

THÈSE

Présentée par : **HOUCHER Zahira**

Pour obtenir le diplôme de **Doctorat en Sciences**

Option : **Biochimie**

THÈME

Facteurs nutritionnels, homocystéine et polymorphisme
C677T du gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase
dans la population algérienne

Soutenue publiquement le 22/11/2012

DEVANT LE JURY

Président:	Rachid MALEK	Professeur, Université Ferhat Abbas, Sétif
Rapporteur:	Abderrezak TOUABTI	Professeur, Université Ferhat Abbas, Sétif
Co-rapporteur:	Bakhouch HOUCHER	Professeur, Université Ferhat Abbas, Sétif
Examineurs:	Dalila SATTA	Professeur, Université Mentouri, Constantine
	Djebbar ATMANI	Professeur, Université Abderahmane Mira, Bejaia
	Mouloud YAHIA	Maître de conférences, Université Hadj Lakhder, Batna

Remerciements

Au terme de ce travail, il m'est très agréable de rendre hommage à tous ceux qui m'ont aidée, soutenue et supportée.

Qu'il me soit permis tout d'abord, d'adresser mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur Rachid MALEK, pour avoir accepté de présider ce jury et avoir consacré son précieux temps à la valorisation de ce travail.

Je ne saurais jamais comment exprimer mon profond respect et toute ma gratitude envers Monsieur le Professeur Abderrezak TOUABTI, pour m'avoir aidée dans l'élaboration de ce travail et avoir accepté de m'encadrer et me diriger tout au long de ces quatre années de thèse.

Je remercie également et sincèrement Monsieur le Professeur Bakhouche HOUCHEUR, qui m'a soutenue et guidée tout au long de ce travail. Sa compétence, son dynamisme et sa collaboration efficace sont beaucoup dans la réalisation et l'aboutissement de ce travail. Je le remercie aussi pour avoir accepté d'être co-rapporteur et de m'avoir honorée par sa présence dans le jury.

Je remercie très sincèrement Madame le Professeur Dalila SATTA, Monsieur le Professeur Djebbar ATMANI et Monsieur le Docteur Mouloud YAHIA, pour avoir accepté d'être membres de jury de cette thèse. Je leur suis très reconnaissante pour le temps et l'énergie consacrés à l'évaluation de ce travail.

Je témoigne ma profonde reconnaissance envers Docteur Mounira AMRANE, qui a bien voulu examiner mon mémoire de thèse puis me prodiguer conseils et suggestions très précieux.

Mes remerciements amicaux vont aussi à toute l'équipe soignante du service de cardiologie, CHU de Sétif pour m'avoir aidée dans le recueil des échantillons et la consultation des dossiers de malades. Je suis particulièrement reconnaissante envers Docteur Fatima KADOUR de m'avoir accueillie au sein du service de cardiologie pour de longues journées.

Enfin, je remercie L'Agence Nationale pour le Développement de la Recherche en Santé (Algérie) pour le support financier du projet de recherche (projet No. 03/03/00/07/093) et l'université d'Ankara (Turquie) pour le génotypage des mutations C677T de la MTHFR et 844ins68 de la CBS de nos sujets.

Je dédie ce modeste travail:

À la mémoire de mon père: feu Houcine HOUCHER

Brutalement arraché à notre affection, ton honnêteté, ton dévouement, ton respect pour le prochain étaient toujours spontanés; les sacrifices que tu as consentis pour notre éducation ont été fructueux. Ton esprit de grandeur nous a ouvert la voie de l'honneur et de la dignité. Ta présence nous aurait beaucoup réconfortés.

Tu constitues un modèle dont je m'inspirerai toujours; paix à ton âme.

Publications

Zahira Houcher, Bakhouché Houcher, Abderrezak Touabti, Samia Begag, Ayşenur Öztürk, Yonca Egin, Nejat Akar, Farida Djabi. Hyperhomocysteinemia and C677T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with cardiovascular disease. *Pteridines* 2010; 21: 103 – 109.

Bakhouché Houcher, **Zahira Houcher**, Abderrezak Touabti, Samia Begag, Didem Torun, Yonca Egin, Nejat Akar, Fatima Kadour. Association of methylenetetrahydrofolate reductase c677t and cystathionine β -synthase polymorphisms in cardiovascular disease in the algerian population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* 2010; 14(6): 775–780.

Zahira Houcher, Bakhouché Houcher, Abderrezak Touabti, Samia Begag, Yonca Egin, Nejat Akar. Nutritional Factors, Homocysteine and C677T Polymorphism of the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene in Algerian Subjects with Cardiovascular Disease. *Pteridines* 2012; 23: 14 – 21.

Communications

Zahira Houcher, Bakhouché Houcher, Abderrezak Touabti. L'effet du polymorphisme C677T de MTHFR sur l'homocystéinémie et le risque cardiovasculaire chez une population algérienne. 21ème Forum International des Sciences Biologiques, Mahdia, Tunisie du 15 au 18 mars 2010.

Résumé

Objectif. Cette étude descriptive a pour but de déterminer la relation entre les taux plasmatiques de l'homocystéine (tHcy), de la vitamine B12, de folates et d'autres paramètres biochimiques avec le polymorphisme C677T du gène de la méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR). **Méthodes.** La population d'étude a été constituée de 131 patients atteints de maladies cardiovasculaires (MCV). tHcy, la folatémie et la vitamine B12 plasmatiques ont été dosées en utilisant une méthode immunologique compétitive. Les concentrations plasmatiques du cholestérol total, des triglycérides, du glucose, de la créatinine et de l'urée ont été déterminées par la méthode colorimétrique. Le génotypage pour C677T MTHFR et 844ins68 cystathionine β -synthase (CBS) a été réalisé par PCR. La mutation C677T de la MTHFR a été estimée aussi chez 147 sujets témoins sains. **Résultats.** Chez tous les patients étudiés atteints de MCV, les valeurs de tHcy étaient élevées dépassant la limite supérieure des valeurs usuelles ($35,74 \pm 10,28 \mu\text{mol/L}$) et atteignant même un grade intermédiaire chez les hypertendus. tHcy a montré aussi une corrélation avec l'âge, l'urée et la créatinine. Par ailleurs, les fréquences de génotypes TT et CT étaient respectivement de 16,1% et 43,5% chez les patients et de 14,3% et 40,1% chez les témoins. Aucune différence significative dans la répartition des génotypes mutés entre les deux groupes étudiés n'a été démontrée. La fréquence du gène d'insertion 844ins68 CBS est observée chez 13,8% des patients. Ces deux polymorphismes des gènes de la MTHFR et de la CBS n'ont montré aucune association ni avec l'HHcy ni avec la survenue de maladies cardiovasculaires. Cela, pourrait être due au statut correct en folates. Les patients atteints de MCV et de génotypes 677CT/TT avaient une plus forte concentration du cholestérol total (Chol T) que ceux du génotype 677CC. L'hypofolatémie ($\leq 16 \text{ ng/mL}$) a altéré aussi le Chol T. Les taux de la folatémie et de la vitamine B12 étaient beaucoup plus élevés chez les sujets sans hyperlipidémie et du génotype 677CC par rapport à ceux de génotypes 677CT/TT ($p < 0,05$). Cependant, leurs valeurs deviennent également basses chez les patients avec hyperlipidémie du génotype 677CC. **Conclusions.** L'augmentation du taux d'Hcy chez ces sujets est principalement due aux perturbations métaboliques liées aux MCV (hypertension artérielle et dysfonctionnement rénal). L'influence des variants mutés 677CT/TT sur le Chol T, les folates et la vitamine B12 pourrait être due à leur action directe sur ces métabolites ou/et indirecte de part leur effet sur l'Hcy.

Mots clés: Homocystéine - folates - vitamines B12 - MTHFR - CBS - maladies cardiovasculaires - Algérie.

Summary

Objective. This descriptive study aimed to examine the relationship between plasma homocysteine (tHcy), vitamin B12, folate and others biochemical metabolic levels as well as polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene. **Methods.** A total of 131 patients with cardiovascular diseases were selected. The concentration of tHcy, folic acid and vitamin B12 levels were determined using a competitive immunoassay method. Plasmatic total cholesterol, triglyceride, glucose, creatinine and urea concentrations were measured by the colorimetric method. The genetic analysis of the MTHFR C677T and cystathionine β -synthase (CBS) 844ins68 polymorphisms was performed by PCR. The (MTHFR) C677T mutations were evaluated also in 147 healthy control subjects. **Results.** Plasma tHcy was significantly higher in the patients with CVD (35.74 ± 10.28 $\mu\text{mol/L}$). This hyperhomocysteinemia (HHcy) was correlated positively with age, urea and creatinine. An elevated plasma tHcy and glucose level was also found in patients with arterial hypertension (AHT). The frequency of the TT genotype was 16.1% in the patient group compared with 14.3 % in the healthy controls. The CT genotype constituted 40.1% and 43.5% in the control group and the patients group respectively. There was no significant difference in the occurrence of the TT genotype between the studied groups. The MTHFR and CBS mutations does not seem to be associated with either high tHcy or the occurrence of cardiovascular diseases in the studied patients and this lack of correlation could be explained by the level of folatemia which seem must to be lower than in our study. CVD patients with 677CT/TT genotypes had a higher concentration of total cholesterol (T Chol) than those with 677CC genotype. Besides, the presence of 677T variant conjugated with hypofolatemia (≤ 16 ng/mL) had a more detrimental effect on the level of T Chol. Folatemia and vitamin B12 were much higher in 677CC genotype compared to 677CT/TT genotype in CVD subjects without hyperlipidemia ($p < 0.05$), however in patients with hyperlipidemia these values became lower also with 677CC genotype. **Conclusion.** HHcy aggravate in patients with AHT and hypercreatinemia. The effect of 677CT/TT variants on T Chol, folate and vitamin B12 can be explained by a direct alteration of these metabolites by mutation and in part by an adverse effect of HHcy on lipid profiles and on plasmatic folate and vitamin B12.

Key words: Homocysteine - folate - vitamin B12 - MTHFR - CBS - cardiovascular disease - Algeria.

الملخص

الهدف : هذه الدراسة الوصفية تهدف إلى تحديد العلاقة بين مستويات الهوموسيستيين (tHcy) و الفيتامين ب 12 وب 9 و عوامل أيضية أخرى مع بوليمورفيزم للجين ميثيلان رباعي الهيدروفولات ريديكتاز (MTHFR). **الطرق:** تمت الدراسة على 131 مريضا مصابا بأمراض القلب و الشرايين (أ ق ش), تراكيز الهوموسيستيين والفولات و الفيتامين ب 12 حددت باستخدام أسلوب المناعية التنافسية, أما كمية الكوليسترول و الدهون الثلاثية والجلوكوز والكرياتينين واليوريا تم قياسها بواسطة الطريقة اللونية. تحديد الأشكال المتعددة لل MTHFR C677T و CBS 844ins68 تم ب PCR. الطفرة MTHFR C677T عوينت أيضا عند 147 شخصا شاهدا سليما. **النتائج:** كان الهوموسيستيين عال عند الأشخاص المصابين بأ ق ش ($35.74 \pm 10.28 \mu\text{mol} / \text{L}$). هذا الارتفاع للهوموسيستيين ارتبط ايجابيا مع العمر و اليوريا و الكرياتينين و وصل إلى قيمة وسيطة عند المرضى الذين يعانون من ارتفاع ضغط الدم (إ ض د ش). كان تردد النمط الجيني TT 16.1 % عند المرضى مقارنة ب 14.3 % عند الشواهد. بينما شكل النمط الجيني CT 40.1 % عند الشواهد و 43.5 % عند المرضى. لم يكن هناك اختلاف كبير في توزيع النمط الجيني TT بين المجموعات المدروسة. يبدو أن الطفرات للجين MTHFR و الجين CBS لا تترافق لا مع ارتفاع كمية tHcy ولا مع حدوث أمراض القلب والأوعية الدموية. عدم وجود العلاقة يمكن إرجاعه إلى التركيز العالي للفولات في الدم. تركيز الكوليسترول في الدم عند المرضى الحاملين للمورثات CT/TT677 كان أكبر من ذوي المورثة CC677. إضافة أن ترافق البديل T677 مع كمية الفولات الضئيلة (≥ 16 نانوغرام / مل) له تأثير أكثر ضررا على مقدار الكوليسترول. كمية الفولات والفيتامين B12 في الدم كانت أعلى عند المرضى دون نسبة عالية من الدهون في الدم و الحاملين للجين CC677 مقارنة مع الحاملين للنمط الجيني CT/TT677 ($p > 0.05$)، غير أن هذه المقادير تنخفض أيضا عند الأشخاص ذوي التركيب الوراثي CC677 و الذين يعانون فرط الدهون. **الخاتمة:** يزداد ارتفاع Hcy بوجود إ ض د ش وارتفاع الكرياتينين. تأثير المتغير CT/TT 677 على كمية الكوليسترول و الفولات والفيتامين B12 يمكن أن يكون راجعا إلى التأثير المباشر لهذه الطفرة على هذه المكونات الأيضية, و يمكن أن يرجع إلى جزء منه إلى التأثير السلبي لارتفاع tHcy على كمية الدهون والفولات والفيتامين B12.

الكلمات المفتاح: هوموسيستيين - فولات - فيتامين ب 12 - MTHFR - CBS - أمراض القلب و الشرايين - الجزائر

Symboles et abréviations

5-Meth-THF: 5-méthyl-tétrahydrofolate
5-MTHF: 5-méthylène tétrahydrofolate
ADMA: diméthylarginine asymétrique
ANAES: Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé
apABG: acétamidobenzoylglutamate
APC: protéine C activée
Apo AI: Apolipoprotéine AI
Apo B: Apolipoprotéine B
ATF-6: Activating transcription factor 6
AVC: Accident vasculaire cérébral
BHMT: bétaine-homocystéine méthyltransférase
CBS: Cystathionine- β -Synthase
Chol: cholestérol
CGL: Cystéine γ Lyase.
CREA: Créatinine.
CRP-us: Protéine C-Réactive ultrasensible
DHF: dihydrofolate
DHFRase: dihydrofolate reductase
EDRF: *endothelium-derived releasing factor*
EP: embolie pulmonaire
FBP: folates binding protein
FI: facteur intrinsèque
FPGS: folylpolyglutamate synthase
GCPIV: glutamate carboxypeptidase IV
GNMT: glycine-N-méthyltransférase
GPX: glutathion peroxydase
GRP: glucose regulated protein
Hcy: Homocystéine
HHcyt: hyperhomocystéinémie
HMT: 5 méthyl tétrahydrofolate homocystéine méthyl-transférase
IDM: infarctus du myocarde
IMC: indice de masse corporelle
IRE-1: protéine kinase transmembranaire de type-I ER
LDL: Lipoprotéine de basse densité (Low Density Lipoprotein)
Lp(a): Lipoprotéine(a)
MAT: Méthionine-Adénosyl-Transférase
MCP-1: monocyte chemoattractant protein 1
MCV: maladies cardiovasculaires
MS: Méthionine synthase
MTHFR: 5,10- méthylène tétrahydrofolate réductase
MTRR ou MSR: méthionine synthase réductase
NF- κ B: necrosis factor kappa B
NO: oxyde nitrique

OMS: Organisation Mondiale de la Santé
pABGn: paraaminobenzoylpolyglutamates
PA: pression artérielle
PCR: répllication par polymérisation en chaîne
PERK: PKR like ER kinase
PL: pyridoxal
PLP: pyridoxal 5'-phosphate
PM: pyridoxamine
PMP: pyridoxamine 5'-phosphate
PN: pyridoxine
PNP: pyridoxine 5'-phosphate
PtéGlu_n: acide ptéroylpolyglutamate
RFC: reduced folate carrier
RFLP: polymorphisme de longueur des fragments de restriction
SAHA: Société Algérienne d'hypertension artérielle
SAH: S-adénosine-L-homocystéine
SAM: S-adénosyl-L-méthionine
SCA: syndromes coronariens aigus
SCS: sténose coronaire significative
S-FBP: serum folates binding proteins
SHMT: sérine hydroxyméthyltransférase
SOD: superoxyde dismutase
TC: transcobalamine
TCN: transcobalamine
TG: triglycéride
THF: tétrahydrofolate
TNF: Facteur de nécrose tumorale
TPA: activateur plasminogène tissulaire
TS: thymidylate synthase
UPR: unfolded protein response

Table des matières

Etude bibliographique	
Introduction	1
I.1. Les maladies cardiovasculaires	3
I.1.1. Mortalité et morbidité des maladies cardiovasculaires.....	3
I.1.2. Définition des maladies cardiovasculaires.....	4
I.1.3. Les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires.....	5
I.2. Homocystéine, un facteur de risque modifiable de MCV	9
I.2.1. Métabolisme de l'homocystéine et les vitamines du groupe B.....	9
I.2.2. Les différentes formes physicochimiques d'homocysteine circulantes.....	12
I.2.3. Déficits enzymatiques et pathogenèse de l'hyperhomocystéinémie.....	12
I.2.4. Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie.....	14
A. Facteurs nutritionnels.....	14
A.1. Les folates ou vitamine B9.....	15
A.1.1. Caractéristiques générale.....	15
A.1.2. Déficit en folates.....	16
A.1.3. Métabolisme et fonctions biologiques des folates.....	17
A.2. La vitamine B12.....	22
A.2.1. Structure et définition.....	22
A.2.2. Données nutritionnelles: sources alimentaires, besoins, carences.....	25
A.2.3. Métabolisme: absorption intestinale, distribution, transport, stockage et excrétion.....	26
A.3. La vitamine B6.....	30
A.4. La vitamine B2.....	30
B. Facteurs génétiques, déficits enzymatiques constitutionnels.....	31
B.1. Anomalies de la voie de reméthylation, mutation du gène de la 5,10-méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR)	31
B.2. Anomalies de la voie de trans-sulfuration, mutation du gène de la cystathionine β synthase (CBS).....	34
C. Facteurs environnementaux.....	34
I.3. Mécanismes de la pathogénicité de l'hyperhomocystéinémie	36
I.3.1. Homocystéine et dysfonction endothéliale.....	36
I.3.1.1. L'effet de homocystéine sur la fonction endothéliale.....	36
I.3.1.1.1 La thrombose.....	36
I.3.1.1.2. L'inflammation.....	38
I.3.1.1.3. La relaxation vasculaire.....	40
I.3.1.1.4. L'apoptose.....	41

I.3.1.2. L'effet moléculaire de l'homocystéine sur l'endothélium.....	41
I.3.1.2.1. La modification de la protéine.....	41
I.3.1.2.2. Stress du réticulum endoplasmique et unfolded protein response.....	44
I.3.1.2.3. Stress oxydant.....	44
I.3.1.2.4. Matrice extracellulaire.....	46

Etude expérimentale

II. Patients et méthodes.....	47
II.1. Population d'étude.....	47
II.2. Prélèvements et analyses.....	47
II.3. Méthode de dosage des différents paramètres biochimiques.....	48
II.3.1. Dosage du glucose (Beckman CX9).....	48
II.3.2. Dosage des triglycérides (Beckman CX9).....	48
II.3.3. Dosage du cholestérol (Beckman CX9).....	49
II.3.4. Dosage de la créatinine (Beckman CX9).....	49
II.3.5. Dosage de l'urée (Beckman CX9).....	49
II.3.6. Dosage de la vitamine B12 et de l'acide folique (Immulite 1000, Siemens Diagnostics).....	50
II.3.6.1. Dosage de la vitamine B12.....	50
II.3.6.2. Dosage de l'acide folique.....	50
II.3.6.3. Préparation de la solution de travail pour le dosage de la vitamine B12 et de l'acide folique.....	51
II.3.6.4. Préparation des échantillons pour le dosage de la vitamine B12 et de l'acide folique.....	51
II.3.7. Dosage de l'homocystéine (Immulite 1000, Siemens Diagnostics)	51
II.4. Recherche de la mutation.....	52
II.4.1. Extraction d'ADN à partir de leucocytes isolés.....	52
II.4.2. Détermination de la pureté de l'ADN.....	54
II.4.3. Détermination de la concentration de l'ADN.....	55
II.4.4. Amplification d'ADN par PCR.....	55
II.4.4.1. Recherche de la mutation C677T du gène MTHFR.....	56
II.4.4.2. Recherche de la mutation 844ins68 du gène de la CBS.....	59
II.5. Analyses statistiques.....	61
III. Résultats.....	63
III.1. Description de la population d'étude et fréquences de différents facteurs de risque.	63
III.2. Caractéristiques biochimiques des sujets atteints de maladies cardiovasculaires...	70
Glycémie.....	70
Triglycérides.....	70
Cholestérol.....	70
Créatinine.....	70
Urée.....	71
Folates et vitamineB12.....	71

Homocystéinémie.....	72
III.3. Répartitions des fréquences génotypiques de C677T du gène de la MTHFR et de 844ins68 de la CBS.....	75
III.4. Effet de C677T de la MTHFR sur les facteurs biochimiques et son interaction avec le désordre lipidique.....	79
III.4.1. Association du génotype C677T MTHFR avec l'homocystéine, les TG et le Chol et l'effet du désordre lipidique.....	79
III.4.2. Association du génotype C677T de la MTHFR avec les vitamines B12 et B9 et l'effet du désordre lipidique.....	80
III.5. Etude de l'effet de la folatémie sur l'interaction entre le polymorphisme C677T de la MTHFR, l'Hcy et le cholestérol.....	81
IV. Discussion.....	83
IV.1. Description de la population d'étude et fréquences de différents facteurs de risque cardiovasculaire.....	83
IV.2. Caractéristiques biochimiques des sujets atteints de maladies cardiovasculaires...	86
IV.2.1. Effets de la glycémie et des triglycérides et du cholestérol plasmatiques et leur relation avec les facteurs de risque cardiovasculaire.....	86
IV.2.2. Homocystéine.....	87
IV.2.2.1. Effet de l'âge et du sexe sur l'homocystéine.....	87
IV.2.2.2. Hyperhomocystéinémie et MCV.....	89
IV.2.2.3. Relation de l'homocystéine avec le glucose, les triglycérides et le cholestérol sanguins.....	92
IV.2.2.4. Relation de l'homocystéine avec les folates et la vitamine B12.....	93
IV.2.2.5. Effet de la créatinine et de l'urée et leur relation avec l'HHcy.....	95
IV.3. Génotypes.....	97
IV.3.1. Fréquence de la MTHFR (C677T)	97
IV.3.2. Effet de l'âge et du sexe sur la distribution du polymorphisme chez les sujets atteints de MCV.....	98
IV.3.3. Relation entre la variation de la fréquence du génotype TT et l'apport nutritionnel en folates.....	99
IV.3.4. Association des génotypes de C677T MTHFR et 844ins 68 CBS avec l'homocystéinémie.....	101
IV.3.5. Etude de l'effet de la folatémie sur l'interaction entre génotypes, tHcy et MCV.....	102
IV.3.6. Effets de génotypes mutés C677T MTHFR sur les taux de vitamines B12 et B9 et de cholestérol.....	105
Conclusion et perspectives.....	107
Références bibliographiques.....	110

Etude Bibliographique

Introduction

La révolution sanitaire qui s'est opérée au XXe siècle et la transition démographique qui l'a accompagnée ont entraîné une transformation radicale du tableau de morbidité dans le monde (Lopez *et al.*, 2001). Cette transformation épidémiologique se caractérise par la régression des affections transmissibles et l'accroissement des maladies cardiovasculaires (MCV) (Institut National de Santé Publique, 2005).

Les MCV ne sont plus l'apanage des pays développés. Leur nombre est en constante augmentation et est une des principales causes de morbidité et de mortalité. Par ailleurs, ce fléau représente aussi l'une des conséquences directes de l'élévation dramatique du diabète de type II et des syndromes métaboliques, et des difficultés à lutter efficacement contre les principaux facteurs de risque "environnementaux" - tabagisme et déséquilibre alimentaire - pour ne citer que les plus importants.

En Algérie, selon une enquête réalisée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2002, les maladies non transmissibles représentent 32,8 % des causes de mortalité. Les pathologies cardiovasculaires viennent en tête dans cette catégorie avec un taux de 23,9 % (Bougherbal, 2008).

Les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires regroupent différentes causes: métaboliques, alimentaires, médicamenteuses, psychologiques et mode de vie. Les principaux marqueurs prédictifs des MCV se situent au niveau des fractions lipidiques, principalement la lipoprotéine de basse densité-cholestérol (LDL-cholestérol) et l'apolipoprotéine B (Apo B). Actuellement, la prévention contre ces maladies repose sur le dosage de nouveaux marqueurs tels que l'homocystéine (Hcy), la lipoprotéine(a) (Lp(a)) et la protéine C-réactive ultrasensible (CRP-us), qui sont eux-mêmes des facteurs de risques indépendants des autres facteurs connus (Arab *et al.*, 2004).

L'homocystéine est un acide aminé soufré intermédiaire du métabolisme intracellulaire de la méthionine, pouvant être catabolisée selon deux voies: la trans-sulfuration et la reméthylation. Les réactions enzymatiques de ces voies sont catalysées par: la cystathionine bêta synthase (CBS) dont le cofacteur est le phosphate de pyridoxal (vitamine B6), la 5 méthyl tétrahydrofolate homocystéine méthyle transférase (HMT) (méthionine synthase) dont le cofacteur est la méthyl-cobalamine (dérivé de la vitamine B12), et la 5,10- méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) dont le cosubstrat est le folate.

Tout déficit (génétique ou acquis) portant sur l'une de ces trois enzymes clés ou sur l'un de leurs cofacteurs et cosubstrats induira une diminution du catabolisme de l'homocystéine qui se traduira par une hyperhomocystéinémie (HHcyt) plus ou moins importante.

Les principales anomalies génétiques associées aux hyperhomocystéinémies modérées, les plus recherchées en pratique courante, sont celles du gène de la MTHFR C677T (Frosst *et al.*, 1995) et de la CBS 844ins68. Différentes études ont rapporté des résultats controversés concernant l'implication de ces polymorphismes génétiques dans les maladies cardiovasculaires.

Le but de la présente étude consiste à déterminer les perturbations métaboliques en association avec l'hyperhomocystéinémie chez une population algérienne atteinte de MCV, à estimer les fréquences génotypiques et alléliques des polymorphismes C677T du gène de la MTHFR et 844ins68 de la CBS et à identifier l'impact de ces mutations sur le taux de l'homocystéine plasmatique. Les effets éventuels des vitamines B12 et B9 sur tHcy sont également évalués dans la mesure où ces vitamines interviennent dans le métabolisme de cet acide aminé.

I.1. Les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires comprennent une multitude de maladies relatives au cœur et au système circulatoire. Ces affections sont des pathologies complexes, multifactorielles et occupent une place prépondérante dans la morbidité et la mortalité dans le monde. En outre, les traitements médicamenteux associés représentent une part importante des dépenses de santé.

I.1.1. Mortalité et morbidité des maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont responsables de la majorité des décès dans les pays au mode de vie occidental, soit 16,7 millions de décès dans le monde en 2003 selon l'OMS (29,2 % de la mortalité totale). Quatre-vingts pour cent de ces décès surviennent dans les pays en voie de développement. Cette mortalité régresse dans les pays occidentaux alors qu'elle augmente dans les pays en voie de développement sur le mode occidental (Baudinb et Cohen, 2009).

Parmi les 16,7 millions de décès annuels, 7,3 sont dus à un infarctus du myocarde (IDM) (43,7 %), 5,5 à un accident vasculaire cérébral (AVC) (32,9 %) et 3,9 à l'hypertension artérielle (HTA) ou aux autres MCV (23,4 %) comme l'embolie pulmonaire (EP). L'athérosclérose et ses conséquences ou complications (thrombose) sont la cause de plus de 90 % des syndromes coronariens aigus (SCA) et de plus de 50 % des AVC (Baudinb et Cohen, 2009).

En Algérie, 50 000 décès dus aux infarctus et aux accidents vasculaires cérébraux sont enregistrés annuellement. Selon une enquête réalisée par l'OMS en 2002, les maladies non transmissibles représentent 32,8 % des causes de mortalité en Algérie. Les pathologies cardiovasculaires viennent en tête dans cette catégorie avec un taux de 23,9 %. Additionnées à l'hypertension artérielle, elles représentent 44,5 % des cas de mortalité. Elles sont suivies par les cancers (16 %), les maladies respiratoires chroniques (7,6 %), le diabète sucré (7,4 %) et les maladies digestives 5,1 %. Les maladies transmissibles et les violences sont responsables de 41,2 % des décès (Bougherba, 2008).

I.1.2. Définition des maladies cardiovasculaires

Selon la Haute Autorité de Santé, dans la littérature médicale, les maladies cardiovasculaires sont les différentes atteintes du système circulatoire (cœur et vaisseaux) qui ont fréquemment en commun une physiopathologie liée à l'athérosclérose infra-clinique et responsable de mort prématurée (ANAES, 2004). En effet, cette définition inclut:

1. Les cardiopathies coronariennes (qui se rapportent aux artères qui alimentent le muscle cardiaque): Un blocage partiel d'une artère coronaire, peut entraîner une insuffisance de sang oxygéné (ischémie), provoquant des symptômes comme l'angine de poitrine (douleur thoracique) et la dyspnée (essoufflement). Le blocage complet d'une artère provoque une nécrose (dommage aux tissus) ou un infarctus du myocarde, couramment appelé crise cardiaque.
2. L'insuffisance cardiaque et les cardiomyopathies: L'insuffisance cardiaque survient lorsque l'activité de pompage du cœur ne permet pas d'atteindre le niveau de circulation sanguine dont le corps a besoin. Cet état peut être la conséquence de dommages au muscle cardiaque, par exemple une crise cardiaque, d'une consommation excessive d'alcool, ou d'une maladie du muscle cardiaque appelée myocardiopathie. Les personnes atteintes d'insuffisance cardiaque éprouvent habituellement un essoufflement et une enflure des jambes.
3. Les maladies cérébro-vasculaires (hémorragiques ou ischémiques, transitoires ou constitués, touchant les vaisseaux sanguins qui alimentent le cerveau): désigne un problème de circulation sanguine dans les vaisseaux du cerveau. Un blocage dont les effets durent moins de 24 heures est appelé un accident ischémique transitoire. Un blocage complet avec des effets à long terme constitue une thrombose cérébrovasculaire ou un AVC. Parfois, un vaisseau sanguin peut éclater dans le cerveau, causant des effets à long terme.
4. Les pathologies vasculaires périphériques (HTA, artériopathie oblitérante des membres inférieurs, anévrisme aortique,...): affecte principalement les vaisseaux sanguins qui alimentent les bras et les jambes. Les personnes atteintes se plaignent habituellement de douleurs aux mollets, en particulier en marchant.
5. La cardiopathie congénitale désigne un problème de structure du cœur, découlant d'une anomalie présente à la naissance. Il peut s'agir d'une anomalie très simple, comme une petite perforation de la paroi interne du cœur, ou d'un problème très complexe affectant la circulation sanguine dans le cœur et les poumons. Certaines

cardiopathies congénitales peuvent causer automatiquement le décès si une intervention chirurgicale immédiate pour les corriger n'est pas procédée. D'autres entraînent un degré variable d'invalidité, et peuvent être traitées par chirurgie au laser à un âge ultérieur, exigeant parfois plusieurs interventions.

6. Les cardiopathies rhumatismales: La maladie a son origine dans une infection bactérienne subie pendant l'enfance, qui affecte les articulations et les valvules cardiaques. Les problèmes cardiaques se manifestent de nombreuses années plus tard, et il faut souvent procéder à une intervention pour remplacer les valvules.

D'autres infections peuvent attaquer les tissus internes du cœur, y compris les valvules (endocardite), ou l'enveloppe externe du cœur (péricardite).

7. Les thromboses veineuses profondes et les embolies pulmonaires (obstruction des veines des jambes par un caillot sanguin, susceptible de se libérer et de migrer vers le cœur ou les poumons).
8. Les maladies du rythme ou de la conduction cardiaque (Newby et Grubb, 2006; Mendis *et al.*, 2011).

I.1.3. Les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires

Un facteur de risque cardiovasculaire se définit comme un état de nature physiologique (e.g; âge et sexe) ou pathologique (hypertension artérielle, diabète,...) ou encore lié à une habitude de vie (tabagisme, sédentarité,...); cet état étant alors associé à une augmentation du risque de survenue d'un événement cardiovasculaire donné, alors que la suppression ou l'amélioration de ce facteur diminue le risque (Jenicek et Cléroux, 1987).

Les recommandations européennes et américaines classent les facteurs de risque cardiovasculaire en 3 groupes selon leur degré d'imputabilité: majeurs, prédisposants ou discutés (Tab. 1). Ainsi, l'âge, l'hypertension artérielle, les dyslipidémies et le diabète ont été identifiés, avec le tabagisme, comme des principaux facteurs de risque cardiovasculaire. L'obésité, la sédentarité, les facteurs psychosociaux comme la précarité mais aussi l'origine géographique et le statut hormonal chez la femme sont considérés comme des facteurs de risque prédisposants et doivent être pris en compte dans une démarche de prévention primaire de l'hypertension artérielle, du diabète et des dyslipidémies. Cependant, ces facteurs ne suffisent pas toujours à expliquer ces pathologies. D'autres facteurs de risque sont discutés

comme les facteurs thrombogéniques, les marqueurs de l'inflammation ou les facteurs génétiques.

Les voies de l'inflammation, de l'adhésion cellulaire, du système immunitaire, de la croissance cellulaire, du métabolisme des lipides et des lipoprotéines, de la régulation de la pression artérielle, de la coagulation ou encore du stress oxydant, sont les principales voies biologiques susceptibles de contribuer au développement et à la progression des maladies cardiovasculaires, et notamment au processus athérosclérotique. La régulation de l'homéostasie des lipides est particulièrement intéressante puisque des concentrations plasmatiques élevées en cholestérol (Chol) total, en cholestérol-LDL (*Low Density Lipoprotein*), en apolipoprotéine B, en triglycérides (TG) ou des concentrations faibles en cholestérol-HDL (*High Density Lipoprotein*) et en apolipoprotéine A1 sont des facteurs pro-athérogènes prédictifs du risque cardiovasculaire et puisque la connaissance du profil lipidique peut prédire les personnes à risque avant l'apparition de la pathologie (Marzolini *et al.*, 2004).

La prise en compte des facteurs génétiques et/ou d'interactions gènes-environnement peut ainsi permettre de découvrir de nouveaux facteurs de risque. Certaines pathologies cardiovasculaires, comme les hypercholestérolémies familiales, sont d'origine monogénique et ont été facilement identifiées par l'étude de quelques familles porteuses. Mais la plupart de ces pathologies sont complexes et de multiples facteurs génétiques et environnementaux contribuent à leur développement et à leur progression dans la population générale (**Tab. 2**) (Klucken *et al.*, 2000). L'un des challenges consiste à identifier les polymorphismes génétiques fréquents qui indépendamment peuvent ne conférer qu'un risque modeste mais qui, collectivement, peuvent donner un profil à haut risque. Cet aspect multifactoriel rend difficile l'étude interindividuelle de la susceptibilité à ces pathologies.

Tableau 1. Différents facteurs de risque cardiovasculaires identifiés (Efferth, 2003).

Lien de causalité	Facteur de risque identifié	Impact du facteur de risque
Facteurs de risque majeurs	- Tabagisme - Hypertension artérielle - Élévation du cholestérol total - Élévation du LDL-cholestérol - Diminution du HDL-cholestérol - Diabète de type 2 - Age	- Effet multiplicateur du risque cardiovasculaire indépendamment des autres facteurs de risque
Facteurs de risque prédisposants	- Obésité androïde - Sédentarité - Antécédents familiaux de maladie coronarienne précoce (H<55 ans, F<65 ans) - Origine géographique - Précarité - Ménopause	- Effet potentialisateur lorsqu'ils sont associés aux facteurs de risque majeurs
Facteurs de risque discutés	- Élévation des triglycérides - Lipoprotéines LDL petites et denses - Élévation de l'homocystéine - Élévation de la lipoprotéine A - Facteurs prothrombotiques (fibrinogène, inhibiteur de l'activateur du plasminogène) - Marqueurs de l'inflammation (CRP, IL-6) - Facteurs génétiques - Facteurs infectieux (<i>Chlamydia pneumoniae</i>, <i>Helicobacter pylori</i>, <i>cytomégalovirus</i>)	- Associé à un risque augmenté de maladie cardio-vasculaire (coronarienne et/ou vasculaire cérébrale) mais le degré d'imputabilité est méconnu

H: homme; F: femme; CRP: C reactive protein; IL-6: interleukine 6; LDL: low density lipoprotein.

Tableau 2. Principaux polymorphismes impliqués dans les pathologies cardiovasculaires
(Maumus *et al.*, 2003).

Métabolisme lipidique							
ADRB3	Trp64Arg						
Apo(a)	C(93)T	G(121)A					
Apo AIV	Thr347Ser	Glu360His					
Apo B	Thr71Ile	Arg3500Gln					
Apo CIII	C(-641)A	C(-482)T	T(-455)C	C(1100)T	C(3175)G	T(3206)G	T(-625)del
Apo E	Cys112Arg	Arg158Cys					
CETP	C(-628)A	Ile405Val	Asp442Gly	G(+1)A	(+3)T		
LDL récepteur	Exon 18Ncol +/-						
Lipase hépatique	C(-480)T						
LPL	T(-93)G	Asp9Asn	Asn291Ser	Ser447Ter	T(-39)C		
Paraoxonase 1	Met55Leu	Gln192Arg					
Paraoxonase 2	Ser311Cys						
Pression artérielle							
a-adducine	Gly460Trp						
ADRB2	Arg16Gly	Gln27Glu					
AGT	Met235Thr						
ANP	Val7Met	T(2238)C					
AT1R	A(1166)C						
Cyp2c9	C(430)T	A(1075)C	T(1076)C				
Cyp2c19	C(99)T	G(681)A	A(991)G				
ACE	Alu élément I/D	Intron 16					
E Na Ca	Trp493Arg	Thr663Ala					
GNB3	C(825)T						
NO Synthase	T(-786)C	Glu298Asp					
PPAR-γ	Pro12Ala						
Métabolisme de l'homocystéine							
CBS	Ile278Thr	Exon 8 insertion					
MTHFR	C677T(Ala/Val)						
Thrombose							
Facteur II (prothrombine)	G20210A						
Facteur V	Arg506Gln						
Facteur VII	(-323)10-pb Ins/del	Arg353Gln					
Fibrinogène	Chaîne β G(-455)A						
GPIa	G(873)A						
GPIIIa	Leu33Pro						
PAI	5G4G	C(11053)T					
Adhésion cellulaire, inflammation							
ELAM	Ser128Arg	Leu554Phe					
ICAM	Gly214Arg						
NOS3	A(-948)G	C(-690)T	Glu298Asp				
STMY1	Promoteur 5A/6A						
TNF(α,β)	G(-308)A	G(-238)A	Thr26Asn				

L'évaluation et la prise en charge des maladies cardiovasculaires se sont historiquement fondées sur les facteurs de risque traditionnels, comme l'hypertension, la dyslipidémie, l'obésité et le tabagisme (Saito *et al.*, 2003). Si l'importance des facteurs de risque en cause est bien établie, les recherches récentes ont mis en évidence l'importance d'autres facteurs de risque dans la pathogenèse et l'évolution de la maladie cardiovasculaire (Ridker *et al.*, 2001). Certains des facteurs de risque en question connaissent une implication croissante, notamment le fibrinogène, la lipoprotéine a, la C-réactive protéine ultrasensible (CRP-us) et l'homocystéine (Boushey *et al.*, 1995).

I.2. Homocystéine, un facteur de risque modifiable de MCV

Découvert en 1932, l'homocystéine est restée dans l'anonymat pendant plusieurs décennies. Ce n'est qu'en 1968 que le Dr Kilmen McCully, chercheur de l'université de HAWARD a mis en évidence de lésions athéromateuses avancées lors d'autopsie de sujets atteints d'homocystinurie. McCully émet l'hypothèse que l'homocystéine était une cause d'athérosclérose et pouvait être considérée comme un facteur de risque indépendant des maladies cardiaques. Depuis, de nombreuses études, expérimentales et observationnelles, ont établi que l'homocystéine augmente d'une part le stress oxydatif (Sengupta *et al.*, 2001), et d'autre part la dysfonction endothéliale (Eberhardt *et al.*, 2000) et l'activité procoagulante (Perta-Kaján *et al.*, 2007). En effet, les personnes ayant un niveau élevé d'homocystéine sont plus vulnérables aux accidents cardio-vasculaires, maladies rénales, maladies de l'œil, trouble de l'érection et certains types de cancers (leucémies) (De Bree *et al.*, 2002).

I.2.1. Métabolisme de l'homocystéine et les vitamines du groupe B

L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé soufré provenant de la déméthylation de la méthionine alimentaire. L'Hcy est synthétisée par toutes les cellules de l'organisme. Le foie et les reins sont les deux organes où l'Hcy est principalement catabolisée, ceci se fait à travers l'une des deux voies vitamine-dépendantes (la voie de la reméthylation et la voie de la trans-sulfuration), en plus d'une troisième, non vitamine-dépendante, exclusivement hépatique (**Fig. 1**) (Guilland et Lequeu, 1992).

Dans la voie de reméthylation, deux réactions enzymatiques distinctes assurent la reméthylation de l'Hcy en méthionine.

