG, McDowell IF. Effect of riboflavin status on the homocysteine-lowering effect of folate in relation to the MTHFR (C677T) genotype. *Clin Chem* 2003; 49: 295-302.

29. Norlund L, Grubb A, Fex G, Leksell H, Nilsson JE, Schenk H, Hultberg B. The increase of plasma homocysteine concentrations with age is partly due to the deterioration of renal function as determined by plasma cystatin C. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36: 175–8.
30. Schlienger JL. Homocystéine et consommation d'alcool une relation ambiguë et un nouveau paradoxe. *Presse Med* 2003; 32: 262-7.
31. Hultberg B, Berlund M, Anderson A, Frank A. Elevated plasma homocysteine in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17: 687-9.
32. Lussier-Cacan J, Xhingnesse M, Piolot A, Sehub J, Davignon J, Genest JR. Plasma total homocysteine in healthy subjects: sex-specific relation with biological traits. *Am J Clin Nutr* 1996; 64: 687-93.
33. Hillman RS, Steinberg SE. The effect of alcohol on folate metabolism. *Annu Rev Med* 1982; 33: 345-54.
34. Laufer EM, Hartman TJ, Baer DJ, Gunter EW, Dorgan JF, Campbell WS, Clevidence BA, Brown ED, Albanes A, Judd JT, Taylor PR. Effects of moderate alcohol consumption on folate and vitamin B12 status in postmenopausal women. *Eur J Nutr* 2004; 58: 1518-24.
35. Van der Gaag MS, Ubbink JB, Sillanaukee P, Nikkari S, Hendriks HF. Effect of consumption of red wine, spirits, and beer on serum homocysteine. *The Lancet* 2000; 355: 1522.
36. Grubben MJ, Boers GH, Blom HJ, Broekhinzen R, De Jond R, Van Rijt L, De Ruijter E, Swinkels DW, Nagengast FM, Katan MB. Unfiltered coffee increases plasma homocysteine concentrations in healthy volunteers: a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 2000; 71:480-4.
37. Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Stensvold I, Nordrehaug JE, Kvale G, Vollset SE. Coffee consumption and plasma total homocysteine: the hordaland homocysteine study. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 136-43.
38. Li YN, Gulati S, Baker PJ, Brody LC, Banerjee R, Kruger WD. Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Hum Molec Genet* 1996; 5: 1851-1858.
39. Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M, Rozen R. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mammalian Genome* 1998; 9: 652.

- 40.** Demuth K, Drunat S, Paul JL, Moatti N. Hyperhomocysteinémie et atherosclérose. *Med/Sci.* 2000; 16: 1081-1083.
- 41.** Barbaux S, Kluijtmans LA, Whitehead AS. Accurate and rapid “multiplex heteroduplexing” method for genotyping key enzymes involved in folate/homocysteine metabolism. *Clin Chem.* 2000; 46: 907-912.
- 42.** Ueland PM, Refsum H, Brattstrom L. Plasma Homocysteine and Cardiovascular Disease. In: Francis RB, Jr., ed. *Atherosclerotic Cardiovascular Disease, Hemostasis, and Endothelial Function.* New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker, Inc., 1993: 183-236.
- 43.** <http://dramyneuzil.com/understanding-the-mthfr-basics/>
- 44.** <http://www.em-consulte.com/en/module/displayarticle/article/99996/iconosup/GCB-6-2004-28-6-7-C1-0399-8320-101019-ART9-ILL1>
- 45.** Cortese C., Motti C. MTHFR gene polymorphism, homocysteine and cardiovascular disease. *Public Health Nutrition* (2001) Volume 4: Issue 2(B): Copyright Nutrition Society.
- 46.** Tran P, Leclerc D, Chan M, et al. Multiple transcription start sites and alternative splicing in the methylenetetrahydrofolate reductase gene result in two enzyme isoforms. *Mamm Genome* 2002; 13: 483–92.
- 47.** Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10 : 111–3.
- 48.** Monika G, Agnieszka SP. Genetic basis of neural tube defects. *J Appl Genet.* 2002; 43 : 511-524.
- 49.** Chen LH, Liu ML, Hwang HY, Chen LS, Korenberg J, Shane B. Human methionine synthase. cDNA cloning, gene localization, and expression. *J Biol Chem* 1997; 272:3628-34.,
- 50.** [https://www.researchgate.net/figure/11869392_fig1_Fig-1-Role-of-methionine-synthase-reductase-MTRR-in-homocysteine-metabolism.](https://www.researchgate.net/figure/11869392_fig1_Fig-1-Role-of-methionine-synthase-reductase-MTRR-in-homocysteine-metabolism)
- 51.** Matherly LH, Taub JW. High frequency of the 844ins68 cystathionine- γ -synthase gene variant in Down syndrome children with acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2002; 16: 2339-2341.
- 52.** Brilakis ES, Berger PB, Ballman KV, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C>T and methionine synthase reductase (MTRR) 66A>G polymorphisms: association with serum homocysteine and angiographic coronary artery disease in the era of flour products fortified with folic acid. *Atherosclerosis* 2003; 168: 315-22.

