

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Constantine 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master
Option : Analyse Protéomique et Santé

Effet de l'extrait des feuilles de *Vitis vinifera* sur la
CRP dans les maladies cardiovasculaires induites par
une hyperhomocystéinémie chez les souris

Présenté par

BEHNAS Widad et RAMOUL Ibtissem

Soutenu le : 28 / 06 / 2014

Jury de soutenance:

Président : MECHAKRA A.

Pr Université de Constantine 1

Encadreur : ZERIZER S.

Pr Université de Constantine 1

Examineur : BEN KAHOUL M.

M.C. (A) Université Constantine 1

Année universitaire : 2013 /2014

SOMMAIRE

Liste des figures et des tableaux

Liste des abréviations

Introduction.....1

Partie bibliographique

1 L'homocystéine2

1.1 Définition2

1.2 Métabolisme de l'homocystéine2

1.2.1 Réméthylation2

1.2.2 Transulfuration.....5

1.2.3 Régulation5

1.3 Homocystéine plasmatique5

1.4 Dosage de l'homocystéine5

1.5 Hyperhomocystéinémie et classification.....7

1.6 Étiologie d'hyperhomocystéinémie7

1.6.1 Homocystéinémies héréditaires7

1.6.2 Homocystéinémies acquises8

1.7 Mécanismes de la pathogénicité de l'hyperhomocystéinémie8

1.7.1 L'intervention du stress oxydatif8

1.7.2 Diminution de la production de NO et dysfonction endothéliale10

2 La protéine C-réactive.....10

2.1 Caractéristiques de la protéine C-réactive.....10

2.2 Structure de la protéine C-réactive.....11

2.3 Fonctions biologiques de la protéine C-réactive.....11

2.4 Dosage de la protéine C-réactive11

3 Physiopathologie de l'athérosclérose13

3.1 Définition13

3.2 Structure de la paroi artérielle13

3.3 Genèse de la plaque.....13

3.4 Rôle de la CRP dans la pathogenèse de l'athérosclérose :17

4 Plante médicinale *Vitis vinifera*19

4.1 Généralités sur la phytothérapie et les plantes médicinales19

4.2 Espèce *Vitis vinifera*.....20

4.2.1 Classification botanique.....20

4.2.2 Description botanique20

4.2.3 Constituants chimiques principaux des feuilles de *Vitis vinifera*20

4.2.4 Pharmacologie20

Partie pratique

Matériels et méthodes	23
1. Matériels	23
1.1. Extrait de plante	23
1.2. Animaux.....	23
1.3. Produits chimiques.....	23
1.4. Equipements.....	23
2. Méthodes	23
2.1. Traitement des souris	23
2.2. Prélèvement sanguin	24
2.3. La dissection	24
2.4. Méthode de dosage des différents paramètres biologiques	24
2.4.1. Dosage de la CRP	26
2.4.2. Dosage des paramètres du stress oxydant.....	26
2.4.3. Dosage des transaminases.....	27
2.5. Analyse statistique	28
Résultats	29
1. Résultats du dosage de CRP	29
2. Résultats du dosage de GSH.....	29
3. Résultats du dosage de l'ASAT	29
4. Résultats du dosage de l'ALAT	29
5. Résultats de corrélation entre les paramètres.....	32
Discussion	34
Conclusion et perspectives	36
Références bibliographiques	37
Annexe	43

Liste des figures et des tableaux

Figure 1 : Structures de l'homocystéine et les acides aminés apparentées	3
Figure 2 : Métabolisme de l'homocystéine	4
Figure 3 : Formes circulantes d'homocystéine.....	6
Figure 4 : Production de peroxyde d'hydrogène par oxydation de l'homocystéine.	9
Figure 5 : Structure et morphologie de la protéine	12
Figure 6 : structure de la paroi artérielle.	14
Figure 7 : Formation des cellules spumeuses	16
Figure 8 : Genèse de la plaque d'athérosclérose.....	18
Figure 9 : Classification systématique de l'espèce <i>Vitis vinifera</i> L. parmi la famille des Vitaceae	21
Figure 10 : Photo de <i>Vitis vinifera</i>	21
Figure 11 : L'interaction du L-méthionine et de <i>Vitis vinifera</i> sur la protéine C-réactive chez les souris.	30
Figure 12 : L'interaction du L-méthionine et de <i>Vitis vinifera</i> sur le taux du glutathion réduit chez les souris.	30
Figure 13 :L'interaction du L-méthionine et de <i>Vitis vinifera</i> sur ASAT chez les souris.	31
Figure 14 : L'interaction du L-méthionine et de <i>Vitis vinifera</i> sur ALAT chez les souris.	31
Figure 15 : Corrélation entre l'ASAT et la CRP chez le groupe (PM).....	33
Figure 16 : La gamme d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines.....	46
Tableau 1 : Constituants chimiques principaux des feuilles de <i>Vitis vinifera</i> L.....	22
Tableau 2 : Traitement des souris	25
Tableau 3 : Les composants de l'aliment des souris.	45

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
AGPI : Acide gras polyinsaturés
ALAT : Alanine aminotransférase
ASAT : Aspartate aminotransférase
BHMT : Bétaïne-homocystéine méthyl transférase
BSA : Bovine serum albumin
C1q : Fraction du complément
C3 : Fraction 3
C4 : Fraction 4
Ca²⁺ : Calcium
CH₂ – THF : 5,10 méthylènetétrahydrofolate
CH₃ - THF : 5 méthyltétrahydrofolate
CML : Cellule musculaire lisse
CRP : Protéine C-réactive
CRP_m : CRP monomérique
CRP_n : CRP native
CβS : Cystathionine bêta synthase
DNPH : 2,4 - Dinitrophénylhydrazone
DO : Densité optique.
DTNB : Acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque
EDTA : Acide éthylène-diamine-tetraacétique
ERO : Espèces réactives de l'oxygène
ET-1 : Endothéline-1
F : Groupe traité par Farine
Fc : Fragment cristallisable des immunoglobulines
GPx : Glutathion peroxydase
GSH : Glutathion réduit
Hcy : Homocystéine
HHcy : Hyperhomocystéinémie
HO-1 : Hème oxygène-1
HPLC : Chromatographie liquide à haute performance
ICAM : Molécule d'adhésion intercellulaire

Liste des abréviations

IL-1 : Interleukine-1

IL-6 : Interleukine-6

KDa : Kilodaltons

LDL : Low density lipoprotein

LEE : Limitante élastique externe

LEI : Limitante élastique interne

M : Groupe traité par L-méthionine

MCP-1: Monocyte chemotactic protein 1

MMP : Matrix metallo proteinases

MP : Groupe traité par Méthionine + plante

MS : Méthionine synthétase

MTHFR : Méthylène tetrahydrofolate réductase

NO : Oxyde nitrique

OIV : Organisation internationale de la vigne de vin

OMS : Organisation mondiale de la santé

P : Groupe traité par la plante

SAH : S-adenosyl-L-homocystéine

SAM : S-adenosyl-L-méthionine

Ser : Sérine

TGO : Transaminase glutamiqueoxaloacétique

TGP : Transaminase glutamique-pyruvique

THF : Tetrahydrofolate

TNF : Tumor necrosis factor

Tris : Trishydroxyméthylaminométhane

VCAM : Molécule d'adhésion des cellules vasculaires

INTRODUCTION

Introduction

L'homocystéine est un acide aminé soufré synthétisé au cours du métabolisme de la méthionine. Les principaux facteurs limitant sont les activités enzymatiques et de leurs cofacteurs vitaminiques (folates, vitamine B6, vitamine B12) (**Cacoub *et al.*, 2007**). Les taux plasmatiques normaux se situent entre 5 et 15 $\mu\text{mol/L}$ (**Vangelder *et al.* 2006**).

En 1969, McCully a été le premier à émettre l'hypothèse qu'une augmentation de la concentration d'homocystéine puisse être associée à une augmentation du risque de maladies cardiovasculaires (**McCully, 1969**).

Depuis 30 ans, de très nombreuses études cliniques tant rétrospectives que prospectives ont retrouvé une relation entre l'homocystéine et les maladies cardiovasculaires. L'hyperhomocystéinémie pourrait être un facteur de risque quantitatif et indépendant pour la survenue d'infarctus du myocarde, d'accident vasculaire cérébral (**Vesin *et al.* 2007**).

La protéine C-réactive (CRP) est un marqueur hautement sensible de l'inflammation. Elle constitue une composante importante du processus athérosclérotique. En effet, la présence d'inflammation témoigne de l'existence de plaques athéromateuses instables plus susceptibles que les autres d'entraîner des événements athérotrombotiques, comme l'infarctus du myocarde (IDM) et l'accident vasculaire cérébral ischémique. En plus d'être connue pour marquer la présence d'inflammation, la CRP s'est révélée avoir des effets athérogéniques directs (**Hrira *et al.*, 2011**).

Le glutathion est naturellement présent à l'intérieur de pratiquement toutes les cellules de notre organisme. Aucun autre antioxydant n'est aussi important que lui. C'est le régulateur et le régénérateur des cellules immunitaires et l'agent détoxifiant le plus efficace de l'organisme humain (**Fily *et al.*, 2004**).

Depuis longtemps la lutte contre les pathologies cardiovasculaires fait l'objectif de plusieurs recherches, et dans ce cadre l'utilisation des plantes médicinales fait un succès dans plusieurs cas.

Dans cette étude plusieurs objectifs sont envisagés :

- ✓ Expérimenter l'effet cytotoxique de l'hyperhomocystéinémie (HHcy) sur le taux de CRP, de glutathion et des transaminases
- ✓ Evaluer l'effet thérapeutique de la vigne *Vitis vinifera* sur les anomalies causées par l'HHcy.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

1 L'homocystéine

1.1 Définition

L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé non protéique qui apparaît comme intermédiaire dans le métabolisme des acides aminés soufrés (De Lonlay *et al.*, 2013). C'est le produit de déméthylation de la méthionine, un acide aminé essentiel apporté par les aliments contenant des protéines. L'Hcy possède une fonction thiol libre (HS) facilement oxydable, ce qui lui permet de se fixer soit sur des protéines, soit sur une autre molécule possédant un thiol libre (cystéine ou Hcy elle-même) (Levasseur, 2009) (Figure 1).

1.2 Métabolisme de l'homocystéine

La méthionine alimentaire est transformée en homocystéine dans un cycle qui lui est propre en passant par la S-adenosylméthionine (SAM); le plus important donneur de groupe méthyl intervenant dans de nombreuses réactions biochimiques (synthèse d'ADN, de protéines, de neurotransmetteurs, d'hormones, de phospholipides...) puis par la S-adenosylhomocystéine (SAH) (Sène et Cacoub, 2013), (Miller, 2013), (De Jaeger, 2010). Une fois formée, l'Hcy est soit reméthylée en méthionine, soit catabolisée en cystathionine selon une suite de réactions enzymatiques complexes. Le catabolisme de l'Hcy se produit principalement dans le foie et dans les reins (Smach *et al.*, 2013) (Figure 2).

1.2.1 Réméthylation

L'homocystéine est reméthylée en méthionine sous l'action de la méthionine synthétase (MS) vitamine B12 dépendante en présence de la 5-méthyltétrahydrofolate (CH₃-THF). Cette dernière provient de la réduction de la 5,10-méthylène-tetrahydrofolate (CH₂-THF) sous l'action de la méthylène-tetrahydrofolate réductase (MTHFR) (Sène et Cacoub, 2013).

Une voie parallèle de reméthylation indépendante des folates et de la cobalamine utilise la conversion de la bétaine en N, N-diméthylglycine sous l'action de la bétaine-homocystéine méthyltransférase (BHMT) (EC 2.1.1.5) (Smach *et al.*, 2013). Cette dernière réaction n'a lieu que dans le foie et le rein alors que la reméthylation via la MS est distribuée de façon ubiquitaire dans tous les tissus (Zittoun, 1998).

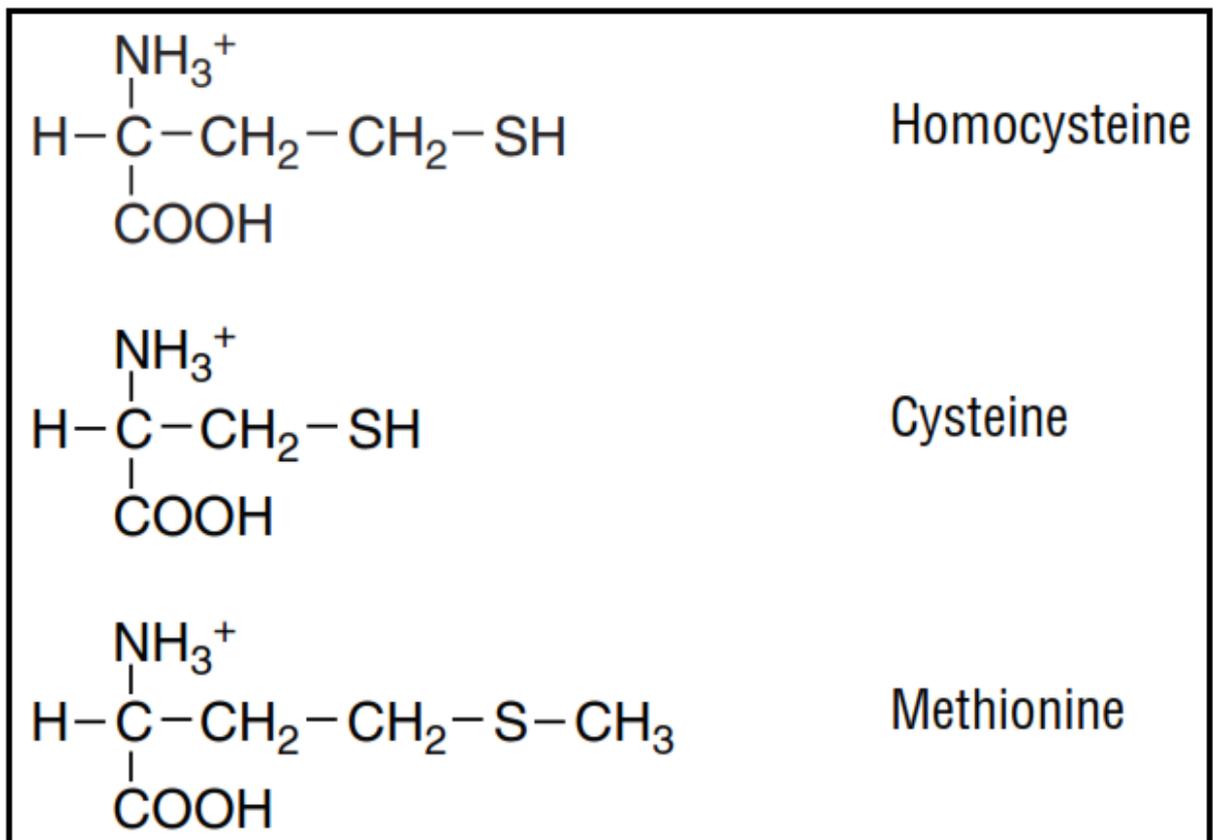


Figure 1: Structures de l'homocystéine et les acides aminés apparentées (Miller, 2013).