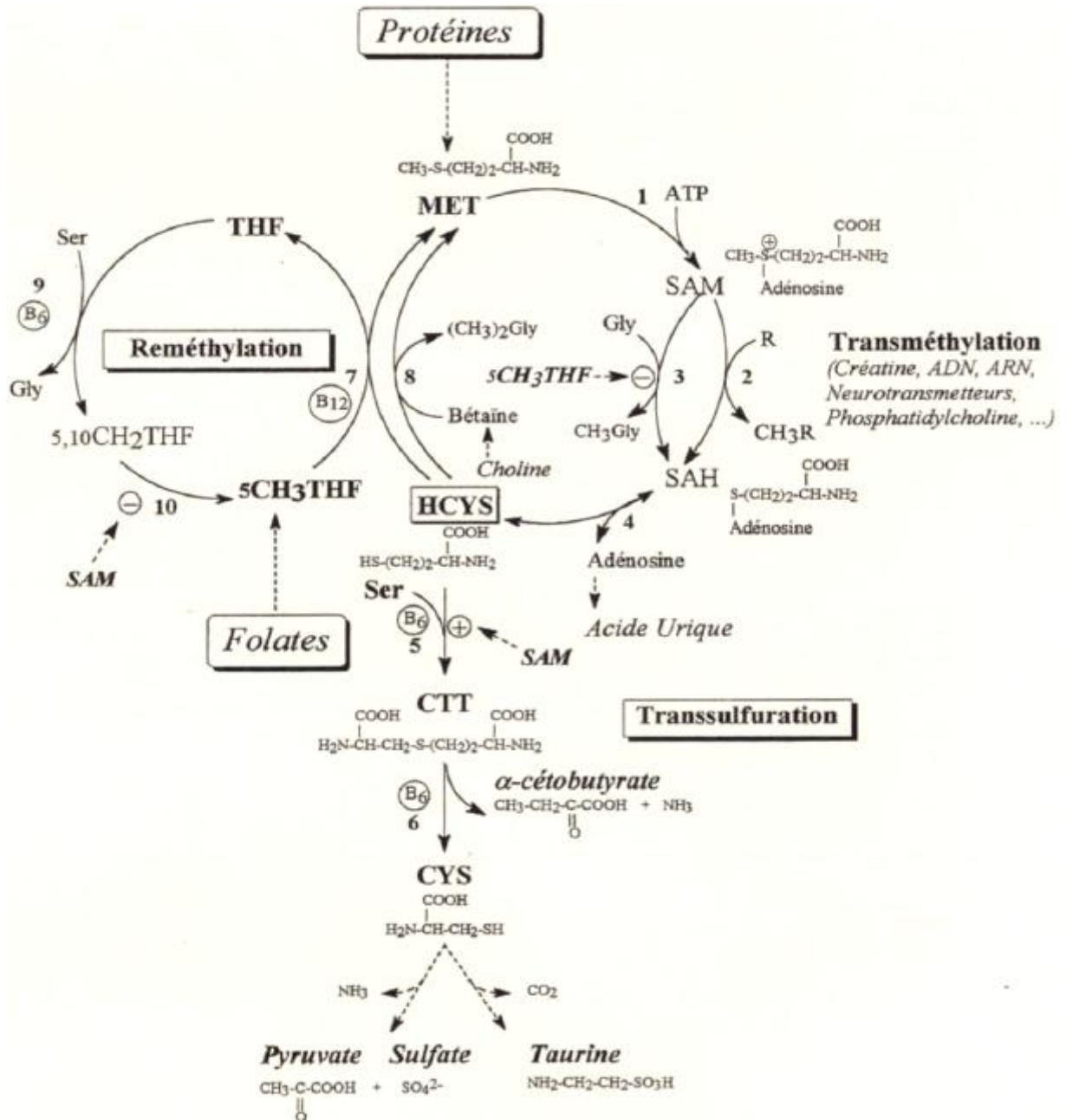


Figure 1. Métabolisme de l'homocystéine (Durand et al., 1998).

(1) Activation de la méthionine (MET) par l'ATP sous l'action de la méthionine S adényltransférase; (2) déméthylation de la S-adénylméthionine (SAM) en S adénylhomocystéine (SAH) et méthylation d'un accepteur R en RCH₃; (3) déméthylation alternative catalysée par la glycine N-méthyltransférase qui convertit la glycine (Gly) en sarcosine (CH₃Gly); (4) hydrolyse de la SAH en homocystéine (HCYS) et en adénosine par la S-adénylhomocystéine hydrolase; (5) condensation de la sérine (Ser) avec l'HCYS pour former la cystathionine (CTT) sous l'action de la cystathionine β-synthase dépendante du pyridoxal-5'-phosphate, dérivé de la vitamine B₆; (6) conversion de la CTT en cystéine (CYS) et en α-cétobutyrate par la γ-cystathionase dépendante du pyridoxal-5'-phosphate; (7) déméthylation du N⁵-méthyltétrahydrofolate (5CH₃THF) en THF et reméthylation de l'HCYS en MET sous l'action de la méthionine synthase dépendante de la formation de méthylcobalamine à partir de cobalamine dérivée de la vitamine B₁₂; (8) dans le foie, reméthylation de l'HCYS par la bétaine-homocystéine méthyltransférase en présence de bétaine issue de la choline; (9) synthèse de N⁵,N¹⁰-méthylène THF (5,10CH₂THF) à partir du THF associée à la conversion de la Ser en Gly sous l'action de la sérine hydroxyméthyltransférase dépendante du pyridoxal-5'-phosphate; (10) réduction du 5,10CH₂THF en 5CH₃THF sous l'action de la N⁵,N¹⁰-méthylène tétrahydrofolate réductase.

La principale réaction fait intervenir deux enzymes: la 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR), et la méthionine synthase (MS). Le 5-méthyl-tétrahydrofolate (5-Meth-THF) cède son groupe méthyle à l'homocystéine sous l'action de la MS et de son coenzyme, la cobalamine (vitamine B12). Le THF, produit déméthylé du 5-Meth-THF, reçoit un méthylène de la sérine, formant le 5,10-méthylène-THF. Sous l'action de la MTHFR, le 5,10-méthylène-THF est réduit en 5-Meth-THF (Ueland *et al.*, 1993; Chadeaux-Vekemans *et al.*, 2002). Ce transfert du groupe méthyle, qui permet la synthèse de la méthionine, nécessite des apports suffisants en acide folique principalement ainsi qu'en vitamine B12 comme cofacteurs; d'où la synergie d'action entre la vitamine B9 et la vitamine B12.

La deuxième réaction est de faible activité et indépendante des folates et de la cobalamine, elle utilise la conversion de la bétaine en N,N-diméthylglycine sous l'action de la bétaine-homocystéine méthyle transférase (BHMT), principalement dans le foie. Cette voie permet de maintenir la concentration tissulaire en méthionine à un niveau suffisant pour assurer la synthèse de la S-adenosyl-L-méthionine (SAM) en cas d'une déficience en folates. Mais la BHMT est moins importante que la MS car la BHMT n'est exprimée chez l'homme qu'au niveau du foie et du rein (Sunden *et al.*, 1997). En effet, en fonction du tissu considéré et du statut protéique, l'importance relative de ces deux voies de reméthylation varie.

La S-adenosylméthionine synthase (ou méthionine-adenosyl-transférase; MAT), catalyse la synthèse de S-adenosyl-méthionine (SAM) à partir d'ATP et de méthionine. Tous les organismes possèdent un ou deux des trois isoforme de la MAT: MATI, MATII et MATIII (Chamberlin *et al.*, 2000). Ce transfert du groupe méthyle, qui est catalysé par des méthyltransférases, induit la synthèse de S-adenosylhomocystéine (SAH).

La SAH, formée dans les réactions de méthylation, est ensuite hydrolysée en homocystéine et adénosine grâce à l'action catalytique de la SAH hydrolase. L'Hcy devient disponible pour démarrer un nouveau cycle de transfert de méthyle.

Dans la voie de trans-sulfuration, l'homocystéine se condense avec la sérine pour donner la L-cystathionine sous l'action de la cystathionine β synthase (CBS). La L-cystathionine est ensuite hydrolysée en cystéine et α -cétobutyrate par la γ -cystathionase (Blacher *et al.*, 2005). Ces deux réactions nécessitent la présence d'un cofacteur, le pyridoxal 5' phosphate ou vitamine B6.

Cette dernière voie ne se déroule qu'au niveau du foie, du rein, de pancréas et d'intestin (Brosnan *et al.*, 2004). Elle est irréversible, contrairement aux autres voies métaboliques, ce

qui a pour conséquence que la cystéine ne peut être un précurseur pour la synthèse de méthionine. Ce fait revêt surtout une importance dans le cadre de recommandations diététiques (McCully et Wilson, 1975; De Bree *et al.*, 2001).

I.2.2. Les différentes formes physicochimiques d'homocystéine circulantes

Du fait de sa cytotoxicité, l'Hcy est rapidement éliminée *via* le plasma. Ce mécanisme d'élimination hors des cellules, complète le catabolisme de l'Hcy par la voie de la trans-sulfuration permettant de maintenir des concentrations intracellulaires basses et précisément régulées inférieures à 1 $\mu\text{mol/L}$ (Zittoun, 1998).

Le plasma humain contient des quantités oxydées et réduites (98 % et 1 à 2 %, respectivement) d'homocystéine (McCully et Wilson, 1975). L'homocystine constitue la forme dimérique oxydée (pont disulfure) de l'homocystéine présente de manière permanente dans les milieux biologiques, car l'oxydation est spontanée et rapide. La forme réduite s'appelle homocystéine. Les formes du bisulfure existent également avec de la cystéine et avec des protéines contenant les résidus réactifs de cystéine (homocystéine liée aux protéines) (Ueland *et al.*, 2000). Les dernières formes oxydées sont désignées sous le nom des disulfides mélangés (**Fig. 2**).

Notre organisme synthétise environ 20 mmoles par jour d'homocystéine, mais très peu comparativement se retrouve dans le sang. Elle existe soit sous forme libre (30 %), soit liée aux protéines (70 %) principalement l'albumine (Mouchabac, 2008). Le devenir de l'Hcy plasmatique n'est pas bien connu. Chez les sujets sains, l'excrétion rénale est faible, compte tenu de la concentration d'Hcy libre. Il est possible que l'Hcy plasmatique soit captée par les cellules et ensuite métabolisée (Zittoun, 1998).

I.2.3. Déficits enzymatiques et pathogenèse de l'hyperhomocystéinémie

Sur la base des travaux menés, la gamme de la concentration totale en homocystéine dans le plasma « des adultes à jeun en bonne santé » est 5–15 $\mu\text{mol/L}$ (Ueland *et al.*, 1993), (**Tab. 3**). Le taux d'homocystéine reste stable dans la durée et de très faibles variations sont observées, faisant conclure que les taux mesurés lors d'un examen biologique sont valides et peuvent être utilisés dans des études cliniques (Ueland *et al.*, 1993). Ces valeurs peuvent varier selon du sexe (normales hommes supérieures aux normales femmes), de l'âge (pour les femmes elles sont plus basses avant 50 ans, après 50 ans les valeurs rejoignent celles des hommes); chez les enfants (3-14 ans) les concentrations normales sont plus basses et se situent autour de 6 $\mu\text{mol/L}$ (Mouchabac, 2008).

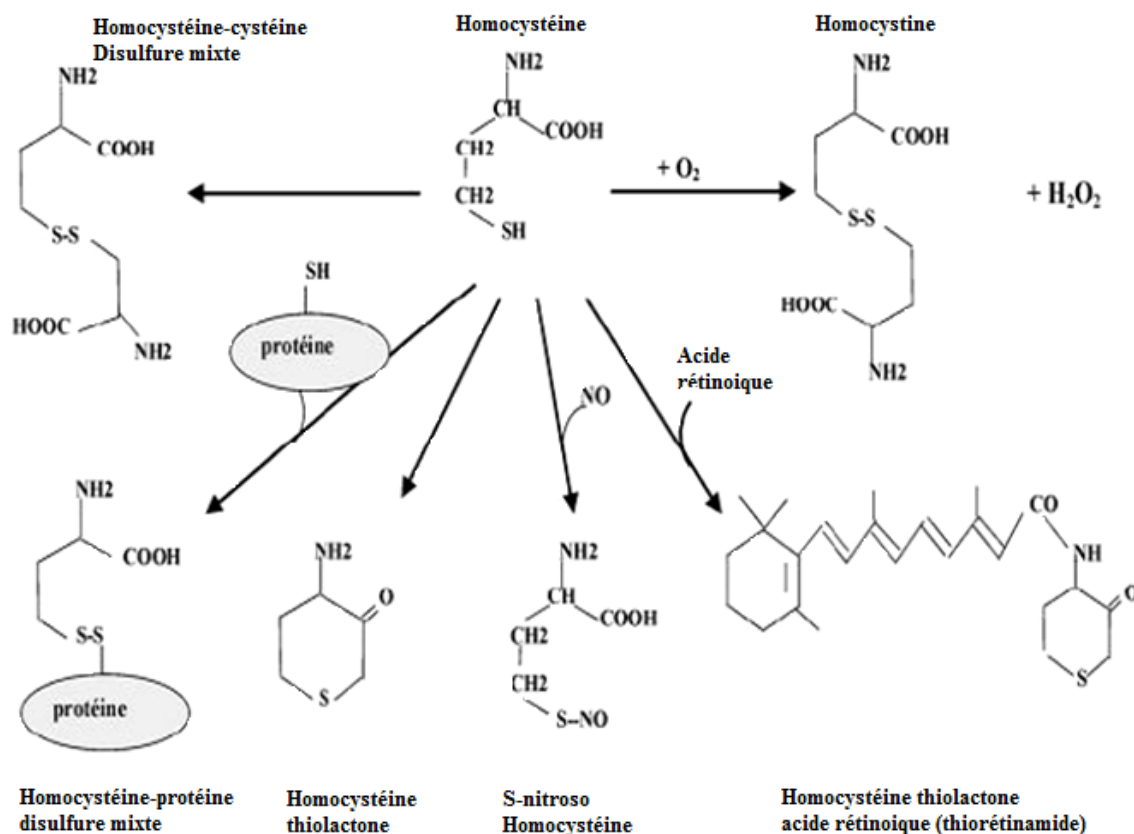


Figure 2. Illustration de toutes les formes de l'Hcy présentes dans le plasma (Selhub, 1999).

La première cause d'hyperhomocystéinémie rapportée était liée à un déficit homozygote en cystathionine β -synthase. Par la suite, il est apparu que les causes sont très nombreuses, concernant des déficits héréditaires de la voie de reméthylation, mais aussi de la voie de trans-sulfuration, ainsi que les anomalies héréditaires ou acquises du métabolisme des co-facteurs de ces enzymes, c'est-à-dire la vitamine B6, la vitamine B12 et l'acide folique (Kang *et al.*, 1988 b; Chango *et al.*, 2000). Une hyperhomocystéinémie est aussi associée à une créatinémie élevée, au tabagisme, à la consommation de café, à l'alcoolisme et à la prise de plusieurs médicaments (tels que les antifolates et l'oxyde nitreux) (Refsum *et al.*, 1998) (**Tab. 3**).

Certains travaux ont prouvé que le risque pour la maladie cardiovasculaire est représenté par un continuum de concentration totale en homocystéine, avec le risque substantiel se produisant entre 10 et 15 $\mu\text{mol/L}$ (Robinson *et al.*, 1995). Les événements cardiovasculaires surviennent dans la plupart des cas, avec des hyperhomocystéinémies modérées (15–25 $\mu\text{mol/L}$) (Ueland *et al.*, 1992; Green et Jacobsen, 1995). Cependant, le taux de l'homocystéine totale (t-Hcy) peut atteindre les concentrations intermédiaires si la fonction rénale est altérée (25–50 $\mu\text{mol/L}$) (Dennis et Robinson, 1996; Bostom et Lathrop, 1997).

Tbleau 3. Valeurs normales et pathologiques d'homocystéine (Kang *et al.*, 1992)

	Homocystéine (μmol/L)
Normale	5-15
Souhaitable	<10
Hyperhomocystéinémie	
Modérée	16-30
Intermédiaire	31-100
Sévère	>100

I.2.4. Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie

Les déterminants de l'homocystéine totale plasmatique sont complexes et impliquent des facteurs nutritionnels, génétiques et environnementaux (Dierkes et Westphal, 2005; McCully, 1996) (**Tab. 4**).

A. Facteurs nutritionnels

Un apport important de méthionine peut majorer ce taux, en théorie cette augmentation devrait être rapidement régulée, grâce aux voies précédemment décrites.

Un déficit en folate (vitamine B9) ou en Vit B12, bien souvent lié à un processus carenciel ou une malabsorption d'origine digestive, va avoir des répercussions sur le cycle de transformation de l'homocystéine, mais de manière moins importante qu'une carence prolongée en Vit B6. Cette dernière conduit à une élévation majeure de l'homocystéinémie en cas d'apport oral important de méthionine (Mouchabac, 2008).

La carence en folates est fréquente (16 à 22 % de la population générale aux États-Unis avant 1998, année de mise en place d'une supplémentation systématique des farines alimentaires en acide folique), elle entraîne une élévation des taux d'homocystéine plasmatique (Pfeiffer *et al.*, 2005). Cependant, la carence en vitamine B12 concerne essentiellement le sujet âgé (5 % des personnes âgées de 65 ans, 20 % des plus de 80 ans), elle devient de fait plus déterminante du niveau d'homocystéine plasmatique que l'acide folique chez le sujet âgé (Clarke *et al.*, 2004).

Tableau 4. Principales causes de l'HHcy (Bottiglieri, 2005; Mouchabac, 2008).

	HHcy modérée	HHcy intermédiaire	HHcy sévère
Concentration sanguine	12-30 $\mu\text{mol/L}$	31-100 $\mu\text{mol/L}$	>100 $\mu\text{mol/L}$
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		

A.1. Les 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 (Davis et Nicol, 1988).

A.1.1. 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) (**Fig. 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) (Abdelmouttaleb *et al.*, 2000; Allen, 2004; Bollander-Gouaille, 2002; Durand *et al.*, 1996).

Les folates alimentaires se retrouvent principalement dans les végétaux (épinards, salades, luzerne, grains de maïs et ses dérivés), les fruits (orange), dans le foie des animaux et dans certaines préparations de levures ou de bactéries (McDowell, 2000). Ces folates naturels sont sensibles à la lumière, facilement oxydables et thermolabiles (Lucock, 2000; Mebart, 2006). La cuisson détruira jusqu'à 80 % des folates présents (Joubert *et al.*, 2002). Ils se trouvent protégés, aussi bien dans les aliments que dans l'organisme par la vitamine C (acide ascorbique), un puissant agent antioxydant, qui a la propriété de limiter fortement l'oxydation des molécules réduites (Lucock, 2000).

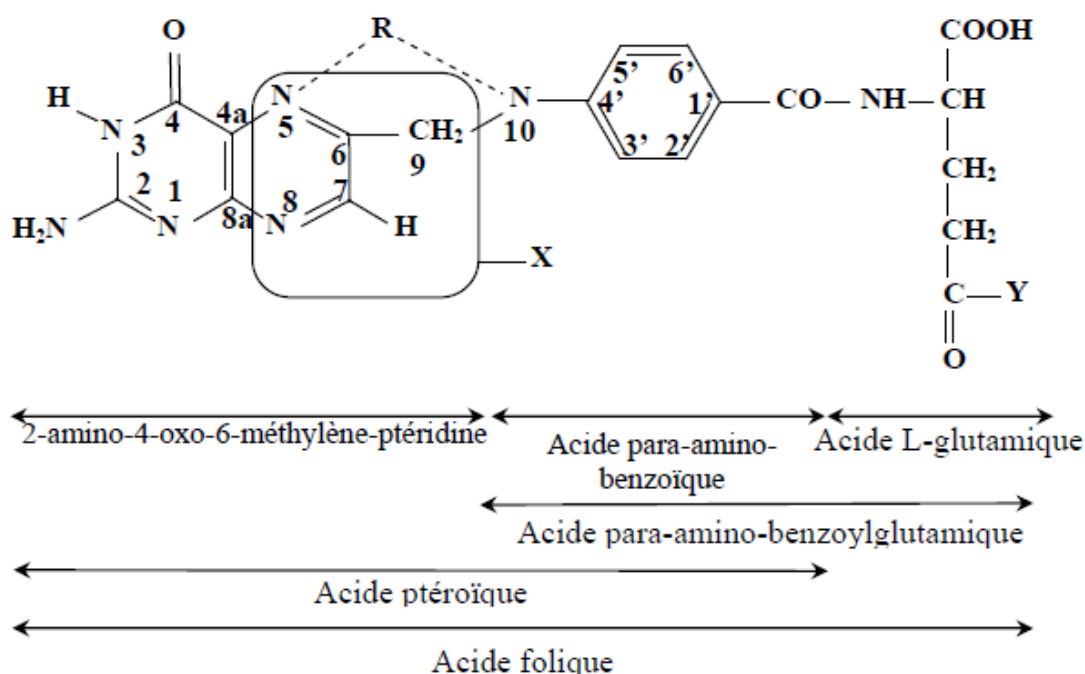


Figure 3. Structure chimique de l'acide folique (ou acide ptéroylglutamique) (voir le **tableau 5** pour la signification de R, X et Y) (Lucock, 2000).

A.1.2. Déficit en folates

Une carence en folates est probablement la cause la plus importante et la plus étudiée d'une hyperhomocystéinémie. Une étude a montré que les taux plasmatiques des folates sont corrélés négativement aux taux d'homocystéine chez les adultes sains et les patients atteints de maladie coronaire; les vitamines B12 et B6 ne sont pas les déterminants principaux de la concentration plasmatique d'homocystéine (Lee *et al.*, 2003). Contrairement à ces dernières vitamines qui jouent un rôle de cofacteurs pour des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'Hcy, les folates sont utilisés comme substrat. Ce sont des donneurs de méthyle dans la réaction de conversion d'Hcy en méthionine (De Bree *et al.*, 2001). Dans une étude

hollandaise portant sur 234 enfants, il a été rapporté que plus les taux plasmatiques de folates étaient bas, plus la concentration d'homocystéine était élevée (Van *et al.*, 2005).

Les doses d'acide folique utilisées pour diminuer l'homocystéinémie diffèrent en fonction des essais cliniques; elles varient de 0,4 mg/jour (apport nutritionnel recommandé; FAO/WHO, 2001) à des doses de 5 mg/jour ou plus (Antoniades *et al.*, 2009). Or, une étude menée en 1994 par le CDC (Centers for Disease Control and prevention) estimait à 275 µg l'apport moyen journalier d'une personne vivant aux Etats-Unis. En effet, 15 % de la population aux Etats-Unis présente des signes de carence en vitamine B9 (Alaimo *et al.*, 1994).

Un apport en folates d'au moins 0,4 à 0,5 mg/jour associé ou pas à des apports suffisants de vitamine B6 (16,5 mg/jour) et de vitamine B12 (0,5 mg/jour) a été décrit comme nécessaire pour garder un taux normal d'Hcy sanguin au sein d'une population (Malinow *et al.*, 1999; Ducros *et al.*, 2002). Un supplément de 0,5 à 5,0 mg/jour d'acide folique diminue de presque 25 % le taux d'Hcy dans le plasma (Clarke *et al.*, 1998).

Aux États Unis, la fortification des aliments à base de céréales par l'acide folique a baissé la proportion des sujets ayant un taux d'Hcy élevé ($>15 \mu\text{mol/L}$) de 41 % à 28 % (Anderson *et al.*, 2004). Au Canada, la moyenne du taux d'Hcy plasmatique est passée de 13,6 à 12,3 µmol/L chez les personnes âgées et de 10,0 à 8,9 µmol/L chez les femmes de 19 à 44 ans (Shiliang *et al.*, 2003).

De nos jours, la déficience en folate est une des carences vitaminiques les plus fréquentes dans le monde et pose un problème de santé publique aussi bien dans les pays en voie de développement que dans les pays industrialisés. La déficience en folates peut avoir lieu à tout âge et est souvent le résultat d'une malnutrition, d'une malabsorption, d'alcoolisme ou encore d'utilisation de certains médicaments (Refsum *et al.*, 2004).

A.1.3. Métabolisme et fonctions biologiques des folates

A.1.3.1. Métabolisme

• Absorption

Les folates polyglutamates, qui constituent les formes naturellement présentes dans les aliments, doivent être hydrolysés en leurs formes monoglutamates avant leur absorption par la muqueuse intestinale (McDowell, 2000; Smulders et Stehouwer, 2005). En effet, au niveau gastrique, les folates ne subissent aucune modification mais l'acidité de l'estomac augmente leur instabilité (Seyoum et Selhoub, 1998).

Cette hydrolyse peut être catalysée par 2 types de conjuguases, l'une issue des sécrétions pancréatiques (γ -glutamyl hydrolase, γ GH) et l'autre associée à la membrane de la bordure en brosse jéjunale (glutamate carboxypeptidase IV, GCPIV) (Gregory, 2001) (**Fig. 4**).

L'absorption des folates monoglutamates se produit dans le jéjunum (Girard et Remond, 2003) par 2 processus distincts: l'un actif et saturable à un pH optimum acide (Gregory, 2001) et l'autre par diffusion passive lorsque les concentrations en acide folique deviennent supérieures à 10 μ M (Blair *et al.*, 1974). Une fois absorbés dans la cellule intestinale et avant d'être libérés dans la veine porte, les folates monoglutamates sont réduits grâce à la dihydrofolate réductase en THF, et subissent une méthylation (5-MTHF) ou une formylation (Le Grusse et Watier, 1993; Smulders et Stehouwer, 2005). Le méthyl-THF ne subit aucune modification alors que les ptéroylmonoglutamates (PtéGlu₁) seront préalablement réduits en DHF par hydrogénation en 7-8 du noyau ptéridine puis en THF par addition d'une paire d'atome d'hydrogène en 5-6 et enfin méthylés et convertis en 5MTHF (Lucock, 2000) qui sera la forme plasmatique circulante de la vitamine (Herbert *et al.*, 1962; Lucock *et al.*, 1989). Pour les fortes doses, une partie de l'acide folique arrive dans le sang portal sans modification (non méthylée) (**Fig. 4**).

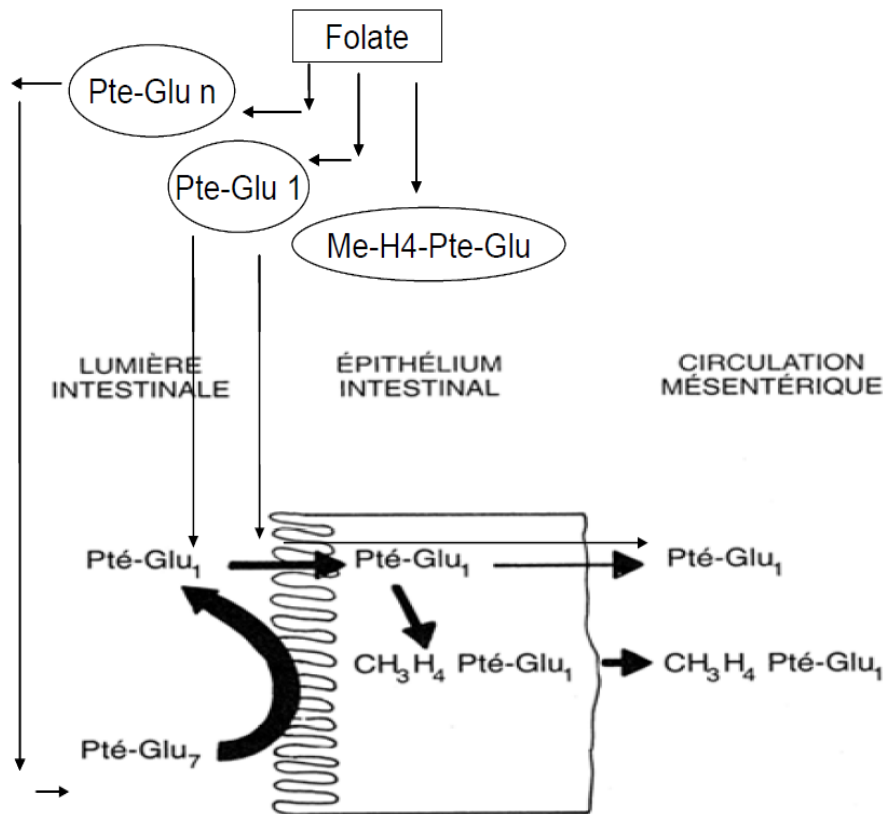


Figure 4. Absorption des folates (Brody, 1999).

• **Transport**

Les folates circulent principalement sous forme de 5-méthyl-THF (Zittoun, 1994) où 90 % de l'activité folique est localisée dans les hématies alors qu'uniquement 10 % résident dans le plasma (Searcy, 1969).

Dans le plasma, les folates peuvent circuler aussi bien sous forme libre que sous forme liée aux protéines (Searcy, 1969). Dans ce dernier cas, deux types de ligands transportent les folates dans le sang :

- Ligands de faible affinité: protéines non spécifiques représentés par l'albumine, l'alpha-2-macroglobuline et la transferrine (Lucock, 2000).
- Ligands de haute affinité: serum folates binding proteins (S-FBP) abondants dans le plasma (Lucock, 2000) mais qui augmentent dans certaines situations comme la déficience en folate (Waxman et Schreiber, 1973), ou au cours des grossesses (da Costa et Rosenberg, 1974).

Le 5 MTHF plasmatique est transféré en grande partie au foie (dont une partie rejoint le cycle entérohépatique). En effet, durant l'abstinence, les folates accumulés dans les cellules hépatiques et ailleurs se perdent rapidement, mais le cycle entérohépatique permet de maintenir le niveau des folates sériques pendant plusieurs jours grâce à l'absorption des folates excrétés dans la bile (Herbert et Das, 1993).

La majorité des études montrent que les folates érythrocytaires sont essentiellement sous forme de 5MTHF, soit de formyl-THF (Lucock *et al.*, 2000) avec 5 à 6 résidus d'acide glutamique (folylpolyglutamate) (Lucock *et al.*, 2000; Perry *et al.*, 1976). Ils n'ont pas de rôle métabolique dans l'organisme. Ils représentent les réserves de l'organisme, et contrairement aux folates plasmatiques, ils ne sont pas influencés par l'alimentation (Lucock, 2000).

• **Distribution cellulaire**

Les folates sont transportés à travers les membranes cellulaires sous leur forme monoglutamates. Plusieurs systèmes sont impliqués; parmi les mieux caractérisés, il y a le transporteur des folates réduits (RFC, Reduced Folate Carrier) qui assure un transport facilité et bidirectionnel des folates et les récepteurs des folates qui permettent l'entrée des folates dans la cellule par endocytose (Matherly et Goldman, 2003).

Le taux intracellulaire de folates régule son transport transmembranaire. Une fois entré dans les cellules, le 5-MTHF est déméthylé sous l'action de la méthionine synthase (MS), vitamine B12 dépendante. Le 5-MTHF est converti en THF, qui peut assurer une variété de réactions cellulaires (Bannerjee et Matthews, 1990).

Le THF monoglutamate est reconverti en H4PteGln par l'enzyme folylpolyglutamate synthétase (FPGS) (Lavoie *et al.*, 1974; Shane, 1989). Cette polyglutamation permet d'une part la rétention des folates à l'intérieur de la cellule et d'autre part les polyglutamates sont de meilleurs substrats pour les enzymes folates dépendantes que les monoglutamates (Lucock, 2000).

• **Excrétion**

Le fait que seulement 1 à 2 % des folates alimentaires soient excrétés sous forme intacte dans les urines suggère que la majorité des folates sont catabolisés avant leur excrétion urinaire. La première étape de ce catabolisme est le clivage de la liaison du carbone 9 et de l'azote 10 des folates polyglutamates intracellulaires, conduisant à la production de ptéridines et de paraaminobenzoylpolyglutamates (pABGn). Ces derniers sont ensuite hydrolysés en monoglutamate (pABG) puis N-acétylés en acétamidobenzoylglutamate (apABG) au niveau hépatique avant leur élimination (Caudill *et al.*, 1998). Chez la femme, le catabolisme des folates est connu pour être augmenté pendant la grossesse. Selon les travaux de Higgins *et al.* (2000), l'apABG augmente de 70 % durant le premier trimestre de la grossesse.

L'excrétion biliaire de folates est très importante mais la plupart de ces folates seront réabsorbés au niveau de l'intestin grêle (cycle entérohépatique), une faible proportion seulement se retrouve dans les fèces (McDowell, 2000).

A.1.3.2. Fonctions biologiques

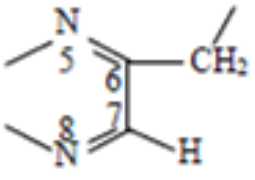
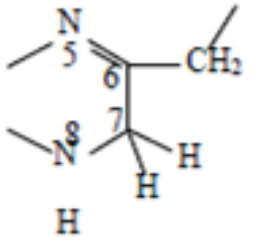
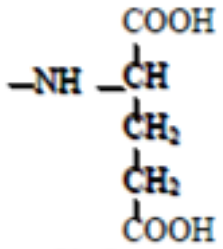
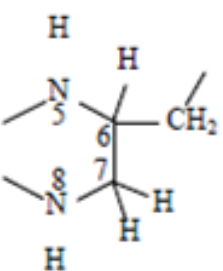
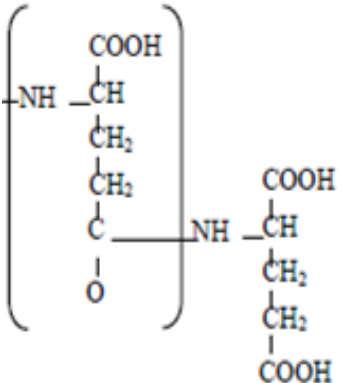
Dans le métabolisme vivant, le folate agit comme coenzyme, transporteur de fractions actives ou radicaux comportant un atome de carbone appelés unités monocarbonées. Ces dernières en se liant au THF, modifient son activité et sa fonction (Scott et Weir, 1994).

Ces unités monocarbonées peuvent être représentées essentiellement par le méthényle (-CH=), le méthylène (-CH₂-), le méthyl (CH₃-), le formyl (HCO-) et le formimino (HN=CH-) (Voet et Voet, 1998) (**Tab. 5**). Ces coenzymes foliques sont impliqués avec des enzymes spécifiques dans plusieurs réactions métaboliques essentielles.

L'étape cruciale et primaire du métabolisme des folates est la transformation de la serine, principal source de carbone, en glycine par la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT), qui aboutit à la conversion du THF en 5,10 méthylène tétrahydrofolate (5,10 MTHF) (Bender, 2002; Lynn *et al.*, 1999) (**Fig. 5**). Ce dernier, par sa fonction de donneur d'unités monocarbonées participe à la fois à la synthèse de la méthionine, des bases puriques et de l'acide thymidilique constitutifs de la molécule d'ADN. Il importe de savoir, qu'il existe

d'autres sources de carbone telles que le métabolisme de certains acides aminés, mais elle reste mineure.

Tableau 5. Principaux folates ayant une activité biologique (Bollheimer *et al.*, 2005).

X	R	Nom	Y
	—H sur N¹⁰ —CH₃ sur N¹⁰ —CHO sur N¹⁰	Acide folique (AF) 10-méthyl-AF (10-CH₃-AF) 10-formyl-AF (10-CHO-AF)	—OH monoglutamate
	—H sur N¹⁰ —CH₃ sur N⁵	Acide 7, 8-dihydro-folique (DHF) Acide 5-méthyl-DHF (5-CH₃-DHF)	 diglutamate
	—H sur N¹⁰ —CH₃ sur N⁵ —CHO sur N⁵ —CHO sur N¹⁰ =CH- sur N⁵ — N¹⁰ —CH₂- sur N⁵ — N¹⁰	5, 6, 7, 8-tétrahydrofolate (THF) 5-méthyl-THF (5- CH₃-THF) 5-formyl-THF (5-CHO-THF) 10-formyl-THF (10-CHO-THF) 5,10-méthényl-THF (5, 10-CH⁺-THF) 5,10-méthylène-THF (5, 10-CH₂-THF)	 polyglutamate (non diglutamate) 1 < m < 6

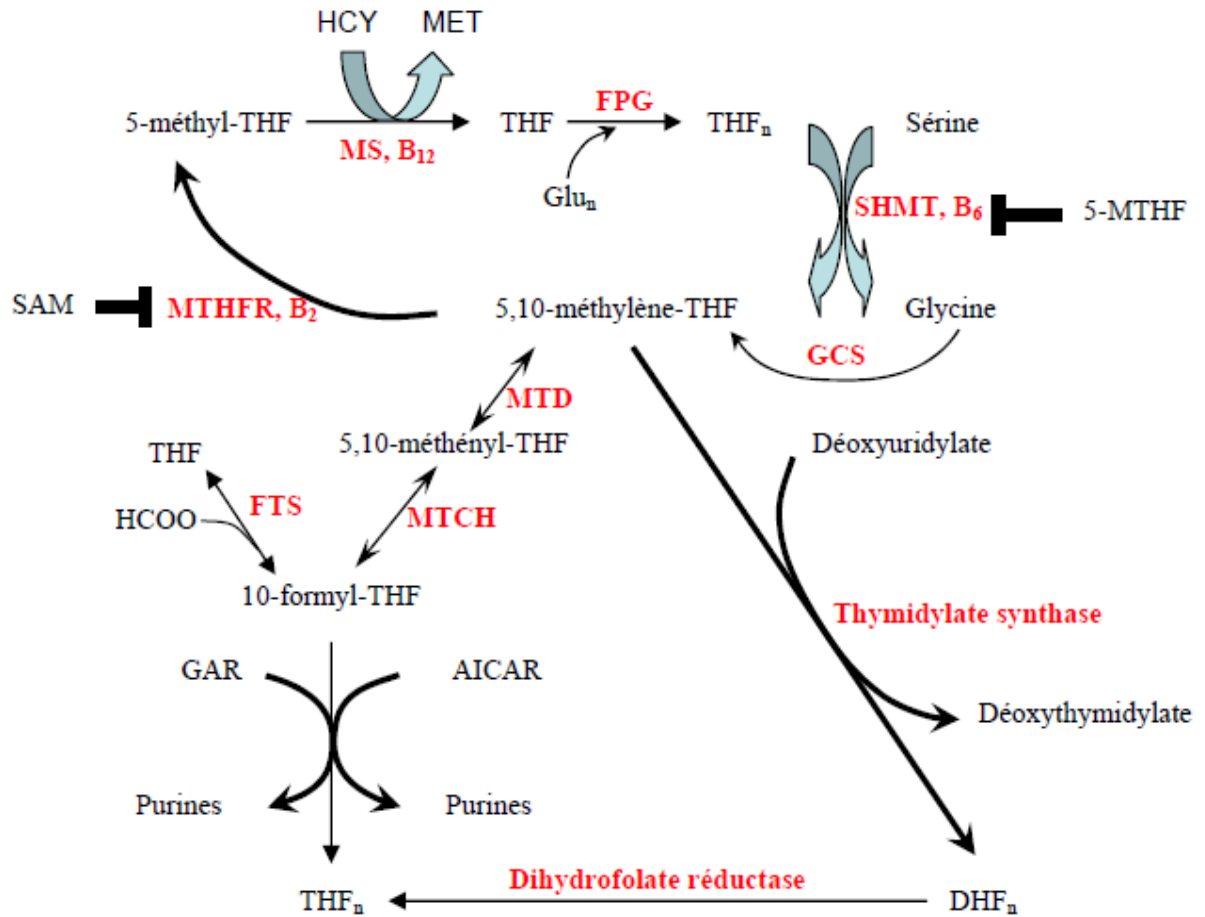


Figure 5. Métabolisme des unités monocarbonées dépendant de l'acide folique (Lucock, 2000).

AICAR, aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide; DHFn, dihydrofolate; HCOOH, acide formique; FPG, folypolyglutamate synthétase; FTS, 10-Formyl-THF Synthétase; GAR, glycinamide ribonucléotide; GCS, glycine cleavage system; Glun, glutamate; HCY, homocystéine; MET, méthionine; MS, méthionine synthase; MTD, 5,10-méthylène-THF déshydrogénase; MTCH, 5,10-méthényl-THF cyclohydrolase; MTHFR, 5,10-méthylène-tétrahydrofolate réductase; SAM, S-adénosylméthionine; SHMT, sérine hydroxyméthyltransférase; THFn, tétrahydrofolate.

A.2. La vitamine B12

A.2.1. Structure et définition

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 corrinoïdes. Elle est constituée d'un noyau corrine et d'un ribonucléotide reliés entre eux par un pont amino 2-propanol (**Fig. 6**).

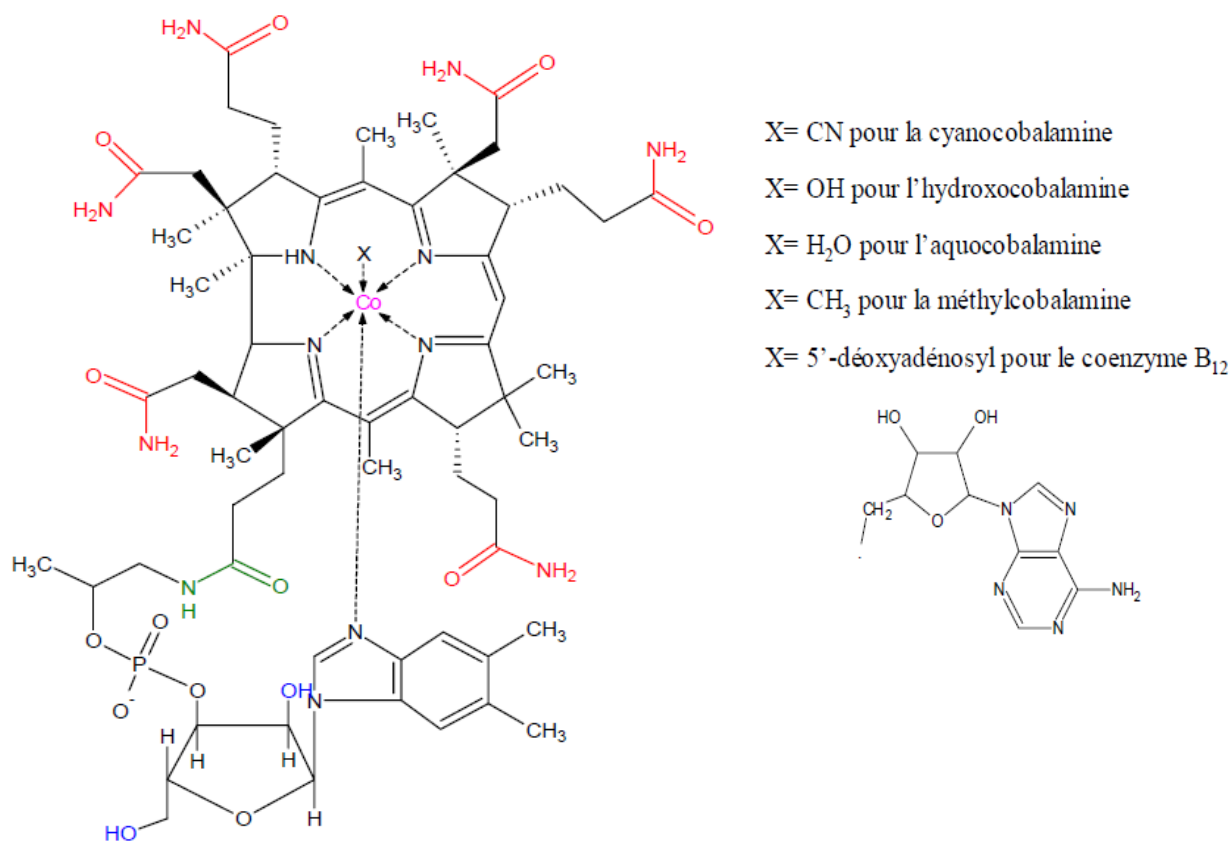


Figure 6. Structures chimiques des différentes cobalamines (Chen *et al.*, 1999).

Le noyau corrine est formé d'un atome de Co central relié à 4 noyaux pyrrole ainsi qu'à un radical anionique (-X) variable qui détermine le nom du composé vitaminique: la cyanocobalamine (-X=-CN), l'hydroxocobalamine (-X=-OH) (formes oxydées et stables), la méthylcobalamine (-X=-CH₃) et la 5'-désoxyadénosyl cobalamine (-X=-5'd Ad) (deux coenzymes réduits présents chez les mammifères) (Le Grusse et Watier, 1993). Seules deux formes de Cbl sont des coenzymes intervenant dans le métabolisme chez l'homme: la 5'-désoxyadénosyl-cobalamine (AdoCbl) et la méthylcobalamine (MeCbl) (**Tab. 6**).