53. Quere I, Bellet H, Hoffet M, Janbon C, Mares P, Gris JC. A woman with five consecutive fetal deaths: case report and retrospective analysis of hyperhomocysteinemia with recurrent miscarriages. *Fertil Steril*. 1998; 69: 152-154.
54. http://ipubli-inserm.inist.fr/bitstream/handle/10608/6125/MS_2007_3_297.html
55. Skovby F. Homocystinuria. Clinical, biochemical and genetic aspects of cystathionine beta-synthase and its deficiency in man. *Acta Paediatr Scand Suppl*. 1985; 321:1-21.
56. Kalra S, Ahuja R, Binion DG, Seetharam S, Seetharam B. Upregulation of transcobalamin (TC) and its receptor in colonic inflammation: Effect of homocysteine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007, 293: G918 .
57. Wilcken DE, Reddy SG, Gupta VJ. Homocysteinemia, ischemic heart disease, and the carrier state for homocystinuria. *Metabolism*. 1983; 32:363-370.
58. Brattstrom L. Vitamins as homocysteine-lowering agents. *J Nutr*. 1996;126:1276S-1280S.
59. Carson NAJ, Neill DW. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child* 1962; 37: 505-15.
60. Welch GN, Loscalzo J. Mechanisms of disease: homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 1998, 338: 1042–50.
61. Den Heijer M, Lewington S, Clarke R. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. *J Thromb Haemost* 2005, 3: 292–9.
62. Hasegawa T, Ukai W, Jo DG, Xu X, Mattson MP, Nakagawa M, Araki W, Saito T, Yamada T, Ho PI, Ashline D, Dhitavat S, Ortiz D, Collins SC, Shea TB, Rogers E. Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. *Neurobiol Dis*. 2003; 14(1):32-42.
63. Yasui K, Kowa H, Nakaso K, Takeshima T, Nakashima K. Plasma homocysteine and MTHFR C677T genotype in levodopa-treated patients with PD. 2000, *Neurology* 55:437-440.
64. Arnadottir M, Hultberg B. Homocysteine in renal disease, In *Homocysteine in Health and Disease*. Carmel R and Jacobson DW. Ed. Cambridge University Press, UK. 2001; pp 321-330.
65. Delattre J, Durand G, Jardillier JC. *Biochimie pathologique, aspects moléculaires et cellulaires*. Ed Medecine et Sciences. Flammarion 2003; 317pages.