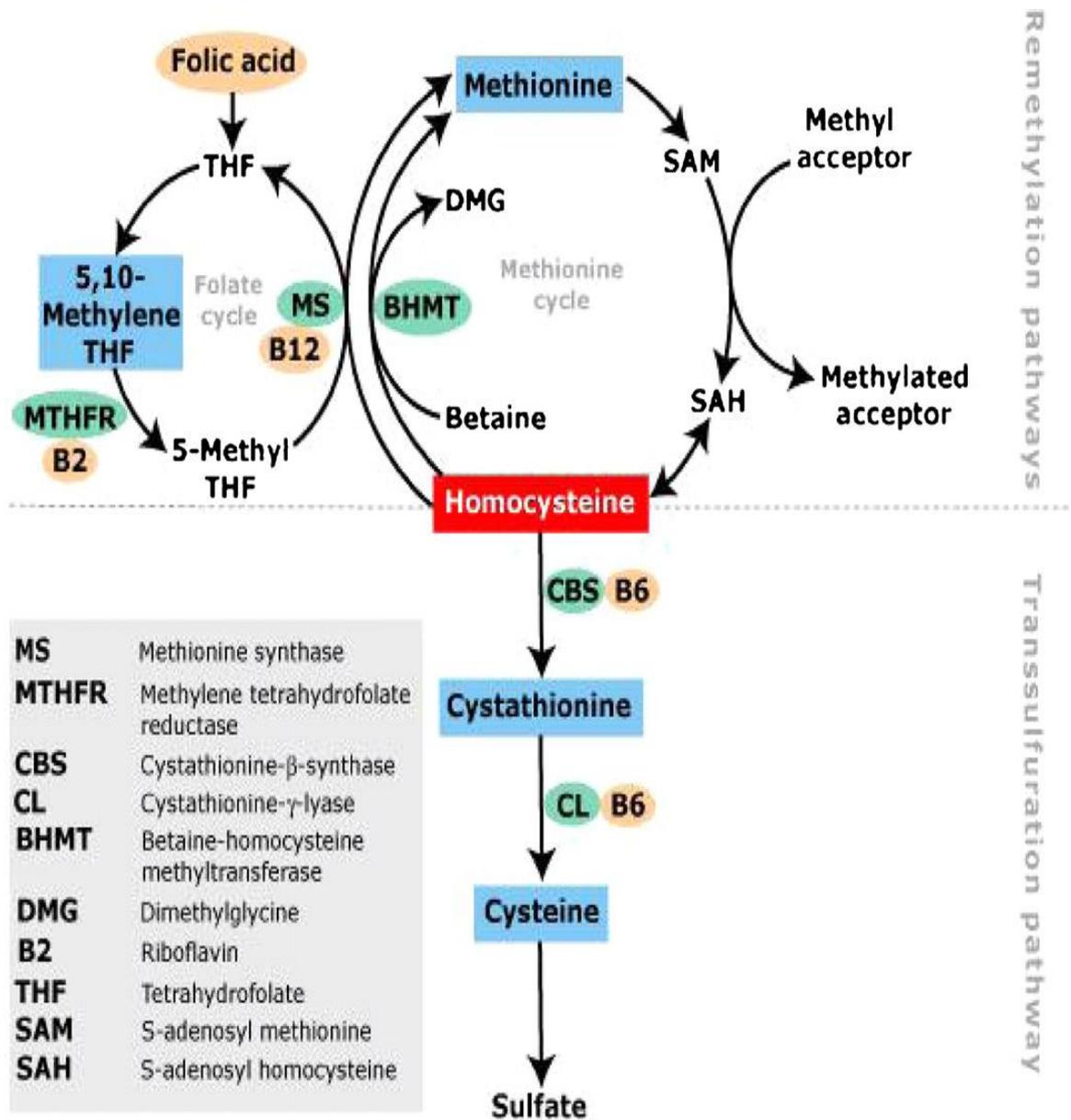


Figure 2 : Métabolisme de l'homocystéine (Mazokopakis et Starakis, 2012).

1.2.2 Transulfuration

L'homocystéine transfère son thiol en deux étapes à une sérine (Ser) qui deviendra alors une cystéine (**Levasseur, 2009**). La première étape de condensation homocystéine-sérine est catalysée par une enzyme à coenzyme B6 (pyridoxine), la cystathionine bêta synthase (EC 4.2.1.22), ou C β S, puis une coupure de la cystathionine formée, catalysée par une enzyme à coenzyme B6, la cystathionase (EC 4.4.1.1), fournit de la cystéine (**Chadefaux-Vekemans, 2003**). La cystéine peut ensuite être métabolisée en sulfate et éliminée dans l'urine (**Aubard et al., 2000**).

1.2.3 Régulation

À l'état physiologique, le métabolisme est autorégulé, permettant de garder des taux constants d'homocystéine, méthionine et SAM. Ainsi un taux de SAM élevé diminue l'activité de la méthionine synthétase et de MTHFR. Inversement, SAM stimule la cystathionine beta-synthétase (**Roblin et al., 2007**), (**Miller, 2013**).

1.3 Homocystéine plasmatique

L'homocystéine circule dans le plasma sous formes réduites et oxydées. Le sulfhydryle ou la forme réduite s'appelle homocystéine et le disulfure ou la forme oxydée connue sous le nom d'homocystine. Les formes du disulfure existent également avec la cystéine et avec des protéines (disulfures mixtes) (**Aguilar et al., 2004**) (**Figure 3**).

1.4 Dosage de l'homocystéine

Sur le plan biologique, c'est l'Hcy plasmatique totale qui est dosée et qui reflète les différentes formes d'homocystéine circulante (**Mairesse et al., 2010**). La détermination de l'homocystéine totale est effectuée dans le plasma. Le sang est prélevé à jeun dans un tube contenant de l'EDTA ou de l'héparine. (**Chadefaux-Vekemans, 2003**). Il est important de centrifuger l'échantillon immédiatement, car le passage de l'homocystéine des globules rouges vers le plasma provoque de fausses hyperhomocystéinémies plasmatiques (**Girs et Giet, 2006**). Les échantillons de plasma sont ensuite conservés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'au dosage (**Chadefaux-Vekemans, 2003**), (**Belkhiria et al., 2007**), (**Loosen et al., 2011**).

Plusieurs types de techniques permettent le dosage de l'Hcy plasmatique : techniques chromatographiques incluant la chromatographie liquide à haute performance (HPLC),

Reduced:		
Homocysteine	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2\text{-SH} \end{array}$	< 2 %
Oxidized:		
Homocystine	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2\text{-S} \\ \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2\text{-S} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	5-10 %
Mixed-disulfides:		
Cysteine-homocysteine	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2\text{-S} \\ \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{-S} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	5-10 %
Protein-bound homocysteine	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2\text{-S} \\ \\ \text{Protein-S} \end{array}$	80-90 %

Figure 3 : Formes circulantes d'homocystéine (Robinson, 2000).

chromatographie échangeuse d'ions, chromatographie en phase inverse de composés fluorescents ou chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse. L'Hcy peut également être dosée par les techniques immunoenzymatiques avec détection en polarisation de fluorescence, Elisa, en chimiluminescence, en électrophorèse capillaire, et enfin en immunonéphélométrie. Quel que soit le type de technique utilisée il est nécessaire que l'Hcy soit libérée de sa fixation aux protéines plasmatiques grâce à différents agents réducteurs (dithiothréitol, 2-mercaptoéthanol, borohydrure de sodium, tri-N-butylphosphine (Chadefaux-Vekemans, 2003), (Lebreton *et al.*, 2009).

1.5 Hyperhomocystéinémie et classification

Les taux plasmatiques d'homocystéine à jeun se situent entre 5 et 15 $\mu\text{mol/l}$. On parle d'hyperhomocystéinémie pour des concentrations plasmatiques d'homocystéine supérieures à 15 μM . L'hyperhomocystéinémie à jeun est classée en trois catégories :

- Entre 15 et 30 μM , on parle d'hyperhomocystéinémie modérée.
- Entre 31 et 100 μM , on parle d'hyperhomocystéinémie intermédiaire.
- Au-delà de 100 μM , on parle d'hyperhomocystéinémie sévère (Boldyrev, 2009).

1.6 Étiologie d'hyperhomocystéinémie

Les hyperhomocystéinémies peuvent être primitive, suite à une anomalie au niveau de l'une des enzymes du métabolisme, ou acquise suite à des facteurs nutritionnels, métaboliques, environnementaux, physiologiques, pathologiques ou encore médicamenteux (Fayol, 2001), (Guilland *et al.*, 2003), (Stalder *et al.*, 2007).

1.6.1 Homocystéinémies héréditaires

L'augmentation importante de l'homocystéine plasmatique peut être due soit à une anomalie dans la voie de la transsulfuration, déficit en CBS à l'origine de l'homocystinurie classique, soit à une anomalie de la reméthylation de la L-homocystéine (déficits enzymatiques en MTHFR) (Chadefaux-Vekemans, 2003).

1.6.1.1 Le déficit en CBS

Le sujet déficitaire homozygote (1/200.000) est atteint d'homocystinurie; il présente une hyperhomocystéinémie sévère (>100 $\mu\text{mol/l}$). C'est le test de surcharge en méthionine qui les révèle avec un taux d'homocystéine se situant entre 20 et 40 $\mu\text{mol/l}$ (Girs et Giet, 2006).

1.6.1.2 Le déficit en MTHFR

Plusieurs mutations du gène de la MTHFR ont été identifiées. Une de ces mutations est le variant thermolabile C677T, mutation autosomique récessive provenant du remplacement d'une cytosine en position 677 par une thymine, et à l'origine de la substitution d'une alanine par une valine (C677→T, ala→val) (Roblin *et al.*, 2007).

1.6.2 Homocystéinémies acquises

Les causes acquises d'hyperhomocystéinémie modérée à intermédiaire (15 à 100 mol/l) correspondent en grande partie aux déficits en cofacteurs vitaminiques des différentes enzymes du métabolisme de l'Hcy (vitamines B9, B6 et B12) et à l'insuffisance rénale. D'autres situations cliniques comme l'hypothyroïdie, le psoriasis, les maladies inflammatoires chroniques du tube digestif, la polyarthrite rhumatoïde et certains médicaments (anticonvulsivants, méthotrexate, L-dopa, ciclosporine A) peuvent être associés à une hyperhomocystéinémie modérée, tout comme l'inactivité physique, le tabagisme, la consommation importante de café, l'âge avancé et la postménopause. Le sexe masculin serait aussi un facteur de risque d'hyperhomocystéinémie (Sène et Cacoub, 2013).

1.7 Mécanismes de la pathogénicité de l'hyperhomocystéinémie

Plusieurs études ont démontré que l'accumulation de l'homocystéine dans le sang altère l'endothélium vasculaire par un processus inflammatoire secondaire à l'oxydation des petites particules de LDL cholestérol, l'induction d'un stress oxydatif local par production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et l'inhibition de la NO synthase (Otmame, 2007).

1.7.1 L'intervention du stress oxydatif

L'homocystéine, bien que disposant d'un groupement thiol réducteur, possède paradoxalement des propriétés pro-oxydantes. L'oxydation de l'homocystéine en homocystine libère du peroxyde d'hydrogène, H₂O₂ (Figure 4). Le groupe thiol de l'Hcy se lierait aussi aux ions ferreux ou cuivreux pour former des (ERO) (Smach, 2013).

Les radicaux libres oxygénés (H₂O₂, peroxinitrite) provenant de l'oxydation de l'homocystéine peuvent entraîner des lésions au sein de l'ADN et altérer le message génétique; ils peuvent aussi modifier la structure primaire, secondaire et tertiaire des protéines entraînant la dépolymérisation de protéines comme le collagène ou l'élastine (Girs et Giet, 2006).

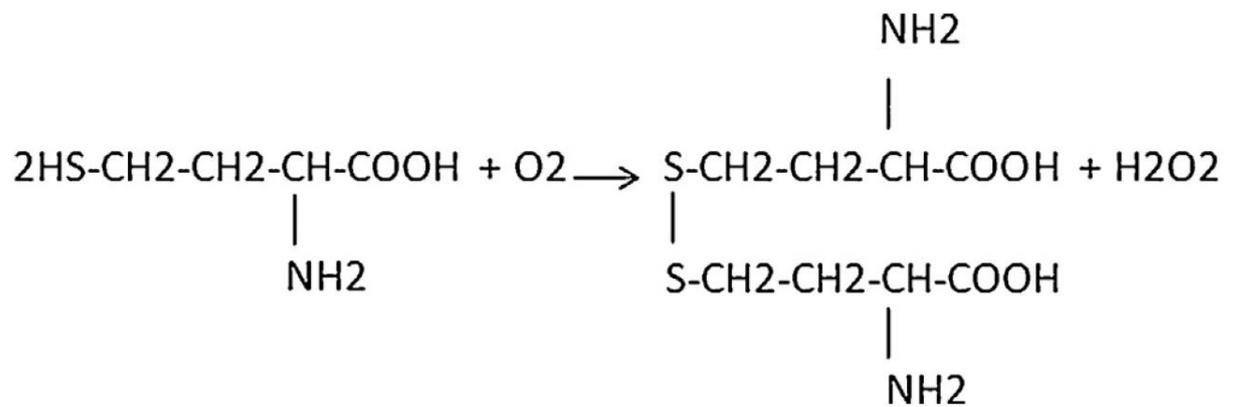


Figure 4 : Production de peroxyde d'hydrogène par oxydation de l'homocystéine
(Smach *et al.*, 2013).

L'homocystéine, par le biais des espèces oxygénées réactives, provoque l'oxydation des lipoprotéines LDL, favorisant leur internalisation par les récepteurs scavengers; situés à la surface des cellules musculaires lisses et des macrophages (**Guilland *et al.*, 2003**), (**Cacoub *et al.*, 2007**).

De plus, l'homocystéine sensibilise les cellules au stress oxydatif en diminuant l'expression de nombreuses enzymes anti-oxydantes dont la glutathion peroxydase (GPx) et l'hème oxygénase-1 (HO-1) (**Koutroubakis *et al.*, 2004**).