Le ribonucléotide résulte de la condensation de la 5,6-diméthylbenzimidazole (base azotée) avec un sucre, le ribose 3' phosphate. Le groupement 5,6-diméthylbenzimidazole dont le groupe imidazole est relié au cobalt et le phosphate à l'un des noyaux pyrroles (McDowell, 2000).

Les réactions où intervient l'AdoCbl semblent être diverses de par de leur nature. En fait, elles sont toutes régies par un mécanisme de transfert d'hydrogène, l'AdoCbl se comportant comme un donneur ou un accepteur d'hydrogène. La principale réaction qui met en jeu la MeCbl comme coenzyme est la méthylation de l'homocystéine en méthionine. La MeCbl est un facteur coenzymatique d'un méthyle. Cette réaction permet la régénération du

tétrahydrofolate à partir du N₅-méthyl-tétrahydrofolate. Le blocage de cette réaction a deux conséquences:

- Le blocage de la régénération de la méthionine perturbe le métabolisme des acides aminés soufrés et explique l'excrétion urinaire augmentée d'homocystéine;
- L'absence de régénération du tétrahydrofolate empêche la régénération de 5,10-méthylène tétrahydrofolate, qui est un coenzyme de la thymidylate synthétase. Il y a donc blocage de la conversion de dUMP (désoxyuridyate) en dTMP (désoxythymidylate) et par voie de conséquence blocage de la synthèse de l'ADN. Ceci explique en partie mégalo blastose médullaire engendrée par la carence en Cbl (Guéant *et al.*, 1993).

Tableau 6. Rôle métabolique des formes coenzymatiques des cobalamines (Grasbeck et Gueant, 1990).

Coenzyme	Liaison substrat	Enzyme	Nomenclature	Réaction
AdoCbl	C-C	Glutamate- mutase	5.4.99.1	Acide glutamique ↔ β-méthylaspartate
		Méthylmalonyl-CoA mutase	5.4.99.2	L-méthylmalonyl-CoA ↔ succinyl-CoA
		Méthylène glutarate mutase	5.4.99.4	α-méthylène glutarate ↔ β- méthylitaconate
	C-O	1-2 propanediol hydrolyase	4.2.1.28	éthylèneglycol → acétaldéhyde + H ₂ O
				1,2 propanediol → propionaldéhyde + H ₂ O
		Glycéroldéshydratase	4.2.1.30	Glycérol → 3-hydroxypropionaldéhyde + H ₂ O
MeCbl	C-N	Ribonucléotide triphosphate réductase	1.17.4.2	Ribonucléotide → 2-désoxyribose + H ₂ O
		Ethanolamine ammonialyase	4.3.1.7	Ethanolamine → acétaldéhyde + NH ₄ ⁺
				2-aminopropanol → propionaldéhyde + NH ₄ ⁺
		Aminomutases	5.4.3.-	Déplacement de NH ₂
				α ou β lysine (de C ₆ à C ₅)
				ornithine (de C ₅ à C ₄)
		leucine (de C ₂ à C ₃)		
		Méthionine synthétase	2.1.1.13	Homocystéine → méthionine
				N ₅ -méthyltétrahydrofolate → tétrahydrofolate
		Méthane synthétase	2.1.1.-	H ⁺ → CH ₄
		Acétate synthétase	2.1.1.-	CO ₂ → acétate

A.2.2. Données nutritionnelles: sources alimentaires, besoins, carences

A.2.2.1. Sources alimentaires

La synthèse des corrinoïdes est réalisée à partir d'acide δ -aminolévulinique ou de porphobilinogène.

Les micro-organismes qui synthétisent les cobalamines sont des bactéries, des levures ou des algues. Un certain nombre d'entre eux sont présents dans la flore digestive des herbivores, notamment chez les ruminants. Les aliments qui contiennent de la Cbl sont donc, mis à part certaines plantes à rhizome, des aliments d'origine animale tels que les abats, le foie, les reins, mais aussi la viande, les œufs, le lait, les fruits de mer et le poisson (Guéant *et al.*, 1993).

Les teneurs en vitamine B12 sont très variables d'un aliment à l'autre: dans les aliments naturels, de $0,9 \text{ ng.g}^{-1}$ pour le yaourt à 650 ng.g^{-1} pour le foie de porc, dans les aliments complémentés, de 5 ng.g^{-1} pour le lait vitaminé à 80 ng.g^{-1} pour certaines préparations infantiles. Les teneurs en vitamine B12 dans les aliments sont par ailleurs très nettement plus faibles que celles des autres vitamines du groupe B (Souci *et al.*, 1994). La détermination de la vitamine B12 totale exige donc l'utilisation d'un mode de détection extrêmement sensible. Il existe de plus de nombreux composés analogues aux cobalamines qui ne sont pas métaboliquement actifs, mais qui peuvent interférer dans les dosages (Friedrich, 1975), ces molécules différant des cobalamines par la présence d'une base autre que le diméthylbenzimidazole.

A.2.2.2. Besoins, apports nutritionnels conseillés

Le régime alimentaire normal de l'homme dans les pays occidentaux apporte entre 5 et $15 \mu\text{g}$ par jour de vitamine B12. Les besoins sont variables selon l'âge (Guéant *et al.*, 1993). Les valeurs suivantes indiquent les ANC (Martin, 2001) pour différents groupes de population:

- De 1-3 ans, 4-6 ans, 7-9 ans, 10-12 ans et 13 à 15 ans: $0,8$; $1,1$; $1,4$; $1,9$ et $2,3 \mu\text{g/j}$,
- À partir de 16 ans, y compris personnes âgées: $2,4 \mu\text{g/j}$,
- Femmes enceintes: $2,6 \mu\text{g/j}$,
- Femmes allaitantes: $2,8 \mu\text{g/j}$.

Les données chez l'enfant sont issues d'estimation, car il n'existe pas de données épidémiologiques dans cette tranche d'âge.

A.2.2.3. Carence en vitamine B12

Chez l'homme, l'absence ou une diminution de synthèse du facteur intrinsèque (protéine intervenant lors de l'absorption intestinale de la vitamine B12) peut entraîner une carence suite à une malabsorption de la vitamine. Le résultat d'une carence en vitamine B12 chez l'homme est une anémie pernicieuse accompagnée d'autres signes cliniques aussi observés chez l'animal: lésions neurologiques, perte d'appétit et de croissance, faiblesse musculaire pour les principaux. Des troubles psychologiques et des inflammations de la peau et des muqueuses peuvent aussi se manifester lors d'un déficit en vitamine B12 (McDowell, 2000).

La prévalence de la carence en vitamine B12 est estimée dans des études d'observation transversales à 13 % en hôpital gériatrique (Rajan *et al.*, 2002), 4,8 % à 9,8 % en hôpital général (Chui *et al.*, 2001) ou même 12 % en population générale (Lindenbaum *et al.*, 1994). Une étude française a observée une prévalence de 3 % de taux plasmatique de B12 < 200 pg/ml, chez des personnes âgées volontaires (Dufouil C, données non publiées).

La carence en B12 s'accompagne classiquement d'une anémie macrocytaire, voire mégalo-blastique, mais il existe des carences sans macrocytose, et même sans anémie. La véritable anémie de Biermer est rare. La principale étiologie est la gastrite atrophique par défaut de libération de la B12 alimentaire. Ce processus est physiologique avec le vieillissement et se manifeste sous la forme d'une hypochlorhydrie qui, en diminuant le pH de l'estomac, limite la libération du support protéique alimentaire, auquel est fixée la B12 (**Tab. 7**).

Tableau 7. Les principales étiologies des carences en B12 (Czernichow *et al.*, 2002)

Origine	Etiologie	Mécanisme impliqué
Gastrique	Anémie de Biermer	Absence de FI
	Anémie pernicieuse juvénile	
	Gastrectomie	
	Gastrite atrophique	Diminution de sécrétion du FI Défaut de libération de la B12 alimentaire chez les sujets âgés
Malnutrition	Végétariens	Apports insuffisants

A.2.3. Métabolisme: absorption intestinale, distribution, transport, stockage et excrétion

A.2.3.1. Absorption intestinale

Dans les aliments, la vitamine B12 reste attachée sur les protéines alimentaires. Le processus d'absorption de cette vitamine est complexe car il va nécessiter l'intervention de plusieurs composés capable de lier la vitamine.

Tout d'abord les sécrétions acides de l'estomac libèrent la cobalamine des protéines alimentaires. Dans le milieu acide qu'est l'estomac, cette dernière va alors préférentiellement se lier à une protéine anciennement appelée « protéine R », l'haptocorrine, d'origine salivaire et gastrique, jusqu'à ce que les enzymes pancréatiques la détruisent (Russell-Jones et Alpers, 1999).

De nouveau libre dans un environnement plus alcalin, la vitamine B12 va pouvoir se complexer au facteur intrinsèque (Nicolas et Guéant, 1994). Le facteur intrinsèque est une glycoprotéine (mucoprotéine) sécrétée par les cellules pariétales de l'estomac, qui va permettre à la cobalamine de franchir la barrière intestinale au niveau iléal (Ganesan *et al.*, 2002). Il est sécrété en grande quantité par rapport aux besoins de liaison avec la vitamine B12; seulement 1 % du facteur intrinsèque total est utilisé. En se liant à la vitamine B12, le facteur intrinsèque se dimérise ce qui lui confère une meilleure résistance à la protéolyse et en même temps protège la vitamine B12 du catabolisme par les bactéries intestinales (Combs, 1998). Le complexe facteur intrinsèque/vitamine B12 va se fixer sur un récepteur spécifique de la bordure en brosse des cellules épithéliales de l'iléon: la cubiline. Ce récepteur possède deux sites de liaison: l'un est spécifique à la partie protéique du facteur intrinsèque et l'autre spécifique à la cobalamine (Nicolas et Guéant, 1994). Une fois fixée au récepteur, le complexe va traverser la paroi du tube digestif par endocytose et le facteur intrinsèque est dégradé dans l'entérocyte libérant ainsi la vitamine B12 dans le sang sous une forme liée à une protéine: la transcobalamine II (**Fig. 7 et 8**) (Seetharam *et al.*, 1999; Seetharam et Li, 2000).

A des plus fortes concentrations, il existe aussi un mécanisme d'absorption passive indépendant du facteur intrinsèque mais dont l'efficacité est faible (1% de la dose ingérée) (Le Grusse et Watier, 1993).

Donc, les patients ayant une diminution de sécrétion d'acide gastrique, un dysfonctionnement du pancréas ou une atrophie du fundus, où est produit le facteur intrinsèque, vont absorber faiblement la vitamine B12 (Allen *et al.*, 1978; Behrns *et al.*, 1994; Cohen *et al.*, 2000). Vu la complexité des mécanismes d'absorption, l'absorption de la vitamine B12 est lente (pic de concentration sanguine entre 6 et 8 heures après ingestion) et limitée (l'absorption est saturée au-delà de 0,7 à 1,1 nmol) (Combs, 1998).

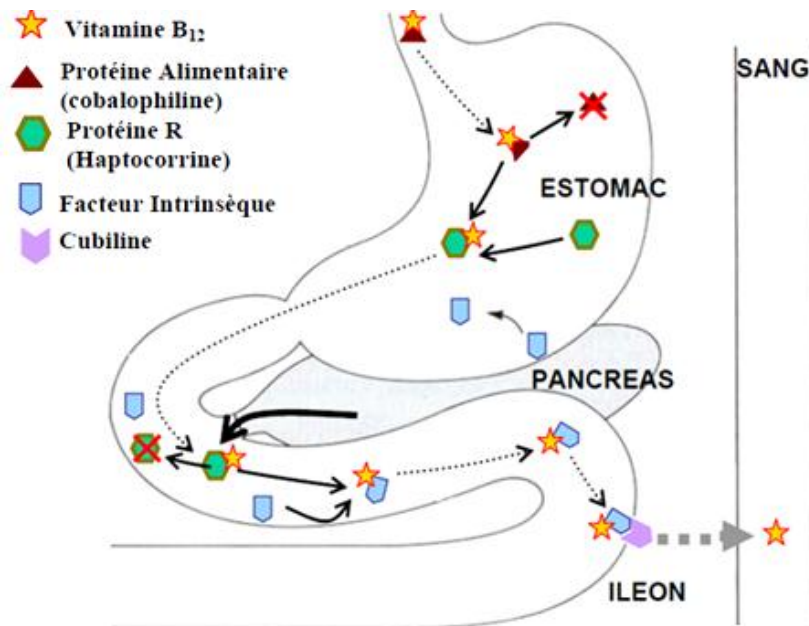


Figure 7. Mécanismes d'absorption de la vitamine B12 (Le Grusse et Watier, 1993).

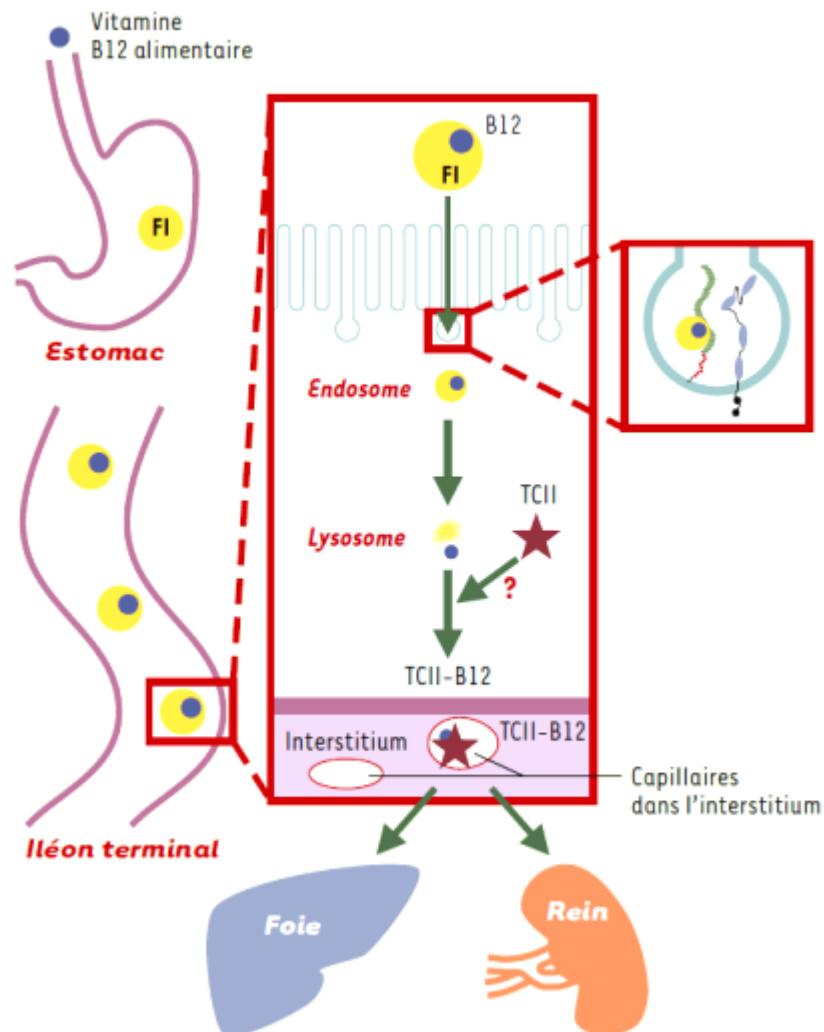


Figure 8. Schéma illustrant la place de la cubiline et de la mégaline dans l'absorption intestinale et le métabolisme de la vitamine B12.

Le complexe formé par la vitamine B12 présente dans les aliments et le facteur intrinsèque (FI) gastrique est internalisé par la cubiline co-exprimée avec la mégaline au pôle apical des entérocytes de l'iléon terminal. Le facteur intrinsèque est dégradé tandis que la vitamine B12 est transférée dans la circulation sous forme complexée à la transcobalamine II (TCII). Les complexes transcobalamine/vitamine B12 sont internalisés dans le foie et les organes périphériques par un récepteur ubiquitaire. Le cas du rein est particulier, car la mégaline exprimée au pôle apical des cellules épithéliales du tube contourné proximal rénal permet l'internalisation des complexes TCII-B12 présents dans le fluide tubulaire, et la sauvegarde de quantités importantes de vitamine B12, probablement du même ordre de grandeur que les quantités absorbées dans l'intestin (Verroust et Kozyraki, 2003).

A.2.3.2. Transport sanguin

Dans le sang, la vitamine B12 est toujours liée à des protéines de transport spécifiques, les transcobalamines ou l'haptocorrine sérique, qui assurent l'internalisation dans les cellules grâce à un phénomène d'endocytose qui s'opère au niveau des récepteurs membranaires (Seetharam *et al.*, 1999).

Il existe trois types de transcobalamines: la transcobalamine I est impliquée dans le stockage de la cobalamine, la transcobalamine II a un rôle dans le transport intracellulaire de la vitamine B12 et enfin la transcobalamine III, dont les fonctions encore inconnues, semblerait participer à la captation de la vitamine B12 par les hépatocytes (McDowell, 2000). La transcobalamine de type II est la plus étudiée car elle facilite le transfert dans le sang portal de la vitamine B12 (Quadros *et al.*, 1999) et que le dosage de cette protéine plasmatique saturée en cobalamine (holo-transcobalamine) serait un marqueur sensible d'une carence en cette vitamine (Herrmann et Geisel, 2002; Nexo *et al.*, 2000).

A.2.3.3. Entrée et distribution tissulaire

Le complexe vitamine B12-transcobalamine II, présent dans le sang portal, se combine aux récepteurs spécifiques présents dans les membranes cellulaires de nombreux tissus. Ce récepteur existe sous deux configurations: monomérique, forme minoritaire et inactive, ou dimérique qui prédomine et permettrait d'assurer sa fonction d'importation de la vitamine B12 dans la cellule (Bose et Seetharam, 1997). Cette dimérisation du récepteur nécessite la présence de cholestérol présent dans la bicouche lipidique constituant la membrane cellulaire, sinon il reste sous forme de monomère (Bose *et al.*, 1996). L'entrée de la vitamine B12 dans la cellule se fait par endocytose, les vésicules d'endocytose fusionnent avec des lysosomes. Après la dégradation lysosomale de la protéine de transport, la cobalamine libre est essentielle soit pour sa rétention intracellulaire ou son utilisation en tant que coenzyme (Seetharam *et al.*, 1999). La vitamine B12 est stockée en quantité significative dans les différents organes dont approximativement 60 % dans le foie humain (Le Grusse et Watier, 1993).

A.2.3.4. Excrétion

Au total, l'élimination quotidienne de la vitamine B12 est de 2 à 5 µg chez l'homme (McDowell, 2000). La cobalamine, non utilisée par l'organisme, est éliminée dans la bile, par voie fécale ou dans les urines mais cette dernière voie est minimale (< 0,25 µg/jour) (Le Grusse et Watier, 1993).

La majorité de la vitamine B12 excrétée par la bile dans l'intestin est réabsorbée au niveau iléal (environ 65 à 75%) selon le mécanisme d'absorption actif impliquant le facteur intrinsèque (McDowell, 2000). Ce cycle entérohépatique constitue un moyen très efficace de conservation de la vitamine B12.

A.3. La 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 (Guilland et Lequeu, 1992).

A.4. La vitamine B2

La vitamine B2 ou la riboflavine est le précurseur de la flavine mononucléotide (FMN) et de la flavine adénine dinucléotide (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 *et al.* (2000) 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. 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 (Jacques *et al.* 2002). De même, Moat *et al.* (2003) ont montré que l'association entre le taux de la riboflavine et le taux d'homocystéine est influencée par le taux de folates.

B. Facteurs génétiques, déficits enzymatiques constitutionnels

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) (Goyette *et al.*, 1998, 1994; Li *et al.*, 1996). De plus, un polymorphisme portant sur une protéine de transport de la vitamine B12, la transcobalamine (TCN C776G), a été rapporté et peut également s'associer à une hyperhomocystéinémie relative (Chen *et al.*, 1997; Christensen *et al.*, 1999; Goyette *et al.*, 1998, 1994; Li *et al.*, 1996)

B.1. Anomalies de la voie de reméthylation

Mutation du gène de la 5,10-méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR)

Le rôle de la 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR; EC 1.5.1.20) dans certaines maladies a d'abord été rapporté par Mudd et ses collaborateurs (1972) qui avaient identifié une altération fonctionnelle majeure de cette enzyme chez un patient présentant une homocystinurie. Ce type d'altération génétique est rare (environ 85 cas répertoriés mondialement) (Ueland et Rozen, 2005). En 1988, une variante commune et thermolabile de la protéine MTHFR fut repérée (Kang *et al.*, 1988 a). La caractérisation de l'ADNc de *MTHFR* (Goyette *et al.*, 1994; Tran *et al.*, 2002) a permis de répertorier plusieurs mutations de *MTHFR* chez des patients homocystinuriques, ainsi qu'un variant commun, 677C→T (A222V), qui correspond à la forme thermolabile de l'enzyme (Frosst *et al.*, 1995). Ce polymorphisme génétique (une mutation communément observée dans la population normale) est la cause génétique la plus fréquente d'hyperhomocystéinémie, il a été beaucoup étudié et cité.

Les symptômes des patients homocystinuriques se manifestent notamment par des retards de développement, ainsi que par diverses affections neurologiques et vasculaires: neuropathie périphérique, convulsions, thromboses et lésions vasculaires (Ueland et Rozen, 2005). L'activité enzymatique résiduelle des fibroblastes des patients et l'âge d'apparition des symptômes sont corrélés.

La **figure 9** présente 41 mutations (numérotation en noir) qui sont propres aux familles des patients homocystinuriques répertoriés. Plusieurs mutations ont été exprimées en utilisant des systèmes bactériens ou des systèmes de levures, afin de vérifier leur effet sur l'activité enzymatique (Ueland et Rozen, 2005). Comme chacune de ces mutations graves n'est

généralement observée que dans une ou deux familles, il peut être avantageux de procéder à un diagnostic moléculaire prénatal par étude de liaisons génétiques (Morel *et al.*, 2005).

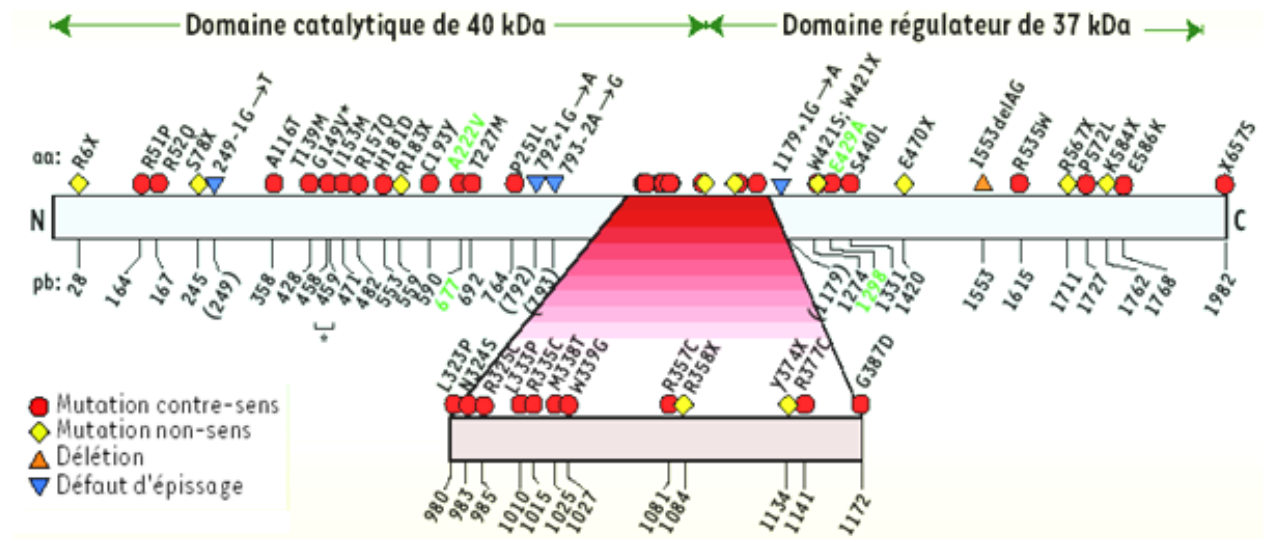


Figure 9. Représentation schématique de 41 mutations graves du gène MTHFR et de 2 polymorphismes particulièrement étudiés (Leclerc et Rozen, 2007).

Les 41 mutations spécifiées n'ont été identifiées que dans des familles de patients présentant un déficit important de MTHFR. La protéine MTHFR est représentée par un rectangle et les acides aminés mutés sont indiqués au-dessus, ainsi que les mutations affectant l'épissage du gène. Les nombres sous le rectangle désignent la position des mutations dans la séquence de l'ADNc (GenBank GI: 6174884); 2 mutations différentes ont été identifiées à la position 1274. Les nombres entre parenthèses désignent la présence d'une mutation intronique à proximité du résidu mentionné. Les 2 polymorphismes de MTHFR les plus étudiés sont aussi indiqués, en vert. Les mutations 1755G → A (M581I) et 1793G → A (R594Q) ne sont pas représentées ici car leur effet reste ambigu. Elles ont initialement été identifiées chez des patients présentant un défaut prononcé de la MTHFR (Selzer *et al.*, 2003, Tonetti *et al.*, 2003), mais Martin *et al.* (2006) ont suggéré qu'il s'agit de polymorphismes plus ou moins communs selon la population analysée. La mutation 459C→T (indiquée par « * ») est muette et elle est représentée ici à titre indicatif car elle accompagne exclusivement la mutation 458G → T (G149V, surmontée par « * »).

Études moléculaires et biochimiques du polymorphisme 677C→T

Il existe une translation C/T au niveau du nucléotide 677 de l'exon 4 (polymorphisme C677T) responsable, dans certaines conditions, d'hyperhomocystéinémie modérée (Frosst *et al.*, 1995). La fréquence de la mutation 677C→T à l'état homozygote est de 5 à 28 % (7 à 40 % pour la fréquence allélique) selon la population étudiée (Schneider *et al.*, 1998).

Au niveau moléculaire, cela entraîne le changement d'une alanine par une valine dans la séquence de l'enzyme et donne lieu à un polymorphisme. Cette simple modification d'un acide aminé entraîne un défaut de «liaison folate» et une activité réduite de l'enzyme MTHFR (Vesin *et al.*, 2007). Chez les sujets homozygotes pour cette mutation, l'enzyme voit son activité réduite de 70 % par rapport à son fonctionnement de base chez les homozygotes de la forme sauvage C, alors que les sujets hétérozygotes conservent environ 65 % de l'activité normale (Mouchabac, 2008).

Les études biochimiques des versions 677C et 677T de l'enzyme ont fourni une explication à l'effet protecteur de l'acide folique sur l'hyperhomocystéinémie des individus mutants. Des extraits de lymphocytes conservent une activité résiduelle plus élevée après avoir été chauffés si l'on augmente la quantité de folate; l'effet protecteur est meilleur pour l'enzyme mutante que pour l'enzyme normale (Guenther *et al.*, 1999). Ce phénomène a été reproduit en chauffant des extraits de bactéries qui expriment l'enzyme recombinante normale ou mutante, ainsi qu'en utilisant l'enzyme humaine purifiée (Ueland et Rozen, 2005). Le FAD (*flavin adenine dinucleotide*), cofacteur de la MTHFR, protège l'enzyme mutante de la déstabilisation; par conséquent, la riboflavine (vitamine B2, précurseur du FAD) peut être considérée comme un déterminant de son activité enzymatique et de l'hyperhomocystéinémie (Ueland et Rozen, 2005). Le variant 677C→T accroît la tendance de l'enzyme à perdre le FAD, et les folates protègent l'enzyme en atténuant cette perte. Par conséquent, bien que l'identité des mutations sévères soit un bon indicateur de l'activité enzymatique résiduelle des patients homocystinuriques, le polymorphisme (et des facteurs externes comme l'acide folique ou la riboflavine) contribue à la complexité de la relation génotypephénotype (Ueland et Rozen, 2005).

Cette mutation a été associée à l'étiologie des maladies cardiovasculaires (Christensen *et al.*, 1997) de la malformation du tube neural (Van der Put *et al.*, 1995; Kirke *et al.*, 1996) et aurait un effet protecteur vis à vis du cancer du côlon (Chen *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 1997).

Des méta-analyses suggèrent que le génotype 677TT peut être un facteur de risque modeste en ce qui concerne les accidents vasculaires cérébraux, la thrombose veineuse et les maladies coronariennes, spécialement s'il y a une carence en acide folique (Ueland et Rozen, 2005).

B.2. Anomalies de la voie de trans-sulfuration, mutation du gène de la cystathionine β synthase (CBS)

La cystathionine β synthase est une enzyme qui convertit l'homocystéine en cystéine par trans-sulfuration lors du cycle de la méthionine; elle nécessite le pyridoxal 5-phosphate comme cofacteur.

Le gène codant pour la CBS est localisé sur le chromosome 21. Plusieurs mutations ont été identifiées dont deux majeures : la mutation Gly-ser, vitamine B6 non sensible, et la mutation Ile-Thr, vitamine B6 sensible. La transmission est autosomale récessive. Il existe une forme homozygote (plutôt rare: 1/200000 environ) qui est responsable de la gravité de l'homocystinurie congénitale, dont la prévalence est relativement plus élevée dans les groupes celtiques.

Alors que la forme hétérozygote (environ 1%) pour laquelle l'augmentation de l'homocystéine est plus modérée et non systématique (environ 40% des cas). Cette mutation est associée à des pathologies vasculaires, des épilepsies et des retards mentaux. Les déficits en CBS se traduisent par une élévation des taux plasmatiques de l'homocystéine et de son précurseur, la méthionine.

C. Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux entraînent habituellement une hyperhomocystéinémie modérée.

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 (Norlund *et al.*, 1998). Les taux d'Hcy élevés chez les hommes s'expliquent par la différence dans la masse musculaire, les hormones et le statut en vitamines (Refsum *et al.*, 2004). Chez les femmes, une augmentation d'homocystéinémie est observée après la ménopause et peut rejoindre celle des hommes (Ueland *et al.*, 2001 a; Refsum *et al.*, 2006).

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 (Schlienger,

2003). Certaines études ont démontré une relation positive entre l'HHcy et la consommation d'alcool (Hultberg *et al.*, 1993; Cravo *et al.*, 1996; Ganji *et al.*, 2003), d'autres ont révélé une relation négative de l'Hcy avec la consommation d'alcool (Ubbink *et al.*, 1998; De Bree *et al.*, 2001), alors que d'autres encore n'ont observé aucune relation (Lussier-Cacan *et al.*, 1996). L'alcool est un antagoniste du métabolisme des folates (Hillman *et al.*, 1982), d'autant plus qu'il pourrait entraver l'absorption intestinale et le métabolisme de la vitamine B12 (Laufer *et al.*, 2004).

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 (Van der Gaag *et al.*, 2000). 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 (Laufer *et al.*, 2004).

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 (Grubben *et al.*, 2000; Urgert *et al.*, 2000). 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 (Nygard *et al.*, 1997).

Iatrogénie

Plusieurs médicaments tels que les antifoliques (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 (Guilland *et al.*, 2003; Kothekar, 2007).

Il a été démontré qu'une interaction "gène-médicament" pouvait aggraver l'hyperhomocystéinémie, 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 (Mouchabac, 2008).

Pathologies somatiques

Une hyperhomocystéinémie modérée est ainsi observée chez des patients atteints de maladies comme l'arthrite rhumatoïde, l'insuffisance rénale (Bostom *et al.*, 1997; Guillard *et al.*, 2003), l'hypothyroïde, les maladies inflammatoires chroniques et neurodégénératives et certaines cancers (Roubenoff *et al.*, 1997, De Bree *et al.*, 2002, Widner *et al.*, 2002).

I.3. Mécanismes de la pathogénicité de l'hyperhomocystéinémie

La toxicité de l'homocystéine (en cas de taux trop élevé) a initialement été décrite dans le cas de certaines maladies vasculaires: coronaropathies et infarctus, thromboses veineuses, artériopathies, atteintes cérébrovasculaires.

En effet, plusieurs mécanismes pathologiques de l'hyperhomocystéinémie ont été proposés, notamment une oxydation de l'endothélium (Cengel et Sahinarslan, 2006). Ce stress oxydant favorise également la peroxydation de lipides ce qui se traduit par une réponse inflammatoire, accélérant le phénomène d'athérosclérose. Sont également mis en cause: une induction de l'activation et de l'agrégation des plaquettes, une altération de l'équilibre entre agents procoagulants et anticoagulants, une diminution des méthylations ainsi qu'une prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, tous ces désordres ayant pour conséquence une augmentation des risques cardiovasculaires (infarctus du myocarde, embolie pulmonaire...) (Trabetti, 2008; Li *et al.*, 2009).

I.3.1. Homocystéine et dysfonction endothéliale

I.3.1.1. L'effet de homocystéine sur la fonction 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 (Cai *et al.*, 2000). Plusieurs études sur des modèles animaux et humains ont démontré que l'Hcy induit une dysfonction endothéliale (Eberhardt *et al.*, 2000; Lentz *et al.*, 2000; Dayal *et al.*, 2001; Faraci et Lentz, 2004).

I.3.1.1.1 La thrombose

Une grande partie des études ont montré que l'hyperhomocystéinémie est associé à un risque de thromboses veineuses et artérielles (Welch et Loscalzo, 1998; Cattaneo, 1999; The Homocysteine Studies Collaboration, 2002). 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% (Den Heijer *et al.*, 2005). Les mécanismes par lesquels l'hyperhomocystéinémie est associée à une thrombose sont encore mal connus.

Néanmoins, 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 (Undas *et al.*, 2001). Cependant, l'importance pathophysiologique 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 (Lentz *et al.*, 2002). Deux autres études cliniques n'ont pas démontré non plus d'association entre hyperhomocystéinémie et résistance à la protéine C (Podda *et al.*, 2003; Zarychanski et Houston, 2004) (**Fig. 10 (1)**). Par ailleurs, les résultats expérimentaux suggèrent que l'hyperhomocystéinémie puisse favoriser la thrombose vasculaire par l'induction des procoagulants. Des cultures de cellules endothéliales humaines exposées à l'homocystéine présentent l'activation du facteur tissulaire et du facteur endogène V de la coagulation (Fryer *et al.*, 1993; Rodgers et Kane, 1986).
- 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 (Lentz *et al.*, 1996; Dayal *et al.*, 2001) (**Fig. 10 (2)**).
- Inhibition des anticoagulants naturels. Dans une autre étude, Nishinaga *et al.*, (1993) 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 (Harpel *et al.*, 1996) (**Fig. 10 (3)**).
- Diminution de l'activité fibrinolytique. L'Hcy peut former un pont disulfide avec un résidu cystéine dans le domaine terminal aminé de l'annexine II, un récepteur pour l'activateur plasminogène tissulaire (TPA) et plasminogène (Hajjar, 1993 ; Hajjar *et al.*, 1998) (**Fig. 10 (4)**).

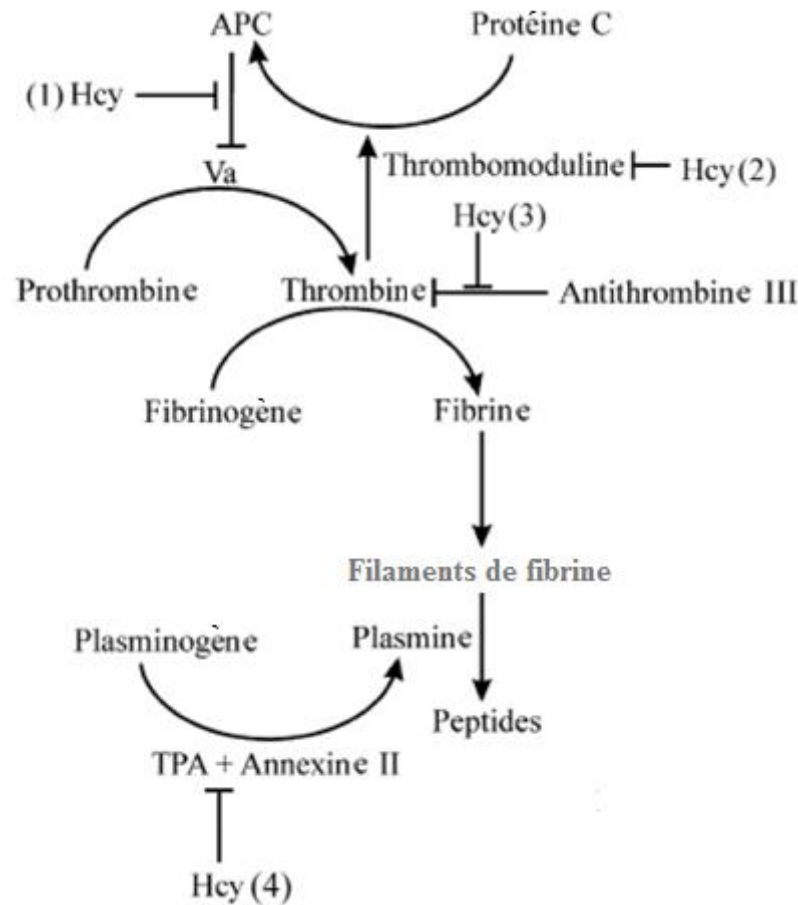


Figure 10. Influence de l'homocystéine sur la coagulation du sang et la fibrinolyse (Perta-Kaján *et al.*, 2007).

I.3.1.1.2. L'inflammation

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique, où des cytokines proinflammatoires 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 (Carson *et al.*, 1962; Ambrosi, 2007).

Deux hypothèses ont été formulées pour expliquer l'athérogénicité de l'HHcy (Demuth *et al.*, 2000) (**Fig. 11**):

- 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 (McCully *et al.*, 1990);

- 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 (Moghadasian *et al.*, 1997).

L'exposition à l'Hcy pourrait induire une augmentation de cytokines proinflammatoires. Poddar *et al.* (2001) ont montré que l'homocystéine augmentait l'expression MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) et de IL-8 dans les cultures humaines de cellules endothéliales. 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 (Wang *et al.*, 2000) et dans les monocytes (Wang et O, 2001) traités avec de l'homocystéine. L'augmentation de l'expression de MCP-1 et d'IL-8, en présence de l'Hcy, est médiée par l'activation du NF- κ B, facteur de transcription impliqué dans la régulation en aval du processus inflammatoire (Wang et O, 2001; Au-Yeung *et al.*, 2004). L'homocystéine initie aussi la production de TNF- α et de nombreux signaux cellulaires impliqués dans le processus inflammatoire (Hofman *et al.*, 2001).

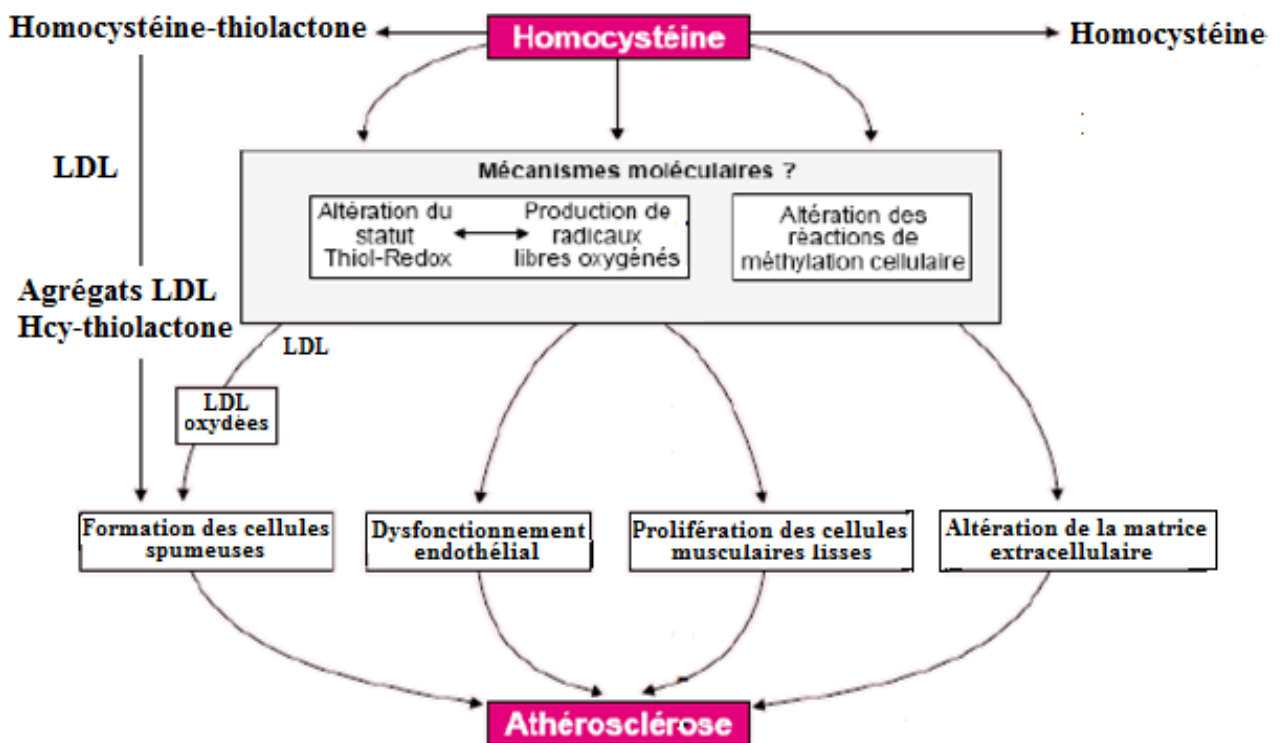


Figure 11. Action de l'Hcy dans l'athéromatose (Demuth, 2000).

I.3.1.1.3. La 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 événements cardiovasculaires (Schachinger *et al.*, 2000).

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 (Demuth *et al.*, 1999), l'oxyde nitrique (NO) (Upchurch *et al.*, 1997) et la prostacycline (Wang *et al.*, 1993). L'incubation des cellules endothéliales avec Hcy (0,05-1 mM) produit moins d'endothéline et cet effet est médié par des produits oxydatifs (Drunat *et al.*, 2001).

L'exposition de cellules endothéliales en culture à de l'homocystéine a un effet biphasique 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 (Stamler *et al.*, 1993). C'est pourquoi l'exposition de cellules endothéliales à l'homocystéine durant 15 minutes augmente la sécrétion d'*endothelium-derived releasing factor* (EDRF) et de S-nitroso-homocystéine, alors qu'une exposition supérieure à trois heures diminue cette sécrétion (Stamler *et al.*, 1993). La S-nitroso-homocystéine, qui se forme lors d'expositions de courte durée, a une action très différente de l'homocystéine, étant 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-κB (Welch *et al.*, 1998). Dans les conditions normales, l'endothélium vasculaire joue un rôle important dans la prévention de l'athérosclérose en produisant du NO (Upchurch *et al.*, 1996). Sur le plan expérimental, l'homocystéine provoque une atteinte des cellules endothéliales (Jacobsen, 1998), freine la libération de NO (Zhang *et al.*, 2000) et affecte la vasotonie dépendant du flux sanguin (Tawakol *et al.*, 1997).