66. Fonseca VA, Risk factors for coronary heart disease in diabetes. *Ann Intern Med* 2000, 133(2): 154-6.
67. DeFronzo RA. Insulin resistance, hyperinsulinemia and coronary artery disease: a complex metabolic web. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992;20 Suppl 1 1 :SI-16. Review.
68. Munshi ML; Stone A, Fink L; Fonseca V. Hyperhomocysteinemia following a methionine load in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and macrovascular disease. *Metabolism.* 1996 Jan; 45(1):133-5.
69. Araki A, Sako Y, Ito H. Plasma homocysteine concentrations in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: effect of parenteral methylcobalamin treatment. *Atherosclerosis.* 1993 Nov;103(2):149-57.
70. Najib S, Sanchez-Margalet V. Homocysteine thiolactone inhibits insulin-stimulated DNA and protein synthesis: possible role of mitogen-activated protein kinase (MAPK), glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) and p70 S6K phosphorylation. *J Mol Endocrinol.* 2005 Feb; 34(1):19-26.
71. Blom HJ. Diseases and drugs associated with hyperhomocysteinemia, in *Homocysteine in health and Disease.* Carmel R and Jacobson DW Ed. Cambridge University Press, UK.2001; pp 331-340,
72. Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 1996; 98:5-7.
- 73.A. Miller, V. Mujumdar, E. Shek, J. Guillot, M. Angelo, L. Palmer, et al., Hyperhomocysteinemia induced multiorgan damage, *Health Vessels* 15 (2000) 135–143.
74. Z. Vahabzed, A. Abolfathi, M.K. Ansari, A. Safaiyan, Effect of dietary Taurine on lipid profile and oxidative stress in tissues of homocysteine-treated rats, *Res. J. Biol. Sci.* 3 (11) (2008) 1271–1275.
75. C. Zhang, Y. Cai, M.T. Adachi, S. Oshiro, T. Aso, R.J. Kaufman, et al., Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response, *Biol.Chem.* 276 (2001) 35867–35874.
76. Favier, A. Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques. L'actualité Chimique* (2003). 108-115.
77. Cai Y, Zhang C, Nawa T, Aso T, Tanaka M, Oshiro S, Ichijo H, Kitajima S. Homocysteine-responsive ATF3 gene expression in human vascular endothelial cells: activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase and promoter response element. *Blood* 2000, 96: 2140-8.

- 78.** Eberhardt RT, Forgione MA, Cap A, Leopold JA, Rudd MA, Tolliet M, Heyrick S, Stark R, Klings ES, Moldovan NI, Yaghoubi M, Goldschmidt-Clermont PJ, Farber HW, Cohen R, Loscalzo J. Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocysteinemia. *J Clin Invest* 2000, 106: 483-91.
- 79.** Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000, 101: 1899-1906.
- 80.** Wang J, Dudman NP, Wilcken DE. Effects of homocysteine and related compounds on prostacyclin production by cultured human vascular endothelial cells. *Thromb Haemost* 1993, 70: 1047–1052.
- 81.** Drunat S, Moatti N, Paul JL, Cogny A, Benoit MO, Demuth K . Homocysteine-induced decrease in endothelin-1 production is initiated at the extracellular level and involves oxidative products. *Eur J Biochem* 2001, 268: 5287–5294.
- 82.** Stamler J, Osborne J, Jaraki O, Rabbani LE, Mullins M, Singel D, Loscalzo J. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest* 1993; 91 (1): 308-18.
- 83.** Duan J, Murohara T, Ikeda H, Sasaki K, Shintani S, Akita T, Shimada T, Imaizumi T. Hyperhomocysteinemia impairs angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20: 2579-85.
- 84.** Undas A, Williams EB, Butenas S, Orfeo T, Mann KG. Homocysteine inhibits inactivation of Factor Va by activated protein C. *J Biol Chem* 2001, 276: 4389–97.
- 85.** Jacobsen DW, Catanescu O, Dibello PM, Barbato JC. Molecular targeting by homocysteine: a mechanism for vascular pathogenesis. *Clin Chem Lab Med* 2005, 43: 1076-83.
- 86.** Perna AF, Satta E, Acanfora F, Lombardi C, Ingrosso D, De Santo NG. Increased plasma protein homocysteinylation in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2007, 69: 869–876.
- 87.** Yang X, Gao Y, Zhou J, Zhen Y, Yang Y, Wang J, Song L, Liu Y, Xu H, Chen Z, Hui R. Plasma homocysteine thiolactone adducts associated with risk of coronary heart disease. *Clin Chim Acta* 2006, 364: 230–234.
- 88.** Lentz SR, Piegors DJ, Fernández JA, Erger RA, Arning E, Malinow MR, Griffin JH, Bottiglieri T, Haynes WG, Heistad DD. Effect of hyperhomocysteinemia on protein C activation and activity. *Blood* 2002, 100: 2108–12.