1.7.2 Diminution de la production de NO et dysfonction endothéliale

Le monoxyde d'azote joue un rôle primordial dans la régulation de la pression sanguine et de la motilité microvasculaire. Il inhibe l'agrégation plaquettaire et l'adhésion des globules blancs sur les parois des vaisseaux, réduisant ainsi le risque de formation du thrombus (**Smach, 2013**). L'Hcy altère la production et/ou la biodisponibilité des médiateurs vasoactifs endothéliaux tels que la prostacycline, l'endothéline-1 (ET-1) et le monoxyde d'azote (**Drunat *et al.*, 2001**).

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) impliquées dans les phénomènes d'apoptose, la prolifération des cellules musculaires lisses, l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales et l'agrégation plaquettaire (**Smach, 2013**).

2 La protéine C-réactive

2.1 Caractéristiques de la protéine C-réactive

La protéine C réactive (CRP) a été découverte en 1930 par Tillet et Francis, lors de la phase aiguë d'une infection à pneumocoques (**Tillet *et al.*, 1930**). Elle est précipitable par un polysaccharide d'un pneumocoque de type C (calcium dépendant) d'où son nom (**Debaty, 2012**). Cette protéine est produite par le foie, parmi les protéines précoces de l'inflammation, sous l'influence du stress cytokinique, en particulier l'IL-6 (**Roubille *et al.*, 2008**). Sa demi-vie est de 6 à 8 heures. Sa valeur physiologique est inférieure à 10 mg/L. Sa concentration s'élève dès la 6ème heure de l'inflammation. En moyenne, elle devient pathologique 24 heures après le début de l'inflammation et se normalise rapidement après la disparition de la source de l'inflammation. Le retour de la CRP à une valeur physiologique permet de juger de l'efficacité du traitement (**Borghini, 2013**).

2.2 Structure de la protéine C-réactive

La CRP est un membre de la famille des pentraxines caractérisée par une structure homopentamérique (**figure 5**), (**Dupuy *et al.*, 2003**). Son poids moléculaire est de 120 KDa et est constituée de 5 chaînes polypeptidiques identiques non glycosylées formant un anneau symétrique de 5 éléments. Chaque sous unité de la CRP contient 206 acide aminé et est composé de 2 couches de feuillets β et d'une seule hélice de type α (**Thompson *et al.*, 1999**).

La CRP présente deux faces, une face dite de « reconnaissance » constituée de cinq sites de fixation à la phosphocholine. et aux ions Ca^{2+} et une face dite « effectrice » constituée des sites de fixation à C1q et probablement aux récepteurs Fc (**Roux *et al.*, 1983**). Il existe plusieurs isoformes de la CRP : la forme native, pentamérique (CRPn) et l'isoforme monomérique (CRPm) (**Taylor et van den Berg, 2007**).

2.3 Fonctions biologiques de la protéine C-réactive

La CRP possède une affinité dépendante du calcium pour de nombreux ligands. Cette liaison initie l'activation de différents systèmes de défense de l'hôte. Une fois fixée à ses ligands, la CRP est capable d'activer le système du complément par la voie classique après liaison du C1q, comme les complexes immuns. Cette activation conduit à la formation des anaphylatoxines C3a et C4a, et des opsonines C4b et C3b. Les propriétés biologiques principales de la CRP présente au niveau des foyers inflammatoires sont donc :

- de se lier à des structures altérées ou étrangères soit endogènes (membranes lésées, chromatine exposée, débris cellulaires), soit exogènes (bactéries, parasites);
- de déclencher par cette liaison, différents mécanismes de défense de l'hôte : initiation de l'adhérence, activation du système complémentaire, stimulation de l'opsonisation et de l'activité des cellules phagocytaires (**Bienvenu, 2003**).

2.4 Dosage de la protéine C-réactive

La protéine C-réactive peut être mesurée dans le sérum ou le plasma. Elle doit être impérativement mesurée par une technique rapide, car la demi-vie de cette protéine est brève (**Bienvenu, 2003**). L'immunonéphélométrie, et l'immunoturbidimétrie sont les techniques les plus couramment utilisées. Pour doser la CRP, il faut effectuer un prélèvement de sang veineux sur anticoagulant EDTA, de sérum ou de sang capillaire, il est préférable d'être à jeun. L'unité de mesure est le mg/l (**Mauris *et al.*, 2005**).

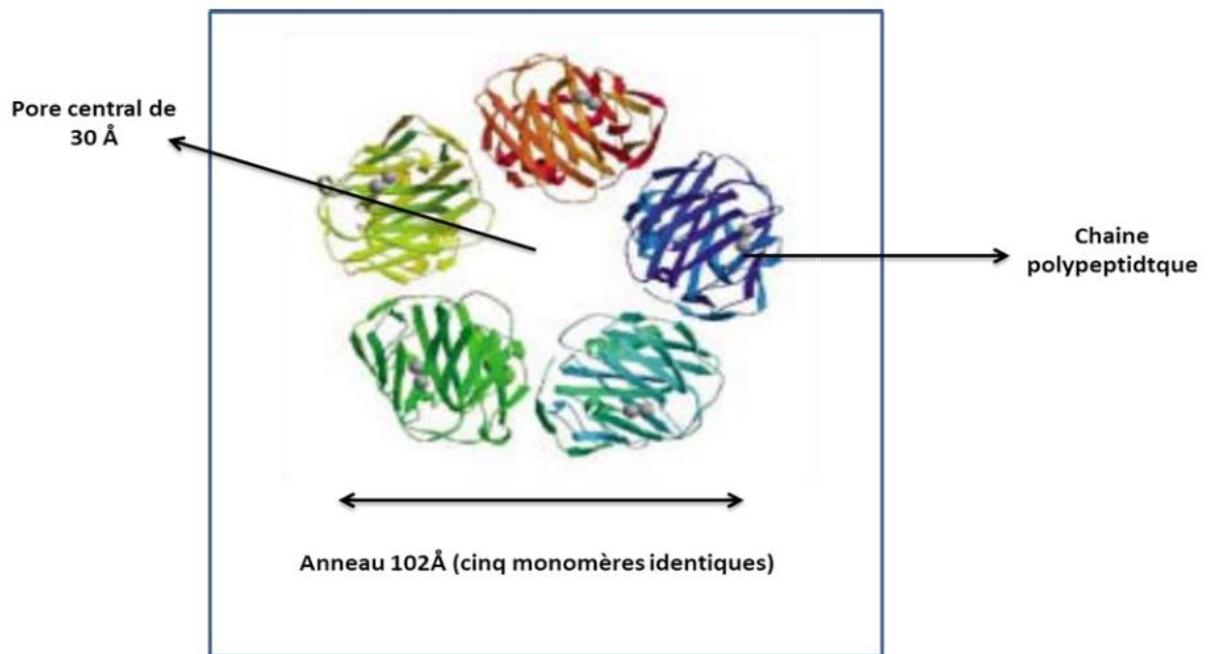


Figure 5 : Structure et morphologie de la protéine (Mark *et al.*, 2003).

3 Physiopathologie de l'athérosclérose

3.1 Définition

Athérosclérose, terme inventé par Marchand, en 1904 (**Tedgui, 2001**), définie par l'organisation mondiale de la santé (OMS) en 1954 comme étant : « une association variable de remaniements de l'intima des artères, consistant en une accumulation focale des lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, un développement de tissu fibreux et de dépôts calcaires ». Cette définition correspond à une description morphologique recouvrant les principaux aspects évolutifs de la lésion artérielle tandis que le terme athérosclérose fait référence aux deux composantes de la lésion : athérome ou cœur lipidique et sclérose ou anneau fibreux (**Paul et Baudin., 2009**).

L'athérosclérose est considérée comme une inflammation chronique de l'intima des artères de gros et de moyen calibre, dont l'origine repose sur une interaction complexe entre des composants plasmatiques athérogènes (certaines lipoprotéines circulantes par exemple) et les cellules de la paroi-artériel [cellules endothéliales, cellules musculaires lisses (CML), monocytes macrophages, lymphocytes T] (**Duriez, 2004**).

3.2 Structure de la paroi artérielle

La paroi artérielle comprend trois tuniques : l'intima, la media et l'adventice :

- **L'intima** est la tunique la plus interne (en regard de la lumière du vaisseau). C'est à son niveau que se développera la plaque d'athérosclérose. Elle est composée d'une couche continue de cellules endothéliales formant une barrière étanche, ainsi que d'une couche sous-jacente de tissu conjonctif appelé espace sous-endothélial.
- **La media** est la tunique moyenne. C'est la plus épaisse. Elle est composée de cellules musculaires lisses (CML); Elle est délimitée des deux autres tuniques par des lames d'élastine: la limitante élastique interne (LEI) et la limitante élastique externe (LEE).
- **L'adventice** ou tunique externe correspond à un tissu conjonctif peu organisé. Elle est irriguée par des vasa-vasorum qui se projettent également dans la partie externe de la media (**Glorian et Limon, 2007**) (**Figure 6**).

3.3 Genèse de la plaque

Le mécanisme moléculaire de l'athérosclérose fait intervenir plusieurs facteurs jouant un rôle prépondérant dans la genèse de la plaque :

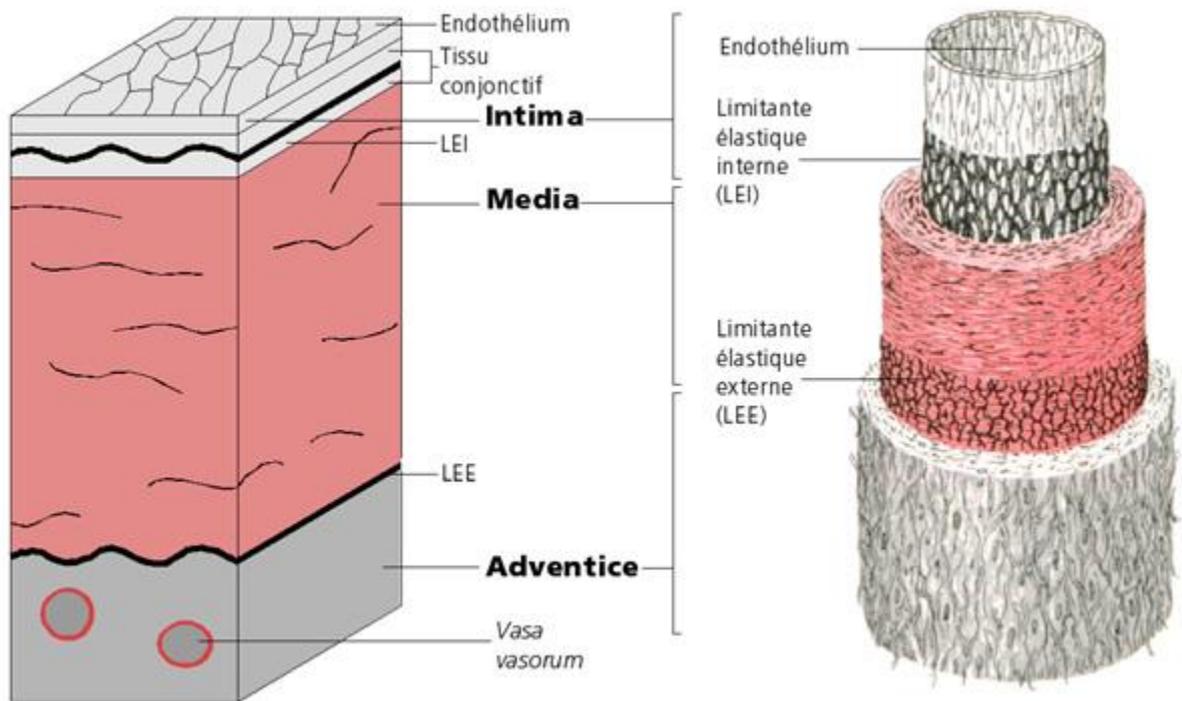


Figure 6 : structure de la paroi artérielle (Léoni, 2001).

Les lipoprotéines essentiellement les LDL oxydées et quatre types cellulaires, les macrophages, les cellules endothéliales, les CML et les lymphocytes. Plusieurs mécanismes s'associent pour aboutir à la formation de la plaque (**Bonnet et Elias, 1997**).

3.3.1 Pénétration et accumulation des lipoprotéines dans l'intima artérielle

Les LDL interviennent dans toutes les premières étapes du processus athéromateux. Elles s'accumulent dans l'espace sous-endothélial, ce qui déclenche le recrutement de monocytes circulants dans l'intima et sa différenciation en macrophages, la transformation des LDL natives en LDL pro-athérogènes (principalement en LDL oxydées) (**Tedgui, 2001**).

3.3.2 Oxydation des LDL

Les LDL peuvent être oxydées dans la paroi artérielle au contact des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses (CML) ou des macrophages qui produisent des radicaux libres de l'oxygène. L'oxydation des LDL débute par la peroxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) portés par les LDL. LDL ainsi modifiée ne peut plus se lier au récepteur cellulaire des LDL natives mais, en revanche, elle pourra se lier aux récepteurs éboueurs ou « scavenger » exprimés à la surface des macrophages, des CML et des cellules endothéliales (**Tsimikas, 2008**).

3.3.3 Recrutement des monocytes circulants et leur transformation en macrophage puis en cellules spumeuses

Lors d'une deuxième phase, les monocytes circulants adhèrent à la surface de l'endothélium, le traversent et se transforment en macrophages puis en cellules spumeuses (**Figure 7**).

Le recrutement des monocytes passe par une étape d'activation endothéliale qui conduit à l'expression de molécules d'adhésion (VCAM-1 et ICAM-1) à sa surface. Après adhésion, les monocytes vont pénétrer dans l'espace sous endothélial et se différencier en macrophages. Certains de ces macrophages pourront alors se transformer en cellules spumeuses (la strie lipidique) en captant les LDL-oxydés via les récepteurs scavengers (**Bonnet, 2005**).

-Réaction d'inflammation

Dès l'infiltration de la paroi artérielle par les macrophages, une réaction inflammatoire chronique se produit et serait à l'origine d'un véritable phénomène d'auto amplification et de croissance de la plaque (**Palinskiw et al ., 1990**).