Plusieurs études utilisant des tissus vasculaires ont montré que l'Hcy provoque une production intracellulaire de superoxyde et par conséquent une altération de la relaxation (Lang *et al.*, 2000, Duan *et al.*, 2000, Franken *et al.*, 1994). Le superoxyde est censé réagir

avec le NO au peroxyxynitrite, limitant de ce fait la réponse vasodilatatrice normale (Gryglewski *et al.*, 1986; Heinecke *et al.*, 1987).

I.3.1.1.4. L'apoptose

Zhang *et al.* (2001) 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). 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 (Cai *et al.*, 2000; Urano *et al.*, 2000). Puisque l'activation persistante de JNK-kinases est associée à la mort par apoptose (Chen *et al.*, 1996), 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 (Huang *et al.*, 2001 a), des cellules endothéliales (Tyagi *et al.*, 2006) et des cellules stromales humaines (Kim *et al.*, 2006).

I.3.1.2. L'effet moléculaire de l'homocystéine sur l'endothélium

I.3.1.2.1. La 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 (Sengupta *et al.*, 2001), fibronectine (Majors *et al.*, 2002), transthyretine (Sass *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2003), facteur V (Undas *et al.*, 2001) et annexine II (Hajjar *et al.*, 1998). 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 (Jacobsen *et al.*, 2005) (**Tab. 8**).

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. 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 (**Fig. 12**).

Tableau 8. Les exemples et les conséquences de la protéine S-homocystéinylation (Perta-Kaján *et al.*, 2007).

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, hémostasie, 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

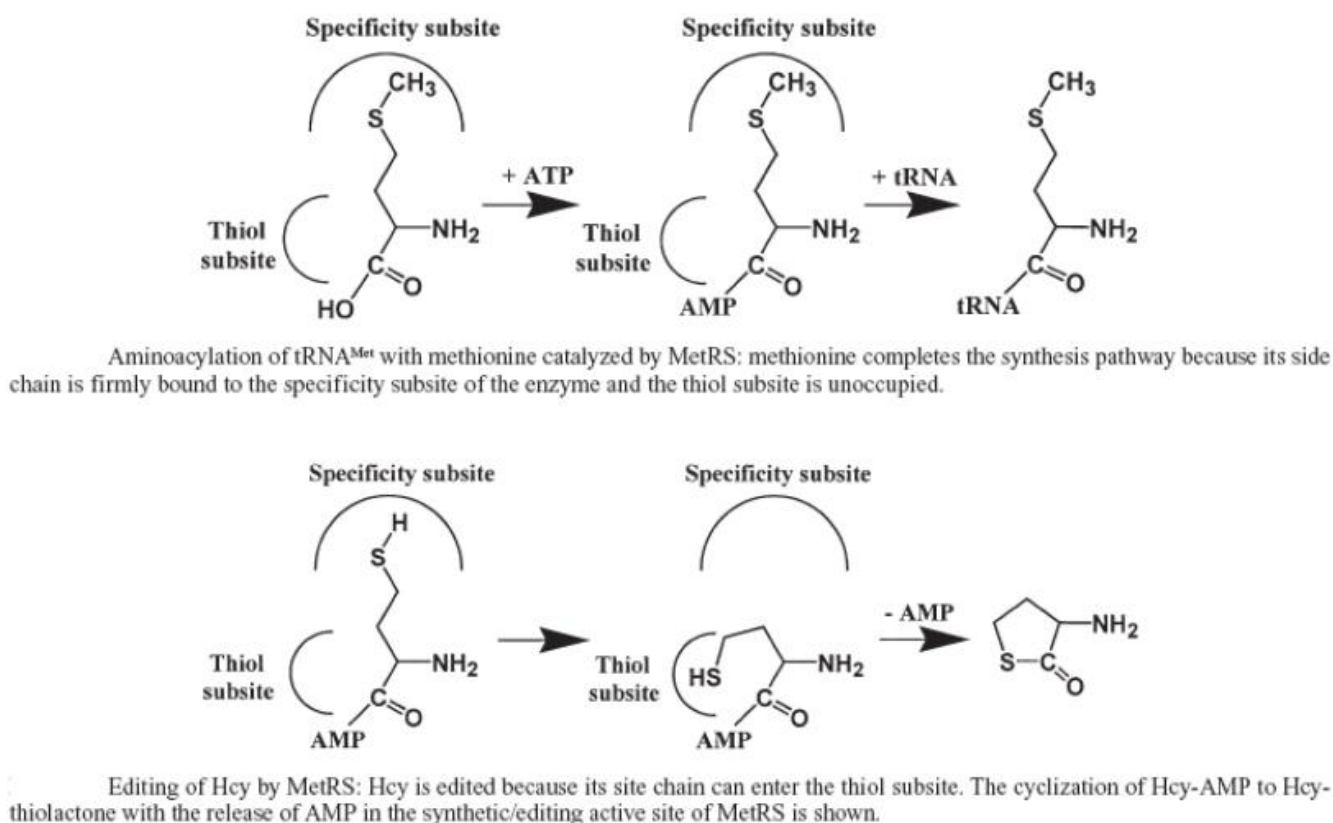


Figure 12. La formation de l'homocystéine-thiolactone (Jakubowski, 2000)

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 (Jakubowski, 2000). 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 (Perna *et al.*, 2007). Yang *et al.* (2006) 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.

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

(Jakubowski, 2002). Les protéines modifiées par l'homocystéine-thiolactone sont délétères et induisent une réponse immune anormale (Jakubowski, 2005 et 2006). 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 rétinique) et le superoxyde, sous contrôle de la thyroxine et de l'hormone de croissance. L'hormone de croissance stimule la production de sulfates à partir de l'homocystéine thiolactone (McCully et Wilson, 1975).

I.3.1.2.2. 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 (Kaufman *et al.*, 2002; Rutkowski *et al.*, 2004). 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 (Kaufman *et al.*, 2002). 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 transmembrane protein 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.

I.3.1.2.3. Stress oxydant

L'homocystéine porte un groupement thiol réducteur qui est aisément auto-oxydé et peut engendrer des radicaux libres (ROS) responsables de lésions vasculaires, même si ceci reste discuté. En effet, la cystéine est présente dans le plasma à des concentrations 20 à 30 fois plus élevées que l'Hcy et son groupement thiol réducteur est plus réactif que celui de l'Hcy. Pourtant la cystéine ne provoque pas des lésions endothéliales et n'est pas considérée comme un facteur de risque cardiovasculaire (Jacobsen, 2000).

Par ailleurs, une étude a démontré que la forme oxydée de l'Hcy vient en grande partie de l'échange des disulfures, et de manière assez rare de l'auto-oxydation directe de l'Hcy (Sengupta *et al.*, 2001).

Des travaux suggèrent que le stress oxydant induit par l'Hcy est dû à l'effet « biochimique » qu'à son effet « chimique ». Le stress oxydant n'est induit que dans l'endothélium incubé avec de L-homocystéine naturelle, mais pas avec la D-homocystéine (Heydrick *et al.*, 2004). L'effet pro-oxydant de la L-homocystéine peut être expliqué par un mécanisme appelé « eNOS uncoupling » (Pritchard *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2003).

Brièvement, la L-homocystéine fait que eNOS devient la source majeur de l'anion superoxyde (O_2^-). L' O_2^- inactive rapidement NO, conduisant à la formation de fortes concentrations de peroxynitrite ($ONOO^-$), un oxydant très puissant et toxique.

Un autre mécanisme potentiel de l'accumulation d'anion superoxyde (O_2^-) en présence d'Hcy est l'inhibition de la production du NO provoquée par le diméthylarginine asymétrique (ADMA), inhibiteur endogène de l'eNOS. Dans un modèle animal avec de l'Hcy, il a été montré une élévation plasmatique d'ADMA (Boger *et al.*, 2000). Quand l'endothélium est exposé à l'Hcy ou à son précurseur méthionine, la concentration d'ADMA dans le milieu de culture augmente de manière dose- et temps dépendante, et est corrélée avec une diminution de la synthèse de NO.

Un autre mécanisme possible du stress oxydant induit par l'Hcy est la perturbation de la fonction de deux enzymes anti-oxydantes: superoxyde dismutase (SOD) et glutathion peroxydase (GPX).

La SOD est une enzyme catalysant la réduction de l'anion superoxyde (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène. Il est rapporté que le niveau d'Hcy plasmatique est corrélé avec une augmentation de SOD extracellulaire chez les patients avec homocystinurie (Wilcken *et al.*, 2000) et chez les patients atteints d'une hyperhomocystéinémie modérée (Wang *et al.*, 1999). Cet effet est probablement causé par la diminution de la liaison de la SOD extracellulaire avec la surface de la cellule endothéliale, parce que l'Hcy pourrait altérer la surface du protéoglycane d'héparane sulfate (Yamamoto *et al.*, 2000). Cet effet pourrait conduire à une perte de sa capacité à protéger la surface endothéliale contre le stress oxydant.

Des résultats montrent que l'Hcy diminue l'expression et l'activité de la glutathion peroxydase (GPX) des cellules endothéliales, (Huang *et al.*, 2001 b; Weiss *et al.*, 2001 et 2002) augmentant ainsi la teneur intracellulaire en H_2O_2 mais aussi en peroxydes organiques et en peroxynitrite qui sont habituellement détruits par la glutathion peroxydase (Upchurch *et al.*, 1997). La GPX catalyse la réduction de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en H_2O par oxydation du GSH en GSSG. Une hyperhomocystéinémie pourrait empêcher, limiter le potentiel antioxydant de certaines cellules (Dayal *et al.*, 2002). Ceci a été démontré dans des

modèles animaux génétiquement modifiés. Weiss *et al.*, (2001) ont rapporté que la surexpression de GPX atténue le dysfonctionnement endothélial induit par l'homocystéine.

Le stress oxydant induit par l'homocystéine peut être mis en évidence sur différents modèles cellulaires. Ainsi la potentialisation par l'homocystéine de la toxicité de la protéine amyloïde, qui induit l'apoptose de cellules de neuroblastome humain différenciées SH-SH-5Y, est entièrement supprimée par les antioxydants tels que la vitamine E et la N-acétylcystéine (Ho *et al.*, 2001).

I.3.1.2.4. Matrice extracellulaire

L'hyperhomocystéinémie perturbe l'organisation des tissus conjonctifs entraînant un basculement du cristallin, une hyperlaxité ligamentaire et un développement anormal des cartilages, retrouvés dans le syndrome de Marfan. Elle agirait sur les fibrillines, mais aussi sur 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 (Khan *et al.*, 2001).

Etude Expérimentale

II. Patients et méthodes

II.1. Population d'étude

Notre étude a enrôlé 131 patients admis au service de cardiologie du CHU de Sétif. Tous ont présenté une pathologie cardiovasculaire confirmée (coronaropathie, accident vasculaire cérébral, thromboembolisme, valvulopathie...). L'interrogatoire et l'examen clinique ont été effectués par les médecins du même service au cours de l'hospitalisation.

Ces sujets se répartissaient en 61 hommes et 70 femmes (*sex ratio* de 0,87). La moyenne d'âge était 56 ± 17 ans allant de 20 à 96 ans répartis en 4 tranches; les sujets dont l'âge est < 45 ans (Gp 1), les sujets de 45 à 54 ans (Gp 2), de 55 à 74 ans (Gp 3) et ceux de 75 ans et plus (Gp 4).

147 sujets apparemment sains ont été choisis comme contrôle et ceci seulement pour l'étude génétique du polymorphisme de gène de la MTHFR.

II.2. Prélèvements et analyses

Les prélèvements de sang sont effectués par ponction veineuse du pli de coude chez tous les sujets après 12 heures de jeûne. Le sang est recueilli dans 2 tubes; l'un contenant EDTA pour l'extraction de l'ADN et l'étude génétique et, l'autre hépariné placé dans la glace pour le dosage de l'Hcy, de la vitamine B12 et de l'acide folique. Ce dernier tube a été acheminé immédiatement au laboratoire et centrifugé à froid. Les échantillons ont été ensuite congelés à -20°C jusqu'à analyse.

Les dossiers de malades ont constitué la source d'information. Leur exploitation s'est effectuée au niveau du CHU. Les facteurs de risque cardiovasculaire (âge, sexe, HTA, obésité, diabète, tabac).

Toute personne ayant une hypertension systolique supérieure ou égale à 160 mmHg ou diastolique supérieure ou égale à 95 mmHg est considérée comme hypertendue.

Pour ce qui est des critères du diagnostic du diabète: on considère comme diabétique tout sujet dont la glycémie à jeun mesurée par la méthode du glucose oxydase, est supérieure à 1,26 g/L de plasma de sang veineux (critère de l'OMS) et tout sujet déjà connu et traité pour diabète.

Le tabagisme a été défini par l'habitude de fumer régulièrement au moins une cigarette par jour, au moment de l'enquête ou sevrée depuis moins de 3 ans.

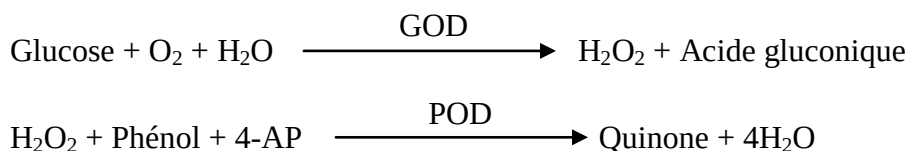
On entend par hyperlipidémie une anomalie du métabolisme des lipoprotéines conduisant à l'élévation des taux plasmatiques des lipides sanguins, cholestérol (total ou ses fractions *low density lipoproteins* [LDL] et *high density lipoprotein* [HDL]) et/ou triglycérides. Les types d'hyperlipidémies ont été classés par Fredrickson, classification simplifiée par De Gennes, et comprennent classiquement (De Gennes, 1971):

- l'hypercholestérolémie pure: élévation isolée du cholestérol (≥ 2 g/L);
- l'hypertriglycéridémie: élévation isolée des triglycérides ($\geq 1,5$ g/L);
- l'hyperlipidémie mixte: élévation combinée du cholestérol et des triglycérides (≥ 2 g/L et $\geq 1,5$ g/L, respectivement).

II.3. Méthode de dosage des différents paramètres biochimiques

II.3.1. Dosage du glucose (Beckman CX9)

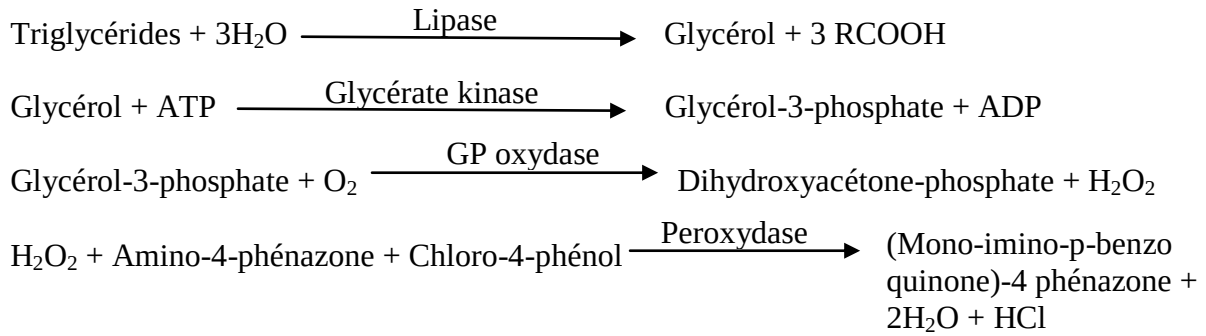
Le glucose est oxydé, suite à l'action du glucose oxydase (GOD), en acide gluconique et en peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène résultant (H_2O_2), est détecté par la réaction avec phénol-aminophénazone en présence de peroxydase (POD).



L'intensité de la couleur formée et mesurée à une longueur d'onde 505 nm est proportionnelle à la concentration de glucose de l'échantillon.

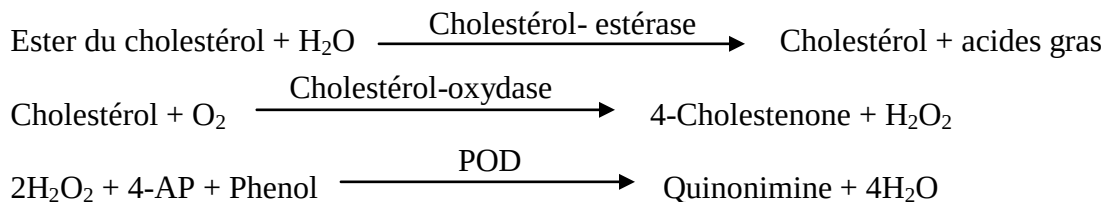
II.3.2. Dosage des triglycérides (Beckman CX9)

La méthode de dosage décrite ci-après repose sur les travaux de Wahlefeld qui fait appel, à l'hydrolyse rapide et complète des triglycérides en glycérol et acides gras, par une lipoprotéine lipase de micro-organismes. Le glycérol formé est ensuite transformé en glycérol-3-phosphate, puis oxydé en dihydroxyacétone-phosphate avec formation d'eau oxygénée. En présence de peroxydase, l'eau oxygénée formée réagit, dans une réaction selon Trinder, avec l'aminophénazone et le chloro-4 phénol pour former un dérivé coloré rouge.



II.3.3. Dosage du cholestérol (Beckman CX9)

Le cholestérol et ses esters sont libérés des lipoprotéines par des détergents. L'estérase de cholestérol hydrolyse les esters et, H_2O_2 est formé dans l'oxydation enzymatique suivante du cholestérol par la cholestérol-oxydase selon les équations suivantes. Dans la dernière réaction, un composant coloré rouge se forme. La production du quinonimine rouge est mesurée à 505 nm et est proportionnelle à la concentration du cholestérol dans l'échantillon.

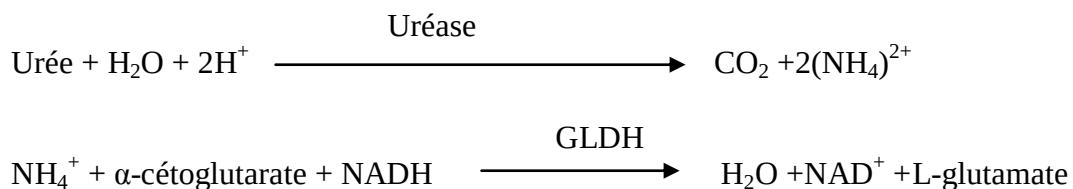


II.3.4. Dosage de la créatinine (Beckman CX9)

Le dosage de la créatinine a été effectué suivant une méthode colorimétrique Jaffé mode cinétique; la créatinine donne avec l'acide picrique, en milieu alcalin, une coloration rouge orangé. La lecture se fait selon un mode cinétique à 510 nm.

II.3.5. Dosage de l'urée (Beckman CX9)

L'urée est hydrolysée en ammoniac et CO_2 . L'ammoniac réagit avec le α -cétoglutarate pour former L-glutamate et NAD^+ de NADH. Cette réaction est catalysée par glutamate déshydrogénase (GLDH). La diminution de NADH est proportionnelle à la concentration de l'urée. La lecture se fait selon un mode cinétique à 340 nm.



II.3.6. Dosage de la vitamine B12 et de l'acide folique (Immulite 1000, Siemens Diagnostics)

II.3.6.1. Dosage de la vitamine B12

Il s'agit d'une immunoenzymologie chimioluminescente compétitive à phase solide. La technique inclue une étape préliminaire de dénaturation par chauffage. La vitamine B12 de l'échantillon du patient est séparée des protéines porteuses par une incubation à 100°C en présence de dithiothréitol et de cyanure de potassium, pour inactiver les protéines liant la vitamine B12, même à des taux très élevés ainsi que les anticorps anti-facteur intrinsèque.

Après l'étape de dénaturation par chauffage, les échantillons des patients prétraités et du facteur intrinsèque de porc purifié sont introduits simultanément et incubés dans l'Unité-test contenant une bille de polystyrène revêtue par un analogue de la vitamine B12 durant 30 minutes à 37°C sous agitation. Pendant cette incubation, la vitamine B12 de l'échantillon prétraité entre en compétition avec l'analogue de la B12 sur la phase solide pour la fixation sur un nombre limité de sites de liaison pour la vitamine B12 sur le facteur intrinsèque de porc purifié. Un anti-facteur intrinsèque marqué à la phosphatase alcaline est ajouté et l'Unité-Test est incubé pendant 30 minutes supplémentaires. L'anticorps marqué en excès est éliminé par un lavage utilisant le principe de la centrifugation axiale.

Cycle d'incubation : 2* 30 minutes.

II.3.6.2. Dosage de l'acide folique

Ce dosage est un test en chimiluminescence utilisant un principe de compétition en phase liquide avec un ligand marqué et une immobilisation *in situ* avec une protéine porteuse. La révélation s'effectue au moyen d'un anti-ligand marqué par de la phosphatase alcaline. Les échantillons à doser doivent subir une ébullition préalable. La phase solide, une bille de polystyrènes contenue dans l'Unité-Test Immulite, est revêtue d'un anticorps monoclonal de souris spécifique de la protéine porteuse de l'acide folique.

Après une étape de préparation, l'échantillon du patient ainsi que l'analogue de l'acide folique marqué par un ligand et la protéine porteuse de l'acide folique sont introduits simultanément dans l'Unité-Test et incubés durant 30 minutes à +37°C sous agitation. Pendant cette incubation, l'acide folique de l'échantillon rentre en compétition avec l'analogue d'acide folique marqué par le ligand vis-à-vis d'une quantité limitée de protéine porteuse de l'acide folique. Cette protéine porteuse est capturée par l'anticorps fixé à la

surface de la bille. L'analogue en excès est éliminé par un lavage utilisant le principe de la centrifugation axiale. Un anti-ligand marqué à la phosphatase alcaline (conjugué enzymatique) est ensuite ajouté et l'Unité-Test est incubée pour 30 min supplémentaire à +37°C. L'excès de conjugué enzymatique est éliminé par centrifugation axiale.

Cycle d'incubation : 2* 30 minutes.

II.3.6.3. Préparation de la solution de travail pour le dosage de la vitamine B12 et de l'acide folique

Puisque les échantillons vont être testés à la fois en vitamine B12 et en acide folique, ils doivent être prétraités avec la même solution de travail. Cette dernière doit contenir 1000 µL/test de solution tampon Borate-cyanure de Potassium, 20 µL/test de folate marqué par un ligand et 20 µL/test de solution de dithiothréitol. Il convient de multiplier ces volumes par un facteur légèrement supérieur au nombre d'analyses à réaliser.

II.3.6.4. Préparation des échantillons pour le dosage de la vitamine B12 et de l'acide folique

Dans des tubes préalablement préparés, 200 µL de chaque ajusteur (bas et haut) et contrôles de la vitamine B12 et de l'acide folique, plasma de patient et 1000 µL de solution de préparation ont été déposés. Tous ces tubes doivent être fermés non-hermétiquement et placés dans un bain d'eau chaude à ébullition (100°C) pendant 15 à 20 minutes. Après refroidissement pendant 5 minutes dans un bain d'eau à température ambiante, au moins 350 µL de l'échantillon ainsi préparé sont pipetés dans une Unité-Echantillon IMMULITE. Les échantillons ainsi préparés, sont stables à température ambiante (+15°C/+28°C) ou à 2°C/8°C pendant une heure avant la réalisation du dosage.

II.3.7. Dosage de l'homocystéine (Immulate 1000, Siemens Diagnostics)

Le dosage de l'Hcy a été effectué sur l'automate Immulate 1000 (laboratoire central, Sétif); il s'agit d'un immunodosage par compétition avec marqueur luminescent. Ce test inclut une étape préliminaire manuelle de prétraitement des échantillons.

II.3.7.1. Préparation de la solution de prétraitement des échantillons

La solution de prétraitement B contenant le dithiothréitol (DTT) dans un tampon, doit être diluée au 1/10 dans de l'eau distillée ou désionisée avant d'être ajoutée à un volume égal de solution de prétraitement A. Cette dernière est constituée de S-adenosyl-L-homocystéine hydrolase bovine dans un tampon avec conservateur. Des quantités suffisantes sont préparées pour le nombre de tests à réaliser.

Cette solution de prétraitement des échantillons doit être utilisée dans les 2 heures suivant la préparation.

II.3.7.2. Prétraitement des échantillons

Dans des tubes de verre étiquetés, 300 μ L de solution de travail de prétraitement des échantillons sont déposés avec 15 μ L de plasma non prétraité. Après une incubation pendant 30 minutes à +37°C dans un bain-marie ou une étuve, l'homocystéine des échantillons plasmatiques de patients est séparée des protéines de liaison et convertie en S-adénosyl homocystéine (SAH).

Les échantillons prétraités sont stables à température ambiante (+15°C/+28°C) ou réfrigérés à +2°C/+8°C 1 heure avant dosage.

L'échantillon prétraité et l'anticorps anti-SAH marqué à la phosphatase alcaline sont introduits simultanément dans l'unité test qui contient une bille de polystyrène recouverte de SAH. Pendant une incubation de 30 minutes, le SAH provenant de l'échantillon prétraité entre en compétition avec le SAH fixé pour se lier à l'anticorps anti-SAH marqué à la phosphatase alcaline. Le conjugué non lié est éliminé par lavage et séparé par centrifugation. Le substrat est ajouté et la procédure continue comme décrite pour les immunodosages classiques.

Les concentrations de l'Hcy sont exprimées en μ mol/L.

II.4. Recherche de la mutation

II.4.1. Extraction d'ADN à partir de leucocytes isolés

L'ADN génomique a été isolé des leucocytes à partir de 10 mL de sang total prélevé sur EDTA (l'héparine inhibant l'action de la Taq polymérase) par la méthode conventionnelle au Phenol-Chloroforme.

Protocole d'extraction

- Lyse des Cellules : Tout le matériel doit être stérile
 - dans un tube conique de 50 mL; le sang total (10 mL) complété à 50 mL avec du TE est mis dans la glace durant 20 min. Il est homogénéisé puis centrifugé à +4°C pendant 20 min à 4000 rpm.
 - à l'issue de la centrifugation, le surnageant est déversé.

- le TE est ensuite ajouté jusqu'à 35 mL au culot, le tout est agité en suspension et laissé 20 min dans la glace puis centrifugé dans les mêmes conditions précédentes.
- ensuite le surnageant est encore une fois déversé pour obtenir du culot de leucocytes (la même opération de lavage est refait 2 à 3 fois jusqu'à l'obtention d'un culot blanc).
- enfin 1000 µL du TE 10:1 sont ajoutés au culot et homogénéisé vigoureusement au vortex (suspension de leucocytes) puis conservé à -20°C dans le congélateur (si nécessaire) jusqu'à utilisation.
- la suspension des leucocytes est décongelée puis homogénéisée par le vortex et mise en suspension.
- dans un tube eppendorf, 200 µL de la suspension des leucocytes déjà préparé sont pipetés. Ensuite, 500 µL de tampon de lyse 1X, 20 µL de protéinase K (2%) et 30 µL de SDS (20%) sont ajoutés. Les tubes eppendorf doivent être couverts avec du papier parafilm, mélangés délicatement par simple retournement, puis incubés une nuit au bain marie à 56°C.
- Extraction au Phénol/Chloroforme/Alcool isoamylique (si possible sous hotte chimique)

1^{ère} extraction

- Un mélange de Phénol/CHCl₃/Alcool isoamylique (25 :24 :1) est placé dans un flacon puis délaissé se stabiliser.
- 750 µL de ce mélange (1V/1V) sont ajoutés de la veille aux tubes eppendorf, après agitation énergiquement à la main, le papier parafilm est enlevé puis ces tubes sont placés dans la glace 20 min puis centrifugés 20 min à 4000 rpm.
- à l'aide d'une pipette automatique dont l'extrémité effilé de l'embout à pointe mousse, le surnageant (~ 750 µL) est transféré dans un nouveau tube eppendorf.

2^{ème} extraction

- 750 μL de CHCl_3 /Alcool isoamylique (24/1) sont ajoutés aux tubes qui vont être agités énergiquement pendant 20 min, puis placés dans la glace 20 min et centrifugés 20 min à 4000 rpm.
- à l'aide d'une pipette automatique, le surnageant est transféré dans un nouveau tube eppendorf contenant 75 μL d'acétate de sodium (3 M, pH 7) et le volume de ce tube est complété avec de l'éthanol 95% préalablement refroidi.
- Après mélange lentement par retournement, un précipité se forme petit à petit (méduse d'ADN).
- la pelote d'ADN récupérée avec une pipette Pasteur recourbée est transférée dans un autre tube eppendorf contenant 500 μL d'éthanol 70 %, l'ADN est remis en suspension puis centrifugé 40 min à 4000 rpm.
- le précipité est "repêché", égoutté sur les bords du tube et transféré dans un tube contenant de TE. Selon la grosseur de la pelote et la concentration souhaitée, entre 50 et 300 μL de TE sont ajoutés.
- les tubes sont tournés sur un agitateur oscillant de 3-4 heures à 37 °C (ou 56 °C pendant 1 heure)
- l'ADN pur est conservé à 4°C jusqu'à utilisation.

II.4.2. Détermination de la pureté de l'ADN

II.4.2.1. Principe

L'ADN absorbe à 260 nm alors que les protéines (témoins de contamination) absorbent à 280 nm.

Par mesure spectrophotométrique de la densité optique (DO) de l'ADN et par le moyen du rapport DO 260 nm/DO 280 nm, la pureté de l'ADN est déterminée en indiquant la contamination de l'ADN par les protéines ou par les ARN.

On considère que :

- l'ADN est suffisamment pur lorsque le rapport $R = \text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ est compris entre 1,8 et 2 ($1,8 < R \leq 2$) ;

- l'ADN est contaminé par les protéines si : $DO_{260}/DO_{280} < 1,8$;
- l'ADN est contaminé par les ARN si : $DO_{260}/DO_{280} > 2$.

La pureté de l'ADN est essentielle pour une action efficace des enzymes de restriction utilisées par la suite. Dans le cas où l'ADN est contaminé, un bon résultat est à écarter dans les étapes suivantes de son analyse par PCR. Il est donc indispensable de procéder par la réextraction de la pelote de l'ADN afin d'obtenir la pureté souhaitée. Les ADN purs sont conservés à + 4°C jusqu'à utilisation.

II.4.2.2. Technique

L'échantillon est dilué au 1/100 dans l'eau distillée (10 µL de l'ADN solubilisé dans 990 µL de l'eau stérile) et les DO sont lues par spectrophotométrie dans le même type de cuve que celle ayant servi à faire le zéro (eau stérile) à 260 et à 280 nm.

II.4.3. Détermination de la concentration de l'ADN

Principe

La concentration de l'ADN est déterminée directement par spectrophotométrie (Nanodrop ND-1000). La densité optique à 260 nm permet de calculer la concentration de l'ADN sachant que: 1 unité de DO_{260} nm = 50 µg/mL d'ADN double brin

La concentration de l'ADN en µg/mL = facteur de dilution × DO_{260} × 50 µg/mL.

Une dilution à 50 ng/mL est réalisée pour utilisation au moment de la PCR.

II.4.4. Amplification d'ADN par PCR

PCR est l'abréviation de l'expression anglaise *Polymerase Chain Reaction* ou réaction en chaîne par polymérase. La PCR est une technique de réplication ciblée *in vitro*, mise au point par Karry Mullis en 1985.

Principe

La PCR permet l'amplification d'un segment d'ADN compris entre deux régions de séquences connues par un procédé d'extension d'amorce (ou primers). Elle consiste à utiliser

deux amorces oligonucléotidiques de synthèse de 20 à 25 nucléotides complémentaires des extrémités 3' des deux brins d'ADN encadrant la séquence à amplifier. Une de ces amorces est une copie du brin codant et l'autre, une copie du brin non codant. Sous l'action d'une enzyme (**Taq** polymérase), chaque amorce est allongée dans le sens 5'→3' d'une séquence exactement complémentaire du brin recopié. A chaque étape de PCR, le nombre de segments d'ADN cible double n cycles permettent ainsi d'obtenir 2^n copies d'ADN.

La réaction de PCR se décompose en trois étapes:

- * dénaturation en deux brins monocaténares
- * hybridation des amorces sur la cible
- * synthèse d'un nouveau brin à partir des amorces par la Tq polymérase.

Il en résulte deux ADN bicaténares.

II.4.4.1. Recherche de la mutation C677T du gène MTHFR

Principe

La mutation C677T du gène de la MTHFR a été déterminée pour la première fois par la méthode PCR/RFLP décrite par Frosst *et al.* (1995).

Le principe de la PCR est la synthèse de multiples copies d'une séquence d'ADN spécifique, l'ADN cible amplifié est analysé par RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction). Le RFLP reflète une différence (un polymorphisme) au niveau d'un site particulier de reconnaissance d'une enzyme de restriction donnée. Après digestion enzymatique, les fragments de restrictions sont soumis à une électrophorèse sur gel qui permet leur séparation en fonction de leur taille. La variabilité d'un site de restriction se manifeste par la présence ou l'absence de celui-ci, ce qui se traduit par un polymorphisme des longueurs des fragments de restriction.

Analyse du polymorphisme de la MTHFR C677T par *LightCycler PCR*[®]

Un fragment de 233 bp du gène de la MTHFR est amplifié à partir d'ADN génomique humain, à l'aide d'amorces spécifiques et détecté par fluorescence à l'aide de deux sondes

HybProbe spécifiques en utilisant le Light Cycler[®]Fast Start^{PLUS} DNA Master Hybridization Probes (Roche Diagnostics), LightMix[®] (TIB MOL BIOL, Berlin, Germany) and LightCycler[®]Instrument1.2.

3 µL d'ADN (concentration de 50 à 100 ng/µL) sont mélangés à 3,5 µL d'H₂O (PCR-grade), à 0,5 µL de chaque amorce¹ (à une concentration de 0,2 µM) et 1 µL du kit LC hybridation probe², et 2 µL contenant MTHFR R mix (voir, ci-dessous). Selon le principe de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), des sondes d'hybridation fluorescentes Flu et Red spécifiques sont ajoutées; la PCR comprend une étape de dénaturation à 95°C pendant 10 minutes, 45 cycles d'amplification à 95°C avec une dénaturation pendant 5 secondes (sec) puis une hybridation à 55°C pendant 10 sec et enfin une extension à 72°C pendant 15 sec. La courbe de fusion (*melting curves*) nécessite une étape de 20 sec à 95°C, de 20 sec à 40°C et de 0 sec à 85°C puis le refroidissement termine le cycle à 40°C pendant 30 sec afin de permettre la fusion progressive des doubles brins d'ADN et des sondes. Les résultats sont lus sur le canal à 640 nm pour la mutation C677T.

¹ Les amorces utilisées pour l'étude du polymorphisme de la MTHFR C677T sont :

- séquences MTHFR sense: 5'-TGGCAGGTTACCCCAAAGG-3'
- séquences MTHFR nonsense 5'-TGATGCCCATGTCTGGTGC-3'

² Les séquences hybridation probe sont :

- 5'-TGAGGCTGACCTGAAGCACTTGAAGCACTTGAAGGAGAAGGTGTCT-3'-Flu
- 5'-LC-640-CGG GAG CCG ATT TCA TCA T-3'-PHO

Réactifs – Solutions de travail

Les composants suivants sont ajoutés dans un tube eppendorf à 1,5 mL, ce dernier est placé sur de la glace, en respectant l'ordre indiqué ci-dessous:

1. MTHFR DIL (Diluant MTHFR) (3,5 µL)

- H₂O, qualité PCR grade

2. MTHFR MD Mix (Mélange de détection de la mutation MTHFR C677T) (2 µL)

- amorce sens (0,5 µL) et antisens (0,5 µL) MTHFR
- sonde HybProbe Red 640 MTHFR (0,5 µL)
- sonde HybProbe Fluorescéine MTHFR (0,5 µL)

3. MTHFR R Mix (Mélange de réaction MTHFR) (2 µL)

- Tampon Tris-HCl
- Taq polymérase
- dNTP
- MgCl₂

Ces composants sont mélangés doucement. 7,5 µL de mélange principal sont pipetés dans chaque tube capillaire LightCycler® préalablement refroidi. 3 µL d'ADN d'échantillon isolés ou du contrôle sont ajoutés, puis chaque tube capillaire est fermé hermétiquement à l'aide d'un bouchon en utilisant le dispositif de pose de bouchon LC Capping Tool. Ces tubes sont centrifugés à $735 \times g$ pendant 30 secondes. A l'issue de la centrifugation, le carrousel LightCycler® est transféré sur l'instrument LightCycler® 1.2.

Le résultat de l'analyse de l'ADN d'échantillon doit toujours afficher un profil de courbe de fusion pour le génotype homozygote sauvage, homozygote mutant ou hétérozygote. Les pics de fusion permettent de différencier les génotypes homozygotes (sauvage ou mutant) et hétérozygotes. Les homozygotes 677CC donnent un pic à 63°C, les mutés (677 TT) un pic à 54,5°C et les hétérozygotes (677TC) 2 pics à 54,5°C et 63°C (**Fig. 13**).

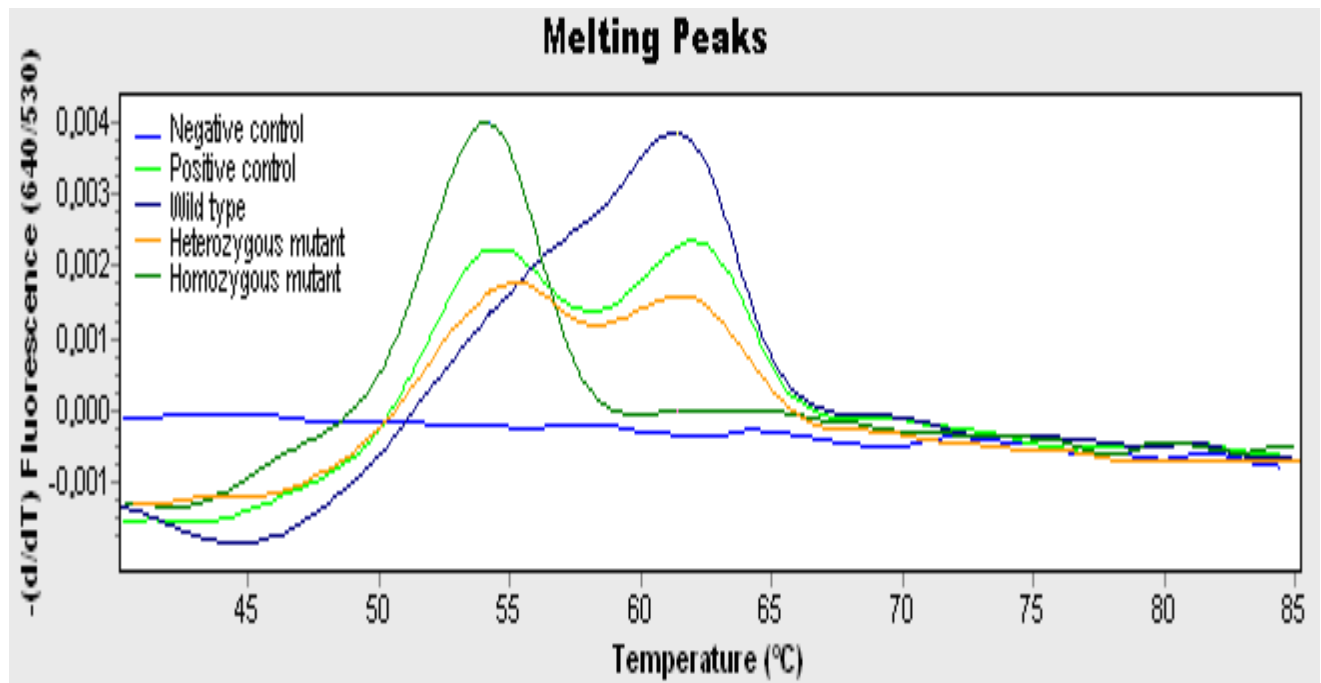


Figure 13. Les courbes obtenues après PCR par le Light-Cycler pour la recherche du polymorphisme 677 du gène de la MTHFR.

II.4.4.2. Recherche de la mutation 844ins68 du gène de la CBS

La mise en évidence de la mutation de la CBS 844ins68 a été déterminée par la PCR dans le thermocycler (Biometra).

Les amorces utilisées pour l'étude du polymorphisme de la CBS sont :

- 5'-CTG GCC TTG AGC CCT GAA-3' Forward
- 5'-GGC CGG GCT CTG GAC T-3' Reverse

Préparation du milieu réactionnel (ou mix) de la PCR

Dans des microtubes stériles de 0,5 mL, pour un volume total de 50 µL, les composants suivants sont mis:

ddH ₂ O	33 µL
(NH ₄) ₂ SO ₄ Buffer (10×)	5 µL
dNTP (10 mM)	2 µL
MgCl ₂ (25 mM)	3 µL
Primer sens (10 pM)	1 µL
Primer anti-sens (10 pM)	1 µL
Taq polymérase (5U/µL)	2 µL
DNA	3 µL

Taq polymérase doit être distribuée très rapidement car elle doit rester le plus possible à -20°C.

La quantité de chaque composant est multipliée par le nombre de tubes voulu plus un autre. C'est le tube témoin négatif dans lequel on met uniquement le mélange sans ADN. Pour les autres tubes, 3 µL d'ADN sont mélangés à 47 µL du mix.

Déroulement des cycles de la PCR

La séquence cible de l'ADN est amplifiée par 35 cycles. Chaque cycle se divise en trois étapes qui se déroulent à différentes températures: la dénaturation, l'hybridation des amorces et l'élongation.

Les conditions d'amplification sont comme suit: une dénaturation initiale à 94°C pendant 4 min, suivie de 35 cycles de PCR, comprenant chacun une dénaturation à 94°C pendant 1 min, une hybridation à 63°C pendant 30 sec et une élongation à 72°C pendant 1 min et enfin une élongation finale à 72°C pendant 10 minutes. La PCR doit être lancée rapidement pour éviter une réaction non spécifique.

Electrophorèse du produit PCR

Le contrôle du produit PCR s'effectue par une électrophorèse sur un gel d'agarose à 2% additionné de 30 µl de bromure d'éthidium (BT) et coulé sur plaque de cuve horizontale.

Dans chaque puits du gel, il est déposé :

- 10 μ L du produit PCR + une goutte de bleu de bromophénol (BBP).
- 3 μ L de marqueur de taille (PM 100 pb, DNA Loader +).

Les dépôts se font du côté cathode (-). Le système soumis à une migration sous un courant de 90 à 120 volts pendant 1 heure.

Les fragments sont révélés par le bromure d'éthidium, réactif intercalant qui se fixe entre les bases nucléiques à l'intérieur de la double hélice et qui rendra les ADN fluorescents par exposition à l'ultras violet (UV).