- 89.** Podda G, Faioni EM, Zighetti ML, Cattaneo M. No effect of fasting plasma total homocysteine on protein C activity in vitro. *Blood* 2003, 101: 2446-7.
- 90.** Rodgers GM, Kane WH. Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *J Clin Invest* 1986, 77: 1909-1916.
- 91.** Nishinaga M, Ozawa T, Shimada K. Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest* 1993, 92: 1381-6.
- 92.** Hajjar KA, Mauri L, Jacovina AT, Zhong FM, Mirza UA, Padovan JC, Chait BT. Tissue plasminogen activator binding to the annexin II tail domain direct modulation by homocysteine. *J Biol Chem* 1998, 273: 9987-93.
- 93.** Perta-Kaján J, Twardowski T, Jakubowski H. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids* 2007, 32: 561-72.
- 94.** Moghadasian MH, McManus BM, Frohlich JJ. Homocyst(e)ine and coronary artery disease. Clinical evidence and genetic and metabolic background. *Arch Intern Med* 1997; 157: 2299-308.
- 95.** Hofman MA, Lalla E, Lu Y, Gleason MR, Wolf BM, Tanji N, Ferran LJ Jr, Kohl B, Rao V, Kisiel W, Stern DM, Schmidt AM. Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J Clin Invest* 2001; 107: 675-83.
- 96.** Kim DJ, Koh JM, Lee O, Lee YS, Kim YS, Park JY, Lee KU, Kim GS. Homocysteine enhances apoptosis in human bone marrow stromal cells. *Bone* 2006, 39: 582-90.
- 97.** Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* 2004, 14: 20-8.
- 98.** Kaufman RJ, Scheuner D, Schroder M, Shen X, Liu CY, Arnold SM. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, 3: 411-21.
- 99.** Khan M, Yamauchi M, Srisawasdi S, Stiner D, Doty S, Paschalis EP, Boskey AL. Homocysteine decreases chondrocyte-mediated matrix mineralisation in differentiating chick limb-bud mesenchymal cell micro-mass cultures. *Bone* 2001; 28: 387-98.
- 100.** Lobo A, Naso A, Arheart K, Kruger WD, Abou-Ghazala T, Alsous F, et al. Reduction of homocysteine levels in coronary artery disease by low-dose folic acid combined with vitamins B6 and B12. *Am J Cardiol* 1999; 83: 821-5.