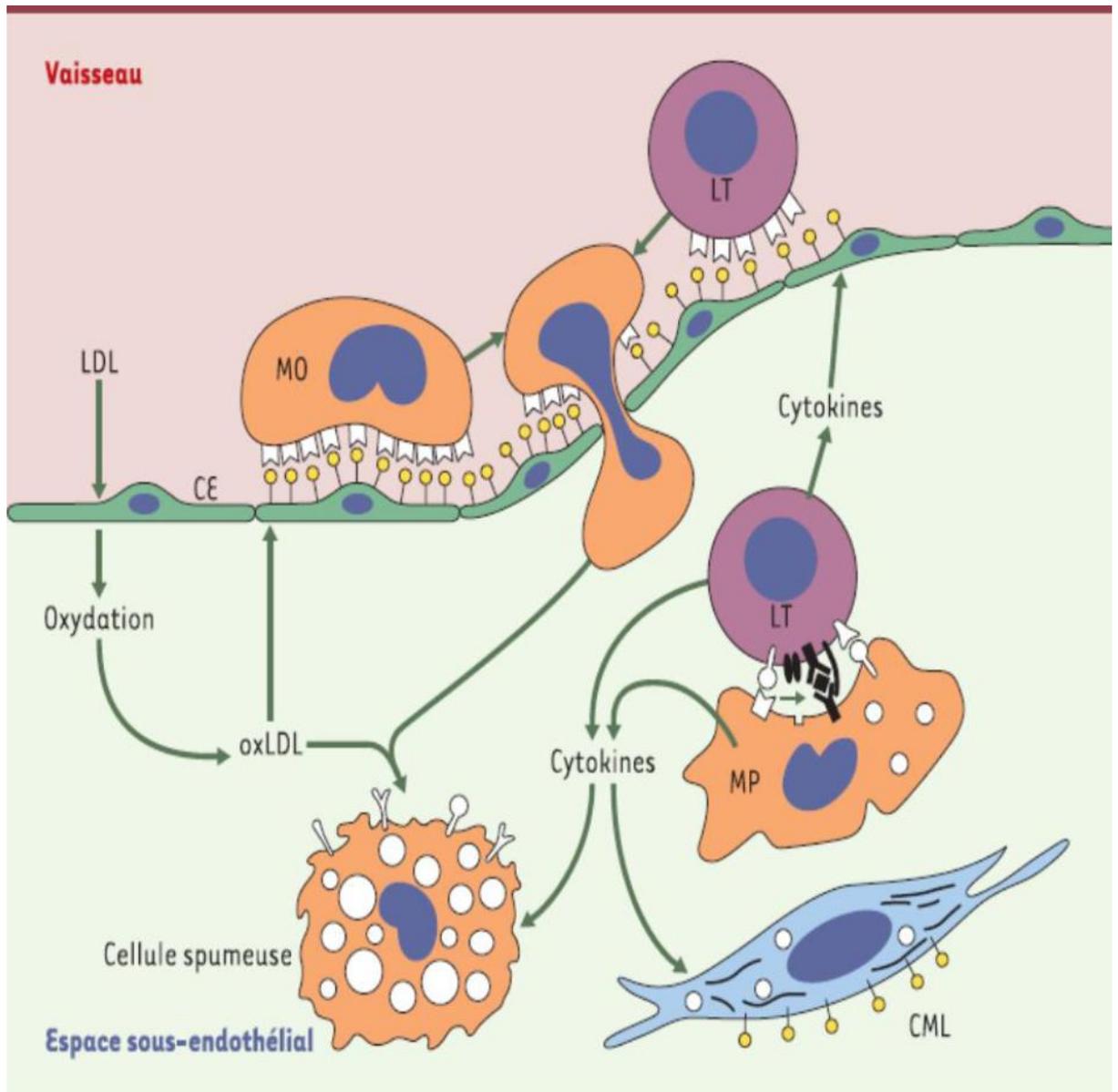


Figure 7 : Formation des cellules spumeuses (Giuseppina, 2004).

Les macrophages produisent de nombreuses cytokines pro inflammatoires (TNF- α , TNF β , IL-1) qui augmentent l'activation endothéliale, et favorisent l'afflux de nouveaux monocytes, ils peuvent aussi induire l'expression par les cellules de la plaque, de MMP (matrix metallo protéinases), des collagénases, élastases et gélatinases qui possèdent toutes une activité de dégradation de la matrice extracellulaire (**Quilici et Gallo, 1999**).

-Migration et prolifération des cellules musculaires lisses (CML)

Les CML provenant du média migrent à travers la limitante élastique interne vers l'intima où elles prolifèrent sous l'action du facteur mitogène PDGF sécrété par les plaquettes et l'endothélium. Au cours de ce passage, les CML acquièrent le phénotype sécrétoire et une forte activité synthétique de protéines conjonctives (collagène, élastine et protéoglycannes) à forte affinité pour les LDL oxydées (**Steinberg et Lewis, 1997**).

3.3.4 Formation du centre athéromateux de la chape fibreuse

A ce stade, les LDL oxydées accumulées au sein des cellules résidant dans le sous endothélium sont cytotoxiques ; elles aboutissent à la mort des cellules spumeuses et se regroupent pour former un amas acellulaire appelé : centre athéromateux.

Le centre lipidique constitué de lipides libérés après dégénérescence des cellules spumeuses est entouré par la chape fibromusculaire (CML, protéines conjonctives) : c'est la plaque athéroscléreuse adulte (**Figure 8**). L'intégrité de cette plaque d'athérome est un élément déterminant de sa stabilité (**Cohen, 1997**).

3.3.5 Remodelage vasculaire

La plaque se développe longtemps sans altérer le calibre vasculaire. Ce processus d'adaptation des vaisseaux athéroscléreux a été dénommé remodelage vasculaire ou élargissement compensateur. Toutefois, lorsque la masse intimale excède 40 % de la surface plaque : son développement se fait alors aux dépens de la lumière artérielle et conduit à son obstruction progressive (**Tedgui et Chapman, 2004**).

3.4 Rôle de la CRP dans la pathogenèse de l'athérosclérose :

La protéine CRP est un marqueur important du risque cardiovasculaire, dont le mécanisme angiotoxique n'est pas bien établi. Toutefois la CRP est caractérisée par ses effets pro-athérogènes : action sur les cellules de l'endothélium vasculaire, activation de l'adhésion et

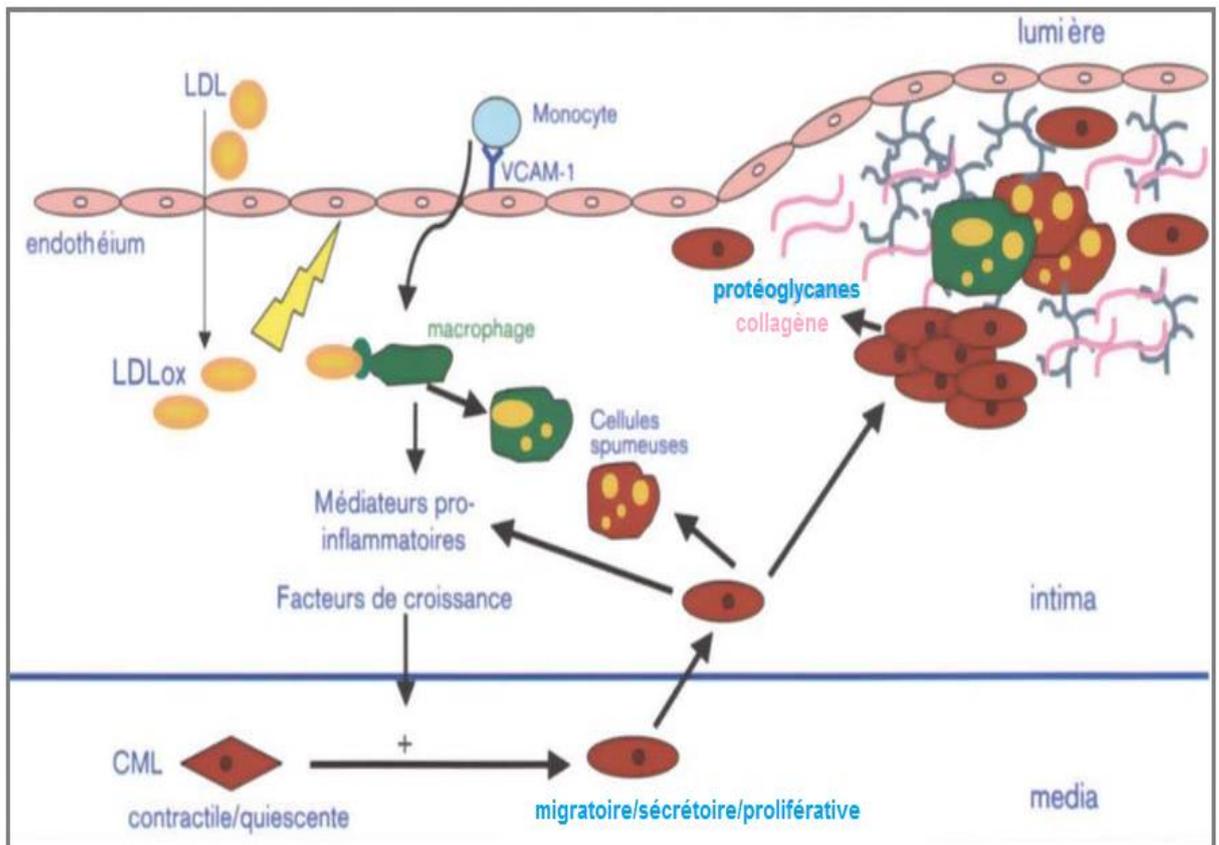


Figure 8 : Genèse de la plaque d'athérosclérose (Glorian et Limon, 2007).

promotion de l'agrégation des LDL qui couplées aux propriétés pro-inflammatoires sur les monocytes et les macrophages induisent un effet délétère sur la paroi vasculaire et participent directement à l'athérogenèse (**Sandhu et al., 2005**).

La CRP se lie spécifiquement aux LDL oxydées (**Zhang et al., 1999**), (**Chang et al., 2002**) et particulièrement aux LDL dégradées à l'intérieur des plaques athéromateuse (**Bhakdis et al., 1999**). En plus l'addition de la CRP aux LDL dans les cellules en culture a montré que cela stimule la formation des cellules spumeuses, qui constituent une caractéristique typique des plaques athérosclérotiques (**Torzewski et al., 1998**).

La CRP favorise et accélère le développement de l'athérosclérose en activant la voie classique du complément et en opsonisant les ligands, en vue de leur phagocytose (**Legrand, 2005**). De même la CRP favorise l'expression de molécules d'adhésion et de protéines attractives de monocytes (MCP1, ET1) qui permettent l'adhérence des monocytes et des lymphocytes à la surface de l'endothélium et ainsi favorisent leur migration à l'intérieur de l'artère et par conséquent stimulent le déclenchement et la progression de l'athérosclérose et de l'instabilité de la plaque (**Mark et al., 2003**), (**Zhang, 2003**).

De plus la CRP favorise l'activation des macrophages en induisant la production de NO et la sécrétion de TNF et d'IL1. La CRP se lie spécifiquement aux résidus phosphocholine présents dans les PAF (platelet activating factor) et les polynucléaires, et atténue la voie de la coagulation (effet pro-coagulant) et l'activation des cellules inflammatoires (**Cermak, 1993**).

4 Plante médicinale *Vitis vinifera*

4.1 Généralités sur la phytothérapie et les plantes médicinales

La Phytothérapie utilise des plantes médicinales dans leur totalité ou certaines parties de la plante dans des buts thérapeutiques (**Falch et al., 2013**).

L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes. Ces dernières contiennent des substances chimiques actives, qui peuvent être des phénols (anti-inflammatoires et antiseptiques), des flavonoïdes (antioxydants, antiinflammatoires et antivirales), des tanins (contre les infections, antihémorragique), des alcaloïdes (activité sédative, effets sur les troubles nerveux), des vitamines (comme B1, B2, C et E), des minéraux et beaucoup d'autres (**Iserin, 2001**).

4.2 Espèce *Vitis vinifera*

4.2.1 Classification botanique

Le genre *Vitis*, membre de la famille des Vitaceae, comprend plusieurs dizaines d'espèces, la plupart originaires d'Amérique du Nord ou d'Asie centrale et orientale (**Figure 9**). Toutes les vignes sont des plantes pérennes, ligneuses et grimpantes. Dans ce groupe, l'espèce *Vitis vinifera* la seule espèce indigène en Europe et en Asie occidentale (**Bouby et Marinval, 2001**).

4.2.2 Description botanique

Arbuste sarmenteux aux feuilles palmatilobées, à fleurs verdâtres et à grappes de couleur verte ou noire (**Figure 10**). La vigne est cultivée dans toutes les régions tempérées, tant pour son fruit que pour la fabrication du vin, les feuilles récolte en été et les fruits, en automne (**Iserin, 2001**).

4.2.3 Constituants chimiques principaux des feuilles de *Vitis vinifera*

Les constituants chimiques principaux des feuilles de *Vitis vinifera* L. sont consignés dans le **Tableau 1** (**Ghedira, 2012**).

4.2.4 Pharmacologie

- Les anthocyanosides ont une action dite vitaminique P et veinotonique.
- Les procyanidols inhibent l'élastase, la collagénase. Ils stabilisent le collagène des parois des vaisseaux.
- Les feuilles de *Vitis vinifera* sont antioxydantes et antidiabétiques (action des procyanidols)
- Les flavonoïdes de type flavonol (quercétine-3-O- β -Dglucuronide, isoquercitrine [quercétine-3-O- β -glucoside], et kaempférol-3-glucoside) sont anti-inflammatoires et anti-œdémateux *in vitro* et *in vivo*.
- L'extrait hydroalcoolique est *bronchodilatateur*. Il a aussi des propriétés antiallergiques dans l'allergie causée par le pollen.
- L'extrait méthanolique issu des feuilles de vigne exerce des activités anti-inflammatoire et antipyrétique chez le rat (**Ghedira, 2012**).