Plus le fragment a une taille élevée, moins la migration électrophorétique par rapport au puits d'inclusion sera importante. A l'opposé, les fragments de petites tailles auront une distance de migration plus élevée (**Fig. 14**).

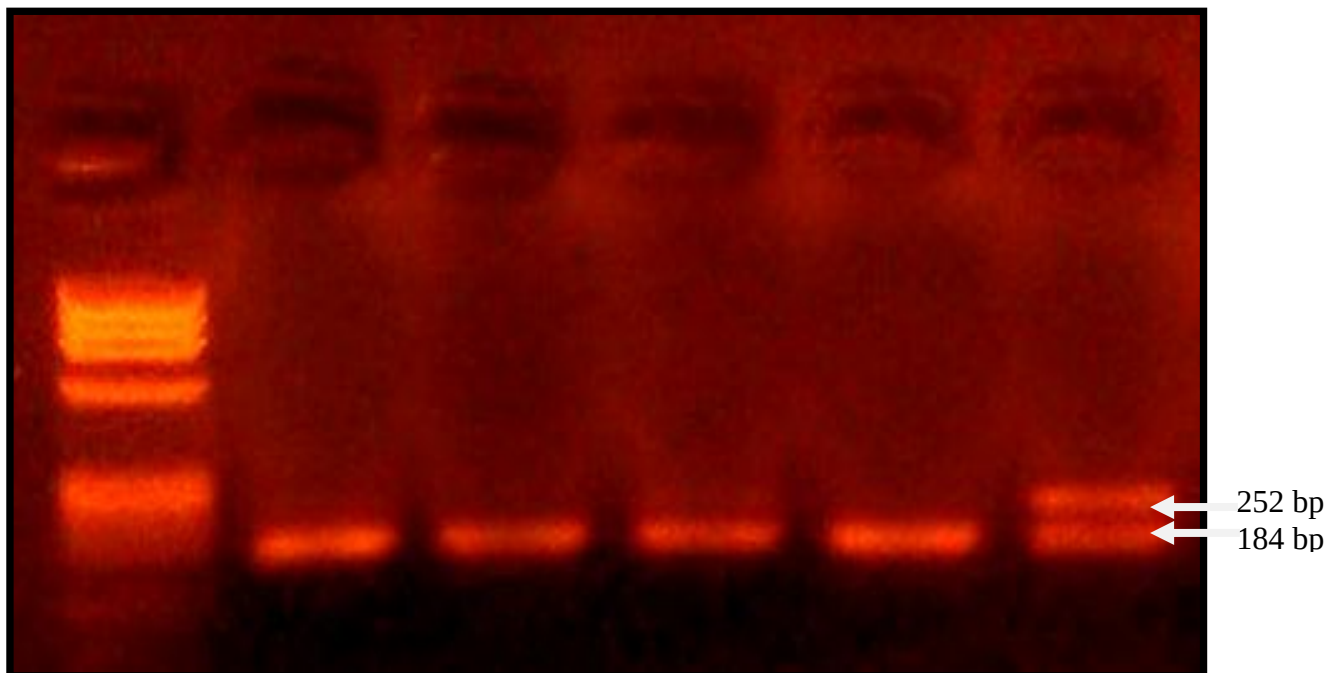


Figure 14. Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose (2%) insertion/délétion de la CBS 844ins68.

II.5. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été effectuée par le programme GraphPad Prism pour Windows. Les données ont été exprimées en pourcentages et fréquences pour les variables qualitatives et en moyenne $\pm$ écart type pour les variables quantitatives.

La comparaison entre variables continues a été réalisée par le calcul du test t Student et les comparaisons multiples ont été faites par l'analyse de variance des rangs suivie par le test de Tukey.

La corrélation entre les différents paramètres a été déterminée par le calcul du coefficient de corrélation de Pearson.

Pour déterminer la relation épidémiologique entre le facteur d'exposition à la mutation pour le gène de la MTHFR et l'incidence des maladies cardiovasculaires, le calcul de l'Odds ratio peut être une bonne approximation du risque relatif en utilisant le tableau de contingence.

Le seuil critique *à priori* est de 0,05 (risque α). Si la valeur de p calculée *à posteriori* est inférieure à ce seuil, la différence entre les paramètres est déclarée statistiquement significative.

III. Résultats

III.1. Description de la population d'étude et fréquences de différents facteurs de risque

L'échantillon de la présente étude regroupe 61 hommes (46,56 %) et 70 femmes (53,44 %). Cette répartition des sujets selon le sexe montre que les MCV affectent avec les mêmes fréquences aussi bien les hommes que les femmes au cours des différentes classes d'âge. En revanche après 60 ans, le *sex ratio* est déséquilibré en faveur des femmes ($\chi^2=7,4$, ddl=1, $p<0,05$)

Notre échantillon s'étale sur une étendue de 76 ans avec un âge minimal de 20 ans et un âge maximal de 96 ans. L'âge moyen était $56,21 \pm 16,85$ ans. Il est de $52,52 \pm 16,89$ ans chez les sujets du sexe masculin et de $59,37 \pm 16,33$ ans chez les sujets du sexe féminin. Le **tableau 9** et la **figure 15** montrent une augmentation de l'atteinte cardiovasculaire avec l'âge pour les deux sexes et notamment chez les femmes.

Tableau 9. Répartition des sujets atteints de MCV selon l'âge et le sexe

	Total	Hommes	Femmes
Age	%	%	%
20-29	5,5	7,1	4,1
30-39	13,2	16,7	10,2
40-49	19,8	23,8	16,3
50-59	18,7	26,2	12,25
≥60	42,8	26,2	57,15*
Total	100	100	100

* $p<0,05$ entre les deux sexes

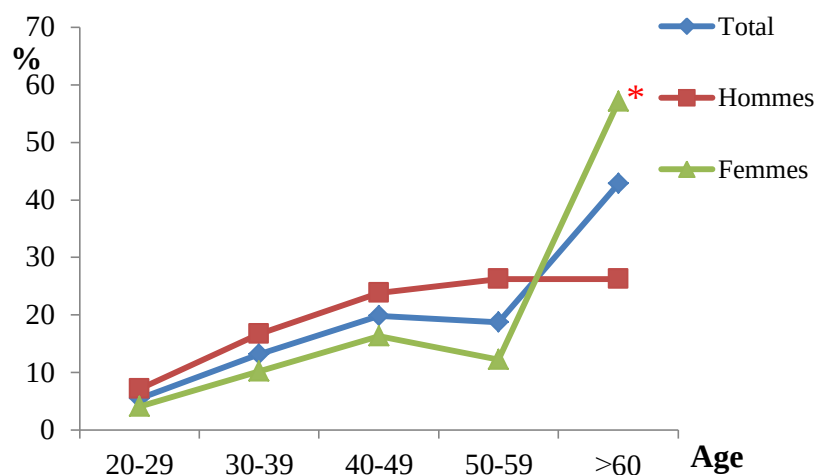


Figure 15. Représentation graphique de la répartition des sujets atteints de MCV selon l'âge et le sexe, * $p < 0,05$ (vs. Groupe d'hommes).

Les caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques des patients sont décrites dans les **tableaux 10 et 11**.

Tableau 10. Variations des métabolites biochimiques en fonction des types de MCV(moyenne $\pm$ SD)

	Insuffisance cardiaque et cardiomyopathies	Cardiopathie ischémique	Pathologie vasculaire	Valvulopathies et Maladies du péricarde et de l'endocarde
Age (ans)	59,06 $\pm$ 14,21	59,02 $\pm$ 16,39	50,65 $\pm$ 19,97	45,86 $\pm$ 17,51
Homocystéine (μ mol/L)	39,69 $\pm$ 10,12	36,31 $\pm$ 11,14	34,9 $\pm$ 8,87	30,5 $\pm$ 7,08
Vitamine B12 (pg/mL)	489,4 $\pm$ 342,1	337,8 $\pm$ 227,1	317,3 $\pm$ 243,8	305 $\pm$ 140,4
Folates (ng/mL)	17,18 $\pm$ 6,74	16,76 $\pm$ 6,24	17,55 $\pm$ 6,76	18,23 $\pm$ 7,26
Glycémie (g/L)	1,34 $\pm$ 0,74	1,3 $\pm$ 0,64	1,01 $\pm$ 0,28	1,5 $\pm$ 1,01
Cholestérolémie (g/L)	1,42 $\pm$ 0,43	1,7 $\pm$ 0,37	1,54 $\pm$ 0,55	1,33 $\pm$ 0,38
Triglycéridémie (g/L)	1,14 $\pm$ 0,5	1,71 $\pm$ 0,91	1,97 $\pm$ 1,89	1,29 $\pm$ 0,34
Urémie (g/L)	0,47 $\pm$ 0,2	0,45 $\pm$ 0,49	0,37 $\pm$ 0,18	0,22 $\pm$ 0,08
Créatininémie (μ mol/L)	127,7 $\pm$ 80,65	107,3 $\pm$ 54,21	106 $\pm$ 47,71	71,33 $\pm$ 12,26

Tableau 11. Caractéristiques de la population d'étude (moyenne $\pm$ SD; n)

	Total	Hommes	Femmes
Age (ans)	56,21 $\pm$ 16,85	52,52 $\pm$ 16,89	59,37 $\pm$ 16,33
Tabac (n) %	25,84	55	2,08***
Diabète (n) %	35,63	25,64	43,75
Obésité (n) %	13,48	0	24,49***
Hypertension (n) %	34,83	27,5	40,82
Dyslipidémie (n) %	26,97	21,74	31,32
Homocystéine (μ mol/L)	35,74 $\pm$ 10,28	35,40 $\pm$ 10,35	36,04 $\pm$ 10,32
Vitamine B12 (pg/mL)	397,6 $\pm$ 324,9	375,0 $\pm$ 366,1	417,5 $\pm$ 285,8
Folates (ng/mL)	17,16 $\pm$ 6,29	16,45 $\pm$ 6,39	17,80 $\pm$ 6,19
Glycémie (g/L)	1,26 $\pm$ 0,63	1,15 $\pm$ 0,55	1,34 $\pm$ 0,68
Cholestérolémie (g/L)	1,59 $\pm$ 0,42	1,59 $\pm$ 0,47	1,59 $\pm$ 0,38
Triglycéridémie (g/L)	1,63 $\pm$ 1,11	1,33 $\pm$ 0,51	1,87 $\pm$ 1,36*
Urémie (g/L)	0,41 $\pm$ 0,37	0,33 $\pm$ 0,22	0,47 $\pm$ 0,45
Créatininémie (μ mol/L)	108,5 $\pm$ 55,55	114,4 $\pm$ 49,17	103,8 $\pm$ 60,21

* T-Test $p < 0,05$ entre les deux sexes

*** $p < 0,001$, test de Fisher, comparaison entre les deux sexes

Sur l'ensemble de la population d'étude, une grande frange des malades (53 %) est affectée de cardiopathie ischémique, alors que 20 % ont de pathologie vasculaire et 18,82 % d'insuffisance cardiaque et de cardiomyopathies. Les valvulopathies et les maladies du péricarde et de l'endocarde ont été trouvées seulement chez 8,23 % des patients. Les valeurs des paramètres biochimiques ne sont pas différentes entre ces sous groupes.

L'obésité est significativement plus observée chez les femmes (24,49 % vs 0 %) dans toutes les classes d'âge avec qui, elle progresse pour culminer dans la tranche des 55-74 ans (28,57 %, $p=0,007$) (**Fig. 16**). L'obésité est associée à un niveau légèrement élevé des TG chez les femmes ($1,68 \pm 1,35$ g/L chez les normaux vs $2,36 \pm 1,32$ g/L chez les obèses, $p = 0,1684$), alors que le taux de cholestérol présente des valeurs homogènes chez les obèses et les non obèses ($1,66 \pm 0,43$ g/L vs $1,57 \pm 0,37$ g/L, respectivement).

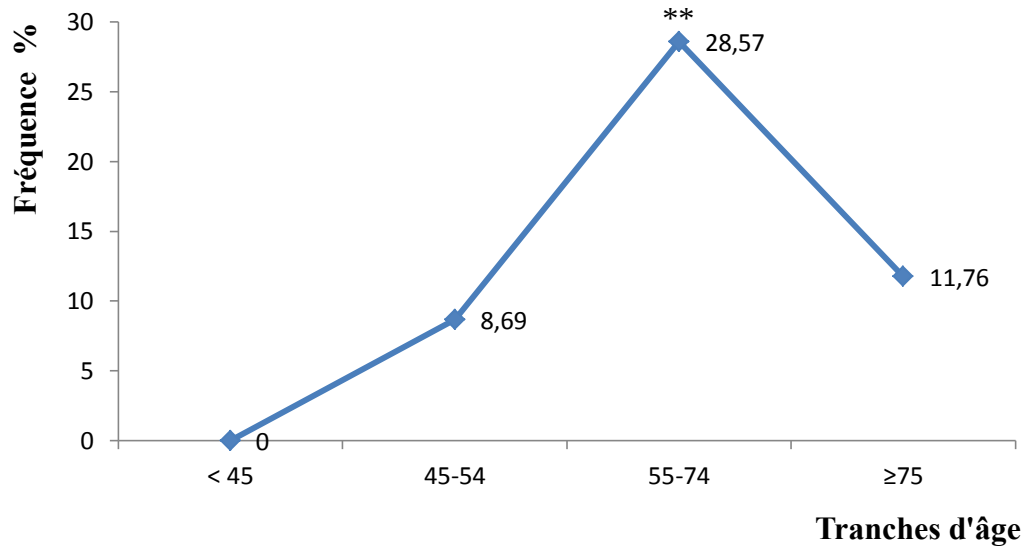


Figure 16. Variations des fréquences de l'obésité selon les tranches d'âge chez les sujets atteints de MCV, ** $p < 0,01$ (Gp3 vs. Gp1).

La fréquence du tabagisme fumée atteint 25,84 %, elle est significativement plus élevée chez les hommes (55 % vs 2,08 %, $p<0,001$).

Conformément aux recommandations pour la mesure de la pression artérielle, les résultats indiquent une fréquence de 34,83 %, avec un pourcentage plus important de femmes hypertendues que d'hommes (40,82 % vs 27,5 %, $p = 0,26$), néanmoins cette différence ne semble pas statistiquement significative. La fréquence de l'hypertension artérielle augmente avec l'âge notamment chez les hommes (**Fig. 17**); en effet, elle passe de 14,28 % chez les 20-44 ans (hommes: 8,33 %; femmes: 22,22 %) à 39,13 % chez les 45-54 ans (hommes: 28,57 %; femmes: 55,55 %) et 28,57 % chez les 55-74 ans (hommes: 14,28 %; femmes: 33,33 %) pour atteindre 35,29 % au-delà des 75 ans (hommes: 71,43 %; femmes: 60 %).

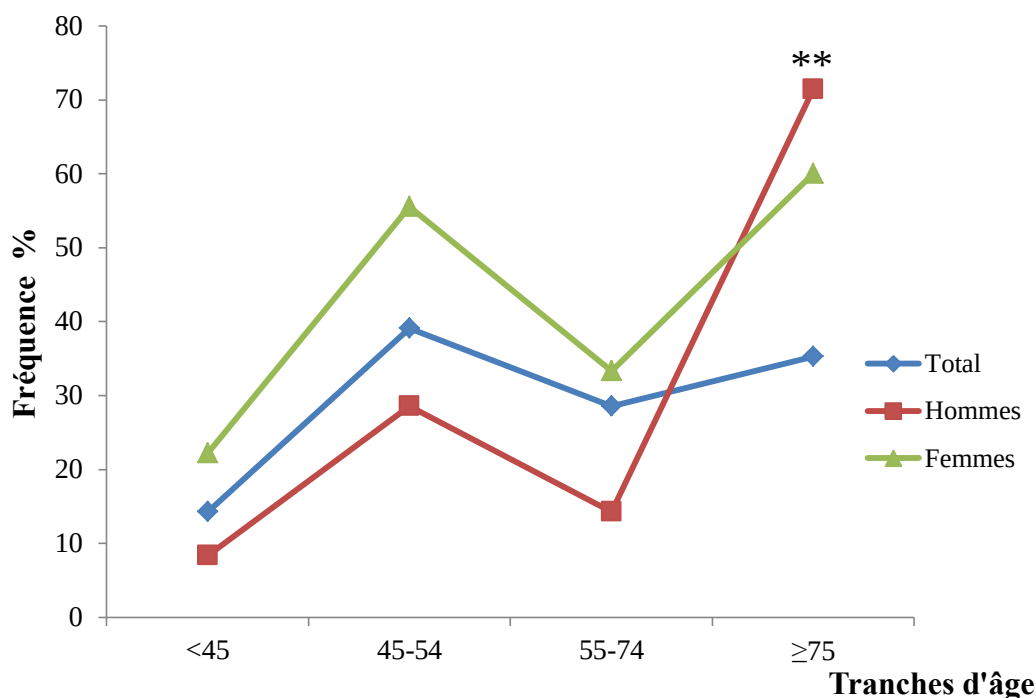


Figure 17. Variations des fréquences de l'HTA selon les tranches d'âge chez les hommes, ** $p < 0,01$ (Gp4 vs. Gp1).

Cette fréquence élevée de l'HTA chez les hommes à âge avancé, a été réaffirmée après stratification de notre échantillon selon ce facteur de risque. En fait, l'âge moyen des hommes hypertendus ($63,73 \pm 17,2$ ans) était significativement plus élevé que celui des normaux ($48,38 \pm 15,61$ ans) ($p < 0,05$) (**Tab. 11**).

En outre, l'analyse de comparaison des moyennes a montré des différences dans les taux plasmatiques d'Hcy et de Glc entre les hypertendus et les non hypertendus. L'homocystéinémie et la glycémie sont respectivement de $33,44 \pm 9,29$ $\mu\text{mol/L}$ et $1,06 \pm 0,45$ g/L chez ces derniers, alors qu'elles atteignent $40,88 \pm 10,35$ $\mu\text{mol/L}$ et $1,63 \pm 0,76$ g/L chez les sujets hypertendus ($p < 0,0001$). Ces constatations ont été décelées aussi bien chez les hommes que les femmes (**Tab. 12**).

Tableau 12. Variation des paramètres biochimiques en fonction de l'HTA

	Total		Hommes		Femmes	
	PA normale	HTA	PA normale	HTA	PA normale	HTA
Age (ans)	53,02±17,16	62,52±15,17*	48,38±15,61	63,73±17,2*	57,66±17,64	61,85±14,30
Homocystéine (μmol/L)	33,44±9,29	40,88±10,35***	33,33±9,32	40,79±11,4*	33,56±9,43	40,94±10,0*
Vitamine B12 (pg/mL)	398,4±301,9	299,2±155,8	343,6±268,5	242,5±136,1	453,2±327,5	330,3±160,3
Folates (ng/mL)	17,37±6,46	16,71± 6,21	16,17±6,84	16,58±5,82	18,58±5,93	16,79±6,57
Glycémie (g/L)	1,06±0,45	1,63±0,76***	1,03±0,50	1,48±0,61*	1,08±0,39	1,71±0,83**
Cholestérolémie (g/L)	1,62±0,48	1,56±0,29	1,63±0,52	1,56±0,28	1,62±0,45	1,57±0,3
Triglycéridémie (g/L)	1,60±1,17	1,63±0,97	1,28±0,44	1,24±0,24	1,90±1,53	1,84±1,15
Urémie (g/L)	0,38±0,40	0,47±0,31	0,32±0,22	0,37±0,25	0,43±0,52	0,52±0,33
Créatininémie (μmol/L)	97,00±35,57	126,2±80,17*	103,7±26,03	133,8±91,45	90,52±42,31	122,3±76,18

* et ***, $p < 0,05$ et $< 0,0001$ respectivement. Comparaison réalisée par test de Fisher entre PA normale vs HTA.

35,63 % de cet échantillon répond à la définition de l'OMS du diabète (glucose plasmatique à jeun $\geq 1,26$ g/L). Cette épidémie touche avec prédilection les femmes (43,75 % femmes vs 25,64 % hommes, $p = 0,114$) et elle semble dépendante de l'âge. Sa fréquence passe de 20 % chez les 20-44 ans (hommes: 9,1 %; femmes: 33,33 %) à 30,43 % chez les 45-54 ans (hommes: 21,43 %; femmes: 44,44 %) pour atteindre 35,71 % chez les 55-74 ans (hommes: 14,28 %; femmes: 42,85 %) et 62,5 % au-delà de 75 ans (hommes: 71,43 %; femmes: 55,55 %) ($p > 0,05$).

La classification des sujets en deux sous groupes en fonction de la valeur critique du Glc sanguin, a permis de ressortir une différence seulement au niveau des valeurs de l'âge et de l'urée ($53,27 \pm 15,63$ vs $62,35 \pm 17,21$ ans et $0,34 \pm 0,21$ vs $0,54 \pm 0,53$ g/L, respectivement; $p < 0,05$). Alors que les autres paramètres biochimiques ne sont pas différents entre les diabétiques et les non diabétiques.

En plus, le regroupement des malades ayant ces deux facteurs de risque, diabète et hypertension, a fait révéler chez eux une concentration moyenne élevée de créatinine ($140,1 \pm 93,98 \mu\text{mol/L}$) mais non de l'homocystéine. La valeur de cette dernière chez les sujets hypertendus et diabétique était similaire à celle trouvée chez les sujets hypertendus ayant une glycémie normale (**Tab. 13**).

Tableau 13. Variation des paramètres biochimiques en fonction de l'HTA et du diabète

	PA normale		HTA	
	Sujets non diabétiques	Sujets diabétiques	Sujets non diabétiques	Sujets diabétiques
Age (ans)	51,86 $\pm$ 16,17	57,38 $\pm$ 18,39	58,58 $\pm$ 13,53	65,94 $\pm$ 15,87 *
Homocystéine ($\mu\text{mol/L}$)	32,78 $\pm$ 8,9	37,07 $\pm$ 9,98	43,57 $\pm$ 10,04 **	40,06 $\pm$ 10,01 *
Vitamine B12 (pg/mL)	400,4 $\pm$ 303,1	417 $\pm$ 326,2	278,3 $\pm$ 171,8	318,2 $\pm$ 150,2
Folates (ng/mL)	17,69 $\pm$ 6,5	16,42 $\pm$ 6,15	17,35 $\pm$ 6,64	16,22 $\pm$ 6,24
Glycémie (g/L)	0,86 $\pm$ 0,16	1,71 $\pm$ 0,48 *** §§§	1,02 $\pm$ 0,14	2,04 $\pm$ 0,73 *** §§§
Cholestérolémie (g/L)	1,63 $\pm$ 0,47	1,6 $\pm$ 0,53	1,51 $\pm$ 0,29	1,59 $\pm$ 0,29
Triglycéridémie (g/L)	1,6 $\pm$ 1,26	1,62 $\pm$ 0,78	1,45 $\pm$ 0,69	1,76 $\pm$ 1,14
Urémie (g/L)	0,32 $\pm$ 0,2	0,55 $\pm$ 0,73	0,39 $\pm$ 0,25	0,54 $\pm$ 0,34
Créatininémie ($\mu\text{mol/L}$)	98,47 $\pm$ 33,52	92,24 $\pm$ 42,71	105,2 $\pm$ 50	140,1 $\pm$ 93,98 *

Comparaison réalisée par test ANOVA

* vs groupe des sujets non hypertendus et non diabétiques, * $p < 0,05$ et *** $p < 0,0001$

§ vs groupe des sujets hypertendus et non diabétiques, §§§ $p < 0,001$

L'anomalie lipidique a touché 4,28 % des patients, ses fréquences étaient similaires chez les deux sexes: 0 % hommes vs. 7,69 % femmes ($p = 0,25$) (**Tab. 11**).

L'hypercholestérolémie est rencontrée chez 11,11 % (hommes 13,16 %; femmes 9,3%, $p=0,72$) alors que l'hypertriglycéridémie chez 45,07 % des cas (hommes 32,26 %; femmes 55 %, $p=0,09$).

III.2. Caractéristiques biochimiques des sujets atteints de maladies cardiovasculaires

- **Glycémie**

Les concentrations moyennes du glucose étaient $1,34 \pm 0,68$ g/L vs $1,15 \pm 0,55$ g/L ($p > 0,05$) respectivement chez les femmes et les hommes. Notre population d'étude semble toucher par ce facteur de risque; en effet, on a colligé plus d'un tiers des sujets atteints du diabète et une moyenne de glycémie ($1,26 \pm 0,63$ g/L) proche de la limite critique du diabète définie par l'American Diabetes Association ($\geq 1,26$ g/L) (**Tab. 11**).

- **Triglycérides**

Le niveau des triglycérides plasmatiques atteint $1,63 \pm 1,11$ g/L, et est plus élevé chez les femmes ($1,33 \pm 0,51$ hommes *versus* $1,87 \pm 1,36$ g/L femmes, $p < 0,05$) (**Tab. 11**).

Ces valeurs de triglycérides plasmatiques ont des conséquences sur l'état sanitaire des malades étant donné que les concentrations moyennes obtenues sont supérieures de la catégorie d'un bilan normal surtout chez les femmes.

- **Cholestérol**

Les analyses biochimiques ont montré des concentrations en cholestérol non pathologiques (< 2 g/l). La cholestérolémie moyenne atteint $1,59 \pm 0,42$ g/L, sans différence entre les deux sexes ($1,59 \pm 0,47$ g/L hommes vs $1,59 \pm 0,38$ g/L femmes) (**Tab. 11**). Ainsi, le test de corrélation n'a pas révélé une interaction entre la cholestérolémie et les autres facteurs dosés.

- **Créatinine**

La créatininémie moyenne atteint $108,5 \pm 55,55$ μ mol/L, sans différence selon le sexe (hommes: $114,4 \pm 49,17$ μ mol/L vs femmes: $103,8 \pm 60,21$ μ mol/L). La fonction rénale semble être moins bonne chez les hommes à un âge avancé (≥ 75 ans, créatinine $159,2 \pm 93,51$ μ mol/L) (**Fig. 18**). Pour les valeurs des autres classes, elles se situent dans la catégorie d'un bilan normal. (**Tab. 11**). Ces résultats indiquent que la fonction rénale est normale, et qu'aucune corrélation ne peut être suscitée entre cette fonction et les MCV.

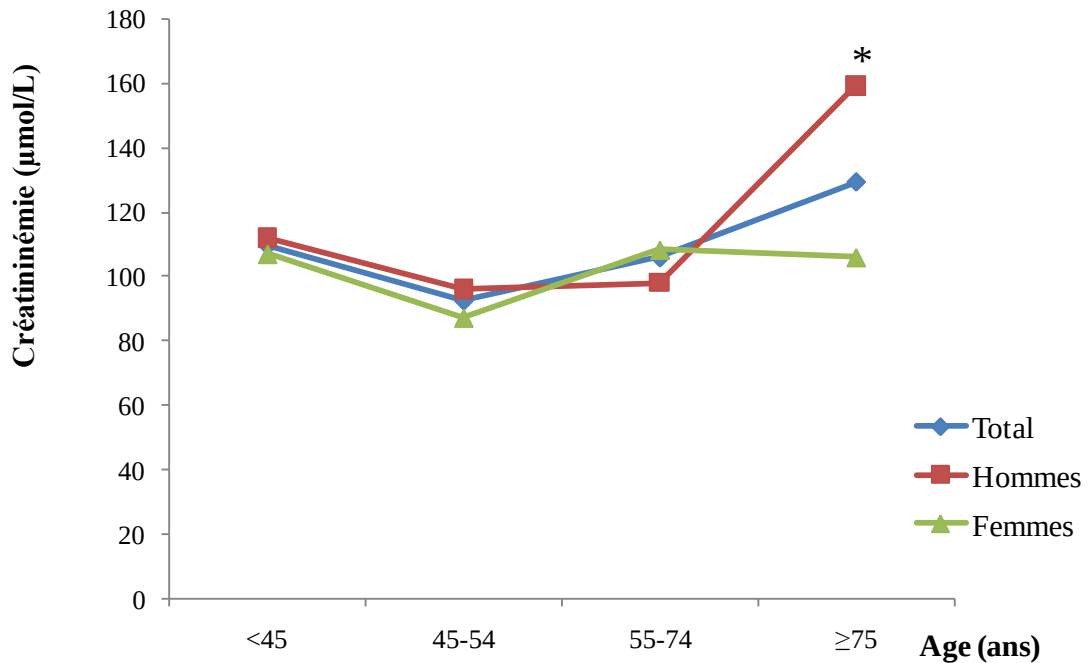


Figure 18. Variation de la créatininémie en fonction des groupes d'âge chez les patients avec maladies cardiovasculaires, * $p < 0,05$ (Gp4 vs Gp2: 45-54 ans, ANOVA).

- **Urée**

D'après les résultats obtenus, la fonction rénale des sujets atteints de MCV est intacte, donc l'absence de toute corrélation entre la maladie en question est l'insuffisance rénale. Les concentrations plasmatiques de ce métabolite sont $0,41 \pm 0,37$, $0,33 \pm 0,22$ et $0,47 \pm 0,45$ g/L colligées en respectivement chez le total, le groupe des hommes et le groupe des femmes (**Tab. 11**). Les analyses statistiques ont révélées une corrélation positive entre la créatininémie et l'urémie ($r = 0,42$; $p < 0,0001$).

- **Folates et vitamine B12**

L'évaluation des taux des vitamines B12 et B9 ont permet d'enregistrer des valeurs qui se situent dans les limites de la normale. En effet, leurs concentrations atteignent respectivement $397,6 \pm 324,9$ pg/mL et $17,16 \pm 6,29$ ng/mL et elles sont indépendantes des facteurs de risque cardiovasculaire étudiés (sexe, âge, obésité, HTA et diabète). Par ailleurs, comme il est prévu, le test de corrélation a révélé un lien étroit entre ces deux vitamines ($r = 0,43$, $p < 0,0001$).

Effet des folates sur les métabolites biochimiques

La stratification des sujets atteints de MCV selon les limites de folatémie ($\leq$ et > 16 ng/mL), nous n'a pas permis de resurgir une différence entre les taux de Glc, de TG, de Chol, de tHcy, d'urée et de créatinine dans les deux classes. Puisque les folates sont corrélés positivement à la vitamine B12, la diminution de taux de folates (≤ 16 ng/mL) entraîne l'abaissement de celui de la vitamine B12 ($309,7 \pm 221,6$ pg/mL) et *vice versa* (folates > 16 ng/mL, $485,5 \pm 385,4$ pg/mL de vitamines B12) (**Tab. 14**).

Tableau 14. Caractéristiques biochimique selon les concentrations des folates

	Folates ≤ 16 ng/mL	Folates >16 ng/mL
Age (ans)	$53,64 \pm 16,42$	$58,62 \pm 17,07$
Vitamine B12, pg/mL	$309,7 \pm 221,6$	$485,5 \pm 385,4$ **
Folate, ng/mL	$11,62 \pm 2,66$	$22,81 \pm 2,99$ ***
Homocystéine, $\mu\text{mol/L}$	$36,44 \pm 10,05$	$35,04 \pm 10,57$
Glycémie, g/L	$1,30 \pm 0,65$	$1,21 \pm 0,62$
Cholestérolémie, g/L	$1,65 \pm 0,41$	$1,53 \pm 0,43$
Triglycéridémie, g/L	$1,51 \pm 0,41$	$1,74 \pm 1,38$
Urémie, g/L	$0,35 \pm 0,21$	$0,47 \pm 0,47$
Créatininémie, $\mu\text{mol/L}$	$109,2 \pm 55,64$	$105,9 \pm 57,98$

*** $p < 0,0001$ et ** $p < 0,001$

- **Homocystéinémie**

Les valeurs de l'homocystéine plasmatique oscillent entre 16,1 et 51 $\mu\text{mol/L}$. La concentration moyenne atteint $35,74 \pm 10,28$ $\mu\text{mol/L}$. 22,45 % des sujets ont une hyperhomocystéinémie modérée et 77,55 % possèdent une hyperhomocystéinémie de grade intermédiaire ($p < 0,0001$). Cette fréquence importante de l'hyperhomocystéinémie intermédiaire comparée à celle modérée est retrouvée ainsi aussi bien chez les hommes (21,15 % vs 78,84 %) que les femmes (23,91 % vs 76,09 %) ($p < 0,0001$).

Lorsque tHcy a été corrélée avec l'âge, l'analyse statistique a montré qu'il y avait un lien significatif entre ces deux facteurs ($p = 0,035$, $r = 0,22$) (**Tab. 15**), ce lien est plus fort notamment chez le groupe d'hommes ($p = 0,035$, $r = 0,32$).

Tableau 15. Les corrélations significatives colligées entre les différents paramètres

	r	p
Age vs urée	0,23	0,035
tHcy vs âge	0,22	0,035
tHcy vs urée	0,23	0,037
tHcy vs créatinine	0,27	0,013
Vitamine B12 vs folates	0,43	$P < 0,0001$
Créatinine vs urée	0,42	$P < 0,0001$

En effet, la concentration moyenne de l'Hcy s'élève continuellement avec l'âge passant de $33,9 \pm 8,14 \mu\text{mol/L}$ entre 20-45 ans à $43,6 \pm 7,99 \mu\text{mol/L}$ au-delà de 75 ans ($p < 0,01$). (**Fig. 19**). Cependant, cette différence n'apparaît pas chez les femmes lorsque on stratifie l'homocystéinémie selon les tranches d'âge ($p = 0,387$) (**Tab. 16**).

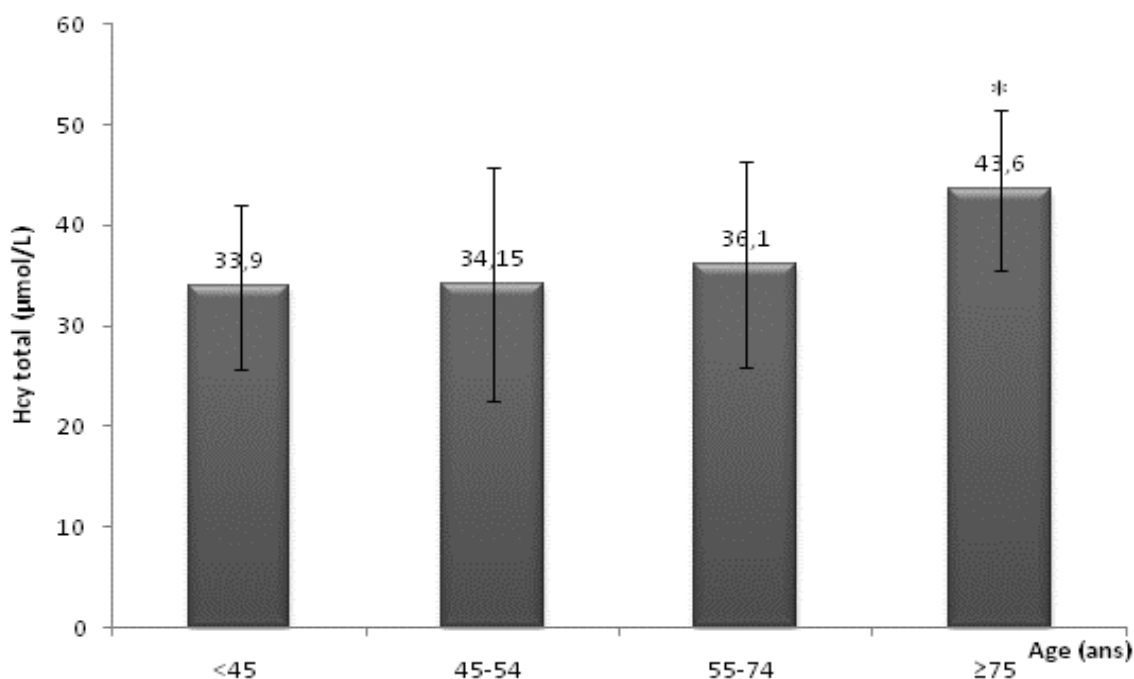


Figure 19. Concentration de tHcy selon les groupes d'âge chez les patients avec maladies cardiovasculaires. * $p < 0,05$ (Gp4 vs. Gp1 et Gp2, ANOVA).

Concernant l'effet du sexe sur le taux de tHcy, nos résultats ont révélé que les valeurs d'homocystéinémie étaient identiques entre femmes et hommes ($36,04 \pm 10,32$ et $35,40 \pm 10,35$ $\mu\text{mol/L}$, respectivement) (**Tab. 16**).

Tableau 16. Concentration de l'homocysteine totale (tHCY) en fonction des classes d'âges et le sexe chez les sujets atteints de MCV

	tHcy total ($\mu\text{mol/L}$)	tHcy chez les hommes ($\mu\text{mol/L}$)	tHcy chez les femmes ($\mu\text{mol/L}$)
Total	$35,74 \pm 10,28$	$35,40 \pm 10,35$	$36,04 \pm 10,32$
Age: <55 ans	$34,02 \pm 10,15$	$33,43 \pm 10,47$	$34,9 \pm 9,86$
≥ 55 ans	$38,53 \pm 9,99^*$	$40,79 \pm 8,67^*$	$37,5 \pm 10,5$

* $p < 0,05$

tHcy et les métabolites biochimiques

Quand les paramètres biochimiques ont été comparés entre le groupe des patients ayant une HHcy modérée à celui d'HHcy intermédiaire, des légères diminutions de folates et de vitamines B12 et une augmentation non significative des taux de Glc, de TG, de Chol, d'urée et de créatinine ont été enregistrées (**Tab. 17**).

Par ailleurs, des corrélations positives ont été identifiées entre tHcy et la créatinine d'une part ($r = 0,27$, $p = 0,013$) et entre tHcy et l'urée ($r = 0,23$, $p = 0,037$) d'autre part (**Tab. 15**). Toutefois, ces associations étaient dépendantes du sexe.

En effet, chez le groupe d'hommes, elles sont significatives entre tHcy et créatinine ($r = 0,418$, $p = 0,009$) et faible entre tHcy vs urée ($r = 0,28$, $p = 0,098$). Contrairement chez les femmes, aucune corrélation entre ces métabolites n'a été décelée (tHcy vs créatinine $r = 0,195$ et tHcy vs urée $r = 0,213$, $p > 0,05$).

En outre, il a été démontré par des analyses statistiques que les concentrations de folates et de vitamine B12 ne sont pas corrélées à l'homocystéine ($r = -0,124$ et $r = -0,161$, $p > 0,05$ respectivement).

Tableau 17. Variations des paramètres biochimiques en fonction des limites de l'hyperhomocystéinémie.

	Homocystéine <30 ($\mu\text{mol/L}$)	Homocystéine ≥ 30 ($\mu\text{mol/L}$)
Age	52,26 $\pm$ 14,38	58,25 $\pm$ 17,76
Vitamine B12 (pg/mL)	410,80 $\pm$ 281	390,2 $\pm$ 348,9
Folate (ng/mL)	18,60 $\pm$ 6,28	16,34 $\pm$ 6,19
glucose (g/L)	1,17 $\pm$ 0,58	1,29 $\pm$ 0,65
Cholestérol (g/L)	1,62 $\pm$ 0,38	1,58 $\pm$ 0,44
Triglycerides (g/L)	1,41 $\pm$ 0,56	1,75 $\pm$ 1,29
Urée (g/L)	0,37 $\pm$ 0,25	0,43 $\pm$ 0,41
Créatinine ($\mu\text{mol/L}$)	93,30 $\pm$ 32,69	114,4 $\pm$ 64,13

III.3. Répartitions des fréquences génotypiques de C677T du gène de la MTHFR et de 844ins68 de la CBS

Le tableau 18 montre la fréquence de chaque génotype dans le groupe des témoins et dans le groupe des malades. Les résultats des tests Chi carré ont été mentionnés en comparant chaque génotype dans les deux groupes différents.

Chez les sujets sains, l'analyse génétique a révélé que les fréquences génotypiques C677T de la MTHFR étaient respectivement, 45,6, 40,1 et 14,3 % pour les allèles sauvage (CC) et mutés hétérozygote (CT) et homozygote (TT). Sur la base de nos données, on ne constate pas d'écart significatif par rapport aux proportions de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 2,58$, 1ddl, NS).

Chez les sujets atteints de MCV, la mutation du gène C677T de la MTHFR a été trouvée chez 78 patients dont lesquels les génotypes CT et TT inclurent respectivement 57 et 21 malades (soit respectivement 43,5 et 16,1 % des cas). La distribution génotypique de la mutation MTHFR suit un équilibre de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,73$, 1ddl, NS), preuve que l'échantillon est représentatif de la population. La fréquence de l'allèle T estimé dans

l'échantillon de 131 individus était égale à 37,8 % et pour l'allèle dominant C, elle était de 62,2 %. Par ailleurs, la fréquence du gène d'insertion 844ins68 CBS, atteint 13,8 % (14/101).

Au point de vue génotypique et après comparaison entre les patients malades et ceux sains, aucune augmentation significative des fréquences des allèles mutés n'a été observée pour les polymorphismes C677T MTHFR (OR=0,86 [0,61-1,21], $\chi^2 = 0,71$) et 844ins68 CBS (**Tab. 18**).

La combinaison des génotypes MTHFR C677T et CBS 844ins68 pour générer des génotypes composites a permis de retrouver les six. Dans notre étude, les fréquences des 6 combinaisons observées CC/N, CC/INS, CT/N, CT/INS, TT/N et TT/INS étaient de 36,6 %, 2,9 %, 38,6 %, 7,9 %, 10,9 % et 2,9 % respectivement.

Donc, chez les 14 patients portant une mutation d'insertion, 3 ont les deux facteurs de risque (MTHFR 677TT et CBS 844ins68), 8 ont les deux facteurs de risque (MTHFR 677CT et CBS 844ins68) et 3 ont un seul facteur de risque (CBS 844ins68). Il n'existe pas une association significative évidente entre les 2 mutations chez les patients atteints de MCV.

Concernant la distribution génotypique selon le sexe, on estime que les fréquences chez les femmes et les hommes atteints de MCV sont respectivement comme suit: 44,3 et 36 % pour CC, 40 et 47,6 % pour CT et 15,7 et 16,4 % pour TT. L'analyse statistique n'a pas montré une différence significative des fréquences de l'allèle T entre les 2 sexes. Néanmoins, chez les hommes, la fréquence de l'allèle T des sujets malades est élevée par rapport à celle de sujets sains (40,2 % vs 29,2 %), mais également, cette différence n'était pas statistiquement significative (OR = 0,62, $\chi^2=3,33$) (**Tab. 19**).

Tableau 18. Les fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme de l'enzyme méthylènetétrahydrofolate réductase C677T et sa combinaison avec la mutation cystathionine β -synthase 844ins68 chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires et les sujets contrôles.