- 101.** Ubbink JB, Vermaak WJ, van der Merwe A, Becker PJ, Delpont R, Potgieter HC. Vitamin requirements for the treatment of hyperhomocysteinemia in humans. *J Nutr* 1994;124:1927-33
- 102.** Mei W, Rong Y, Jinming L, et al. Effect of homocysteine interventions on the risk of cerebrovascular events: A meta-analysis of randomised controlled trials. *Int J Clin Pract* 2010;64:208-15.
- 103.** Vitatops trial. B vitamins in patients with recent transient ischaemic attack or stroke in the vitamins to prevent stroke trial : A randomised parallel trial. *Lancet Neurol* 2010;9:842-3.
- 104.** Lee M, Hong KS, Chang SC, et al. Efficacy of homocysteine-lowering therapy with folic acid in stroke prevention. A meta-analysis. *Stroke* 2010; 41:1205-12.
- 105.** Miller ER, Juraschek S, Pastor-Barriuso R, et al. Meta-analysis of folic acid supplementation trials on risk of CV disease and risk interaction with baseline homocysteine levels. *Am J Cardiol* 2010; 106:517-27.
- 106.** Sato Y, Honda Y, Iwamoto J, et al. Effect of folate and mecobalamin on hip fractures in patients with stroke: A randomised controlled trial. *JAMA* 2005; 293: 1082-8.
- 107.** Sawka AM, Ray JG, Yi Q, et al. Randomized clinical trial of homocysteine lowering therapy and fractures. *Arch Int Med* 2007; 167:2136-9.
- 108.** Christen WG, Glynn RJ, Chew EY, et al. Folic acid, pyridoxine and cyanocobolamin combination treatment and age-related macular degeneration in women. *Arch Int Med* 2009; 169:335-41.
- 109.** Maluf R, Grimley Evans J. Folic acid with or without vitamin B12 for the prevention and treatment of healthy elderly and demented people. *Cochrane Database Syst Rev* 2008 oct 8;(4):CD004514.
- 110.** Almeida CP. B-vitamins reduce the long-term risk of depression after stroke : The VITATOPS-DEP trial. *Ann Neurol* 2010;68:503-10.
- 111.** Giovannucci E. Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia : A review. *J Nutr* 2002;132(Suppl. 8) 2350S-6.
- 112.** Kim Y. Folate : A magic bullet or a double edged sword for colorectal cancer prevention ? *Gut* 2006;55: 1387-9.
- 113.** Larsson SC, Giovannucci E, Wolk A. Folate risk and breast cancer : A meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:64-76.

- 114.** Villa P, Perri C, Suriano R, et al. L-folic acid supplementation in healthy postmenopausal women : Effect on homocysteine and glycolipid metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4622-9
- 115.** Tsugane S, Inoue M. Insulin resistance and cancer : Epidemiological evidence. *Cancer Sci* 2010;101:1073-9.
- 116.** Cole BF, Baron JA, Sandler RS, et al. Folic acid for the prevention of colorectal adenoma. *JAMA* 2007;297: 2351-9.
- 117.** Scardino PT, Weaver R, Hudson MA. Early detection of prostate cancer. *Hum Pathol* 1992;23:211-22.
- 118.** Morris MS, Sakakeeny L, Jacques PF, et al. Vitamin B6 intake, is inversely related to and the requirements is affected by inflammation status. *J Nutr* 2010;140:103-10
- 119.** M. Uchiyama, M. Mihara, Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal.Biochem.* 1978,86: 271–278.
- 120.** Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem.Biophys.*1959, 82: 70–77.
- 121.** Gabriela C., Vasil E., Dumitru C., Cojocar U., Elena C. L'étude de l'activité des quelques enzymes du stress oxydatif dans le tissu musculaire a des différents cyprinidés de culture. *Annale de SAUAC.* Vol2005. 7(1): 1-4.
- 122.** Not C. Caractérisation de l'oxydation du fer ferreux en présence de deux bactéries ferro-oxydantes neutrophiles, du champ hydrothermal de Loihi, Hawi. *Mémoire biologie.* Qué bec. UQM 2006. 151p.
- 123.** Alis S., Characterization of Biophysical and Metabolic Properties of Cells Labeled with Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles and Transfection Agent for Cellular MR Imaging .*Annale de RSNA.* Vol 2003. 229 (3): 1-9.
- 124.** Sacoti H. Lésions élémentaires des cellules, tissus et organes. *Annale de COPATH.* Vol 2012. 3(1): 1-29.
- 125.** Martoja R, Martoja PM. *Initiation aux techniques de l'histologie animale.* Paris : Edition Masson. 1967, 345 p.
- 126.** Buysschaert M. L'homocystéine : un paramètre à suivre ? *Journal du médecin (Belgique),* 2004, n°1563.
- 127.** Bhandari et al. Et Bhandari U., Ansari M.N., Islam F. et Tripathi C.D. The effect of aqueous extract of EmbeliharibesBurm on serum homocysteine, lipids and oxidative enzymes in methionine induced hyperhomocysteinemia. *Indian Journal of Pharmacology* 2008, 40 (4): 152-157

128.)Tselmin S., Rodionov R.N., Müller G., Bornstein S. et Julius U. Homocysteine in lipoprotein apheresis patients – Retrospective data analysis in apheresis center of a university hospital. *Atherosclerosis Supplements* (2013). 14: 123-128.