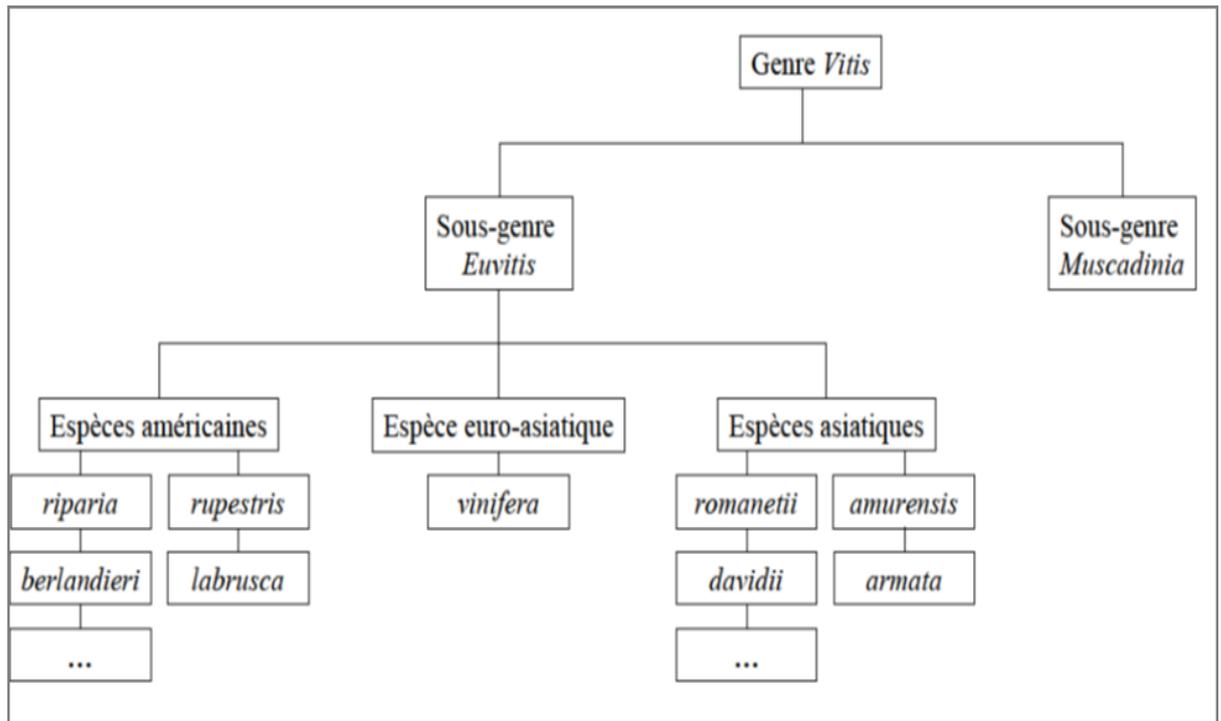


Figure 9 : Classification systématique de l'espèce *Vitis vinifera* L. parmi la famille des Vitaceae (Planchon, 1887).



Figure 10 : Photo de *Vitis vinifera*.

Tableau 1 : Constituants chimiques principaux des feuilles de *Vitis vinifera* L.

Familles de constituants chimiques	Constituants chimiques
Anthocyanosides	O-glucosides du cyanidol et du péonidol
Acides phénols	Acide monocaféyl-tartrique, acidesphénylpropanoïques
Tanins	Tanins hydrolysables (esters du glucose et des acides gallique et déhydrohexahydroxydiphénique)
Hétérosides de flavonols	Glucosides de flavonols : quercétine-3-O- β -D-glucuronide, isoquercitrine (quercétine-3-O β -glucoside), et kaempférol-3glucoside

PARTIE
PRATIQUE

Matériels et méthodes

1. Matériels

1.1. Extrait de plante

Les feuilles ont été lavées et séchées à l'ombre à une température comprise entre 26 et 30°C puis finement broyées.

1.2. Animaux

L'étude a été effectuée sur un groupe de souris mâles (22 souris), du genre (*Mus*), espèce (*Mus Musculus*), ayant un poids entre 17,7 g et 27,2 g. provenant de l'Institut de pharmacie de Constantine. Durant la période de cette expérimentation, les souris sont logées dans des cages en plastique avec libre accès à l'eau et à la nourriture (la composition de l'aliment est montrée dans le **Tableau 3 Annexe**), la litière est renouvelée chaque jour. Ils sont acclimatés aux conditions de l'animalerie de l'Université Constantine 1 pendant toute la période du traitement.

1.3. Produits chimiques

Les produits utilisés au cours de notre étude sont : L-Méthionine, Chloroforme, Formol 10%, Ethanol de différentes concentrations (50%,70%,96%), Tris, EDTA, DTNB, Acide sulfosalicylique, BSA, Bleu de Coomassie, Acide orthophosphorique, Eau distillée, NaCl, HCl, NaOH.

1.4. Equipements

Nous avons utilisé les équipements suivants : Balance, Balance de précision, Agitateur, Etuve, pH-mètre, Trousse de dissection, Centrifugeuse, Homogénéisateur, Spectrophotomètre, Centrifugeuse à froid, Tubes héparinés, Tubes sec, Fpendorf et Micropipettes.

2. Méthodes

2.1. Traitement des souris

- L'étude est réalisée sur un groupe de 22 souris réparties sur 4 lots. Le premier groupe recevait un régime alimentaire normal et le deuxième traitait par une dose élevée de

méthionine, le troisième groupe est traité par une dose élevée de méthionine et supplémenté par l'extrait de plante alors que, le quatrième groupe est seulement traité par l'extrait de plante (**Tableau 2**).

- Le poids corporel des souris est mesuré quotidiennement.
- Les doses de L-méthionine et de *Vitis vinifera* sont calculées selon le poids moyen des souris de chaque lot (1 g/Kg/J pour la L-méthionine et 500mg/Kg/J pour *Vitis vinifera*).
- Chaque dose de méthionine ou d'extrait de plante est incorporée dans une boule de farine (0,1g) puis administrée à la souris par voie orale.
- Après 12 jours de traitement, le sang et le foie sont prélevés, (le sang pour le dosage de la CRP, les transaminases (ASAT, ALAT) et le foie pour le dosage des protéines totale et de glutathion réduit).

2.2. Prélèvement sanguin

Le prélèvement sanguin a été effectué à jeun au niveau du sinus caverneux des souris, le sang est collecté dans des tubes hépariné et immédiatement centrifugé, le plasma obtenu a été conservé dans des tubes Ependorff à -20°C jusqu'au moment de l'analyse.

2.3. La dissection

Elle comporte les étapes suivantes:

- Incision cutanée
 - Incision musculaire :
- Ouverture de la cage abdominale.
- Prélèvement de foie.

Le foie prélevé est rincé par le NaCl et bien débarrassé de tout tissu adjacent, et ensuite congelé pour l'utilisation ultérieure.

2.4. Méthode de dosage des différents paramètres biologiques

L'étude comporte le dosage des différents paramètres biologiques faisant l'objet de notre étude : CRP, glutathion réduit et les transaminases (ASAT, ALAT).

Tableau 2 : Traitement des souris

Groupe expérimental	Traitement	Nombre d'animaux	La durée de l'expérience (J)	Dose quotidienne
F	Farine	5	12	0,1g/souris
M	L-méthionine	7	12	1g/kg/J
MP	L-méthionine + Plante	5 -	12	1g/Kg/+500mg/Kg
P	Plante	5	12	500mg/Kg

(-) : Une souris est morte.

2.4.1. Dosage de la CRP

Dans notre étude le dosage de la CRP s'est effectué selon le test immunoturbidimétrique sur l'auto analyseur Cobas Intégra 400. Ce test mesure de très faibles concentrations de la CRP dans des échantillons de sérum ou de plasma.

2.4.2. Dosage des paramètres du stress oxydant

2.4.2.1. Préparation de l'homogénat

On prend 0,5 g de foie des différents groupes étudiés. Après broyage et homogénéisation des tissus dans 4 ml de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM. pH 7,4), on a procédé à une centrifugation de la suspension cellulaire (9000 tours/min, 4 °C, 15 min), puis le surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes eppendorfs puis conservés à -20 °C en attendant d'effectuer le dosage du glutathion réduit.

2.4.2.2. Dosage du glutathion de foie

Le dosage du glutathion est réalisé selon la méthode de Weckbeker et cory (1988), le principe de ce dosage repose 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. Pour cela on réalise une déprotéinisation afin de garder uniquement les groupements (-SH) spécifique du glutathion.

La procédure expérimentale du dosage du glutathion est la suivante :

- ✓ Prélever 0,8 ml de l'homogénat.
- ✓ 0,2 ml de la solution d'acide sulfo-salicylique (0,25%).
- ✓ Agiter et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace.
- ✓ Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 min.
- ✓ Prélever 0,5 ml du surnageant.
- ✓ Ajouter 1 ml du tampon Tris-EDTA, pH 9,6.
- ✓ Mélanger et ajouter 0,025 ml de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0,01 M.

Laissez pendant 5 min à une température ambiante et lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc réactif. La concentration du glutathion est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GSH (nmol GSH /mg protéine)} = (\text{DO} \times 1 \times 1,525) / (13100 \times 0,8 \times 0,5 \times \text{mg protein})$$

DO : Densité optique

- 1: Volume total des solutions dans la déprotéinisation (0.8 ml homogénat + 0.2 ml de l'acide sulfo-salicylique).
- 1,525 : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0,5 ml surnageant + 1 ml Tris + 0,025 ml DTNB)
- 13100 : coefficient d'absorbance du groupement -SH à 412 nm.
- 0,8 : Volume de l'homogénat.
- 0,5 : Volume du surnageant.

2.4.2.3. Dosage des protéines

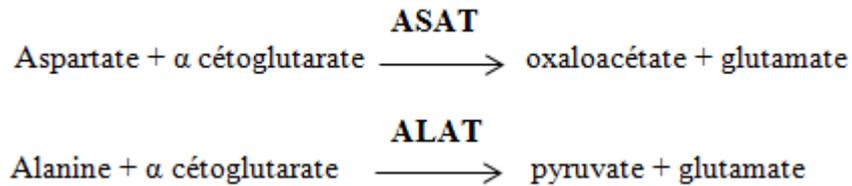
La concentration de protéine est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu de coomassie comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines (-NH₂) des protéines pour former un complexe de couleur bleu. (L'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines). Pour cela nous avons procédé aux étapes suivantes :

- ✓ Prélever 0,1 ml de l'homogénat.
- ✓ Ajouter 5 ml du réactif de Bradford.
- ✓ Agiter et laisser reposer 5 minutes.
- ✓ Lire à 595 nm les densités optiques contre le blanc.

La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (1 mg/ml) préalablement réalisée dans les mêmes conditions (**Figure 17 Annexe**).

2.4.3. Dosage des transaminases

L'alanine aminotransférase (ALAT), connue sous le nom de transaminase glutamiqueoxaloacétique (TGO) et l'aspartate aminotransférase (ASAT), connue aussi sous le nom de transaminase glutamique-pyruvique (TGP) sont des transaminases catalysant le transfert de la fonction amine entre les acides aminés et les acides α -cétoniques selon les réactions suivantes :



Le pyruvate ou l'oxaloacétate formés réagissent avec le 2,4 DNPH pour former leur dérivé 2,4-Dinitrophénylhydrazone (DNPH), qui donne en milieu alcalin une coloration lisible à 505 nm proportionnelle à l'activité ASAT ou ALAT.

Le dosage des transaminases est réalisé par une méthode colorimétrique enzymatique sur l'auto analyseur Cobas Intégra 400 selon la méthode de **Reitman et Frankel (1957)**.

2.5. Analyse statistique

Les analyses biochimiques (la CRP, le glutathion réduit et les transaminases ALAT et ASAT) sont présentés sous forme de moyennes accompagnées de l'écart-type (moyenne \pm écart-type). La comparaison entre les groupes a été réalisée par le test One-Way ANOVA, lorsqu'une différence significative est observée, le test de comparaison multiple de Tukey est effectué. La comparaison ou la corrélation est considérée, selon la probabilité (p), comme :

- Non significative si $p > 0,05$.
- Significative (*) si $p < 0,05$.
- Hautement significative (**) si $p < 0,01$.
- Très hautement significative (***) si $p < 0,001$.

Résultats

1. Résultats du dosage de CRP

Les taux du CRP des groupes (F) et (M) sont respectivement ($0,16 \pm 0,048$ mg/l) et ($0,22 \pm 0,043$ mg/l) et du groupes (MP) et (P) sont respectivement ($0,18 \pm 0,073$ mg/l) et ($0,19 \pm 0,07$ mg/l) (**Figure 11**).

La comparaison des données montre qu'il y'a une différence entre les groupes et que le groupe M possède une valeur élevée par rapport aux autres groupes (PM, P et F), $p > 0,05$.

2. Résultats du dosage de GSH

Les taux du glutathion des groupes (F) et (M) sont respectivement ($30,71 \pm 2,67$ nmol/mg protéine) et ($26,14 \pm 4,54$ nmole/mg protéine) et du groupes (MP) et (P) sont respectivement ($26,095 \pm 0,63$ nmole/mg protéine) et ($25,706 \pm 2,45$ nmol/mg protéine) (**Figure 12**).

La comparaison des données montre que le taux de GSH du groupe (M) a une valeur basse par rapport au groupe (F) et que le taux de GSH du groupe (P) a une valeur basse par rapport au groupe (MP), $p > 0,05$

3. Résultats du dosage de l'ASAT

Les taux de l'ASAT des groupes (F) et (M) sont respectivement ($297,24 \pm 59,94$ UI/L) et ($224,5 \pm 128,24$ UI/L) et du groupes (MP) et (P) sont respectivement ($449,07 \pm 292,64$ UI/L) et ($244,84 \pm 156,94$ UI/L) (**Figure 13**).

La comparaison des données montre que le taux de l'ASAT du groupe (M) a une valeur basse par rapport au groupe (F) et que le taux de l'ASAT du groupe (P) a une valeur basse par rapport au groupe (MP), ces résultats sont significatifs $p < 0,05$.

Le test Tukey, révèle une différence hautement significative ($p = 0,003$) entre les groupes (M) et (MP) et une différence significative entre les groupes (F) et (MP) ($p = 0,02$) et les groupes (MP) et (P) ($p = 0,014$).

4. Résultats du dosage de l'ALAT

Les taux de de l'ALAT des groupes (F) et (M) sont respectivement ($61,44 \pm 15,31$ UI/L) et ($63,65 \pm 28,8$ UI/L) et du groupes (MP) et (P) sont respectivement ($85,8 \pm 28,64$ UI/L) et ($48,62 \pm 18,54$ UI/L) (**Figure 14**).