Génotype/ allèle	Patients (n =131)	Contrôle (n =147)	OR (95% CI)
Génotypes			
CC	53 (40,4)	67 (45,6)	1
CT	57 (43,5)	59 (40,1)	0,82 (0,49–1,37)
TT	21 (16,1)	21 (14,3)	0,79 (0,39–1,6)
Allèles			
C	163 (62,2)	193 (65,6)	1
T	99 (37,8)	101 (34,4)	0,86 (0,61–1,21)

Distribution combinée du génotype de MTHFR et de mutation CBS844ins68 chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires

	CBS (N)	CBS (INS)
CC	37 (36,6)	3 (2,9)
CT	39 (38,6)	8 (7,9)
TT	11 (10,9)	3 (2,9)

Les valeurs entre parenthèse indiquent les fréquences génotypiques (colonnes 2 et 3) ou CI 95% (colonne 4).

CI, intervalle de confiance; OR, odds ratio; N, normale; INS, insertion; MTHFR, méthylènetétrahydrofolate réductase; CBS, cystathionine β -synthase.

Tableau 19. Distribution des fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme génétique de MTHFR C677T selon le sexe chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires et les sujets contrôles.

Génotype/allèle	Hommes			Femmes		
	Patients (n=61)	Contrôles (n=65)	OR (95% CI) ^a	Patients (n=70)	Contrôles (n=82)	OR (95% CI)
Génotypes						
CC	22 (36,0)	34 (52,3)	1	31 (44,3)	33 (40,2)	1
CT	29 (47,6)	24 (36,9)	0,54 (0,25–1,16)	28 (40,0)	35 (42,7)	1,17 (0,58–2,35)
TT	10 (16,4)	7 (20,8)	0,45 (0,15–1,36)	11 (15,7)	14 (17,1)	1,2 (0,47–3,04)
Allèles						
C	73 (59,8)	92 (70,8)	1	90 (64,3)	101 (61,6)	1
T	49 (40,2)	38 (29,2)	0,62 (0,37–1,05)	50 (35,7)	63 (38,4)	1,12 (0,7–1,79)

Les valeurs entre parenthèse représentent les fréquences génotypiques (colonnes 2, 3, 5 et 6) et CI 95% (colonne 4 et 7). Les différences selon le sexe entre les génotypes de MTHFR ne sont pas significatives.

Toutefois, nous avons noté une différence de la distribution du polymorphisme C677T en fonction de l'âge, puisque les fréquences étaient de 19,6 et 4,7 % respectivement chez les sujets <55 ans (n = 46) et ceux au-delà de 55 ans (n = 43) ($p < 0,05$) (**Tab. 20**).

Par ailleurs, lorsqu'on stratifie les génotypes selon les tranches d'âge, on révèle que la fréquence du génotype TT est significativement plus basse chez les sujets de 55 à 74 ans (**Tab. 21**).

Tableau 20. Fréquences génotypiques du polymorphisme de la méthylentetrahydrofolate reductase (MTHFR) selon le sexe et l'âge chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires

Age	CC n (%)	CT n (%)	TT n (%)
<55 ans (n = 46)	16 (34,8)	21 (45,6)	9 (19,6)
≥55 ans (n = 43)	20 (46,5)	21 (48,8)	2 (4,7) *
Hommes (n = 40)			
<55ans (n = 28)	9 (32,1)	14 (50,0)	5 (17,9)
≥55 ans (n = 12)	5 (41,7)	7 (58,3)	0 (0,0)
Femmes (n = 49)			
<55 ans (n = 18)	7 (38,9)	7 (38,9)	4 (22,2)
≥55 ans (n = 31)	15 (48,4)	14 (45,2)	2 (6,4)

* $p < 0,05$

Tableau 21. Les polymorphismes de la méthylentetrahydrofolate reductase (MTHFR) selon les groupes d'âge chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires.

	Gp1 (<45 ans) (n = 21)	Gp2 (45-54 ans) (n = 25)	Gp3 (55-74 ans) (n = 27)	Gp4 (≥75 ans) (n = 16)
génotype MTHFR				
CC	9 (42,8)	7 (28,0)	12 (44,4)	8 (50,0)
CT	10 (47,6)	11 (44,0)	14 (51,8)	7 (43,7)
TT	2 (9,6)	7 (28,0)	1 (3,8) *	1 (6,3)

* $p < 0.05$ (TT; Gp3 vs Gp2)

III.4. Effet de C677T de la MTHFR sur les facteurs biochimiques et son interaction avec le désordre lipidique

III.4.1. Association du génotype C677T MTHFR avec l'homocystéine, les TG et le Chol et l'effet du désordre lipidique

Pour étudier l'effet des génotypes mutés (CT/TT de la MTHFR) sur l'homocystéinémie et les autres métabolites (Chol et TG), leurs concentrations plasmatiques ont été comparées entre les génotypes CC et CT/TT dans l'ensemble de nos sujets (GP1). En tenant compte de la rareté de la fréquence du génotype homozygote TT, nous avons opté d'assembler les génotypes TT et CT (677CT/TT) dans un même groupe.

En outre, GP1 est subdivisé en deux groupes dont le but était de déterminer si les désordres des lipidiques plasmatiques accroîtraient le taux d'homocystéine en présence du génotype muté; le premier groupe inclut les sujets ayant une hyperlipidémie (GP2), tandis que le second comprend les sujets indemnes d'hyperlipidémie (GP3) (**Tab. 22**).

Les résultats obtenus révèlent qu'il n'y avait pas de différence significative de tHcy entre les génotypes CC et CT/TT dans les GP1, 2 et 3. Les concentrations moyennes d'Hcy chez les sujets du génotype CC étaient de $35,68 \pm 9,95$, $36,71 \pm 9,24$ et $36,27 \pm 11,65$ $\mu\text{mol/L}$ respectivement pour les groupes cités ci-dessus et de $35,78 \pm 10,59$, $35,33 \pm 9,74$ et $38,41 \pm 10,38$ $\mu\text{mol/L}$ chez les sujets des génotypes CT/TT. Donc, aucune influence significative du polymorphisme MTHFR C677T sur le taux plasmatique de tHcy n'a été notée ($p > 0,05$).

De même, les concentrations des triglycérides étaient similaires chez les différents groupes et indépendantes du génotype de la MTHFR. En revanche, la cholestérolémie était plus élevée chez les sujets de GP1 porteurs du polymorphisme CT/TT en comparaison à ceux de CC ($1,68 \pm 0,42$ vs. $1,47 \pm 0,39$ g/L, $p < 0,05$).

Tableau 22. Association des génotypes de MTHFR C677T avec le cholestérol (CH), les triglycérides, la vitamine B12, les folates et l'homocystéine
(Moyenne $\pm$ SD)

Génes variants		MTHFR	
		CC	CT/TT
Total (GP1)	Chol (g/L)	1,47 $\pm$ 0,39	1,68 $\pm$ 0,42*
	TG (g/L)	1,40 $\pm$ 0,67	1,82 $\pm$ 1,34
	Vitamine B12 (pg/mL)	448,60 $\pm$ 341,90	362,40 $\pm$ 310,80
	Folates (ng/mL)	18,66 $\pm$ 6,10	16,15 $\pm$ 6,26
	Homocystéine (μ mol/L)	35,68 $\pm$ 9,95	35,78 $\pm$ 10,59
Hyperlipidémie (GP2)	Chol (g/L)	1,56 $\pm$ 0,44	1,69 $\pm$ 0,47
	TG (g/L)	1,94 $\pm$ 0,62	2,03 $\pm$ 0,96
	Vitamine B12 (pg/mL)	361,90 $\pm$ 411,70	298,30 $\pm$ 257,30
	Folates (ng/mL)	15,79 $\pm$ 5,86	16,80 $\pm$ 6,03
	tHcy (μ mol/L)	36,71 $\pm$ 9,24	35,33 $\pm$ 9,74
Sans hyperlipidémie (GP3)	Chol (g/L)	1,44 $\pm$ 0,35	1,52 $\pm$ 0,25
	TG (g/L)	0,99 $\pm$ 0,33	1,14 $\pm$ 0,23
	Vitamine B12 (pg/mL)	544,30 $\pm$ 307,50	322,80 $\pm$ 255,60*
	Folates (ng/mL)	21,52 $\pm$ 5,49	16,02 $\pm$ 6,28*
	tHcy (μ mol/L)	36,27 $\pm$ 11,65	38,41 $\pm$ 10,38

* $p < 0,05$; CT/TT vs CC test de Student

III.4.2. Association du génotype C677T de la MTHFR avec les vitamines B12 et B9 et l'effet du désordre lipidique

Il a été démontré que les niveaux de folate et de la vitamine B12 plasmatiques n'étaient pas strictement dépendants du polymorphisme de la MTHFR; il paraît que les variants mutés CT/TT avaient des taux plus bas en folates et en vitamine B12 (16,15 $\pm$ 6,26 ng/mL et 362,40 $\pm$ 310,80 pg/mL) comparativement aux homozygotes 677CC (18,66 $\pm$ 6,10 ng/mL et 448,60 $\pm$ 341,90 pg/mL). Cependant, ces différences n'étaient pas significatives (**Tab. 22**).

En revanche, chez les patients sans désordres lipidiques (GP3), les taux de la vitamine B12 et des folates plasmatiques étaient plus faible chez les porteurs des gènes mutés pour le polymorphisme C677T du gène de la MTHFR (**Tab. 21**). En effet, la concentration moyenne

de folatémie était de $21,52 \pm 5,49$ ng/mL chez les CC, et de $16,02 \pm 6,28$ ng/mL chez les CT/TT ($16,02 \pm 6,28$ ng/mL). Quant à la vitamine B12, elle est passée de $544,30 \pm 307,50$ pg/mL à $322,80 \pm 255,60$ pg/mL chez respectivement les CC et CT/TT ($p < 0,05$).

Néanmoins, cet effet délétère du génotype muté sur les vitamines B12 et B9 s'absente en présence d'hyperlipidémie (GP2). Les concentrations moyennes, chez les sujets de génotypes CC et CT/TT en respectives, sont de $15,79 \pm 5,86$ vs $16,80 \pm 6,03$ ng/mL pour les folates et de $361,90 \pm 411,70$ vs $298,30 \pm 257,30$ pg/mL pour la vitamine B12.

III.5. Etude de l'effet de la folatémie sur l'interaction entre le polymorphisme C677T de la MTHFR, l'Hcy et le cholestérol

Afin de déterminer l'action de la folatémie sur l'homocystéine plasmatique et son interaction avec le polymorphisme C677T du gène de la MTHFR, on a subdivisé les patients en deux groupes selon le taux plasmatique de folates, en considérant la médiane 16 ng/mL comme limite. Le **tableau 22** démontre que l'influence de la mutation 677TT MTHFR sur les taux de tHcy n'est pas confinée à la moitié des folates la plus basse (≤ 16 ng/mL, $11,62 \pm 2,67$ ng/mL). Dans ce sous-groupe, la concentration moyenne de tHcy était de $37,35 \pm 9,31$ μ mol/L chez les patients du génotype CC contre $35,95 \pm 10,53$ μ mol/L chez ceux de génotypes CT/TT.

Cependant, la redistribution de l'échantillon par classes de folatémie et par génotypes de MTHFR, a montré chez les patients ayant une folatémie >16 ng/mL, un taux bas de cholestérol ($1,38 \pm 0,36$ g/L) mais ceci a été seulement démontré chez les porteurs du génotype CC et non pour ceux de génotypes CT/TT ($1,69 \pm 0,45$ g/L) (**Tab. 23**). Néanmoins, aucune action de synergie sur l'augmentation de la cholestérolémie n'a été déterminée lors de la présence simultanée de génotypes mutés C677T MTHFR et de folatémie ≤ 16 ng/mL.

Tableau 23. Effet de la folatémie sur la relation entre C677T MTHFR, tHcy, vitamine B12 et cholestérol.

Folate (ng/mL)	Genotype (n,%)	tHcy (µmol/L)	Vitamine B12 (pg/mL)	Chol (g/L)
≤ 16	CC (n=17, 32,61 %)	37,35±9,31	369±258,5	1,61±0,43
	CT/TT (n=32, 67,39 %)	35,95±10,53	278,2±196,5 ^{§§&}	1,67±0,41
>16	CC (n=23, 47,06 %)	34,44±10,43	507,5±387,4	1,38±0,36 [*]
	CT/TT (n=26, 52.94 %)	35,56± 10,87	466±390,1	1,69±0,45

^{§§} vs le groupe de folatémie >16 ng/mL et du génotype CC, p < 0,01

[&] vs le groupe de folatémie >16 ng/mL et du génotype CT/TT, p < 0,05

^{*} vs le groupe de folatémie >16 ng/mL et du génotype CT/TT, p < 0,05 et vs le groupe de folatémie ≤ 16 ng/mL et du génotype CC ou CT/TT, p < 0,05.

IV. Discussion

IV.1. Description de la population d'étude et fréquences de différents facteurs de risque cardiovasculaire

Plusieurs études ont montré que l'association de plus d'un facteur de risque contribue à la progression du phénomène d'athérosclérose (Saito et al., 2003, Ridker, 2004). Les complications cardiovasculaires sont de plus en plus importantes en fonction de l'accumulation de plusieurs facteurs de risque (Bermudez et al., 2002).

La répartition de nos sujets malades selon le sexe et l'âge, a montré que l'incidence des MCV est similaire entre hommes et femmes. Cependant après l'âge de 60 ans, les femmes deviennent les plus prédisposées aux MCV. Ceci pourrait être lié à la disparition de l'effet protecteur des œstrogènes naturels après 10 à 15 ans de la ménopause (Menu, 2002).

Nos résultats ont rapporté une fréquence élevée de l'obésité chez les femmes par rapport aux hommes. Ce facteur de risque a montré un impact significatif sur l'accroissement des TG plasmatiques chez les femmes. Ceci, pourrait expliquer en partie la différence décelée entre les triglycéridémies chez les deux sexes. Contrairement à ce qui a été rapporté par plusieurs études (WHO/MONICA Project, 1988; Rapport de l'approche Step Wise, 2004), l'obésité n'a pas montré une influence sur l'accroissement du niveau de cholestérol total.

Similairement ce qu'on a présagé, le tabagisme était plus fréquent chez les hommes que chez les femmes. Les données nationales ont indiqué que le tabagisme chez les femmes est rare, et même si le pourcentage des ex-fumeurs (19,7 %) parmi les hommes reste acceptable. Le programme de lutte contre le tabagisme en est encore à son début dans notre pays. Néanmoins l'influence de l'Occident sur le comportement et le mode de vie est de plus en plus manifesté et l'épidémie de tabagisme menace dans les prochaines années (Yahia-Berrouiguet et al., 2009).

Une enquête épidémiologique réalisée par la Société Algérienne d'hypertension artérielle (SAHA), avait enregistré en 2005, une prévalence d'HTA de 35,3 %. Elle est largement plus élevée que les prévalences publiées pour la Tunisie (28,9 %) (Ben Romdhane et al., 2005). Ces données réaffirment que la prévalence de l'HTA en Algérie est une des plus élevées des

pays a forte prévalence, tels que l'Italie (38 %) et l'Espagne (45 %) (WHO/MONICA Project, 1988).

Sur la base de nos résultats, nous avons rapporté des fréquences d'HTA et de diabète plus importantes chez les femmes. Ces fréquences augmentent après l'âge de 45 ans. L'accroissement de l'HTA avec l'âge a été rapporté par la plupart des études citées (Institut National de Santé Publique, 2005; Benkhedda *et al.*, 2005).

Concernant la fréquence élevée de l'HTA chez les femmes, celle-ci pourrait être attribuée à l'association avec d'autres facteurs de risque. Plusieurs facteurs y contribuent, dont l'élévation de la PA suivant l'IMC: 40 % des hypertendus sont obèses contre 13,8 % chez les non hypertendus. En effet, malgré la politique de couverture sociale de prise en charge des soins à 100 % soutenue par notre pays, Yahia-Berrouiguet et ses collaborateurs (2009) ont démontré que seulement 23,6 % des individus hypertendus réussissent à équilibrer leur PA en accord avec les recommandations. Ce constat d'échec pourrait s'expliquer par l'attitude des patients qui considèrent que le traitement se limite à la prise médicamenteuse, alors que les mesures diététiques et l'activité physique régulière, volets importants de la prise en charge, ne sont pas encore intégrés par les patients, et même par certains praticiens, comme faisant partie intégrante de la prise en charge.

La prévalence du diabète connaît une forte augmentation dans tous les pays du monde, prenant même des allures épidémiques dans certains pays en développement. À Sétif, la prévalence du diabète estimée est de 7,3 % (Malek *et al.*, 2001).

Par ailleurs, notre étude indique une proportion significativement plus élevée du diabète chez les femmes avec CVD qui sont beaucoup plus touchées par l'obésité, et comme il est habituel, la prévalence du diabète augmente avec l'âge et l'IMC (Rapport de l'approche Step Wise, 2004; Ben Romdhane *et al.*, 2005; Institut National de Santé Publique, 2005). Il est à noter que la prévalence du diabète a doublé en 15 ans devant l'importance des facteurs environnementaux par l'abandon du mode de vie traditionnel au profit d'un comportement basé sur le modèle occidental favorisant l'accroissement de l'obésité et de la sédentarité.

Quant à la fréquence de l'HTA chez les diabétiques, elle atteint 58 % qui sont très significativement élevés par rapport à 21,4 % colligés chez les non diabétiques hypertendus. Par voie de conséquence, l'accumulation de ces deux facteurs de risque chez nos patients

atteints de MCV, avait altérer les fonctions rénales, action authentifiée par l'accroissement du taux de la créatinine surtout chez les hommes à âge avancé.

Les patients porteurs d'une MCV étaient plus souvent atteints d'insuffisance rénale chronique, même modérée, comparativement à la population générale. Nombre des facteurs de risque traditionnels de MCV, sont également des facteurs de risque d'insuffisance rénale chronique, entre autre l'âge, l'hypertension artérielle, le diabète et le tabagisme (Charriere *et al.*, 2009). L'hypertension artérielle est un facteur de risque majeur dans l'insuffisance rénale chronique, dont elle est à la fois une cause et une conséquence. Plusieurs mécanismes contribuent à l'élévation de la pression artérielle dans l'insuffisance rénale chronique: la rétention hydrosodée et l'activation du système rénine-angiotensine essentiellement, mais également d'autres facteurs comme l'hyperactivité du système sympathique, le défaut de production du NO et l'hyperparathyroïdie (Laville, 2004). La dyslipidémie est également une complication fréquente de l'insuffisance rénale chronique. Elle se traduit en général par une hypertriglycémie, liée à une altération de la clearance des VLDL et des chylomicrons, associée à une diminution du cholestérol HDL, le taux de cholestérol total et LDL étant variable. Ce profil lipidique est fortement athérogène. Bien qu'il ne soit pas formellement démontré que, chez les patients en insuffisance rénale chronique, traiter la dyslipidémie réduise la morbi-mortalité cardiovasculaire, ce qui incite à dépister et à traiter cette dyslipidémie (Charriere *et al.*, 2009).

Donc, l'épidémie de MCV peut s'expliquer, en grande partie, par le vieillissement de la population et par l'accroissement de l'exposition à certain nombre de facteurs de risque (interaction des facteurs comportementaux et génétiques). Cependant, les différences d'incidences constatées entre pays, au sein d'un même pays et selon les époques, indiquent que les MCV dépendent fortement des caractéristiques sociales, culturelles et économiques (Marmot et Mstard, 1996).

IV.2. Caractéristiques biochimiques des sujets atteints de maladies cardiovasculaires

IV.2.1. Effets de la glycémie et des triglycérides et du cholestérol plasmatiques et leur relation avec les facteurs de risque cardiovasculaire

La présente étude a montré un niveau légèrement élevé du glucose plasmatique à jeun chez les femmes par rapport aux hommes. Cette appréciation est liée à la fréquence élevée du diabète chez les femmes (43,75% F vs 25,64% H).

L'hyperglycémie chronique s'accompagne de complications apparaissant au long cours et touchant de nombreux organes particulièrement le rein, l'oeil, et les systèmes nerveux et cardiovasculaire (Raccach et al., 1999).

Le diabète, qui représente un facteur de risque important du développement des maladies cardiovasculaires, est associé à l'augmentation des marqueurs sensibles de la réaction inflammatoire. Plusieurs études cliniques et épidémiologiques suggèrent que l'inflammation joue un rôle essentiel dans le développement de l'athérosclérose (Gustavsson *et al.*, 2004, Lagrand *et al.*, 1999). En effet, des études récentes montrent que l'augmentation des taux de la CRP chez les diabétiques représente un facteur prédictif du diabète de type 2 (Aouni *et al.*, 2008).

En ce qui concerne le bilan lipidique chez nos sujets, on rapporte des concentrations similaires du cholestérol chez les deux sexes et une valeur des TG significativement élevée chez les femmes. Ce dernier constat pourrait être dû à la grande proportion des femmes obèses recensées vu que le taux des TG augmente avec le surpoids. Leur augmentation peut accroître le risque de maladies cardiovasculaire surtout en présence d'un taux élevé de cholestérol LDL (Alfthan *et al.*, 1994; Yavasoglu, 2008). En fait, les arguments épidémiologiques pour associer les hyperlipidémies au risque cardiovasculaire sont nombreux (Keys *et al.*, 1963; Kannel *et al.*, 1971; Stamler *et al.*, 1986; Pekkanen *et al.*, 1990; Assmann *et al.*, 1998).

IV.2.2. Homocystéine

IV.2.2.1. Effet de l'âge et du sexe sur l'homocystéine

Plusieurs études publiées et réalisées sur des échantillons de petite ou de grande taille ont rapporté que les taux de tHcy sont positivement corrélés avec l'âge et plus élevés dans le sexe masculin que féminin (Brattstrom *et al.*, 1994; Koehler *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 1996; Friedman *et al.*, 1999; Russo *et al.*, 2003).

Cependant, les résultats de ce présent travail ont indiqué seulement un lien entre le vieillissement et l'homocystéine. Les concentrations moyennes d'Hcy étaient identiques pour les deux sexes.

Il a été démontré par des études antérieures réalisées chez des populations de différentes ethnies que les concentrations de tHcy augmentent en moyenne de 1,3 $\mu\text{mol/L}$ par vingtaine d'années. Les raisons de l'élévation de tHcy à des âges avancés sont toujours inconnues, bien que les modifications de la fonction rénale et notamment le métabolisme rénal de l'Hcy (Norlund *et al.*, 1998), la détérioration accrue des fonctions de certains organes et le ralentissement de certains processus biologiques dont lequel le métabolisme de la méthionine (Stampfer et Grodstein, 2002) puissent être impliqués.

Les altérations touchant les organes au cours de vieillissement reflètent la prévalence plus élevée du diabète et de l'hypertension chez les personnes âgées. Ces deux facteurs de risque altèrent les reins et par conséquent leur métabolisme de l'Hcy, ce qui pourrait expliquer en grande partie l'augmentation de l'homocystéinémie surtout chez les insulino-résistants et les patients atteints d'insuffisance rénale (Giltay *et al.*, 1998; Benjafeld *et al.*, 2001). Une part importante de la relation avec l'âge chez les femmes peut être attribuée à la ménopause. En effet, les concentrations élevées en tHcy ont été trouvées essentiellement chez les femmes post ménopausées (Andersson *et al.*, 1992).

Concernant la différence selon le sexe, il a été démontré que les hommes ont une augmentation moyenne de 1 $\mu\text{mol/L}$ de tHcy par rapport aux femmes, alors qu'aux États-Unis, cette augmentation était de l'ordre de 1,9 $\mu\text{mol/L}$ (Ganji et Kafai, 2003).

Ces élévations sont probablement dues à la différence du statut vitaminique entre les deux sexes, la masse musculaire importante et la synthèse de créatine phosphate chez les hommes et l'effet des œstrogènes chez les femmes (Graham, 1999).

Dans notre étude, l'âge moyen féminin est élevé ($59,37 \pm 16,33$ vs $52,52 \pm 16,89$ ans chez le groupe d'homme) avec une proportion de femmes jeunes non ménopausées assez faible (14,28 %, âge < 40) qui coïncide bien avec les taux d'homocystéine les plus élevés ($36,04 \pm 10,32$ vs $35,40 \pm 10,35$ $\mu\text{mol/l}$ chez les hommes).

Par contre, on ne sait pas clairement, si cette augmentation de tHcy chez les femmes d'âge moyen et avancé est attribuable à une baisse des concentrations d'œstrogène ou s'il s'agit d'une manifestation générale du vieillissement.

Avant la ménopause, les œstrogènes contribuent à garder un haut taux de HDL et un bas taux de LDL. Il semble donc que ces hormones protègent le cœur et les vaisseaux sanguins (Mendelsohn et Karas, 1999). Etant donné que le taux d'œstrogènes chute à la ménopause, cette protection peut s'en trouver diminuée. Une réduction des concentrations d'œstrogène après la ménopause peut aussi entraîner des modifications indésirables de la tension artérielle, de la distribution des matières grasses, des facteurs de coagulation sanguine, du métabolisme du glucose ainsi que l'obésité et le diabète, tous des facteurs susceptibles de faire augmenter le risque de maladies coronariennes (Abramson *et al.*, 2002).

Des études ont permis d'observer à la fois les effets bénéfiques et les effets indésirables de l'œstrogène. Il a été prouvé que les œstrogènes oraux réduisent le cholestérol LDL et les lipoprotéines (a) et augmentent le cholestérol HDL (Herrington *et al.*, 2000). On accumule de plus en plus de preuves à l'appui du fait que l'œstrogène améliore la fonction endothéliale et, par conséquent, la vasodilatation. De plus, l'œstrogénothérapie substitutive a pour effet de réduire les concentrations sanguines de fibrinogènes et de l'inhibiteur-1 de l'activateur du plasminogène, ce qui pourrait avoir des effets anti-thrombotiques et pro-fibrinolytiques (Kon Koh *et al.*, 1997). Par contre, d'autres effets peuvent se révéler pro-inflammatoires (augmentation de la protéine C-réactive) et pro-coagulants, par conséquent, nuisibles au profil cardiovasculaire global (Cushman *et al.*, 1999; van Baal *et al.*, 1999).

Ainsi, des études antérieures ont indiqué que l'hormonothérapie augmente les risques de maladies coronariennes et d'accidents vasculaires cérébraux (WGWII, 2002). Ceci fait ressortir que les effets des œstrogènes sur les maladies cardiovasculaires demeurent encore mal connus.

IV.2.2.2. Hyperhomocystéinémie et MCV

Il est actuellement bien établi que l'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque indépendant des maladies cardiovasculaires (Stampfer *et al.*, 1992; Arnesen *et al.*, 1995; Faria-Neto *et al.*, 2006).

En effet, nous avons trouvé chez nos sujets atteints de MCV des concentrations plasmatiques en tHcy très élevées par comparaison à celles colligées par une autre étude chez des sujets sains ($14,69 \pm 7,30$ $\mu\text{mol/L}$) (Hambaba *et al.*, 2008).

Nos valeurs en homocystéine plasmatique varient entre 16,1 et 51 $\mu\text{mol/L}$. La concentration moyenne atteint $35,74 \pm 10,28$ $\mu\text{mol/L}$. D'après la définition de l'hyperhomocystéinémie avancée par la littérature (> 15 $\mu\text{mol/L}$), nos sujets sont hyperhomocystéinémiques dont 22,45 % ont une hyperhomocystéinémie modérée et 77,55 % une hyperhomocystéinémie intermédiaire. Ce constat est retrouvé aussi bien chez les hommes (21,15 et 78,84 %) que les femmes (23,9 et 76,09 %).

Les événements cardiovasculaires surviennent dans la plupart des cas, avec des hyperhomocystéinémies modérées (15–25 $\mu\text{mol/L}$) (Ueland *et al.*, 1992; Green et Jacobsen, 1995). Cependant, le taux de tHcy peut atteindre des concentrations intermédiaires si la fonction rénale est altérée (25–50 $\mu\text{mol/L}$) (Dennis et Robinson, 1996; Bostom et Lathrop, 1997). Cela reflète ainsi que la grande frange d'individus aurait été hyperhomocystéinurique.

La toxicité de l'homocystéine (en cas de taux trop élevé) a initialement été décrite dans le cas de certaines maladies vasculaires: coronaropathies, infarctus, thromboses veineuses, artériopathies et atteintes cérébrovasculaires.

Dans ce même contexte, d'autres études ont montré que à chaque élévation du facteur de l'homocystéine correspond une élévation proportionnelle du risque. Alors qu'une élévation de 5 $\mu\text{mol/L}$ augmente d'après Boushey, le risque vasculaire, autant qu'une élévation de la cholestérolémie de 0,2 g/L (0,5 mmol/L) (Boushey *et al.*, 1995).

Par ailleurs, une étude menée sur une population tunisienne (Belkahla *et al.*, 2008) admise au service de cardiologie, a révélé, d'une part, une augmentation significative de tHcy chez les patients du groupe sténose (+) par rapport à ceux du groupe sténose (-) et, d'autre part, en calculant l'OR de sténose coronaire significative (SCS) associé avec une hyperhomocystéinémie, a montré que les sujets ayant une Hcy au troisième et quatrième quartiles ($> 13 \mu\text{mol/L}$) présentent environ deux fois plus de risque d'avoir une SCS que les sujets présentant une Hcy au premier quartile ($< 9 \mu\text{mol/L}$). En effet, différentes études ont rapporté une corrélation entre l'augmentation de tHcy et les maladies coronariennes (Frosst *et al.*, 1995; Hanson *et al.*, 2001; Bowron *et al.*, 2005; Kerkni *et al.*, 2006; Huh *et al.*, 2006; Laraqui *et al.*, 2006). En se basant sur une relation linéaire entre tHcy et le risque de maladies coronariennes, Boushey *et al.* (1995) ont rapporté des OR des maladies coronariennes de 1,12 et 1,6 associés respectivement avec une augmentation de tHcy de 1 et 5 $\mu\text{mol/L}$.

La relation entre homocystéinémie et risque cardiovasculaire est linéaire, dose-dépendante et sans seuil. Des concentrations élevées ($> 95^{\text{ème}}$ centile) constituent un facteur indépendant de morbi-mortalité cardio-vasculaire (coronaire, cérébrale et périphérique) dans la population générale, chez l'insuffisant rénal et le diabétique de type 2, avec ou sans micro-albuminurie (Graham *et al.*, 1997; Giles WH, 2000). L'excès de risque apparaît dès 10 $\mu\text{mol/L}$. Une valeur $\geq 15 \mu\text{mol/L}$ vs $\leq 10 \mu\text{mol/L}$ double la probabilité d'infarctus myocardique. À tout accroissement de 5 $\mu\text{mol/L}$ (+ 1 DS) correspond un *odds ratio* de coronaropathie de 1,6 (1,4-1,7) pour les hommes et 1,8 (1,3-1,9) pour les femmes. Dix-pour-cent du risque coronaire sont imputables à l'hyperhomocystéinémie (Boushey *et al.*, 1995), laquelle est également associée à l'atteinte cérébro-vasculaire et à l'artériopathie des membres inférieurs (méta-analyse de Boushey, 1995).

Dans la "BUPA prospective study" (21520 hommes, 35-64 ans), l'homocystéinémie des sujets décédés de cardiopathie ischémique était de 13,1 vs 11,8 $\mu\text{mol/L}$ chez les témoins (Wald *et al.*, 1998). L'homocystéinémie est un puissant prédicteur de mortalité globale et cardio-vasculaire (Hordaland Study: 4700 sujets de 65-72 ans suivis pendant 4 ans) (Vollset *et al.*, 2001).

L'hyperhomocystéinémie est également associée au risque de mort subite coronaire (Burke *et al.*, 2002), en particulier chez les diabétiques, et prédit la morbi-mortalité coronaire après angioplastie (Schnyder *et al.*, 2002). Si le poids du risque lié à l'hyperhomocystéinémie diminue avec l'âge, il reste synergique des autres facteurs (tabac, dyslipidémie, diabète, HTA, insuffisance rénale). La relation avec la morbi-mortalité cardiovasculaire est retrouvée,

amplifiée, chez les diabétiques. Ainsi, dans la cohorte de Soinio *et al.* (2004) qui compte 840 diabétiques de type 2 d'âge moyen, l'hyperhomocystéinémie prédit à sept ans la survenue d'une cardiopathie ischémique (RR 2,21 [1,38-3,54]) et la mortalité coronaire. Le taux de survie actuariel à 7 ans est de 70 % pour une homocystéinémie ≥ 15 $\mu\text{mol/L}$ vs 89 % <15 $\mu\text{mol/L}$. Cette association reste significative chez les sujets indemnes à l'inclusion: l'hyperhomocystéinémie interviendrait dès le développement initial de l'athérome. Enfin, elle prédispose également à la thrombose veineuse profonde, avec ou sans embolie pulmonaire (RR 1,60 ; 1,15-2,22).

Cependant, l'homocystéinémie reste élevée (> 100 $\mu\text{mol/l}$) chez certains patients sans qu'aucun événement pathologique ne soit noté chez ces derniers (Wilcken et Wilcken, 1997; Yap et Naughten, 1998). L'hyperhomocystéinémie sévère n'est donc pas toujours associée à une pathologie cardiovasculaire probablement du fait de l'absence d'autres facteurs de risque. Cette observation souligne le caractère multifactoriel de la genèse de l'athérosclérose et l'existence probable d'une interactivité entre l'hyperhomocystéinémie et d'autres facteurs de risque (Guilland *et al.*, 2003).

Il a été démontré que l'Hcy, en association avec le tabagisme, accroît de façon très importante le risque de complications cardiovasculaires en accélérant le processus athéromateux (Avci *et al.*, 2009).

En ce qui concerne la relation entre l'Hcy et l'HTA, notre étude a révélé qu'il y a une augmentation significative de l'Hcy chez les sujets hypertendus par comparaison à ceux normaux. Cela concorde avec les résultats rapportés par Glew *et al.* (2004) dans la population des Foulani nigériens, où la concentration sérique d'Hcy a été corrélée positivement avec l'augmentation de la pression artérielle systolique et diastolique. En revanche, Garcin *et al.* (2005) ont trouvé une faible corrélation entre l'Hcy avec la pression artérielle.

A présent, les preuves tangibles concernant la relation de causalité ou de conséquence entre l'Hcy avec l'hypertension restent obscures. Cependant, l'hypothèse qui indique que l'Hcy pourrait jouer un rôle dans l'apparition de l'hypertension a été fondée sur les effets éventuels générés par l'Hcy. En effet, des études expérimentales ont permis de montrer que l'hyperhomocystéinémie induisait une constriction artériolaire, un dysfonctionnement rénal avec hausse de réabsorption du sodium, et une augmentation du resserrement artériel (Vermeulen *et al.*, 2001; Stehouwer et van Guldener, 2003). En outre, l'HHcy est connue

d'être liée à l'augmentation du stress oxydatif qui entraîne une dysfonction endothéliale, une diminution de la vasodilatation induite par NO, une stimulation de la prolifération de cellules musculaires lisses et une altération des propriétés élastiques de la paroi vasculaire (van Guldener *et al.*, 2003). Tous ces effets sont incriminés de générer une hypertension artérielle. Par conséquent, l'HHcy pourrait donc contribuer à l'élévation de la pression sanguine (Sen et Tyagi, 2010).

Ces études ont cependant été menées avec des concentrations extrêmement élevées d'homocystéine, dans l'hypothèse que les conséquences seraient les mêmes en cas d'hyperhomocystéinémie modérée mais maintenue de nombreuses années (Vesin *et al.*, 2007).

IV.2.2.3. Relation de l'homocystéine avec le glucose, les triglycérides et le cholestérol sanguins

L'analyse statistique de nos résultats n'a pas révélé une corrélation entre l'Hcy et le taux du glucose sanguin. Cependant, après stratification de notre échantillon en fonction des limites de tHcy ($<$ et $\geq 30 \mu\text{mol/L}$), une légère augmentation mais non significative de la glycémie a été notée.

Dans une cohorte de diabétiques de type 2, 70 % des patients ayant une HHcy avaient une macroangiopathie comparativement à 40 % des normohomocystéinémiques ($p < 0,001$) (Buysschaert *et al.*, 2000). Une autre étude a été réalisée chez 185 diabétiques de type 2 et après ajustement pour l'âge et la créatinine, l'Hcy était de $13,1 \pm 2,3 \mu\text{mol/L}$ chez les patients sans complications cardiovasculaires alors qu'elle était de $15,4 \pm 3,5 \mu\text{mol/L}$ chez ceux ayant des complications cardiovasculaires ($p < 0,001$). De ce fait, les auteurs ont conclu que l'HHcy était un facteur de risque de complications cardiovasculaires pour les patients souffrant de diabète de type 2 indépendamment de leur âge et de leur fonction rénale (Vangelder *et al.*, 2006).

L'hyperhomocystéinémie est associée aux plusieurs facteurs de risque cardiovasculaires, parmi lesquels la dysfonction endothéliale et des anomalies de fonctions de coagulation, qui sont également des caractéristiques communes du syndrome de résistance à l'insuline (Bar-On *et al.*, 2000). Plusieurs études ont montré que l'augmentation de la résistance à l'insuline a été concomitante avec la hausse de tHcy plasmatique (Meigs *et al.*, 2001; Fonseca *et al.*, 2003).

En outre, il a été démontré chez le modèle murin que l'hyperinsulinémie supprime l'expression hépatocytaire d'une enzyme, en l'occurrence la cystathionine β synthase (McCarty, 2000). En effet, cette suppression répercute sur le métabolisme de l'homocystéine avec comme conséquence la génération d'une hyperhomocystéinémie (McCarty, 2000).

Ce qui ressort également de nos résultats, c'est l'absence de corrélation entre tHcy et les taux des TG d'une part et de cholestérol d'autre part.

En revanche, d'autres études ont noté un lien proportionnel entre l'hyperhomocystéine et le cholestérol plasmatique. Cette association pourrait s'expliquer par une relation de causalité entre ces deux facteurs. Li *et al.* (2002) ont démontré que l'hyperhomocystéinémie a un effet positif sur la méthyl hydroxyle glutaryl-CoA synthase, enzyme limitante dans la biosynthèse du cholestérol, ceci entraîne donc une hypercholestérolémie. En outre, ils ont suggéré que l'hyperhomocystéinémie accroît l'accumulation de cholestérol dans les cellules endothéliales et ils ont suggéré l'utilisation de statines chez les patients hyperhomocystéinémique même sans hypercholestérolémie.

IV.2.2.4. Relation de l'homocystéine avec les folates et la vitamine B12

Nos résultats ont montré une corrélation entre les folates et la vitamine B12 plasmatique. En effet, les relations étroites entre la vitamine B12 et le métabolisme des folates sont mises en évidence avec l'hypothèse du « methyl trap ». La MS, avec son coenzyme, enlève le groupe méthyle du 5-MTHF et permet la régénération de la méthionine à partir d'homocystéine et du THF, accepteur de groupements monocarbonés et impliqué entre autre dans la synthèse des acides nucléiques. Mais avec une carence en vitamine B12, la MS ne déméthyle pas efficacement le 5-MTHF qui va alors s'accumuler dans le plasma car il n'est pas bien retenu par les tissus (Smith et Osborne-White, 1973). De telles conditions entraînent alors une carence fonctionnelle en folates qui empêche la régénération de la méthionine, ce qui peut entraver le cycle des méthylations (Shane et Stokstad, 1985).

Par ailleurs, les analyses statistiques de nos résultats n'ont pas révélé une corrélation entre l'homocystéine plasmatique avec l'acide folique et la vitamine B12. Cela pourrait être expliqué par la présence d'insuffisance rénale légère chez nos patients, comme en témoigne le niveau significativement plus élevé de créatinine chez les sujets hypertendus. Cette

insuffisance rénale légère pourrait entraîner une hyperhomocystéinémie résistante (Brosnan *et al.*, 1995), malgré le taux élevé de folates ($16,71 \pm 6,21$ ng/mL, chez les patients avec HTA).

Cependant, des études antérieures ont rapporté des relations étroites entre homocystéine et vitamines B6, B12 et acide folique. Au niveau plasmatique, les taux d'homocystéine varient de manière opposée aux concentrations en vitamines B6, acide folique et B12 (De Bree *et al.*, 2001; Jacques *et al.*, 2001; Hao *et al.*, 2007). C'est grâce à cette spécificité que l'homocystéine suscite autant d'intérêt en termes de prévention cardiovasculaire.

En effet, il est actuellement largement démontré que la supplémentation en acide folique et autres vitamines du groupe B permet d'abaisser le niveau d'homocystéine de manière significative (> 25%) (Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration, 1998).

La diminution de l'homocystéinémie sous traitement vitaminique (acide folique, vitamines B6 et B12) réduit la morbi-mortalité cardio-vasculaire en prévention primaire comme en prévention secondaire, chez le non diabétique et le diabétique de type 2 (Schnyder *et al.*, 2002; Wald *et al.*, 2002; Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration, 1998). Une réduction de 25 % ($\# 3 \mu\text{mol/L}$) de son taux abaisse le risque coronaire de 11 % (RR 0,89; 0.83-0.96) et d'AVC de 19 % (0.81; 0.69-0.95) (The Homocysteine Studies Collaboration, 2002).

Le traitement par l'acide folique, simple et bon marché, est envisagé chez l'hyperhomocystéinémique d'âge moyen de risque cardiovasculaire absolu élevé (cumul de facteurs de risque, prévention secondaire). Il faut ainsi:

- corriger les déficits en vitamine B6 et en acide folique (2/3 des hyperhomocystéinémies). Une dose optimale d'acide folique de 0,8-1 mg/j réduit l'homocystéinémie de 25 % en 2 à 6 semaines (The Homocysteine Studies Collaboration, 2002). Elle préviendrait les sténoses coronaires (Schnyder *et al.*, 2002).
- corriger un éventuel déficit en vitamine B12 (risque neurologique) par 0,5-1 mg/j *per os*.

Chez le sujet âgé, la supplémentation en acide folique doit systématiquement être associée à la vitamine B12, car il est démontré que de fortes doses d'acide folique peuvent entraîner une détérioration des fonctions cognitives, en masquant une carence en vitamine B12 (Vesin *et al.*, 2007). Une alimentation riche en folates (fruits, légumes, céréales enrichies) améliore l'homocystéinémie. Les modifications du style de vie et le contrôle des autres facteurs de risque s'inscrivent dans la prévention cardiovasculaire globale et intéressent toute la

population. Toutefois à l'heure actuelle, il n'existe pas de preuve tangible que la baisse du niveau d'homocystéine par une thérapie vitaminique soit associée à une baisse du risque cardiovasculaire (Vesin *et al.*, 2007).

Deux méta-analyses récentes résument les résultats des essais de prévention vasculaire avec les vitamines B6, B12 et B9 chez des patients présentant des antécédents de maladies coronaires ou vasculaires cérébrales (Bazzano *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). Dans la première, la consommation de vitamine B9 s'accompagnait de diminutions non significatives de 4 % du risque de mortalité totale et de 5 % du risque d'évènement cardiovasculaire.

Des résultats similaires sont rapportés dans la seconde méta-analyse avec une sélection différente d'études (Wang *et al.*, 2007). Le risque relatif (RR) d'accident vasculaire cérébral diminuait de 18 %. La réduction du risque était corrélée à la durée de l'étude et à la diminution des niveaux plasmatiques d'homocystéine. L'ensemble de ces résultats ne permet pas de conclure très clairement à un bénéfice des compléments de vitamines B6, B9 et B12 pour la prévention des récives coronaires et cardiaques (Dallongeville, 2009).