129. Navarro, C.M., Montilla, P.M. Martin, A., Jimenez, J., Utrilla, P.M Free radicals scavenger and antihepatotoxic activity of rosmarinus. *Plant. Med.* (1993).. 59:312-314.

Hyperhomocysteinemia: genetic, biochemical and histological study**Abstract**

Hyperhomocysteinemia (HHcy) is an elevation of plasma total homocysteine level in excess of 15 uM. It is due to genetic, nutritional and environmental factors and also linked to several diseases. In this study we demonstrated in the theoretical section, genetic causes or polymorphisms of this disease, and other causes involved. In the experimental section, using a model of hyperhomocysteinemia in albino Wistar rats, we assayed the plasma levels of homocysteine (Hcy), glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), cholesterol TC, LDL C, HDL-C, triglycerides (TG) and serum enzymes: GOT, GPT and ALP. Histological sections at heart, abdominal aorta, liver and kidney were also performed. The results showed increase in MDA and reduced GSH, in CT, LDL-C, TG with decrease in HDL-C, in parallel, the enzymes TGO, TGP and ALP were increased. Histological changes of organs were also observed. In conclusion the HHcy induced in this model oxidative stress leading to the alteration of the previous biochemical plasma parameters and the morphological structure of the organs (heart, aorta, liver, and kidney) which confirms the multiple pathophysiology of this disease.

Keywords: Homocysteine, Polymorphisms, Oxidative stress, Biochemical parameters, Aorta, Heart, Liver , Kidney.

Résumé

L'hyperhomocystéinémie (HHcy) est l'élévation du taux d'homocystéine plasmatique au-delà de $15\mu\text{M}$. Elle est due aux facteurs génétiques, nutritionnels et environnementaux et également liée à plusieurs maladies. Dans cette étude nous avons détaillé dans la partie théorique les polymorphismes génétiques de cette pathologie, ainsi que les autres causes impliquées. Dans la partie expérimentale, en utilisant un modèle d'hyperhomocystéinémie chez le rat Wistar albinos, nous avons réalisé les dosages plasmatiques de l'homocystéine (Hcy), du glutathion (GSH), du malondialdéhyde (MDA), du cholestérol CT, des LDL-C, des HDL-C, des triglycérides (TG) et des enzymes sériques : TGO, TGP et ALP. Des coupes histologiques au niveau du cœur, aorte abdominale, foie et rein ont été aussi réalisées. Les résultats ont montré une augmentation du MDA et une diminution du GSH, une augmentation en CT, LDL-C, TG avec diminution en HDL-C, en parallèle, les enzymes TGO, TGP et ALP ont été augmentées. Des altérations histologiques des organes étudiés ont été aussi observées. En conclusion l'HHcy a induit dans ce modèle d'étude un stress oxydatif qui a conduit à l'altération des paramètres plasmatiques biochimiques précédents et la structure morphologiques des organes (cœur, aorte, foie, et rein) ce qui confirme la physiopathologie multiple de cette maladie.

Mots-clés : Homocystéine, Polymorphismes, Stress oxydatif, Paramètres biochimiques, Aorte, Cœur, Foie, Rein.