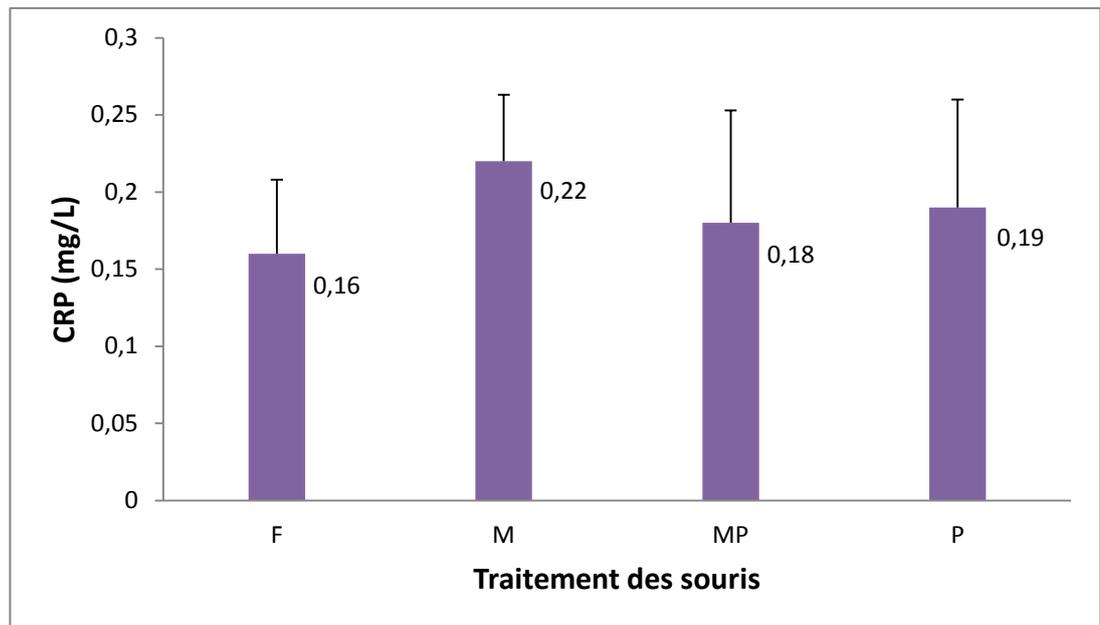


Figure 11 : L'interaction du L-méthionine et de *Vitis vinifera* sur la protéine C-réactive chez les souris.

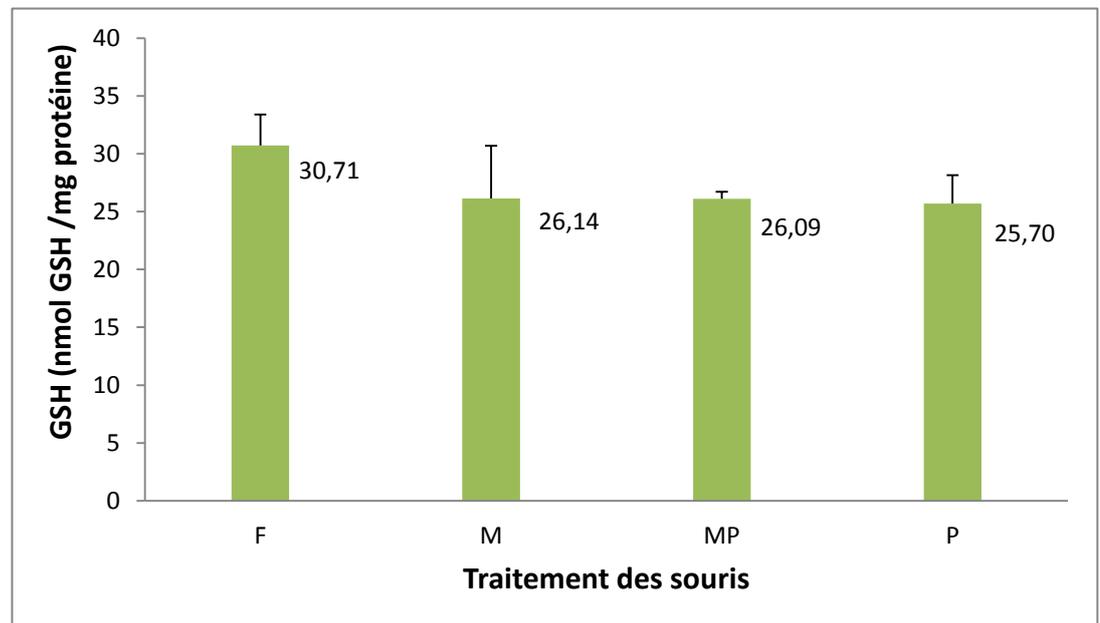


Figure 12 : L'interaction du L-méthionine et de *Vitis vinifera* sur le taux du glutathion réduit chez les souris.

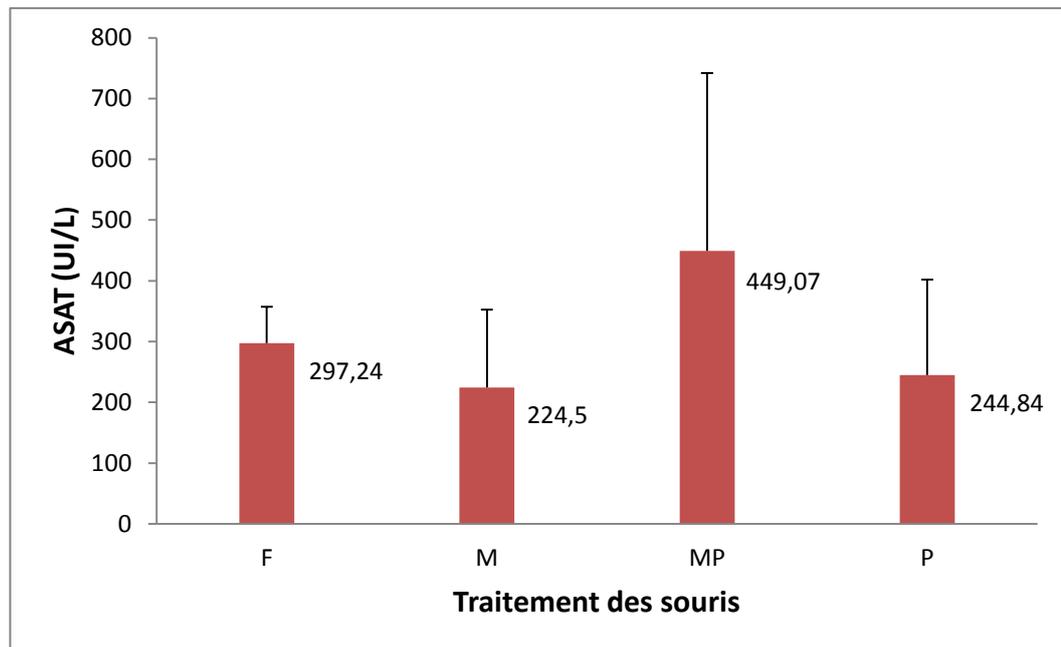


Figure 13 : L'interaction du L-méthionine et de *Vitis vinifera* sur ASAT chez les souris.

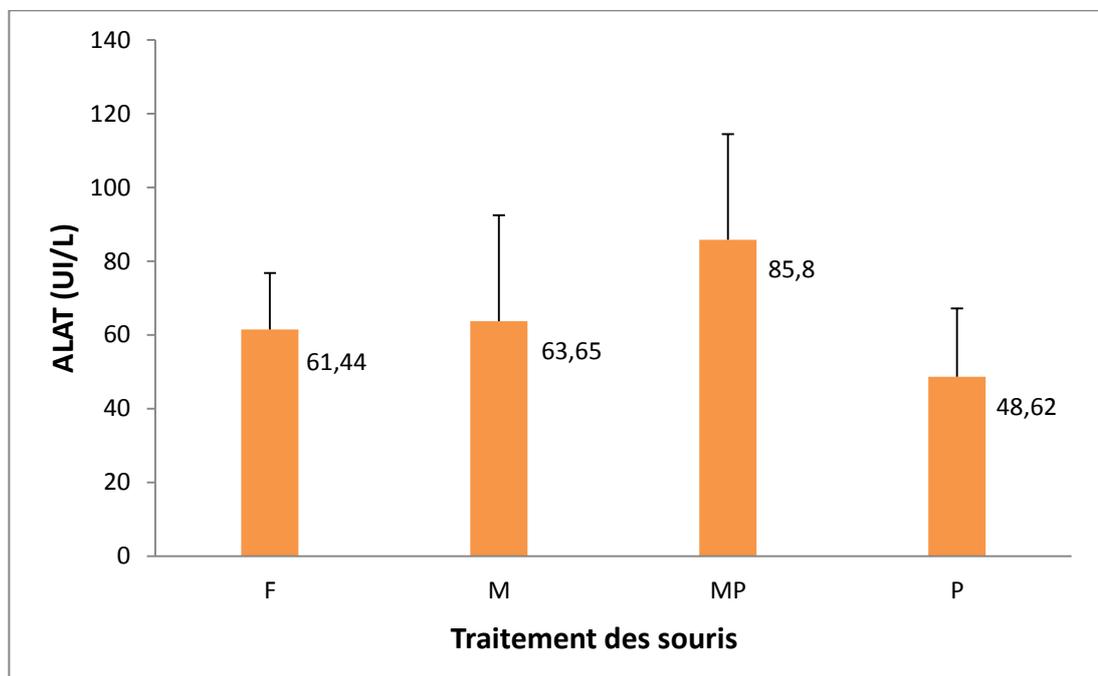


Figure 14 : L'interaction du L-méthionine et de *Vitis vinifera* sur ALAT chez les souris.

La comparaison des données montre que le taux de l'ALAT du groupe (M) a une valeur élevée par rapport au groupe (F) et que le taux de l'ALAT du groupe (MP) a une valeur plus élevée par rapport aux groupe (P), ces résultats sont non significatifs $p > 0,05$.

5. Résultats de corrélation entre les paramètres

Dans cette étude, nous sommes intéressés seulement aux corrélations significatives ($p < 0,05$). La seule corrélation significative qu'on a trouvé est celle de l'ASAT avec la CRP ($r = 0,953$ et $p = 0,047$) (**Figure 15**).

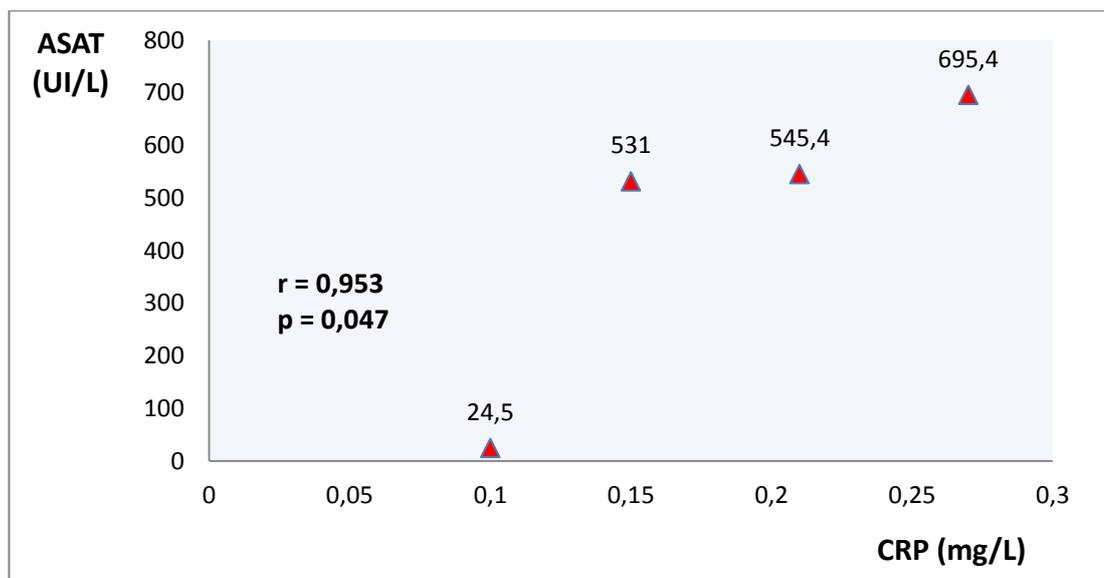


Figure 15 : Corrélation entre l'ASAT et la CRP chez le groupe (PM).

Discussion

L'objectif principal de notre travail est de clarifier les effets d'une dose élevée de L-méthionine sur le marqueur biochimiques CRP chez les souris et d'explorer l'effet thérapeutique de la plante *vitis vinifera* sur les anomalies causées par la dose élevée de L-méthionine.

Comme il a été cité dans la partie bibliographique, l'Hcy est produite à partir de la méthionine. Nous avons respecté cette voie métabolique, et pour cette raison, nous avons administré aux animaux une dose élevée (1g/kg) de L-méthionine pendant 12 jours, dans le but d'induire une HHcy.

Une hyperhomocystéinémie modérée entraîne une toxicité cellulaire. Les très nombreux travaux expérimentaux et cliniques ont éprouvé qu'il existe une relation entre l'hyperhomocystéinémie modérée et la maladie cardiovasculaire. L'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque indépendant pour la survenue d'accidents cardiovasculaires d'origine ischémique (**Lelong *et al.*, 2012, Zerizer et Naimi, 2004**).

Dans cette étude nous avons dosé : la hs-CRP comme marqueur dans l'inflammation cardiaque, le glutathion comme un antioxydant et les transaminases (ASAT et ALAT).

Nous avons observé une augmentation de la synthèse de la CRP dans le groupe traité par la L-méthionine. Cette augmentation a été corrigée par l'extrait de la plante

Sharma *et al* (2007) et Benmebarek *et al.*, (2013) suggérèrent que l'augmentation de la CRP est associée à l'augmentation de l'Hcy au niveau du plasma.

De nombreuses équipes ont travaillé ces dernières années sur l'intérêt de la CRP dans les maladies cardiovasculaires, l'inflammation étant un mécanisme clé du processus pathologique de l'athérosclérose. La relation entre le taux de CRP chez le patient et le risque cardiovasculaire potentiel a été démontrée dans plusieurs études aux États-Unis et en Europe (**Onraed *et al.*, 2005**).

Un groupe international de chercheurs a publié récemment dans le *British Medical Journal* une méta-analyse sur données individuelles utilisant le concept de randomisation mendélienne pour avancer quant au caractère causal de la relation CRP/risque cardiovasculaire augmenté. Ils ont conclu que la CRP n'est probablement pas associée au risque cardiovasculaire de façon causale mais ne serait qu'un marqueur de risque (on sait bien

que le niveau de CRP augmente en association avec les autres facteurs de risque cardiovasculaire (**Lelong et al., 2012**).

L'augmentation de la CRP par la dose élevée de la L-méthionine a été corrigée par la plante *vitis vinifera*. Cette résultat accords avec les travaux de Benmebark *et al.*,2013 qui rapportent une diminution de CRP chez les souris administrés par 200 mg/kg de L-méthionine pendant 21 jours et traité par *Stachysmialheside* Noé.

Les résultats de dosage de glutathion réduit montrent une diminution dans le groupe M par rapport aux autres groupes (F, P, MP).

L'oxydation de l'homocystéine libère du peroxyde d'hydrogène, H₂O₂ et provoque un stress oxydant (**Guilland et al., 2003**).

Plusieurs études indiquent que dans différentes conditions physiopathologiques associées à un stress oxydant, les stocks de glutathion sont réduits du fait d'une consommation accrue de glutathion (**Darmaun et al., 2005**).