Il est possible que des posologies trop élevées de vitamines antioxydantes aient été utilisées, compromettant les mécanismes de défense de l'organisme. Les expériences biologiques récentes semblent confirmer cette hypothèse. La notion d'équilibre antioxydant, plutôt que de « renforcement » des défenses antioxydantes, semble être privilégiée dans les travaux les plus récents. Il est aussi possible que des combinaisons de plusieurs molécules antioxydantes soient plus efficaces ou au contraire interagissent défavorablement. La combinaison idéale reste encore à trouver. Enfin, pour la plupart, les essais (prévention secondaire) ont été conduits chez des patients présentant des lésions vasculaires avancées à un stade où peut-être la maladie n'est plus réversible sous l'action des vitamines.

IV.2.2.5. Effet de la créatinine et de l'urée et leur relation avec l'HHcy

La présente étude a montré une corrélation positive entre l'urée, la créatinine et tHcy. La fonction rénale étant incriminée avec une faible proportion dans les variations des concentrations de tHcy dans notre étude, cela nous laisse de suggérer que non seulement les interactions entre le génotype C677T MTHFR et folates peuvent être prises en considération.

L'altération des fonctions rénales constitue probablement une des conséquences de complications cardiovasculaires (par exemple l'hypertension ou l'insuffisance cardiaque), étant donné que les patients atteints de maladie rénale primaire n'étaient pas inclus dans cette étude.

De même, conformément à la littérature, une corrélation a été notée entre l'Hcy et la créatininémie (Davies *et al.*, 2001). L'altération de la fonction rénale est un facteur majeur d'élévation de l'Hcy. L'Hcy s'élève dès que le taux de filtration glomérulaire est inférieur à 70 mL/min, pour des créatininémies de l'ordre de 200 à 300 mol/L et elle double environ par rapport à une population témoin (Zimmet *et al.*, 2005). Par ailleurs, il existe une forte corrélation entre créatininémie et Hcy à jeun et après test de charge en méthionine dans des populations comportant des sujets avec fonction rénale normale ou modérément altérée. Les sujets très âgés, dont la fonction rénale est habituellement altérée, sont très souvent hyperhomocystéinémiques. Dans l'étude de Hermann (Ambrosi, 2000), 58 % des sujets de plus de 84 ans étaient hyperhomocystéinémiques. Par ailleurs, 85 à 100 % des dialysés sont hyperhomocystéinémiques. Chez ces patients, les concentrations plasmatiques totales d'Hcy atteignent souvent des valeurs relativement élevées de l'ordre de 50 μ mol/L, soit nettement plus élevées que chez les coronariens. Les mécanismes de l'hyperhomocystéinémie de l'insuffisant rénal demeurent discutés. Ils ont constaté que l'explication n'est pas dans la diminution de l'excrétion urinaire de l'Hcy qui est habituellement très faible. Classiquement le rein est un des organes assurant une partie importante de la transformation de l'Hcy. Cependant, tous les auteurs n'ont pas trouvé au niveau rénal une différence artérioveineuse notable de concentration plasmatique d'Hcy. Le rôle épurateur de l'Hcy du rein est donc contesté par certains. Ceux-ci évoquent la responsabilité de toxines accumulées en cas d'insuffisance rénale et agissant par exemple sur le métabolisme hépatique de l'Hcy. Il existe des arguments pour penser que chez le sujet présentant une insuffisance rénale modérée non seulement la transsulfuration est altérée mais également la reméthylation (Ambrosi, 2000).

IV.3. Génotypes

IV.3.1. Fréquence de la MTHFR (C677T)

Le polymorphisme MTHFR C677T relatif aux enzymes du métabolisme de l'homocystéine est celui qui a fait l'objet du plus grand nombre d'études dans les différents types de MCV et autres pathologies. Dans la plupart des études, les génotypes CC et CT ont été regroupés et comparés au génotype TT. Ce dernier est associé à une réduction très considérable de l'activité enzymatique de l'ordre de 50 % à 37°C, ce qui vaut à l'enzyme mutée d'être qualifiée de thermolabile (Bosco *et al.*, 2003; Krajinovic *et al.*, 2005). Toutefois, l'hétérozygotie s'accompagne d'une diminution de l'activité de l'enzyme moins importante qu'en cas de mutation homozygote (Frosst *et al.*, 1995; Isolato *et al.*, 2000; Amouzou *et al.*, 2004).

Cette variante du gène consiste en une mutation ponctuelle où la cytosine est remplacée par la thymine, soit une substitution de l'alanine par la valine au niveau protéique noté A222V ou au niveau allélique: C677T (Ueland *et al.*, 2001 b; Zetterberg *et al.*, 2002).

Dans la présente étude, la prévalence de la mutation C677T de la MTHFR chez les témoins (14,3 %) est similaire à celle retrouvée en France au sein du recrutement témoin du CEPH (Faure-Delanef *et al.*, 1997), en Italie (de Franchis *et al.*, 1996) et au Canada (Jacques *et al.*, 1996).

La distribution mondiale du polymorphisme C677T est très hétérogène et correspond géographiquement à une répartition croissante Nord-Sud, notamment en Europe et en Amérique du Nord. C'est ainsi qu'en Europe, la fréquence du génotype TT est faible au nord (4 à 7 % en Finlande et en Russie), intermédiaire au centre (8 à 10 % en France, 12 à 15 % en Espagne et au nord de l'Italie) et élevée au sud (20 à 26 % en Sicile) (Wilcken *et al.*, 2003). Un gradient similaire a été trouvé en Amérique du Nord, où la fréquence du génotype TT augmente de l'ouest du Canada (Alberta) au sud-est des Etats-Unis, pour atteindre un pic au Mexique (Wilcken *et al.*, 2003). Dans les pays arabes du golfe, les fréquences tournent toutes autour de 2,5 % (Al Habboubi *et al.*, 2004). En Algérie, une étude portée sur des sujets apparemment sains de la région de Batna, a révélé une fréquence allélique T de 30,5 % et une fréquence génotypique TT de 6 % (fréquence génotypique faible par rapport à la notre) (Hambaba *et al.*, 2008). Ces résultats semblent proches des nôtres (34,4 % et 14,3 %, respectivement). Les fréquences de la présente étude sont intermédiaires entre celles

observées en Afrique (par exemple en Tunisie, fréquence génotypique 17,8 %; Jerbi *et al.*, 2005) et celles estimées dans les pays occidentaux.

Par ailleurs, nos résultats ont montré que les prévalences de la mutation C677T de la MTHFR sont identiques entre les patients et les témoins. Cela suggère que la forme thermolabile homozygote de la MTHFR ne soit pas un facteur déterminant direct du risque vasculaire lié à l'hyperhomocystéinémie. Dans le même contexte, beaucoup d'études n'ont pas trouvé une association entre le gène muté C677T de MTHFR et le développement ultérieur des maladies cardiovasculaires (Brugada et Marian, 1997; Folsom *et al.*, 1998; Thogersen *et al.*, 2001). De plus, il est démontré en Europe, en Amérique du nord et en Australie (Lewis *et al.*, 2005) qu'il n'y a pas d'association évidente entre le polymorphisme C677T et la maladie coronarienne. Dans les thromboses veineuses profondes, ils ont révélé que cette mutation à l'état homozygote ne constituait pas en soi un risque de thromboses mais augmentait ce risque lorsque le mutant V Leiden était associé (Cattaneo *et al.*, 1997). En fait, dans la mesure où cette mutation commune C677 => T est associée généralement à une hyperhomocystéinémie modérée et à une diminution des folates, il est possible que le risque accru de thromboses soit lié à des interactions génétiques et environnementales (Ma *et al.*, 1996).

Cependant le rôle du polymorphisme MTHFR C677T dans la survenue de la maladie coronarienne reste controversé.

La mutation C677T a été retrouvée avec une fréquence plus élevée chez des sujets ayant une pathologie coronaire (Kang *et al.*, 1991). Cette mutation Ala => Val est considérée dans certaines études comme un facteur de risque de thromboses artérielles et veineuses (Arruda *et al.*, 1997) et notamment de maladie cardiaque coronaire (Gallagher *et al.*, 1996; Morita *et al.*, 1997).

IV.3.2. Effet de l'âge et du sexe sur la distribution du polymorphisme chez les sujets atteints de MCV

Nous avons noté une différence de distribution du polymorphisme C677T de la MTHFR en fonction de l'âge, puisque la fréquence était de 19,6 % et 4,7 % respectivement chez les sujets <55 ans et ceux de plus de 55 ans. Ceci est en accord avec d'autres études qui ont montré que la fréquence de cette mutation est significativement plus basse chez les personnes âgées que chez les sujets plus jeunes (Matsushita *et al.*, 1997; Heijmans *et al.*, 1999; Jerbi *et al.*, 2005).

La survie des personnes âgées, sujettes aux carences vitaminiques suite aux vieillissements des villosités intestinales et à un apport alimentaire diminué, pourrait être amoindrie en présence du génotype TT. Ceci pourrait indiquer l'effet délétère du génotype TT avec comme répercussion la diminution de sa fréquence chez les sujets âgés (Devlin *et al.*, 2006).

En outre, nous n'avons pas observé de différence significative selon le sexe, ce qui est en accord avec des études antérieures dont l'une est menée en Espagne et l'autre en Tunisie (Guillen *et al.*, 2001; Jerbi *et al.*, 2005).

IV.3.3. Relation entre la variation de la fréquence du génotype TT et l'apport nutritionnel en folates

Les auteurs ont souligné que cette hétérogénéité dans la distribution mondiale du polymorphisme C677T est attribuée à l'interaction gène-nutriment. Le contenu alimentaire en acide folique semble plus important dans les populations du sud par rapport aux populations nordiques, ce qui contrebalancerait l'effet du génotype sur l'homocystéine et donc sur l'espérance de vie.

Par ailleurs, la fréquence de l'allèle T est de 7 % chez les Noirs africains avec 0 % de génotype TT et pour ce même génotype, la fréquence est très basse: de 1 à 2 % chez les Noirs du Brésil et des États-Unis (Botto et Yang, 2000; Wilcken *et al.*, 2003). Ainsi, la faible fréquence de l'allèle T observée en Afrique, pourrait être liée à une carence en folates, puisque la malnutrition et les maladies infectieuses (à l'origine d'une diminution de l'absorption intestinale des folates), sont fréquentes dans ces pays (Saweda *et al.*, 2002). Selon Rosenberg *et al.* (2002), la faible augmentation de la fréquence du génotype TT chez les Noirs américains en comparaison avec les Noirs africains, pourrait être expliquée par la consommation régulière de folates alimentaires et la prise d'acide folique aux États-Unis (enrichissement des farines), mais pourrait également être due à un mélange de populations. Néanmoins, les importantes variations géographiques et ethniques du polymorphisme C677T suggèrent également une pression de sélection dont les raisons sont peu claires.

Les apports nutritionnels quotidiens recommandés de folates est d'environ 200 et 180 µg pour les hommes et les femmes respectivement (National Research Council, 1989; Dawson et

Waters, 1994). Toutefois, Poitier de Courcy a recommandé des valeurs assez élevées (330 et 276 µg/j pour les hommes et les femmes, respectivement) (Poitier de Courcy, 2001).

La fréquence intermédiaire du génotype TT trouvée dans notre population et qui se situe entre les valeurs trouvée en Espagne et au nord de l'Italie, pourrait être expliquée comme suit:

- L'alimentation algérienne rejoint la typologie alimentaire méditerranéenne à base de légumes et céréales, qui constituent des importantes sources de folates. Cependant, les modalités de préparation des aliments comme l'ébullition prolongée des légumes contenant des fibres réduit jusqu'à 90 % leur contenu en folates (Hoffbrand *et al.*, 1966),
- Notre régime social est relativement bien protégé contre les maladies infectieuses.

En revanche, une étude antérieure portée chez des sujets sains de la région de Sétif, a montré après comparaison avec les apports journaliers recommandés (AJR), que les apports quotidiens en folates sont satisfaisants pour les besoins de l'organisme des femmes (183 vs 180 mg/j) et insuffisants pour ceux des hommes (165 vs 200 µg/j) (Houcher *et al.*, 2003). En outre, par rapport à la moyenne conseillée chez les personnes de plus de 40 ans (287 µg/jour dans Third National Health and Nutrition Survey, la phase 1, Alaimo *et al.*, 1994), l'analyse des données individuelles a permis d'identifier, qu'une proportion appréciable de la population étudiée est sous risque de carence et, que cet apport en folates totaux était globalement faible (165 µg/j chez hommes et 183 µg/j chez les femmes) (Houcher *et al.*, 2003). Ces données disponibles suggèrent fortement que les critères de "carence en folates" peuvent être redéfinis (Stanger, 2002). Dans les pays industrialisés, l'insuffisance en micronutriment est rare. Ainsi, l'apport en folate total moyen par habitant en Grande-Bretagne en 1998 était d'environ 241 µg/jour (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1994).

Les facteurs responsables de carence en acide folique et en vitamine B12 sont présagés d'être liés à la consommation insuffisante de légumes verts et des céréales, la malabsorption de ces micronutriments due à une gastrite atrophique, l'utilisation d'agents thérapeutiques et la consommation d'alcool (Health & Welfare Canada, 1990).

La carence en vitamine B12 (cobalamine) pourrait être un autre facteur contributif. Les métabolismes de folates et de vitamine B12 sont liés: dans les carences en vitamine B12, le taux de folates sériques s'élève alors que ce érythrocytaire diminue. Il serait donc souhaitable d'envisager une fortification des céréales à la fois avec de l'acide folique et de la vitamine B12 (Candito *et al.*, 2003). Donc, l'hétérogénéité de la distribution de polymorphisme C677T est de cause multifactorielle et illustre bien les interactions gène-environnement.

IV.3.4. Association des génotypes de C677T MTHFR et 844ins68 CBS avec l'homocystéinémie

En ce qui concerne la relation de tHcy avec les différents génotypes des deux polymorphismes étudiés, nous n'avons pas identifié une augmentation de tHcy associée aux génotypes mutés de polymorphismes C677T MTHFR et 844ins68 CBS. Cette constatation est conforme à celle montrée par Morelli et ses collaborateurs (2002), qui n'ont révélé aucune association entre l'homocystéine plasmatique et la mutation C677T de la MTHFR.

En revanche, depuis que Frosst et ses collaborateurs (1995) ont proposé la mutation C667T comme une raison possible de l'apparition de complications vasculaires; plusieurs groupes de recherche ont évalué cette hypothèse chez les patients cardiovasculaires de différents groupes ethniques (Mogk *et al.*, 2000; Esfahani *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2003) et une augmentation de tHcy chez les sujets de génotype TT a été rapportée (Frosst *et al.*, 1995; Hanson *et al.*, 2001; Klerk *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Barbosa *et al.*, 2008).

Dans l'étude actuelle, lorsque nos malades classés en fonction de l'âge ont été stratifiés selon l'expression de l'allèle T et réanalysés pour tHcy, le résultat obtenu n'a pas révélé une augmentation significative de tHcy chez les individus de génotypes TT/CT par rapport au génotype CC dans les différentes classes d'âges. Cela prend en charge plus de l'absence d'association entre la présence de l'allèle T et le taux de tHcy élevée chez nos patients. Donc, cette hyperhomocystéinémie pourrait être attribuée à: la présence d'autres facteurs qui déterminent son taux, en particulier les valeurs de folate et de vitamine B12 plasmatique (Jacques *et al.*, 1999), la présence d'autres mutations qui pourraient affecter son métabolisme (par exemple mutation MTHFR A1298C) (Friedman *et al.*, 1999) et l'action des facteurs de risque cardiovasculaire conventionnels comme l'HTA.

Pour le polymorphisme 844ins68 CBS, aucune étude n'a rapporté un effet délétère de ce génotype sur tHcy (Tsai *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2005; Belkahla *et al.*, 2008). Bien au contraire, Zhang *et al.* (2001) ont rapporté que la mutation 844ins68 CBS semble avoir un effet protecteur contre les pathologies coronariennes. L'OR d'IDM calculé associé au génotype muté est égal à 0,26. De même, Belkahla et ses collaborateurs (2008) ont rapporté des valeurs d'OR ajusté de SCS associée à 844ins68 CBS également inférieures à 1 (muté: OR= 0,8; hétérozygote: OR= 0,75), suggérant un effet protecteur; cependant, cet effet ne semble pas être significatif.

Ces discordances entre les différents résultats traitant la relation de ces deux polymorphismes avec l'hyperhomocystéinémie et les MCV, pourraient être expliquées par :

- la population d'étude (ethnie, origine géographique,...);
- les conditions d'étude (les critères d'inclusion et d'exclusion,...);
- les autres facteurs de risque des maladies cardiovasculaires et leur distribution en fonction des différents génotypes (d'où l'intérêt des ajustements des OR à ces facteurs);
- le statut nutritionnel et notamment le statut en folates (Bostom, 1996; Selhub *et al.*, 2000).

IV.3.5. Etude de l'effet de la folatémie sur l'interaction entre génotypes, tHcy et MCV

Il a été démontré par plusieurs études qu'un déficit en folates peut entraîner un accroissement de tHcy. En outre, les folates ont été proposés comme un facteur de risque indépendant de maladie vasculaire (Pancharuniti *et al.*, 1994). Par conséquent, l'effet positif de l'apport en folates sur la réduction de taux de tHcy et la diminution subséquente de l'incidence des maladies cardiovasculaires a été confirmé expérimentalement (Selhub *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003).

Dans la présente étude, il n'y avait pas de différence significative entre les taux de folates dans les différents groupes (groupes classés selon: le sexe, le taux de l'homocystéine, la perturbation lipidique, et les génotypes). La concentration moyenne de folates chez nos sujets ($17,16 \pm 6,29$ ng/mL) est au-dessus de l'intervalle critique (5-15 ng/mL). Cette constatation bien que surprenante, elle est en conformité avec le résultat de Verhoef *et al.* (1997) qui n'ont

trouvé aucune différence significative entre les taux de folates plasmatiques chez les patients atteints de maladies vasculaires et les témoins (Verhoef *et al.*, 1997).

La moyenne de folatémie dans notre population d'étude était relativement haute, ce qui expliquerait l'absence d'effet significatif du génotype muté (TT) sur tHcy.

Guéant-Rodriguez et ses collaborateurs (2006) en comparant quatre populations différentes, ont montré que l'effet du génotype TT sur tHcy dépend de l'origine géographique des populations dont les apports en folates varient d'une manière importante. En effet, l'hyperhomocystéinémie chez les TT n'a été significative que chez les populations de l'Afrique de l'ouest, de l'Italie et de la France, chez lesquelles les moyennes respectives de folatémies ont été 5,01, 6,47 et 6,29 ng/mL, mais pas chez la population mexicaine où la folatémie a été de 8,6 ng/mL (Guéant-Rodriguez *et al.*, 2006).

Egalement, Belkahla et ses collaborateurs (2008) ont déterminé, que lorsque la folatémie est supérieure à 6,1 ng/mL, la concentration plasmatique de tHcy entre génotype CC et TT devient non significative. Donc, l'effet de la mutation n'est observé qu'en cas d'hypofolatémie (< 6,1 ng/mL). Dans le même sens, Jacques *et al.* (1996) ont rapporté que si la folatémie est supérieure à 15 µmol/L, aucune interaction entre le génotype TT et tHcy ne s'établira.

Une étude antérieure réalisée par Abdessemed et ses collaboratrices (2009) a montré que le génotype MTHFR 677TT interagit avec les taux de folates sériques faibles pour produire un phénotype élevé de tHcy, surtout chez les hommes ($9,6 \pm 5,4$ nmol/L).

Les travaux de Guenther *et al.* (1999) expliquent comment la supplémentation peut protéger les sujets avec 1 ou 2 allèles T d'un déficit en folate et d'une concentration élevée de l'homocystéine. En effet, un approvisionnement optimal en folates empêche la perte de flavin adenine dinucleotide et évite l'inactivation de l'enzyme.

Une méta-analyse publiée en 2002 a montré que le risque de développer une maladie coronarienne en présence du génotype TT augmente lorsque la folatémie est inférieure à la médiane (OR = 1,44 ; IC 95%: 1,12–1,83), alors que ce risque diminue si la folatémie est supérieure à la médiane (OR = 0,99 ; IC 95%: 0,77–1,29) (Mariska *et al.*, 2002). Une autre méta-analyse publiée en 2005, a noté que l'augmentation de tHcy et les OR des maladies coronariennes associées à TT est faible chez les populations américaines dont l'alimentation

est supplémentée en folates, alors qu'ils sont plus élevés chez les populations du moyen orient et d'Asie où l'apport en folates est plus modéré (Lewis *et al.*, 2005).

Les conséquences d'une supplémentation par l'acide folique peuvent être ajoutées à cette évidence de l'effet métabolique de la mutation C677T sur le folate et l'homocystéine (Van der Put *et al.*, 1996; Van der Put *et al.*, 1997). En effet, une différence de changement du taux de folate et d'homocystéine, suite à une supplémentation de 0,5 mg/j d'acide folique entre les individus TT et CC a été constatée (Nelen *et al.*, 1998).

La plupart des études visent le génotype TT, bien que le génotype CT puisse aussi causer une baisse des folates, une augmentation d'homocystéine et une réponse positive à la supplémentation en acide folique (O'Leary *et al.*, 2004). En effet, il est admis que la production de méthyles disponible est abaissée de 70 % chez les porteurs homozygotes de la mutation et de 35 % chez les hétérozygotes (Eskes, 2005).

La présence de la mutation entraîne un ralentissement de l'activité du cycle folique, augmente le besoin de ce nutriment et diminue du potentiel méthylant de l'organisme, y compris sa capacité à reméthyler l'homocystéine. Par conséquent, ce polymorphisme peut être impliqué dans les MCV, expliquant l'augmentation du taux d'homocystéine chez les sujets atteints de MCV.

Dans la population noire africaine où la fréquence du génotype MTHFR 677TT est très faible (0,02 %), le seul modulateur des concentrations de tHcy était la carence en folate malgré une fréquence très faible du génotype MTHFR 677TT puisque la malnutrition et les maladies infectieuses (à l'origine d'une diminution de l'absorption intestinale des folates) sont fréquentes dans ces pays (Amouzou *et al.*, 2004). En revanche, dans une population noire américaine de l'Ouest, la variabilité des concentrations en tHcy était attribuée uniquement aux facteurs génétiques (Tsai *et al.*, 2000).

La relation entre polymorphismes génétiques des enzymes clés de la reméthylation de l'homocystéine et l'apport alimentaire des vitamines, cofacteurs de ces enzymes, est l'un des meilleurs exemples de l'effet interactif entre déterminants génétiques et nutritionnels impliqués dans l'hyperhomocystéinémie, facteur de risque associé à plusieurs pathologies dont les malformations foetales (Botto *et al.*, 1998), les grossesses à risque (Mitraoui *et al.*, 2006), les maladies cardiovasculaires (Danesh et Lewington, 1998; Wald *et al.*, 2002),

l'insuffisance rénale chronique (Suliman *et al.*, 2000), les maladies neurodégénératives, dont la maladie d'Alzheimer (Arinami *et al.*, 1997; Clarke, 1998) et le syndrome de fatigue chronique (Regland *et al.*, 1997).

IV.3.6. Effets de génotypes mutés C677T MTHFR sur les taux de vitamines B12 et B9 et de cholestérol

Il a été démontré par plusieurs études que la mutation au niveau du gène C677T MTHFR augmente les besoins en folates et en vitamine B12 sériques (Delvin *et al.*, 2000; Yong *et al.*, 2008).

Dans l'ensemble de nos sujets atteints de MCV, les taux de folates et de la vitamine B12 ne semblent pas être influencés directement par la mutation du polymorphisme du gène de la MTHFR. Ce résultat concorde bien avec celui trouvé par Andrea *et al.* en 2002.

Cependant, chez nos patients non hyperlipidimique, les sujets de génotypes mutés (CT/TT MTHFR), ont montré des taux amoindries en vitamine B12 et en folates plasmatiques en comparaison avec ceux du génotype sauvage CC. Ces résultats confirment l'action délétère du génotype muté de MTHFR sur les micronutriments ce qui nous laisserait penser que ces patients porteurs de gène muté répondraient bien à une supplémentation en folates. Plusieurs investigateurs ont trouvé que les taux plasmatiques de folates sont significativement bas chez les individus de génotype TT (Van der Put *et al.*, 1995; Jacques *et al.*, 1996; Brattstrom *et al.*, 1998; Nelen *et al.*, 1998).

L'interaction folate/génotypes MTHFR, a été déjà décrite chez des enfants grecs (Papoutsakis *et al.*, 2005) et chez des femmes japonaises (Hiraoka *et al.*, 2004). Il est possible que la mutation elle-même affecte la folatémie, puisque la forme primaire circulante des folates est le 5-méthyltétrahydrofolate.

Le génotype 677TT de la MTHFR rendant l'enzyme thermolabile, diminue l'efficacité et par voie de conséquence la quantité de méthyl-THF qui en résulte, et partant une perturbation du métabolisme de folates et un changement de la composition cellulaire des dérivés foliques (Bagley et Selhub, 1998).

En revanche, chez les sujets hyperlipidimiques, les concentrations moyennes de folates et de vitamine B12 étaient basses pour tous les variant du polymorphisme C677T MTHFR. Il paraît

que cette perturbation lipidique a entraîné le camouflage de l'action délétère du génotype muté sur ces micronutriments.

Par ailleurs, d'après les analyses de nos résultats, on a rapporté des concentrations élevées du Chol chez les sujets ayant des valeurs basses de folates ou chez ceux porteurs des génotypes mutés de la MTHFR C677T.

Cependant, après stratification de la cholestérolémie en fonction de génotypes et de limites de folatémie, on a observé chez les sujets de folatémie ≤ 16 ng/mL et de génotypes mutés, de folatémie ≤ 16 ng/mL et du génotype sauvage et ceux de folatémie >16 ng/mL et de génotypes mutés, des concentrations similaires de Chol. Ceci pourrait s'expliquer par l'absence d'effet délétère cumulatif de la mutation avec l'hypofolatémie sur le Chol. En outre, le taux élevé de ce dernier ne semble pas être rétabli par un apport suffisant en folates en présence du gène muté pour le polymorphisme C677T de la MTHFR.

Conclusion et perspectives

Les MCV sont les maladies qui font le plus de décès dans le monde. Les efforts financiers et humains déployés dans le domaine de la recherche pour la lutte contre ces maladies sont énormes. Cependant, les résultats restent encore en deçà des espérances et des attentes des populations malades. Un changement d'axe de recherche qui s'appuie sur le profil génétique des patients, semble en effet une évidence et fait ressurgir d'une médecine de type prédictif. Le but de cette médecine est d'adapter le mode de vie au risque de développer une pathologie, mais aussi orienter le choix d'un traitement et prédire sa tolérance.

L'identification de gènes déterminant la variabilité interindividuelle des facteurs de risque représente une étape indispensable dans la compréhension des mécanismes qui conduisent au développement et/ou à la progression de la pathologie.

L'hypothèse de départ de ce travail a consisté à établir une éventuelle relation entre l'hyperhomocystéinémie comme facteur de risque de MCV et les mutations des gènes de la MTHFR C677T et de la CBS 844ins68.

Les principales conclusions de cette étude, sont les suivantes:

- L'analyse des données a montré des différences significatives dans la répartition des facteurs de risque cardiovasculaire entre femmes et hommes. Les femmes étaient plus souvent obèses, tandis que les hommes étaient des fumeurs.
- 100 % des patients souffrant de pathologies cardiovasculaires ont présenté une hyperhomocystéinémie modérée à intermédiaires. Le taux de ce métabolite était significativement plus élevé chez les patients âgés par rapport à ceux jeunes. En effet, le test de corrélation a indiqué un lien positif entre tHcy et l'âge.
- La concentration moyenne de tHcy était plus élevée chez les sujets hypertendus par comparaison à celle trouvée chez les non hypertendus. Cela témoigne d'une association entre l'Hcy et le syndrome métabolique et appuie l'intérêt du dosage de ce métabolite chez les patients ayant un syndrome métabolique sévère.

En plus, l'hyperhomocystéinémie était associée à la présence d'une élévation significative des taux sériques de la créatinine et du glucose chez les patients hypertendus, indiquant que nos malades souffrent d'une légère détérioration au niveau des fonctions rénales et leur glycémie est mal équilibrée.

- Les mutations des gènes de la MTHFR C677T et de la CBS 844ins68 n'ont été associées ni à la survenue de maladies cardiovasculaires, ni à la hausse de tHcy. Il paraît que l'action délétère des variants mutés C677T de la MTHFR sur tHcy n'est particulièrement significative qu'en cas d'hypofolatémie. Un statut correct en folates, comme nous l'avons enregistré chez nos malades, pourrait donc annuler l'effet de la mutation.
- Il paraît aussi que l'hyperlipidémie ou les deux polymorphismes CT et TT de la MTHFR engendrent une diminution des taux de folates et de vitamine B12, mais ils n'interagissent pas en synergie pour les régresser encore plus. Cela a été déduit suite à l'absence d'effet des génotypes mutés sur les valeurs de la vitamine B12 et de folates chez les malades hyperlipidémiques. De plus, la mutation C677T au niveau du gène de la MTHFR associée ou non au taux sérique de folates ≤ 16 ng/mL, a entraîné une hypercholestérolémie. Ces observations ouvrent des perspectives physiopathologiques intéressantes dans plusieurs domaines des maladies métaboliques. L'élucidation du rôle des micronutriments et leur relation avec les différents facteurs biochimiques et génétiques constitue une voie d'investigation particulièrement passionnante puisque une grande frange de la population algérienne est atteinte de maladies métaboliques.

Bien que l'homocystéine soit conditionnée par les facteurs génétiques, environnementaux et nutritionnels, la part de chacun d'entre eux est difficile à déterminer dans l'hyperhomocystéinémie observée en pathologie. Les études futures devraient s'intéresser en plus des facteurs abordés dans cette étude, aux autres facteurs incriminés à la survenue d'une HHcy, soit nutritionnel comme la vitamine B6 et les folates érythrocytaires, ou bien une autre mutation sur le gène de la MTHFR ou encore un autre gène, en particulier de la MS, les gènes codant les récepteurs de folates ou les enzymes comme la MTHFD et la SHMT (Morrison *et al.*, 1998, Wilson *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2003). L'interaction de ces différents facteurs nutritionnels et héréditaires et leur relation avec les différentes voies biologiques contribuant au développement du processus athérosclérotique, dont principalement les voies de l'inflammation, du métabolisme des lipides et des lipoprotéines, de la régulation de la pression artérielle, de la coagulation ou encore du stress oxydatif, mériteraient ainsi d'être clairement évaluées.

Dans les pays développés, les taux de mortalité selon l'âge pour la plupart des types de maladies cardiovasculaires sont désormais à la baisse, alors que dans les pays en voie de développement, le manque d'accès aux soins ainsi que la pénurie de programmes de

prévention entraînent une augmentation des décès par maladies cardiovasculaires. Notre investigation suggère donc l'implantation d'un programme gouvernemental pour une prise en charge des perturbations métaboliques, la poursuite des mesures de santé publique, l'information de la population et la pratique régulière du sport. Comme le démontrent aujourd'hui les récentes études d'intervention, la modification raisonnable du mode de vie peut laisser entrevoir la régression de la véritable épidémie d'obésité, de diabète de type 2 et d'HTA, qui frappe à la porte de nos pays et qui conduira à la progression de toutes les conséquences de l'athérosclérose.

Enfin, un traitement simple et bien toléré comme les complexes vitaminiques B visant à abaisser le taux d'homocystéine ne permet pas de diminuer la survenue ou la récurrence d'infarctus myocardique/cérébral, ni la mortalité globale. L'indication clinique, la posologie efficace et la combinaison optimale de molécules sont parfaitement inconnues (Dallongeville, 2009). Mais à l'heure actuelle, il semble difficile de délaisser complètement la piste de l'homocystéine. Il existe probablement d'autres raisons expliquant l'absence d'efficacité de la vitaminothérapie dans l'hyperhomocystéinémie: la relation acide folique-homocystéine-MCV est vraisemblablement plus complexe sur le plan métabolique qu'il n'avait été initialement pensé. La tentative de réduction de l'homocystéinémie par d'autres voies (métabolisation hépatique ou excrétion urinaire) mérite d'une étude plus approfondie qui permettra peut-être de prouver l'intérêt de la diminution de l'homocystéinémie en pratique clinique.

Références bibliographiques

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.

Abdessemed S, Hambaba L, Rodriguez-Guéant RM, Corinne P, Philipe G, Laroui S, Yahia M, Ferd K, Rouabah F. Contribution des facteurs génétiques et nutritionnels dans les hyperhomocystéinémies dans la population algérienne saine. *Nutrition clinique et métabolisme* 2009; 23: 50-54.

Abramson B, Derzko C, Lalonde A, Reid R, Turek M, Wielgosz A. Hormone replacement therapy and cardiovascular disease. *J Obstet Gynaecol Can* 2002; 24(7): 577-9.

Al Habboubi H, Tamim H, Ameen G, Al Mawi WY. C677T and A1298C single nucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene among Bahraini Arabs. *Thromb Haemost* 2004; 91: 843-5.

Alaimo K, Mc Dowell MA, Briefel RR, Bischof AM, Caughman CR, Loria CM, Johnson CL. Dietary intake of vitamins, minerals, and fiber of persons aged 2 months and over in the United States: Third National Health and Nutrition Survey, Phase 1, 1988-91. *National Center for Health statistics Advance data* 1994; 258: 13.

Alfthan G, Pekkanen J, Jauhiainen M, Pitkaniemi J, Karvonen M, Tuomilehto J, Salonen JT, Ehnholm C. Relation of serum homocysteine and lipoprotein(a) concentrations to atherosclerotic disease in a prospective Finnish population based study. *Atherosclerosis* 1994; 106: 9-19

Allen LH. Folate and vitamin B12 status in the Americas. *Nutr Rev* 2004; 62: S29-33.

Allen RH, Seetharam B, Allen NC, Podell ER, Alpers DH. Correction of cobalamin malabsorption in pancreatic insufficiency with a cobalamin analogue that binds with high affinity to R protein but not to intrinsic factor. In vivo evidence that a failure to partially degrade R protein is responsible for cobalamin malabsorption in pancreatic insufficiency. *J Clin Invest* 1978, 61: 1628-1634.

Ambrosi P. La prévention cardiovasculaire. *John Libbey Eurotext*, 2007.

Ambrosi P. Homocystéine et transplantation. *Sang Thromb Vaiss* 2000; 12: 510-4.

Amouzou EK, Chabi NW, Adjalla CE, Rodriguez-Guéant RM, Feillet F, Villaume C, Sanni A, Gueant JL. High prevalence of hyperhomocysteinemia related to folate deficiency and 677C→T mutation of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase in coastal West Africa. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 619-24.

ANAES, Méthode d'évaluation du risque cardio-vasculaire global. Paris: *Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé* 2004; 1-102.

Anderson JL, Jensen KR, Clarquist JF, Bair TL, Horne BD, Muhlestein JB. Effect of Folic Acid Fortification of Food on Homocysteine-Related Mortality. *Am J Med* 2004; 116: 158-64.

Andersson A, Brattstrom L, Israelson B, Isaksson A, Hamfelt A, Hultberg B. Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender and menopausal status. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 79–87.

Andrea LA, Cunha, Mario H, Hirata, Chong A. Kim, Elvira M, Guerra-Shinohara, Kymio Nonoyama, Rosario DC. Metabolic effects of C677T and A1298C mutations at the MTHFR gene in Brazilian children with neural tube defects. *Clinica Chimica Acta* 2002; 318: 139-143.

Antoniades C, Antonopoulos AS, Tousoulis D, Marinou K, Stefanadis C. Homocysteine and coronary atherosclerosis: from folate to the recent clinical trials. *Eur Heart J* 2009; 30: 6-15.

Aouni Z, Oudi M, Ourtani H, Mazigh C, Essaies O, Nsiri B, Zidi B, Machghoul S. Inflammation chronique subclinique et insulino-résistance chez les diabétiques non Insulinodépendants. *Immunoanal Biol Spec* 2008; 23: 353–7.

Arab M, Toumi S, Berhoune A. Marqueurs biologiques des maladies cardiovasculaires, que choisir? *Les cahiers de la santé* 2004; 22: 20-29.

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, 103:149-157.

Arinami T, Yamada N, Yamakawa-Kobayashi K, Hamaguchi H, Toru M. Methylenetetrahydrofolate reductase variant and schizophrenia/ depression. *Am J Med Genet* 1997; 74: 526-8.

Arnesen E, Refsum H, Bønaa KH, Ueland PM, Førde OH, Nordrehaug JE. Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol* 1995; 24: 704-9.

Arruda VR, vonZuben PM, Chiaparini LC, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF. The mutation Ala 677 => Val in the methylene tetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; 77: 818-21.

Assmann G, Cullen P, Schulte H. The Münster heart study (PROCAM). Results of follow-up at 8 years. *Eur Heart J* 1998; 19(suppl A): A2-A11

Au-Yeung KK, Woo CW, Sung FL, Yip JC, Siow YL, OK. Hyperhomocysteinemia activates nuclear factor-kappaB in endothelial cells via oxidative stress. *Circ Res* 2004, 94: 28-36.

Avci A, Ariturk I, Ucar A, Hasipek S, Erguder T, Sunguroglu K, Erguder IB. The effects of cigarette smoking on serum oxidant status, and cholesterol, homocysteine, folic acid, copper, and zinc levels in university students. *Turk J Med Sci* 2009; 39: 513-7.

Bagley PJ, Selhub J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 13217–13220.

Bannerjee RV, Matthews RG. Cobalamin-dependent methionine synthase. *FASEB J* 1990; 4: 1450–1459.

Barbosa PR, Stabler SP, Machado ALK, Braga RC, Hirata RDC, Hirata MH, Sampaio-Neto LF, Allen RH, Guerra-Shinohara EM. Association between decreased vitamin levels and MTHFR, MTR and MTRR gene polymorphisms as determinants for elevated total homocysteine concentrations in pregnant women. *Eur J Clin Nutr* 2008; 62(8): 1010-1021.

Bar-On H, Kidron M, Friedlander Y, Ben-Yehuda A, Selhub J, Rosenberg IH, Friedman G. Plasma total homocysteine levels in subjects with hyperinsulinemia. *J Intern Med* 2000; 247(2): 287-94.

Baudinb B et Cohen A. Données épidémiologiques des maladies cardiovasculaires et prise en charge des accidents cardiovasculaires. *Revue Francophone des Laboratoires* 2009; 409: 27-39.

Bazzano LA, Reynolds K, Holder KN, He J. Effect of folic acid supplementation on risk of cardiovascular diseases: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 2006; 296: 2720-6.

Behrns KE, Smith CD, Sarr MG. Prospective evaluation of gastric acid secretion and cobalamin absorption following gastric bypass for clinically severe obesity. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 315-320.

Belkahla R, Omezzine A, Kchok K, Rebhi L, Ben Hadj Mbarek I, Rejeb J, Ben Rejeb N, Slimane N, Nabli N, Ben Abdelaziz A, Boughzala E, Bouslama A. Effet des polymorphismes des enzymes clés du métabolisme de l'homocystéine sur l'homocystéinémie et le risque coronarien chez une population tunisienne. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie* 2008; 57: 219–224

Ben Romdhane H, Habib H, Ali B, Drissa H, Kafsi N, Boujnah R, Mechmèche R, Slimane M, Achour N, Nacef T, Gueddiche M. La transition épidémiologique ses déterminants et son impact sur les systèmes de santé à travers l'analyse de la tendance des maladies cardiovasculaires en Tunisie. *Tunisie Médicale* 2005; 83:1-7.

Bender DA. Introduction to nutrition and metabolism. 3rd edition, ISBN 0415257980. Boca Raton: CRC Press 2002 p 450.

Benjafield AV, Wang XL, Morris BJ. Tumor necrosis factor receptor 2 gene (TNFRSF1B) in genetic basis of coronary artery disease. *J Mol Med* 2001; 79(2-3): 109-15.

Benkhedda S, Chibane A, Atif A, Temmar M, Aicheur T, Bendaoud N, Latreche S, Abbou J, Ziari J, Merad K. Prevalence of cardiovascular risk factors associated to hypertension in the Algerian population a national survey. Report SAHA. *J Hypertens* 2005; 23 (suppl 2).

Bermudez EA, Rifai N, Buring J, Manson JE, Ridker PM. Inter-relationships among circulating interleukin-6, C-reactive protein, and traditional cardiovascular risk factors in women. *Arterios- cler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1668-73.

Blacher J, Czernichow S, Horellou MH, Conard J, David P, Chadeaux-Vekemans B, Ankri A, Galan P, Hercberg S, Ducimetiere P. Homocystéine, acide folique, vitamines du groupe B, et risque cardiovasculaire. *Arch Mal Cœur Vaiss* 2005; 98: 145-52.

Blair JA, Johnson IT, Matty AJ. Absorption of folic acid by everted segments of rat jejunum. *J Physiol* 1974, 236: 653-661.

Boger RH, Bode-Boger SM, Sydow K, Heistad DD, Lentz SR. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocysteinemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1557-64.

Bollander-Gouaille C. Focus on Homocysteine and the Vitamins involved in its metabolism. *Paris: Springer-Verlag*, 2nd Edition, 2002.

Bollheimer LC, Buettner R, Kullmann A, Kullmann F. Folate and its preventive potential in colorectal carcinogenesis. How strong is the biological and epidemiological evidence? *Crit Rev Oncol Hematol* 2005, 55: 13-36.

Bonaa KH, Njolstad I, Ueland PM, Schirmer H, Tverdal A, Steigen T, Wang H, Nordrehaug JE, Arnesen E, Rasmussen K; NORVIT Trial Investigators. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 354(15): 1578-88.

Bosco P, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, Namour F, Caraci F, Romano A, Romano C, Guéant JL. Methionine synthase (MTR) 2756 (A-G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are 3 risk factors for having a child with Down syndrome. *Am J Med Genet* 2003; 121: 219-24.

Bose S and Seetharam B. Purification, membrane expression, and interactions of transcobalamin II receptor. *Methods Enzymol* 1997; 281: 281-289.

Bose S, Feix J, Seetharam S, Seetharam B. Dimerization of transcobalamin II receptor - requirement of a structurally ordered lipid bilayer. *J Biol Chem* 1996; 271: 11718-11725.

Bostom AG, Lathrop L. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney Int* 1997; 52(1): 10-20.

Bostom AG, Shemin D, Verhoef P, Nadeau MR, Jacques PF, Selhub J, Dworkin L, Rosenberg IH. Elevated fasting total plasma homocysteine levels and cardiovascular disease outcomes in maintenance dialysis patients: A prospective study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(11): 2554-8.

Bostom AG. Folic acid fortification of food. *JAMA* 1996; 275(9): 681-3.