فرط الهوموستتين في الدم : وراثية ، وكيمياء حيوية و نسيجية

فرط الهوموستتين في الدم هو ارتفاع مستوى مجموع الحمض الاميني الهوموستتين في البلازما ما يزيد على $15\mu\text{M}$. هذا راجع للعديد من العوامل الوراثية والغذائية والبيئية العديد من الأمراض. في هذه الدراسة أثبتنا في الجزء انواع العوامل الوراثية المتحكمة في المرض ، وأسبابه الأخرى المسؤولة عنه. في القسم التجريبي، باستخدام نموذج من فرط الهوموستتين في الدم في فئران ويستار البيضاء، قمنا بمعايرت مستويات البلازما من الحمض الاميني (HCY)، الجلوتاثيون (GSH) ، والكولسترول باقسامه HDL-C LDL C CT، الدهون الثلاثية (TG) والإنزيمات ALP, TGP TGO : و قمنا ايضا بعمل مقاطع نسيجية للقلب، والشريان الأورطي البط . أظهرت النتائج زيادة في MDA GSH ، في ارتفاع ايضا في نسبة HDL- TG LDL-C CT في الإنزيمات ALP TGP TGO C في الإنزيمات ALP TGP TGO. كما لوحظ تغيرات على مستوى نسيج الاعضاء . وفي الختام، فرط الهوموستتين في هذا نموذج يتسبب في الإجهاد التأكسدي مما يؤدي إلى تغيير المعلمات البلازما الكيمياء الحيوية السابقة والبنية المورفولوجية للأجهزة (القلب والشريان الأورطي، والكبد، والكلى) مما يؤكد تعدد الفيزيولوجيا المرضية لهذا المرض.

: الهوموستتين، الوراثة، الإجهاد التأكسدي، القياسات البيوكيميائية، الأورطي، القلب.

Annexes

Nom et prénom : Boutarfa Roumissa

Nom et prénom : Sahraoui Amina

Date de soutenance : 26/05/2016

Master académique

Biologie moléculaire et génie génétique

Thème

Hyperhomocystéinémie : Étude génétique biochimique et histologique

Résumé

L'hyperhomocystéinémie (HHcy) est l'élévation du taux d'homocystéine plasmatique au-delà de 15 μ M. Elle est due aux facteurs génétiques, nutritionnels et environnementaux et également liée à plusieurs maladies. Dans cette étude nous avons détaillé dans la partie théorique les polymorphismes génétiques de cette pathologie, ainsi que les autres causes impliquées. Dans la partie expérimentale, en utilisant un modèle d'hyperhomocystéinémie chez le rat Wistar albinos, nous avons réalisé les dosages plasmatiques de l'homocystéine (Hcy), du glutathion (GSH), du malondialdéhyde (MDA), du cholestérol CT, des LDL-C, des HDL-C, des triglycérides (TG) et des enzymes sériques : TGO, TGP et ALP. Des coupes histologiques au niveau du cœur, aorte abdominale, foie et rein ont été aussi réalisées. Les résultats ont montré une augmentation du MDA et une diminution du GSH, une augmentation en CT, LDL-C, TG avec diminution en HDL-C, en parallèle, les enzymes TGO, TGP et ALP ont été augmentées. Des altérations histologiques des organes étudiés ont été aussi observées. En conclusion l'HHcy a induit dans ce modèle d'étude un stress oxydatif qui a conduit à l'altération des paramètres plasmatiques biochimiques précédents et la structure morphologiques des organes (cœur, aorte, foie, et rein) ce qui confirme la physiopathologie multiple de cette maladie.

Mots-clés : Homocystéine, Polymorphismes, Stress oxydatif, Paramètres biochimiques, Aorte, Cœur, Foie, Rein.

Jury de soutenance

Présidente : Mme Merabti Ryma **MCB** **Université Abbes Laghrour Khenchela**

Encadreur : Mme Derouiche Faouzia **MCB** **Université Abbes Laghrour Khenchela**

Examinatrice: Mme Bouhalit Samira **MAA** **Université Abbes Laghrour Khenchela**

Laboratoire où le travail a été réalisé

Service Anapathologie hôpital Ahmed Benbella Khenchela.

laboratoire pédagogique de l'université Abbes Laghrour Khenchela.

Polyclinique El mahmel.