Les concentrations plasmatiques et extra-hépatiques en glutathion sont peu affectées à court et moyen terme, ce qui suggère que l'export hépatique de glutathion est augmenté pour maintenir le statut en glutathion extra-hépatique (**Morand et al., 1997**).

Chez les souris traitées par la L-méthionine et supplémentée par *vitis vinifera*, la concentration de GSH est diminuée. Ce résultat montre que la dose 500mg /kg de l'extrait de la plante administrée dans cette expérience ne soit pas suffisante pour éliminer les effets secondaires de l'hyperhomocystéinémie.

Les transaminases sont présentes dans tous les tissus, mais leur présence dans le sang à une concentration élevée est souvent liée à des maladies cardiovasculaires et hépatiques.

Dans ce cas, le niveau sérique de l'ALAT est augmenté dans le groupe traité par 1g/kg de L-méthionine par contre le niveau de l'ASAT est diminué. Ce résultat est n'en pas accord avec les travaux de Boudebouz S. (2013).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Le cible de la prévention est de dépister et de prendre en charge les facteurs de risques cardiovasculaire et de mettre en place des mesures thérapeutiques afin d'éviter, limiter ou retarder le développement d'un risque cardiovasculaire. De nombreuses études conduites ces dernières années notent qu'un nouveau facteur pourrait se révéler un meilleur indicateur du risque cardiaque, il s'agit de la protéine C-réactive.

Le dosage de glutathion, les transaminases (ASAT et ALAT) semble avoir un intérêt dans le dépistage des complications vasculaires chez les personnes qui ont un risque.

Les feuilles de la vigne *vitis vinifera* joue un rôle prépondérant dans la prévention contre ces maladies à des doses importantes. Donc l'utilisation de cette plante médicinale, semble avoir un intérêt dans la prévention des complications vasculaires.

Enfin, dans notre modeste travail nous avons montré que les feuilles de la vigne *vitis vinifera* a des effets anti-inflammatoires et on peut la considérée comme une source naturelle de prévention et de médication pour aboutir un traitement anti-inflammatoire des maladies cardiovasculaire.

À la lumière de ces résultats, on voit comme perspectives d'avenir :

- Identification et purification des molécules bioactives à partir des feuilles de la vigne *vitis vinifera*.
- Traiter les souris et les rats avec les molécules bioactives pendant une période de 1 mois et détecter la protéine C- réactive.
- Déterminer le taux de l'antioxydant comme le glutathion réduit et oxydé, et les enzymes antioxydants comme catalase, superoxide-dismutase et le glutathion peroxidase.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. **Aguilar B., Rojas J. C. & Collados M. T. (2004).** Metabolism of homocysteine and its relationship with cardiovascular disease. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 18(2) : 75-87.
2. **Aubard Y., Darodes N., Cantaloube M., Aubard V., Diallo D. & Teissier M. P. (2000).** Hyperhomocystéinémie et grossesse : une association dangereuse. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, 29 : 363-372.
3. **Belkhiria M. N., Ducros V., Harzallah K., Jarraya F., Cordonnier D., Favier A. & Achour A. (2007).** Évaluation d'un transfert de méthode : dosage de l'homocystéine plasmatique par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. In *Annales de Biologie Clinique*, 65(4) : 393-398.
4. **Benmebarek A., Zerizer S., Laggoune S. & Kabouche Z. (2013).** Effect of stachys mialhesi de Noé on the inflammation induced by hyperhomocysteinemia in cardiovascular diseases. *Der Pharmacia letter*, 5(2) : 212-223.
5. **Bhakdi S., Torzewski M., Klouche M. & Hemmes M. (1999).** Complement and atherogenesis. Binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 19 : 2348-2354.
6. **Bienvenu F. (2003).** C-reactive protein (CRP). *EMC - Biologie médicale*, 1-0 [Article 90-10-0315].
7. **Bin M., Weina G., Jingyu W., Jijun Y., Jianquan W., Lingling P. & Changjiang G. (2013).** Quercetin reduces serum homocysteine level in rats fed a methionine-enriched diet. *Nutrition*, 29 : 661-666.
8. **Boldyrev A. A. (2009).** Molecular mechanisms of homocysteine toxicity. *Biochemistry (Moscow)*, 74(6) : 589-598.
9. **Bonnet J. & Elias A. (1997).** Athérosclérose et plaque d'athérome. *Encycl Méd Chir. Cardiologie Angéiologie*, 11 : 605-610.
10. **Bonnet J. (2005).** Athérosclérose. *EMC-Cardiologie Angéiologie*, 2 : 436-458.
11. **Borghini T., Vernez L. & Kessler D. (2013).** Protéine C réactive (CRP) et Vitesse de sédimentation (VS). *CSCQ*.
12. **Bouby L. & Marival P. (2001).** La vigne et les débuts de la viticulture en France : apports de l'archéobotanique. *Gallia*, 58(1) : 13-28.
13. **Boudebouz S. (2013).** Effet comparatif de l'extrait butanolique de la plante *Stachys mialhesi* avec les vitamines B9 et B12 sur quelques paramètres biochimiques et la

Références bibliographiques

- structure de l'aorte chez des souris induites par une hyperhomocystéinémie. Mémoire en vue de l'obtention de diplôme de magister en biologie appliquée. Université constantine 1.
14. **Cacoub P., Sene D. & Piette J. C. (2007).** Hyperhomocystéinémies et cardiopathies ischémiques. *Sang Thrombose Vaisseaux*, 19(4) : 203-209.
 15. **Cermak J. (1993).** C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. *Blood*, 82 : 513-520. In Semmame O. (2008). Etude des marqueurs biologiques (lipides, homocystéine, CRP) et génétiques (MTHFR) dans l'infarctus de myocarde. Université Mentouri.
 16. **Chadefaux-Vekemans B. (2003).** Homocystéine totale. EMC - Biologie médicale, 1-0 [Article 90-10-0525].
 17. **Chang M., Binder C., Torzewski M. & Witztum J. (2002).** C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 99 : 13043-13048.
 18. **Cohen A. (1997).** Cardiologie et pathologie vasculaire. ESTEM. Paris.
 19. **Darmaun D., Smith S. D., Sweeten S., Sager B.K., Welch S., Mauras N. (2005)** Evidence for accelerated rates of glutathione utilization and glutathione depletion in adolescents with poorly controlled type 1 diabetes. *Diabetes*; 54 : 190-196.
 20. **De Jaeger C., Fraucene N., Voronska E. & Cherin P. (2010).** Rôle de l'homocystéine en pathologie. *Médecine & longévité*, 2(2) : 73-86.
 21. **De Lonlay P., Dubois S., Valayannopoulos V., Depondt E., Ottolenghi C. & Rabier D. (2013).** Prise en charge médicale et diététique des maladies héréditaires du métabolisme. Springer, 487.
 22. **Debaty G.** Chapitre 8 : La protéine C réactive IN : **Claessens Y. E. & Ray P. (2012).** Les Biomarqueurs en médecine d'urgence. Springer, 384.
 23. **Drunat S., Moatti N., Paul J. L., Cogny A., Benoit M. O. & Demuth K. (2001).** Homocysteine-induced decrease in endothelin-1 production is initiated at the extracellular level and involves oxidative products. *European Journal of Biochemistry*, 268(20) : 5287-5294.
 24. **Dupuy A., Terrier N., Senecal L., Morena M., Leray H., Canaud B. & Cristol J. (2003).** La CRP est-elle plus qu'un marqueur de l'inflammation? (A C-reactive protein is it a marker of inflammation?). *NIST-CNRS no 7*, 24(5) : 337-341.
 25. **Fayol V. (2001).** Données récentes sur l'homocystéine. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 16(2) : 78-86.

Références bibliographiques

26. **Fernandes F., Ramalhosa E., Pires P., Verdial J., Valentao P., Andrade P., Bento A. & Pereira J. A. (2013).** *Vitis vinifera* leaves towards bioactivity. *Industrial Crops and Products*, 43 : 434-440.
27. **Ghedira K., Goetz, P. & Le Jeune R. (2012).** *Vitis vinifera* var. tinctoria L.: vigne rouge Ampelidaceae (Vitaceae). *Phytothérapie*, 1-6.
28. **Girs N. & Giet D. (2006).** Le dosage de l'homocystéine intéresse-T-il le médecin généraliste?. *RMLG. Revue médicale de Liège*, 61(5-6) : 352-361.
29. **Giuseppina C. (2004).** Rôle de l'immunité dans l'athérosclérose et dans les syndromes coronariens aigus. *Médecine sciences*, 20(2) : 175-181.
30. **Glorian M. & Limon I. (2006).** L'athérosclérose, une maladie inflammatoire. *Revue francophone des laboratoires*, 389.
31. **Guilland J. C., Favier A., Potier de Courcy G., Galan P. & Hercberg S. (2003).** L'hyperhomocystéinémie: facteur de risque cardiovasculaire ou simple marqueur?: 1. Données fondamentales. *Pathologie Biologie*, 51(2) : 101-110.
32. **Hrira M Y., Mnif W., Kerkeni M., Jaidane Z., Kasab A., Ferchichi S., Laradi S., Addad F., Ben Limam H. & Miled A. (2011).** C-réactive protéine ultrasensible et facteurs de risque cardiovasculaire dans une population tunisienne. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, 26 : 107-112.
33. **Iserin P., Masson M. & Restellini J. P. (2001).** Larousse encyclopédie des plantes médicinales: identification, préparations, soins. Larousse, Paris. 335.
34. **Koutroubakis I. E., Malliaraki N., Dimoulios P. D., Karmiris K., Castanas E. & Kouroumalis E. A. (2004).** Decreased total and corrected antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Digestive diseases and sciences*, 49(9) : 1433-1437.
35. **Lebreton A., Bonneau C., Bouvier D., Albert A., Ughetto S., Mulliez A., ... & Fogli A. (2009).** Dosage de l'homocystéine plasmatique, comparaison de deux méthodes: CLHP versus immunonéphélométrie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 24(3) : 155-159.
36. **Legrand V. (2005).** Atherosclerose et inflammation. *chu de liege belgeque*.
37. **Lelong H., Kretz S. & Blacher J. (2012).** Protéine C réactive, homocystéine et risque cardiovasculaire. *Revue Francophone des Laboratoires*, (439) : 27-31.
38. **Léoni J. (2001).** Physiopathologie de l'athérosclérose Mécanismes et prévention de l'athérombose. Thèse de doctorat. Université de Franche-Comté. IN site <http://www.123bio.net/revues/jleoni/1chap2.html>.
39. **Levasseur R. (2009).** Tissu osseux et hyperhomocystéinémie. *Revue du rhumatisme*, 76(5) : 390-396.

Références bibliographiques

40. **Loosen C., Briclet C., Banyihishako L., Boeur M. & Vankerkhoven P. (2011).** Homocystéine sérique et plasmatique: les immuno-essais face à la chromatographie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 26(2) : 96.
41. **Mairesse S., Drevillon T., Swebel T. A., Horellou M. H., Conard J., Le Junne C. & Blacher J. (2010).** Homocystéine et maladie veineuse thromboembolique: la fin d'une belle histoire?. *Sang Thrombose Vaisseaux*, 22(3) : 144-149.
42. **Mark B., Pepys P., Gideon M. & Hirschfiel D. (2003).** C-reactive protein: a critical update. *J. Clin. Invest*, 111 : 1805-1812.
43. **Mazokopakis E. E. & Starakis I. K. (2012).** Recommendations for diagnosis and management of metformin-induced vitamin B12 (Cbl) deficiency. *Diabetes research and clinical practice*, 97(3) : 359-367.
44. **McCully K. S. (1969).** Vascular pathology of homocysteinemia: implication for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am. J. Pathol*, 56 : 111-28.
45. **Miller J. W. (2013).** Homocysteine. *Encyclopedia of Human Nutrition*, 2 : 424-430.
46. **Morand C., Rios L., Moundras C., Besson C., Remesy C., Demigne C. (1997)** Influence of methionine availability on glutathione synthesis and delivery by the liver. *J NutrBiochem*, 8 : 246-255.
47. **Onraed B. & Hennache B. (2005).** Le dosage de la CRP ultrasensible par immunoturbidimétrieFumouze et immunonéphélométrieDade Behring. *Annales de Biologie Clinique*, 63(3) : 339-44.
48. **Otmane A., Makrelouf M., Bouchama R., Boucelma M., Berrah A. & Zenati A. (2007).** Dosage de l'homocystéine totale chez une cohorte de diabétiques de type 2. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2007(396) : 21-24.
49. **Palinski w., Hertuala y., Rosenldm E. et al. (1990).** Antisera and monoclonal antibodies specific for epitopes generated during oxidative modification of low density lipoprotein .*Arteriosclerosis*, 10 : 325-335.
50. **Planchon JE. 1887.** Monographie des Ampélidées vraies Monographia hanerogamer- um 5 ,305-364.
51. **Quilici J., Gallo R. (1991).** Physiologie des syndromes coronariens aigus. *Ann.Cardio.Angio.*, 48 : 611-23.
52. **Reitman S. & Frankel S. (1957).** Coloric determination of GOT or GPT activity. *Am. Clin. Path*, 28 : 56.
53. **Reynier A. 2003.** Manuel de viticulture, 9e édition. TEC and DOC, Paris, France, 63, 545-554.

Références bibliographiques

- 54. Robinson K. (Ed.). (2000).** Homocysteine and vascular disease, (Vol. 230) : 447.
- 55. Roblin X., Pofelski J. & Zarski J. P. (2007).** Rôle de l'homocystéine au cours de la stéatose hépatique et de l'hépatite chronique C. *Gastroenterol Clin Biol*, 31 : 415-420.
- 56. Roubille F., Cayla G., Picot M-C., Pradet V., Massin F., Gervasoni R., Pasquie J-L., Macia J-C., Piot C. & Leclercq F. (2008).** Intérêt de la C-reactive protein (CRP) dans l'évaluation pronostique de l'infarctus du myocarde revascularisé. *La Revue de médecine interne*, 29 : 868-874.
- 57. Roux K. H., Kilpatrick J. M., Volanakis J. E. & Kearney J. F. (1983)** Localization of the phosphocholine-binding sites on C-reactive protein by immunoelectron microscopy. *J.Immunol.* **131**, 2411-2415.
- 58. Sandhu R., Petroni D. & George W. (2005).** Ambient particulate matter, C-reactive Protein and coronary artery disease. *Inhal Toxicol*, 17: 409-13.
- 59. Sène D., Cacoub P. (2013).** Hyperhomocystéinémie : un vrai facteur de risque cardiovasculaire ? *EMC – Cardiologie*, 8(1) : 1-7.
- 60. Sharma M., Rai S. K., Tiwari R. K., Tiwari M. & Chandra R. (2008).** Effects of nitric oxide modulators on cardiovascular risk factors in mild hyperhomocysteinaemic rat model. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 103(1) : 25-30.
- 61. Smach M. A., Naffeti S., Charfeddine B., Ben Abdallah J., Othmen L. B., Letaef A. & Limem K. (2013).** Homocystéine, vitamine B12 et acide folique dans le déclin cognitif chez les personnes âgées. *Pathologie Biologie*, 61(5) : 184-192.
- 62. Stalder M., Lovey P. Y. & Dayer E. (2007).** Homocystéine et maladie thromboembolique. *Institut Central des Hôpitaux Valaisans, Sion.* 9(3).
- 63. Steinberg D. Lewis A. (1997).** Conner memorial lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation*, 95 (4) : 1062-71.
- 64. Taylor K. E. & Van Den Berg C. W. (2007).** Structural and functional comparison of native pentameric, denatured monomeric and biotinylated C-reactive protein. *Immunology*, 120(3), 404-411.
- 65. Tedgui A. & Chapman J. (2004).** Pathogénèse de l'athérosclérose : théories et mécanismes.
- 66. Tedgui A. (2001).** Pathogénèse de l'athérosclérose. *Encycl. Méd. Chir. Neurologieendocrinologie-Nutrition*, 10-368-I-10, 7.
- 67. Thompson D., Pepys M. B. & Wood S. P. (1999).** The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure*, 7(2) : 169-177.

Références bibliographiques

- 68. Torzewski J. (1998).** C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 18 : 1386-1392.
- 69. Tsimikas S. (2008).** In vivo markers of oxidative stress and therapeutic interventions. *Am J Cardiol*, 101(10A) : 34D-42D.
- 70. Vangelder E., Delecourt F., Cardozo M. B., Dhondt J. L. & Forzy G. (2006).** Hyperhomocystéinémie et diabète de type 2. *Annales de Biologie Clinique*, 64(5) : 485-9
- 71. Vesin C., Horellou M. H., Mairesse S., Conard J., Safar M. & Blacher J. (2007).** Homocystéine et risque cardiovasculaire. *Sang Thrombose Vaisseaux.*, 19(3) : 143-9
- 72. Volanakis J. E. (2001).** Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Molecular immunology*, 38(2) : 189-197.
- 73. Weckbeker G. & Cory J.G. (1988).** Ribonucleotidoreductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukaemia L 1210 cells *in vitro*. *Cancer letters*, 40 : 257-267.
- 74. Zerizer S. & Naimi D. (2004).** Homocystéine; An independent risk factor in atherogenic process. *Egypt Pharm.J.N.R.C*, 3 : 110-114.
- 75. Zhang W. (2003).** The Role of Lipoic Acid in Inflammation and Atherosclerosis. *Micronutrient Research for Optimum Health*.
- 76. Zhang Y., Cliff W., Schoefl G. & Higgins G. (1999).** Coronary C-reactive protein distribution: its relation to development of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 145 : 375-379.
- 77. Zittoun J. (1998).** Homocystéine et pathologie vasculaire. *Hématologie*, 4 (1) : 7-16.

Reference web

<http://www.123bio.net/revues/jleoni/1chap2.html>.

<http://www.djebahia.com/flore3/Vitis-vinifera.jpg>

ANNEXE

Annexe

I. Calcule de la dose

- **La dose de la plante (0,5g/Kg)**

$$\begin{array}{l} 0,5\text{g} \longrightarrow 1000 \text{ g} \\ X \text{ g} \longrightarrow \text{ poids de souris (g)} \end{array}$$

La dose de la plante = $(0,5 \times \text{poids de souris}) / 1000$

- **La dose de la méthionine (1g/Kg)**

$$\begin{array}{l} 0,5\text{g} \longrightarrow 1000\text{g} \\ X \text{ g} \longrightarrow \text{ poids de souris(g)} \end{array}$$

La dose de la méthionine= $(0,5 \times \text{poids de souris}) / 1000\text{g}$

II. Préparation des solutions

- **La dissection**

- **Na Cl (0,9%)**

Dissoudre 0,9g de l'Na Cl dans 100 ml d'eau distillée.

- **Préparation de l'homogénat**

- **Solution de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM) pH 7.4**

Calcule de la quantité de produit (g) selon la règle de trois :

$$\begin{array}{l} 1 \text{ Mole} \longrightarrow \text{masse molaire (g)} \\ n \text{ Mole} \longrightarrow X \text{ (g)} \end{array}$$

n : nombre de moles

La quantité de produit = $[(n \times \text{masse molaire}) / 1]\text{g}$

-Dissoudre 6,057g de tris (121,14g/mole) et 8,766g de NaCl (58,44g/mole) dans un litre d'eau distillé. Puis ajuster le pH à 7,4 avec l'HCL.

- **Dosage de glutathion**

- **Solution Tris (0,4M), EDTA (0,02M) et pH 9,6**

Dissoudre 12,114 g tris et 1,871g EDTA dans 250 ml d'eau distillée et ajuster le pH à 9,6 en ajoutant HCL ou NAOH.

- **Solution DTNB (0,01M)**

Dissoudre 200 mg DTNB dans 50 ml de méthanol absolu.

- **Solution d'acide sulfo-salicylique 0,25%**

Dissoudre 250 mg d'acide salicylique dans 100 ml d'eau distillée.

- **Dosage des protéines totales**

- **Solution de BSA (1mg/ml)**

Dissoudre 5 mg de BSA dans 5 ml d'eau distillée.

- **Réactif de Bradford**

Dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie (G250) dans 50 ml d'éthanol (95%). Agiter par l'agitateur pendant 2 heures, puis ajouter 100 ml d'acide ortho-phosphorique (85%) et 850 ml d'eau distillée (pour obtenir 1 L de solution).

Ce réactif peut être filtré puis conserver pendant 1 mois au maximum à une température de 4°C à l'abri de la lumière.

Tableau 3 : Les composants de l'aliment des souris.

Protéines	15%
Lipides	2,5%
Cellulose	8%
Minérales	8%
Humidité	13%
Vitamine A	150.000 UI
Vitamine D	3 200.000 UI
Vitamine E	3 mg
Fer	6mg
Cu	1,2mg
Zn	14,400mg
Cobalt	60mg
Mn	10,800mg
Iode	150 mg
sélénium	30mg
Ca ⁺²	1%
Phosphore	0,8%

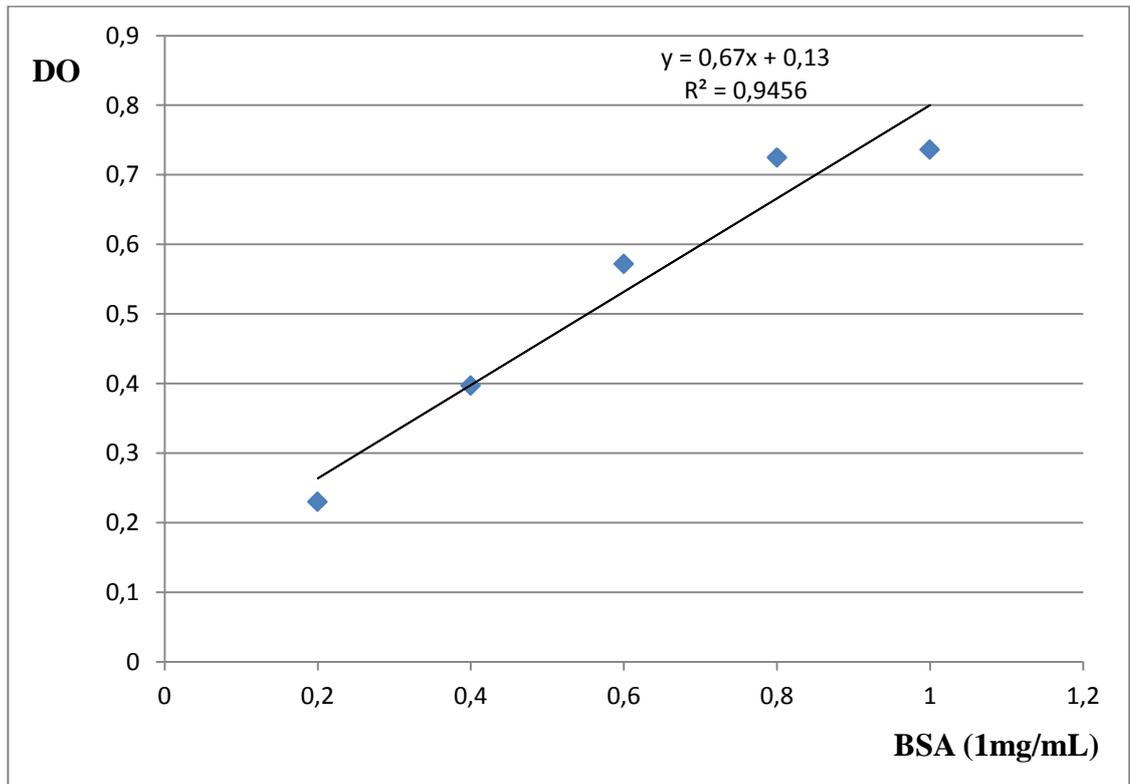


Figure 16 : La gamme d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines.

Résumé

L'homocystéine est un acide aminé soufré, formé au cours du métabolisme de la méthionine présente dans les protéines animales.

L'hyperhomocystéinémie, considérée comme un facteur de risque d'athérosclérose favorisant un processus inflammatoire, peut être évaluée par un dosage de la protéine C-réactive (CRP).

L'analyse ultrasensible (hsCRP) réalisée dans notre travail, reposant sur une technique de dosage à haute sensibilité, a été nécessaire pour obtenir des mesures précises de la CRP aux taux liés aux maladies cardiaques.

En outre, dans notre recherche, nous avons mesuré le glutathion réduit pour distinguer l'association entre le taux de glutathion réduit chez des souris induites par hyperhomocystéinémie dans les maladies cardiovasculaires.

Les feuilles de vitis vinifera (500 mg/kg/j), utilisées dans cette investigation, ont montré des effets anti-inflammatoires chez les souris traitées par la L-méthionine (1g/kg) pendant 12 jours et est donc considérée comme une source naturelle dans la prévention contre les maladies cardiovasculaires.

Summary

Homocysteine, sulfur amino-acid is formed during the metabolism of methionine, essential amino-acid present in animal protein.

At high level, hyperhomocysteinemia is considered as a risk factor in atherosclerosis which induced an inflammatory process that can be detected by measurement of C-reactive protein (CRP).

The analytical sensitivity (CRP hs) which is used in the present work based on an assay with high sensitivity which is required to obtain accurate measurements of CRP at the rates that are linked to cardiovascular diseases.

Also in the present research we have measured the glutathione reduced to see the association between the level of glutathione in mice induced by hyperhomocysteinemia and cardiovascular diseases.

Vitis vinifera leaves (500 mg/Kg/day), used in this study have an anti-inflammatory and antioxidant effects in mice administered with L-methionine (1 g/kg).

Our results obtained in this study showed that *Vitis vinifera* can be considered as natural source in the prevention against cardiovascular diseases.

ملخص

يعتبر الهوموسيستين حمض أميني مكبرت يتشكل خلال عملية أيض الميثيونين، هذا الأخير حمض أميني أساسي يتواجد في البروتينات الحيوانية.

إن ارتفاع تركيز الهوموسيستين في بلازما الدم يعتبر عامل مسبب لتصلب الشرايين المؤدي لحدوث ظاهرة الالتهاب، هذه الأخيرة يمكن تقديرها بمعايرة CRP

خلال هذا البحث تم قياس CRP بواسطة طريقة يطلق عليها hsCRP التي تعني التحليل الدقيق لهذا البروتين و هي ضرورية للحصول على كميات دقيقة من CRP التي تكون مرتبطة بأمراض الأوعية القلبية.

قمنا كذلك خلال هذا البحث بقياس الجلوثاثيون المختزل لدراسة علاقته بأمراض الأوعية القلبية.

إن أوراق نبات العنب *Vitis vinifera* (بمقدار 500مغ/كغ/يوم) قادرة على انخفاض الإلتهاب و كذلك تعمل كمضادة للأكسدة عند الفئران المعاملة بالمثيونين (بمقدار 1غ/كغ/يوم).

إن النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة بينت أن مستخلص أوراق نبات العنب *Vitis vinifera* يعتبر مصدر طبيعي يمكن استخدامه في الوقاية من أمراض الأوعية القلبية.

Nom et Prénom : BEHNAS Widad RAMOUL Ibtissem	Date de soutenance : 28 / 06 / 2014
Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de master en Biochimie Option : analyse protéomique et santé	
Effet de l'extrait des feuilles de <i>Vitis vinifera</i> sur la CRP dans les maladies cardiovasculaires induites par une hyperhomocystéinémie chez les souris	
<p>Résumé</p> <p>L'homocystéine est un acide aminé soufré, formé au cours du métabolisme de la méthionine présente dans les protéines animales.</p> <p>L'hyperhomocystéinémie, considérée comme un facteur de risque d'athérosclérose favorisant un processus inflammatoire, peut être évaluée par un dosage de la protéine C-réactive (CRP).</p> <p>L'analyse ultrasensible (hsCRP) réalisée dans notre travail, reposant sur une technique de dosage à haute sensibilité, a été nécessaire pour obtenir des mesures précises de la CRP aux taux liés aux maladies cardiaques.</p> <p>En outre, dans notre recherche, nous avons mesuré le glutathion réduit pour distinguer l'association entre le taux de glutathion réduit chez des souris induites par hyperhomocystéinémie dans les maladies cardiovasculaires.</p> <p>Les feuilles de <i>Vitis vinifera</i> (500 mg/kg/j), utilisées dans cette investigation, ont montré des effets anti-inflammatoires chez les souris traitées par la L-méthionine (1g/kg) pendant 12 jours et est donc considérée comme une source naturelle dans la prévention contre les maladies cardiovasculaires.</p>	
Mots clés: Méthionine, hyperhomocystéinémie, CRP, <i>Vitis vinifera</i> , Maladie cardiovasculaire.	
Structure de recherche : Laboratoire de Biologie physiologie cellulaire et moléculaire, laboratoire d'immunologie; (Université Constantine 1), Laboratoire d'analyses médicales (IBN SINA).	
Devant le jury :	
Président : MECHAKRA A.	Pr Université de Constantine 1
Encadreur : ZERIZER S.	Pr Université de Constantine 1
Examineur : BEN KAHOU M.	M.C. (A) Université Constantine 1