Bots ML, Launer LJ, Lindemans J, Hoes AW, Hofman A, Witteman JCM, Koudstaal PJ, Grobbee DE. Homocysteine and shortterm risk of myocardial infarction and stroke in the elderly: the Rotterdam Study. *Arch Intern Med* 1999; 59: 38-44.

Bottiglieri T. homocysteine and folate metabolism in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005, 29: 1103-1112.

Botto LD and Mastroiacovo P. Exploring gene-gene interactions in the etiology of neural tube defect. *Clin Genet* 1998; 53: 456-9.

Botto LD and Yang Q. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies : a huge review. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 862-77.

Bougherbal R. Près de 24 % des décès en Algérie sont dus aux maladies cardiovasculaires. *Le Jeune Indépendant* 2008; 2965: 12-13.

Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995; 274: 1049–57.

Bowron A, Scott J, Stansbie D. The influence of genetic and environmental factors on plasma homocysteine concentrations in a population at high risk for coronary artery disease. *Ann Clin Biochem* 2005; 42: 459–62.

Brattstrom L, Lindgren A, Israelson B, Andersson A, Hultberg B. Homocysteine and cysteine determinants of plasma levels in middle-aged and elderly subjects. *J Inter Med* 1994; 36: 633- 41.

Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation* 1998; 98(23): 2520-6.

Brody T. Nutritional Biochemistry. Second Edition : elsevier ISBN 0121348369; 1999: 623-624.

Brosnan JT, Hall B, Selhub J, Nadeau MR, Bostom AG. Renal metabolism of homocysteine in vivo. *Biochem Soc Trans* 1995; 23(3): 470S.

Brosnan JT, Jacobs RL, Stead LM, Brosnan ME. Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism. *Acta Biochim Pol* 2004, 51: 405-13.

Brugada R and Marian AJ. A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene is not a major risk of coronary artery disease or myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1997; 128(1): 107-12.

Burke AP, Fonseca V, Kolodgie F, Zieske A, Fink L, Virmani R. Increased serum homocysteine and sudden death resulting from coronary atherosclerosis with fibrous plaques. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2002; 22: 1936.

Buysschaert M, Dramais AS, Wallemacq PE, Hermans MP. Hyperhomocysteinemia in type 2 diabetes: relationship to macroangiopathy, nephropathy, and insulin resistance. *Diabetes Care* 2000; 23: 1816-22.

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.

Candito M, Houcher B, Boisson C, Abellard J, Demarcq MJ, Guéant JL, Benhacine K, Van Obberghen E. Neural tube defects and decreased vitamin B12 values. Study of two cases in Algeria and one case in France. *Amino Acids* 2003; 25(2): 111-204.

Carson NAI, Neill DW. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child* 1962; 37: 505-15.

Cattaneo M. Hyperhomocysteinemia, atherosclerosis and thrombosis. *Thromb Haemost* 1999, 81: 165–76.

Cattaneo M, Tsai MY, Bucciarelli P, Taioli E, Zighetti ML, Bignell M, Mannucci PM. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (C677 =>T) increases the risk for deep-vein thrombosis in patients with mutant factor V (factor V : Q⁵⁰⁶). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1662-6.

Caudill MA, Gregory JF, Hutson AD, Bailey LB. Folate catabolism in pregnant and nonpregnant women with controlled folate intakes. *J Nutr* 1998, 128: 204-208.

Cengel A, Sahinarslan A. Nitric oxide and oardiovascular oystem. *Anadolu Kardiyol Derg* 2006, 6: 364-368.

Chadefaux-Vekemans B, Coude M, Muller F, Oury J, Cali A, Kamoun P. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in the etiology of Down syndrome. *Pediatr Res* 2002; 51: 766-7.

Chamberlin ME, Ubagai T, Mudd SH, Thomas J, Pao VY, Nguyen TK, Levy HL, Greene C, Freehauf C, Chou JY. Methionine adenosyltransferase I/III deficiency: novel mutations and clinical variations. *Am J Hum Genet* 2000, 66: 347-55.

Chango A, De Potier Courcy G, Boisson F, Guillard JC, Barbé F, Perrin MO, Christidès JP, Rabhi K, Pfister M, Galan P, Hercberg S, Nicolas JP. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase common mutations, folate status and plasma homocysteine in healthy French adults of the “supplementation en vitamines et minéraux antioxydants (SU, VI. MAX)” cohort. *Br J Nutr* 2000; 84: 891–6.

Charriere S, Rognant N, Chiche F, Cremer A, Deray G, Priou M. Insuffisance rénale chronique et maladie cardiovasculaire Chronic renal insufficiency and cardiovascular disease. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie* 2009; 58 : 40–52.

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.

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.

Chen YT, Meyer CF, Tan TH. Persistent activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in gamma radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1996, 271: 631-4.

Christensen B, Frosst P, Lussier-Cacan S Selhub J, Goyette P, Rosenblatt DS, Genest J, Rozen R. Correlation of a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene with plasma homocysteine in patients with premature coronary artery disease. *Arter Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 569-573

Chui CH, Lau FY, Wong R, SooOY, Lam CK, Lee PW, et al. Vitamin B12 deficiency--need for a new guideline. *Nutrition* 2001; 17(11-12): 917-20.

Clarke R, Grimley Evans J, Schneede J, Nexø E, Bates C, Fletcher A, Prentice A, Johnston C, Ueland PM, Refsum H, Sherliker P, Birks J, Whitlock G, Breeze E, Scott JM. Vitamin B12 and folate deficiency in later life. *Age Ageing* 2004; 33: 34-41.

Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1998; 55: 1449-55.

Cohen H, Weinstein WM, Carmel R. Heterogeneity of gastric histology and function in food cobalamin malabsorption: absence of atrophic gastritis and achlorhydria in some patients with severe malabsorption. *Gut* 2000; 47: 638-645.

Combs GF. The vitamins. Fundamental aspects in nutrition and health. 2nd Edition San Diego CA 1998, USA: academic press.

Cravo M, Gloria L, Selhub J, Nadeau MR, Camilo ME, Resend MP, Cardoso JN, Leitao CN, Mira FC. Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: correlation with folate, vitamin B12 and B6 status. *Am J Clin Nutr* 1996; 63:220- 4.

Cushman M, Legault C, Barrett-Connor E, Stefanick ML, Kessler C, Judd HL, Sakkinen PA, Tracy RP. Effect of postmenopausal hormones on inflammation-sensitive proteins: the Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Study. *Circulation* 1999; 100: 717-22.

Czernichow S, Blacher J, Ducimetière P. Enrichissement de la farine en vitamines B en France proposition d'un programme-pilote. Afssa, en liaison avec l'Institut de veille sanitaire 2002, 71p.

da Costa M, Rosenberg SP. Appearance of a folate binder in leukocytes and serum of women who are pregnant or are taking oral contraceptives. *J Lab Clin Med* 1974; 83: 207-214.

Dallongeville J. Vitamines et prévention de maladies cardiovasculaires: quelles preuves? *Cahiers de nutrition et de diététique*; 2009, doi: 10.1016/j.cnd.2009.06.003

Danesh J and Levington S. Plasma homocysteine and coronary heart disease: systematic review of published epidemiological studies. *J Cardiovasc Risk* 1998; 5: 229-32.

Davies L, Wilmschurst EG, McElduff A, Gunton J, Clifton-Bligh P, Fulcher G. The relationship among homocystéine, creatinine clearance and albuminuria in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24: 1805-9.

Davis RE and Nicol DJ. Folic acid. *Int J Biochem* 1988; 20: 133-139.

Dawson DW and Waters HM. Malnutrition: folate and cobalamin deficiency. *Br J Biomed Sc* 1994; 51: 221-227.

Dayal S, Bottiglieri T, Arning E, Maeda N, Malinow MR, Sigmund CD, Heistad DD, Faraci FM, Lentz SR. Endothelial dysfunction and elevation of S adenosylhomocysteine in cystathionine b synthasedeficient mice. *Circ Res* 2001, 88: 1203-9.

Dayal S, Brown KL, Weydert CJ, Oberley LW, Arning E, Bottiglieri T, Faraci FM, Lentz SR. Deficiency of glutathione peroxidase-1 sensitizes hyperhomocysteinemic mice to endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002, 22: 1996-2002.

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.

De Bree A, Verschuren WM, Kromhout D, Kluijtmans LA, Blom HJ. Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. *Pharmacol Rev* 2002, 54: 599-618.

de Franchis R, Mancini FP, D'Angelo A et al. Elevated total plasma homocysteine and C677T mutation of the 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase gene in thrombotic vascular disease. *Ant J Hum Genet* 1996; 59: 262-4.

De Fronzo RA. Insulin resistance, hyperinsulinemia, and coronary artery disease: a complex metabolic web. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992, 20 Suppl 11:S1-16.

De Gennes JL. Les hyperlipidémies idiopathiques. Proposition d'une classification simplifiée. *Presse Méd* 1971; 79: 791-795.

Delvin EE, Rozen R, Merouani A, Genest Jr. J, Lambert M. Influence of methylenetetrahydrofolate reductase genotype, age, vitamin B-12, and folate status on plasma homocysteine. *Children Am J Clin Nutr* 2000; 72: 1469-73.

Demuth K, Atger V, Borderie D, Benoit MO, Sauvaget D, Lotersztajn S, Moatti N. Homocysteine decreases endothelin-1 production by cultured human endothelial cells. *Eur J Biochem* 1999, 263: 367-376.

Demuth K, Drunat S, Paul JL, Moatti N. Hyperhomocystéine et athérosclérose. *M/S* 2000; 16:1081-90.

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.

Dennis VW and Robinson K. Homocysteinemia and vascular disease in end-stage renal disease. *Kidney Int* 1996; 50(Suppl 57): S11-17.

Devlin AM, Clarke R, Birks J, Grimley-Evans J, Halsted CH. Interactions among polymorphisms in folate-metabolising genes and serum total homocysteine concentrations in a healthy elderly population. *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 708-13.

Dicker-Brown A, Fonseca VA, Fink LM, Kern PA. The effect of glucose and insulin on the activity of methylene tetrahydrofolate reductase and cystathionine-beta-synthase: studies in hepatocytes. *Atherosclerosis* 2001, 158: 297-301.

Dierkes J and Westphal S. Effect of drugs on homocysteine concentrations. *Semin Vasc Med* 2005; 5: 124-39.

- 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.
- 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.
- Ducros V, Demuth K, Sauvant MP, Quillard M, Caussé E, Candito M, Read MH, Draï J, Garcia I, Gerhardt MF. Methods for homocysteine analysis and biological relevance of the results. *Journal of chromatography B* 2002; 781:207-26.
- Dupont P et Ducobu J. Physiopathologie et traitement de facteurs de risque cardiovasculaire. Frison-Roche, Paris 1989; 699p.
- Durand P, Prost M, Blache D. Pro-thrombotic effects of a folic acid deficient diet in rat platelets and macrophages related to elevated homocysteine and decreased n-3 polyunsaturated fatty acids. *Atherosclerosis* 1996; 121: 231-43.
- Durand P, Prost M, Blache D. Altération du metabolisme de l'homocystéine et maladies cardiovasculaires. *Revue française des laboratoires*, 1998; 307: 33-44.
- 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.
- 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.
- Efferth T. Adenosine triphosphate-binding cassette transporter genes in ageing and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 2003; 2: 11-24.
- Esfahani ST, Cogger EA, Caudill MA. Heterogeneity in the prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in women of different ethnic groups. *Am Diet Assoc* 2003; 103(2): 200-7.
- Eskes TK. Abnormal folate metabolism in mothers with Down syndrome offspring: Review of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 124: 130-133.
- FAO/WHO. Human vitamin and mineral requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation. Rome, 2001.
- Faraci FM, Lentz SR. Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction. *Stroke* 2004, 35: 345-7.

Faria-Neto JR, Chagas ACP, Bydlowski SP, Lemos Neto PA, Chamone DA, Ramirez JAF, da Luz PL. Hyperhomocystinemia in patients with coronary artery disease. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39: 455–63.

Faure-Delanef L, Quéré I, Chassé JF et al. Homocysteine and MTHFR in centenarians: Implication in vascular disease. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 999-1001.

Folsom AR, Nieto FJ, McGovern PG, Tsai MY, Malinow MR, Eckfeldt JH, Hess DL, Davis CE. Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphisms, and B vitamins: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation* 1998; 98(3): 204-10.

Fonseca VA, Fink LM, Kern PA. Insulin sensitivity and plasma homocysteine concentrations in non-diabetic obese and normal weight subjects. *Atherosclerosis* 2003, 167(1): 105-9

Fonseca VA, Mudaliar S, Schmidt B, Fink LM, Kern PA, Henry RR. Plasma homocysteine concentrations are regulated by acute hyperinsulinemia in nondiabetic but not type 2 diabetic subjects. *Metabolism* 1998, 47: 686-689.

Fonseca VA, Risk factors for coronary heart disease in diabetes. *Ann Intern Med* 2000, 133(2): 154-6.

Franken DG, Boers GHJ, Blom HJ, Trijbels FJM, Kloppenborg PW. Treatment of mild hyperhomocysteinemia in vascular disease patients. *Arterioscler Thromb* 1994, 14: 465-70.

Friedman G, Goldschmidt N, Friedlander Y, Ben-Yehuda A, Selhub J, Babaey S, Mendel M, Kidron M, Bar-On H. A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations. *J Nutr* 1999; 129(9): 1656-61.

Friedrich W. Vitamin B12 und verwandte Corrinoiden in Fermente, Hormone, Vitamine, Vol III-2, A. Ammon und W. Dirscherl Eds, Georg Thieme Verlag, 1975 Stuttgart.

Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Rozen R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genet* 1995; 10: 111-3.

Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, Fitzgerald LA, Rodgers GM. Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 1993, 13: 1327-1333.

Gallagher PM, Meleady R, Shields DC, Tan KS, McMaster, Drozen R, Evans A, Graham IM, Whitehead AS. Homocysteine and risk of premature coronary heart disease. Evidence for a common gene mutation. *Circulation* 1996; 94: 2154-8.

Ganesan T, Khadra MH, Wallis J, Neal DE. Vitamin B12 malabsorption following bladder reconstruction or diversion with bowel segments. *ANZ J Surg* 2002, 72: 479-482.

Ganji V, Kafai MR. Demographic, health, lifestyle, and blood vitamin determinants of serum total homocysteine concentrations in The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 826-33.

Garcin JM, Mayaudon H, Bauduceau B, et al. L'hyperhomocystéinémie est-elle un facteur de risque supplémentaire du syndrome métabolique? *Rev Med Interne* 2005; 26: 695-702.

Giles WH, Croft JB, Greenlund KJ, Ford ES, Kittner SJ. Association between total homocyst(e)ine and the likelihood for a history of Acute myocardial infarction by race and ethnicity: Results from the Third National Health and Nutrition Examination survey. *Am Heart J* 2000, 139 (3): 446-453.

Giltay EJ, Hoogeveen EK, Elbers JM, Gooren LJ, Asscheman H, Stehouwer CD. Insulin resistance is associated with elevated plasma total homocysteine levels in healthy, non-obese subjects. *Atherosclerosis* 1998; 139(1): 197-8.

Girard CL and Remond D. Net flux of folates and vitamin B12 through the gastrointestinal tract of sheep. *Can J Anim Sci* 2003, 83: 273-278.

Glew RH, Conn CA, VanderJagt TA, Calvin CD, Obadofin MO, Crossey M, VanderJagt DJ. Risk factors for cardiovascular disease and diet of urban and rural dwellers in northern Nigeria. *J Health Popul Nutr* 2004; 22: 357-369.

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: 652-6.

Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1994; 7: 195-200.

Graham I. Homocysteine in health and disease. *Ann Inter Med* 1999; 3: 387-8.

Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattström LE, Ueland PM, Palma-Reis RJ, Boers GHJ, Sheahan RG, Israelsson B, Uiterwaal CS, Meleady R, McMaster D, Verhoef P, Witterman J, Rubba P, Bellet H, Wautrecht JC, de Valk HW, Sales Luís AC, Parrot-Roulaud FM, Tan KS, Higgins I, Garçon D, Medrano MJ, Candito M, Evans AE, Andria G. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: the European Concerted Action Project. *JAMA* 1997; 277(22): 1775-81.

Grasbeck R et Gueant JL. New data on the porcine and human intrinsic factor receptors. In: Biomedicine and physiology of vitamin B, CMC. London 1990; 313-320.

Green R and Jacobsen DW. Clinical implications of hyperhomocysteinemia. Bailey LB eds. Folate in health and disease Marcel Dekker, Inc. New York 1995: 75-122.

Gregory JF. Case study: folate bioavailability. *J Nutr* 2001, 131: 1376S-1382S.

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.

Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986, 320: 454-6.

Guéant JL, Lambert D, Schohn H, Nicolas JP. Cobalamine (vitamine B12). Editions Techniques, Encycl Med Chir (Paris, France), Hématologie, 13-001-D-10, 1993; 4p.

Guéant-Rodriguez RM, Guéant JL, Debard R, Thirion S, Hong LX, Bronowicki JP, Namour F, Chabi NW, Sanni A, Anello G, Bosco P, Romano C, Amouzou E, Arrieta HR, Sánchez BE, Romano A, Herbeth B, Guillard JC, OM Mutchinick. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European population. *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 701-7.

Guenther BD, Sheppard CA, Tran P, Rozen R, Matthews RG, Ludwig ML. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nat Struct Biol* 1999; 6: 359–65.

Guillard JC and Lequeu B. Les vitamines: Du nutriment au médicament. EM internationales. Paris. 1992 p357.

Guillard JC, Favier A, Potier de Courcy G, Galan P, Hercberg S. L'hyperhomocystéinémie: facteur de risque cardiovasculaire ou simple marqueur ? 2. Données épidémiologiques. *Pathologie Biologie* 2003; 51: 111-121.

Guillen M, Corella D, Portoles, Gonzalez JI, Mulet F, Saiz C. Prevalence of the methylenetetrahydrofolate reductase 677 C > T mutation in the mediterranean spanish population. Association with cardiovascular risk factors. *Eur J Epidemiol* 2001; 17: 255-61.

Gustavsson CG, Agardh CD. Markers of inflammation in patients with coronary artery disease are also associated with glycosylated haemoglobin A1C within the normal range. *Eurp Heart J* 2004; 25: 2120–4.

Gutiérrez JI, Pérez F, Tamparillas M, Grasa JM, Calvo MT, Osuna C, Sánchez B, Torres M. Polymorphisms in cystathionine beta-synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes as risk factors for cerebral vascular disease. *Med Clin (Barc)* 2005; 124: 281–4.

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.

Hajjar KA. Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. *J Clin Invest* 1993, 91: 2873-9.

Hambaba L, Abdessemed S, Yahia M, Laroui S, Rouabah F. Relation entre hyperhomocystéinémie et polymorphisme C677T du gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase dans la population algérienne saine. *Ann Biol Clin* 2008; 66 (6): 637-41.

Hanson NQ, Aras O, Yang F, Tsai MY. C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: incidence and effect of combined genotypes on plasma fasting and post-methionine load homocysteine in vascular disease. *Clin Chem* 2001; 47: 661–6.

Hao L, Ma J, Zhu J, Stampfer MJ, Tian Y, Willett WC, Li Z. High prevalence of hyperhomocysteinemia in Chinese adults is associated with low folate, vitamin B12, and vitamin B6 status. *J Nutr* 2007, 137: 407-13.

Harpel P, Zhang X, Borth W. Homocysteine and hemostasis: pathogenic mechanisms predisposing to thrombosis. *J Nutr* 1996: 1285S-9S.

Health & Welfare Canada. Nutrition recommendation. The report of the Scientific Review Committee. Ottawa: Supply & Services 1990.

Heijmans BT, Gussekloo J, Kluit C, Droog S, Lagaay AM, Knook DL, Westendorp RG, Slagboom EP. Mortality risk in men is associated with a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR). *Eur J Hum Genet* 1999; 7: 197-204.

Heinecke JW, Rosen H, Suzuki LA, Chait A. The role of sulfur-containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1987, 262: 10098-103.

Herbert V and Das K. Folic acid and vitamin B12. In *Modern Nutrition in Health and Disease*. 8th Edition; 1993: pp 402-425.

Herbert V, Larrabee AR, Buchanan JM. Studies on the identification of a folate compound of human serum. *J Clin Invest* 1962; 41: 1134-1138.

Herrington DM, Reboussin DM, Brosnihan KB, Sharp PC, Shumaker SA, Snyder TE, Furberg CD, Kowalchuk GJ, Stuckey TD, Rogers WJ, Givens DH, Waters D. Effects of estrogen replacement on the progression of coronary artery atherosclerosis. *N Engl J Med* 2000; 343: 522-529

Herrmann W and Geisel J. Vegetarian lifestyle and monitoring of vitamin B-12 status. *Clin Chim Acta* 2002, 326: 47-59.

Heydrick SJ, Weiss N, Thomas SR, Cap AP, Pimentel DR, Loscalzo J, Keaney JF Jr. L-Homocysteine and L-homocystine stereospecifically induce endothelial nitric oxide synthase-dependent lipid peroxidation in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2004, 36: 632-40.

Higgins JR, Quinlivan EP, McPartlin J, Scott JM, Weir DG, Darling MR. The relationship between increased folate catabolism and the increased requirement for folate in pregnancy. *BJOG* 2000 107: 1149-1154.

Hillman RS, Steinberg SE. The effect of alcohol on folate metabolism. *Annu Rev Med* 1982; 33: 345-54.

Hiraoka M, Kato K, Saito Y, Yasuda K, Kagawa Y. Gene–nutrient and gene–gene interactions of controlled folate intake by Japanese women. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 1210–6.

Ho PI, Collins SC, Dhitavat S, Ortiz D, Ashline D, Rogers E, Shea TB. Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. *J Neurochem* 2001; 78: 249-53.

Hoffbrand AV, Newcombe BFA, mMollin DL. Method of assay of red cell folate activity and the value of the assay as a test for folate deficiency. *J Clin Pathol* 1966; 19: 17-28.

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.

Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements meta-analysis of randomized trials. *Br Med J* 1998; 316: 894-8.

Houcher B, Poitier De Courcy G, Candito M, Van Obberghen E, Naimi D. Nutritional Assessment of Folate Status in a Population of Sétif, Algeria. *Pteridines* 14, 2003: 138-142

Huang RF, Hsu YC, Lin HL, Yang FL. Folate depletion and elevated plasma homocysteine promote oxidative stress in rat livers. *J Nutr* 2001, 131: 33-8. (b)

Huang RFS, Huang SM, Lin BS, Wei JS, Liu TZ Homocysteine thiolactone induces apoptotic DNA damage mediated by increased intracellular hydrogen peroxide and caspase 3 activation in HL-60 cells. *Life Sci* 2001, 68: 2799-811. (a)

Huh HJ, Chi HS, Shim EH, Jang S, Park CJ. Gene–nutrition interactions in coronary artery disease: correlation between the MTHFR C677T polymorphism and folate and homocysteine status in a Korean population. *Thromb Res* 2006; 117: 501–6.

Hultberg B, Berlund M, Anderson A, Frank A. Elevated plasma homocysteine in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17: 687-9.

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 methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Clin Chem* 2000, 46: 1065-71.

Institut National de Sante Publique. Projet TAHINA (Transition épidémiologique et impact sur la sante en Afrique du Nord), enquête nationale de santé 2005 (Contrat N°ICA3-CT-2002 10011).

Isolato PA, Wells GA, Donnelly JG. Neonatal and fetal methylene-tetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 986-90.

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.

Jacobsen DW. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin Chem* 1998; 44: 1833-43.

Jacobsen DW. Hyperhomocysteinemia and oxidative stress: time for a reality check? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20: 1182-4.

Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996; 93(1):7–9.

Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J. Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr* 2001, 73: 613-21.

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.

Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Wilson PW, Rosenberg IH. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Engl J Med* 1999; 340(19): 1449-54.

Jager A, Kostense PJ, Nijpels G, Dekker JM, Heine RJ, Bouter LM, Donker AJ, Stehouwer CD. Serum Homocysteine Levels Are Associated With the Development of Microalbuminuria: The Hoorn Study. *Arterioscler Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(1): 74-81.

Jakubowski H. Anti-N-homocysteinylated protein autoantibodies and cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med* 2005, 43:1011-4.

Jakubowski H. Homocysteine is a protein amino acid in humans implications for homocysteine-linked disease. *J Biol Chem* 2002, 277: 30425–30428.

Jakubowski H. Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. *J Nutr* 2000, 130: 377S–381S.

Jakubowski H. Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *J Nutr* 2006, 136: 1741S-1749S.

Jenicek M and Clérout R. Epidémiologie: Principes, techniques, applications. Pris: Maloine; 1987.

Jerbi Z, Abdennebi M, Douik H, Ben Romdhane H, Harzallah L, Guemira F, Ghanem A. Étude du polymorphisme C677T du gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase dans la population tunisienne. *Ann Biol Clin* 2005; 63 (5): 487-91.

Joubert F, Hammoud C, Chevallier B. Carences vitaminiques (hormis la carence en vitamine D. *Encycl Méd Chir Elsevier*, Paris, Pédiatrie 2002; 4-056-A-10, p5.

Kang SS, Wong PW, Malinow MR. Hyperhomocysteinemia as a Risk Factor for Occlusive Vascular Disease. *Annu Rev Nutr* 1992, 12: 279-298.

Kang SS, Wong PWK, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 536-45.

Kang SS, Wong PW, Zhou JM, Sora J, Lessick M, Ruggie N, Grcevich G. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in patients with coronary artery disease. *Metabolism* 1988; 37: 611-3. (a)

Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 414-21. (b)

Kannel WB, Castelli WP, Gordon T, McNamara PM. Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham study. *Ann Intern Med* 1971; 74: 1-12.

Kaufman RJ, Scheuner D, Schroder M, Shen X, Lee K, Liu CY, Arnold SM. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, 3: 411-21.

Kerkeni M, Addad F, Chauffert M, Myara A, Gerhardt M, Chevenne D, Trivin F, Farhat MB, Miled A, Maaroufi K. Hyperhomocysteinaemia, methylenetetrahydrofolate reductase and risk of coronary artery disease. *Ann Clin Biochem* 2006; 43: 200–6.

Keys A, Taylor HL, Blackburn H. Coronary heart disease among Minnesota business and professional men followed fifteen years. *Circulation* 1963; 28: 381-395.

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.

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.

Kim MK, Ordovas JM, Selhub J, Campos H. B vitamins and plasma homocysteine concentrations in an urban and rural area of Costa Rica. *J Am Coll Nutr* 2003; 22(3): 224-31.

Kirke PN, Mills JL, Whitehead AS, Molloy A, Scott JM. Methylenetetrahydrofolate reductase mutation and neural tube defects. *Lancet* 1996; 348: 1037-8.

Kittner SJ, Giles WH, Macko RF, Hebel JR, Wozniak MA, Wityk RJ, Stolley PD, Stern BJ, Sloan MA, Sherwin R, Price TR, McCarter RJ, Johnson CJ, Earley CJ, Buchholz DW, Malinow MR. Homocystéine and risk of cerebral infarction in a biracial population: the stroke prevention in young women study. *Stroke* 1999; 30: 1554–1560.

Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG. MTHFR 677C-->T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA* 2002; 288(16): 2023-31.

Klucken J, Büchler C, Orsó E, Kaminski WE, Porsch-Özcürümez M, Liebisch G, Kapinsky M, Diederich W, Drobnik W, Dean M, Allikmets R, Schmitz G. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 817-22.

Koehler KM, Romero LJ, Stauber PM, Pareo-Tubbeh SL, Liang HC, Baumgartner RN, PJ, RH, Stabler SP. Vitamin supplementation and other variables affecting serum homocysteine and methylmalonic acid concentrations in elderly men and women. *J Am Coll Nutr* 1996; 15: 364–76.

Kon Koh K, Mincemoyer R, Bui MN, Csako G, Pucino F, Guetta V, Waclawiw M, Cannon RO. Effects of hormone-replacement therapy on fibrinolysis in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1997; 336: 683-90.

Kothekar MA. Homocysteine in cardiovascular disease: a culprit or an innocent bystander? *Indian J Med Sci* 2007; 61: 361- 71.

Krajcinovic M, Robaey P, Chiasson S, Lemieux-Blanchard E, Rouillard M, Primeau M, Bournissen FG, Moghrabi A. Polymorphisms of genes controlling homocysteine levels and IQ score following the treatment for childhood ALL. *Pharmacogenomics* 2005, 6(3): 293-302.

Lagrand WK, Visser CA, Hermens WT, Niessen HWM, Verheugt FWA, Wolbink GJ, Hack CE. C-reactive protein as a cardiovascular disease risk factor more than an epiphenomenon. *Circulation* 1999; 100: 96–102.

Lang D, Kredan MB, Moat SJ, Hussain SA, Powell CA, Bellamy MF, Powers HJ, Lewis MJ. Homocysteine-induced inhibition of endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta: role for superoxide anions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20: 422-7.

Laraqui A, Allami A, Carrié A, Coiffard AS, Benkouka F, Benjouad A, Bendriss A, Kadiri N, Bennouar N, Benomar A, Guedira A, Raisonnier A, Fellati S, Srairi JE, Benomar M. Influence of methionine synthase (A2756G) and methionine synthase reductase(A66G) polymorphisms on plasma homocysteine levels and relation to risk of coronary artery disease. *Acta Cardiol* 2006; 61: 51–61.

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 of folate and vitamin B12 status in postmenopausal women. *Eur J Nutr* 2004; 58: 1518-24.

Laville M. Hypertension in patients with chronic renal disease. *Rev Prat* 2004; 54(6): 641–5.

Lavoie A, Tripp E, Hoffbrand AV. The effect of Vitamin B12 deficiency on methyl-folate metabolism and pteroylpolyglutamate synthesis in human cells. *Clinical Science and Molecular Medicine* 1974; 47: 617-630.

Le Grusse J and Watier B. Les vitamines. Données biochimiques, nutritionnelles et cliniques. Centre d'étude et d'information sur les vitamines, Produits Roche 1993. Neuilly-sur-Seine, France.

Leclerc D and Rozen R. Génétique moléculaire de MTHFR, les polymorphismes ne sont pas tous bénins. *Medecine/Sciences* 2007; 23: 297-302.

Lee BJ, Lin PT, Liaw YP, Chang SJ, Cheng CH, Huang YC. Homocysteine and risk of coronary artery disease: Folate is the important determinant of plasma homocysteine concentration. *Nutrition* 2003, 19: 577-83.

- Lentz SR, Erger RA, Dayal S, Maeda N, Malinow MR, Heistad DD, Faraci FM. Folate dependence of hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction in cystathionine b-synthase-deficient mice. *Am J Physiol* 2000, 278: H970–H975.
- 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.
- Lentz SR, Sobey CG, Piegors DJ, Bhopatkar MY, Faraci FM, Malinow MR, Heistad DD. Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocysteinemia. *J Clin Invest* 1996, 98: 24–9.
- Lewis SJ, Ebrahim S, Smith GD. Meta-analysis of MTHFR 677C→T polymorphism and coronary heart disease: does totality of evidence support causal role for homocysteine and preventive potential of folate? *BMJ* 2005; 331: 1053.
- Li H, Lewis A, Brodsky S, Rieger R, Iden C, Goligorsky MS. Homocysteine Induces 3 Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase in Vascular Endothelial Cells: A Mechanism for Development of Atherosclerosis? *Circulation* 2002; 105(9): 1037–43.
- Li S, Arning E, Liu C, Vitvitsky V, Hernandez C, Banerjee R, Bottiglieri T, Lin JD. Regulation of homocysteine homeostasis through the transcriptional coactivator pgc-1alpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009, 296: E543–548.
- 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.
- Lim A, Sengupta S, McComb ME, Theberge R, Wilson WG, Costello CE, Jacobsen DW. In vitro and in vivo interactions of homocysteine with human plasma transthyretin. *J Biol Chem* 2003, 278: 49707–13.
- Lindenbaum J, Rosenberg IH, Wilson PW, Stabler SP, Allen RH. Prevalence of cobalamin deficiency in the Framingham elderly population. *Am J Clin Nutr* 1994; 60(1): 2–11.
- Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJL. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* 2006; 367: 1747–57.
- Lucock M, Daskalakis I, Briggs D, Yates Z, Levene M. Altered folate metabolism and disposition in mothers affected by a spina bifida pregnancy: Influence of 677c → t methylenetetrahydrofolate reductase and 2756a → g methionine synthase genotypes. *Mol Genet Metabol* 2000, 70: 27–44.
- Lucock M. Folic Acid: Nutritional Biochemistry, Molecular Biology, and Role in Disease Processes. *Molecular Genetics and Metabolism* 2000, 71: 121–138.
- Lucock MD, Hartley R, Smithells RW. A rapid and specific HPLC-electrochemical method for the determination of endogenous 5-Methyltetrahydrofolic acid in plasma using solid phase sample preparation with internal standardization. *Biomed Chromatogr* 1989; 3: 58–64.
- 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.

Lynn B. Bailey and Jesse F. Gregory, III. Folate metabolism and Requirements . *Journal of nutrition* 1999; 129: 779-782.

Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, Fuchs C, Willett WC, Selhub J, Hennekens CH, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 1098-1102.

Ma J, Stampfer MJ, Hennekens CH, Frosst P, Selhub J, Horsford J, Malinow MR, Willett WC, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in US physicians. *Circulation* 1996; 94: 2410-6.

Ma J, Stampfer MJ, Hennekens CH, Frosst P, Selhub J, Horsford J, Malinow MR, Willett WC, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in US physicians. *Circulation* 1996; 94(10): 2410-6.

Majors AK, Sengupta S, Willard B, Kinter MT, Pyeritz RE, Jacobsen DW. Homocysteine binds to human plasma fibronectin and inhibits its interaction with fibrin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1354-9.

Malek R, Belateche F, Laouamri S, Hamdi-Cherif M, Touabti A, Bendib W, Nechadi A, Mekideche FZ, Hanta S. Prévalence du diabète de type 2 et de l'intolérance au glucose dans la région de Sétif (Algérie). *Diabetes Metab* (Paris) 2001; 27: 164-71.

Malinow MR, Bostom G, Krauss RM. Homocyst(e)ine, diet and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the nutrition committee, American Heart Association. *Circulation* 1999; 99: 178- 82.

Mariska K, Petra V, Robert C, Henk JB, Frans JK, Evert G. MTHFR 677C→T polymorphism and risk of coronary heart disease: a metaanalysis. *JAMA* 2002; 288: 2023-32.

Marmot MG et Mstard JF. Les maladies coronariennes et la santé des populations. In: Evans RG, Barer ML, Marmot T, editors. *Etre ou ne pas être en bonne santé*. Paris: John Libbey Eurotext; 1996; 195-219.

Martin Ac. Apports Nutritionnels Conseillés pour la population française. 3e édition: *Tec&Doc*, 2001.

Martin YN, Salavaggione OE, Eckloff BW, Wieben ED, Schaid DJ, Weinshilboum RM. Human methylenetetrahydrofolate reductase pharmacogenomics: gene resequencing and functional genomics. *Pharmacogenet Genomics* 2006; 16(4): 265-77.

Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75(1): 13-33.

Matherly LH and Goldman DI. Membrane transport of folates. *Vitam Horm* 2003; 66: 403-456.

Matsushita S, Muramatsu T, Arai H, Matsui T, Higushi S. The frequency of methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation varies with age in the normal population. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 1459-60.

Maumus S, Marteau JB, Siest G, Visvikis S. Génétique et facteurs de risque cardiovasculaires. *Sang Thrombose Vaisseaux* 2003; 15(8): 449–53

McCarty MF. Insulin secretion as a potential determinant of homocysteine levels. *Med Hypotheses* 2000; 55(5): 454-5.

McCully KS and Wilson RB. Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis* 1975; 22: 215-27.

McCully KS, Olszewski AJ, Vezeridis MP. Homocysteine and lipid metabolism in atherogenesis: effect of the homocysteine thiolactonyl derivatives, thioretinaco and thioretinamide. *Atherosclerosis* 1990; 83: 197-206.

McCully KS. Homocysteine and vascular disease. *Nat Med* 1996; 2: 386-9.

McDowell LR. Vitamins in animal and human nutrition. 2nd edition, Iowa State University Press 2000, Ames, IA.

Mebart J. Manuel pratique de nutrition /l'alimentation preventive et curative. ISBN 2804148041, 2006, 278p.

Meigs JB, Jacques PF, Selhub J, Singer DE, Nathan DM, Rifai N, D'Agostino RB Sr, Wilson PW. Fasting plasma homocysteine levels in the insulin resistance syndrome: the Framingham offspring study. *Diabetes Care* 2001; 24(8): 1403-10.

Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 1999; 340: 1801-1811.

Mendis S, Puska P, Norrving B. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. World Health Organization, Geneva 2011, 155p.

Menu P. Physiopathologie cardiaque. Faculté de pharmacie, université paris Sud XI (2002).

Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. The Dietary and Nutritional Survey of British Adults - Further Analysis". London: HMSO 1994.

Mitraoui N, Zammiti W, Ghazouani L, Jmili-Braham N, Saidi S, Finan RR, Almawi WY, Mahdjoub T. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and changes in homocysteine concentrations in women with idiopathic recurrent pregnancy losses. *Reproduction* 2006; 131: 395-401.

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.

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.

Mogk RL, Rothenmund H, Evans JA, Carson N, Dawson AJ. The frequency of the C677T substitution in the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Manitoba. *Clin Genet* 2000; 58(5): 406-8.

Morel CF, Scott P, Christensen E, Rosenblatt DS, Rozen R. Prenatal diagnosis for severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency by linkage analysis and enzymatic assay. *Mol Genet Metab* 2005; 85: 115-20.

Morelli VM, Lourenco DM, D'Almeida V, Franco RF, Miranda F, Zago MA, Noguti MA, Cruz E, Kerbaux J. Hyperhomocysteinemia increases the risk of venous thrombosis independent of the C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in selected Brazilian patients. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002; 13(3): 271-5.

Morita H, Taguchi J, Kurihara H, Kitaoka M, Kaneda H, Kurihara Y, Maemura K, Tayayuki S, Minamino T, Yamaoki K, Ogasawara K, Aizawa T, Suzuki S, Yazaki Y. Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease. *Circulation* 1997; 95: 2032-6.

Morrison K, Papapetrou C, Hol FA, Mariman ECM, Lynch SA, Burn J, Edwards YH. Susceptibility to spina bifida: an association study of five candidate genes. *Am J Med Genet Ann Hum Genet* 1998; 62: 379-96.

Mouchabac S. Homocystéine, hyperhomocystéinémie et dépression. *Neuropsychiatrie: Tendances et Débats* 2008; 32: 9-18.

Mudd SH, Uhlendorf BW, Freeman JM, Finkelstein JD, Shih VE. Homocystinuria associated with decreased methylenetetrahydrofolate reductase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1972; 46: 905-12.

Munshi M, Stone A, Fink L, Fonseca V. Hyperhomocysteinemia following a methionine load in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and macrovascular disease. *Metabolism* 1996; 45(1): 133-5.

Munshi MN, Stone A, Fink L, Fonseca V. Hyperhomocysteinemia following a methionine load in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and macrovascular disease. *Metabolism* 1996; 45:133-135.

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, 34:119-126.

National Research Council "Recommended Dietary Allowances", 10th ed. Washington, D.C.: National Academy Press 1989.

Nelen WLD, Blom HJ, Thomas CMG, Steegers EAP, Boers GHJ, Eskes TKAB. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism affects the change in homocysteine and folate concentrations resulting from low dose folic acid supplementation in women with unexplained recurrent miscarriages. *J Nutr* 1998; 128: 1336-1341.

Newby DE et Grubb NR. Cardiologie. Elsevier 2006, 170p.

Nexo E, Christensen AL, Petersen TE, Fedosov SN. Measurement of transcobalamin by ELISA. *Clin Chem* 2000; 46: 1643-1649.

Nicolas JP and Gueant JL. Absorption, distribution and excretion of vitamin B12. *Ann Gastroenterol Hepatol* (Paris) 1994, 30: 270-276, 281; discussion, 281-282.

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.

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.

Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Stensvold I, Nordrehang JE, Kvale G, Vollset SE. Coffee consumption and plasma total homocysteine: the hordaland homocysteine study. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 136-43.

O'Leary VB, Daly L, Murray S, Conley M, Mayne P, Kirke OPN, Mills JL, Molloy AM, Brody LC, Smith VB and Scott JM. Impact of the MTHFR C677T polymorphism on risk of neural tube defects: case-control study. *BMJ* 2004; 328: 1535-1536.

Olsewski A and McCully K. Homocysteine metabolism and the oxidative modification of proteins and lipids. *Free Radic Biol Med* 1993; 14: 683-93.

Pancharuniti N, Lewis CA, Sauberlich HE, Perkins LL, Go RCP, Alvarez JO, Macaluso M, TActon R, Copeland RB, Cousins AL, Gore TB, Cornwell PE, Roseman JM. Plasma homocysteine, folate, and vitamin B12 concentrations and risk for early-onset coronary artery disease. *Am J Clin Nutr* 1994; 59(4): 940-948.

Papoutsakis C, Yiannakouris N, Manios Y, Papaconstantinou E, Magkos F, Schulpis KH, Zampelas A, Matalas AL. Plasma homocysteine concentrations in Greek children are influenced by an interaction between the methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype and folate status. *J Nutr* 2005; 135: 383-8.

Pekkanen J, Linn S, Heiss G, Suchindran CM, Leon A, Rifkind BM, Tyroler HA. Ten-year mortality from cardiovascular disease in relation to cholesterol level among men with and without preexisting cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1990; 322: 1700-1707

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.

Perry J, Lumb M, Laundry M, Reynolds EH, Chanarin I. Role of Vitamin B12 in folate coenzyme synthesis. *Br J Haematol* 1976; 32: 243-248.

Perta-Kaján J, Twardowski T, Jakubowski H. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids* 2007, 32: 561-72.

Pfeiffer GM, Caudill SP, Gunter EW, Osterloh J, Sampson EJ. Biochemical indicators of B vitamin status in the US population after folic acid fortification: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000. *Am J Nutr* 2005; 82: 442-50.

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.

Poddar R, Sivasubramanian N, Dibello PM, Robinson K, Jacobsen D. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation* 2001, 103: 2717- 23.

Poirier LA, Brown AT, Fink LM, Wise CK, Randolph CJ, Delongchamp RR, Fonseca VA. Blood Sadenosylmethionine concentrations and lymphocyte methylenetetrahydrofolate reductase activity in diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Metabolism* 2001, 50:1014-1018.

Poitier de Courcy G. Apports nutritionnels conseillés en folates. *Ann Biol Clin* 2001; 59: 198-209.

Pritchard KA Jr, Groszek L, Smalley DM, Sessa WC, Wu M, Villalon P, Wolin MS, Stemerman MB. Native low density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ Res* 1995, 77: 510-8.

Qi Z, Hoffman G, Kurtycz D, Yu J. Prevalence of the C677T substitution of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in Wisconsin. *Genet Med* 2003; 5(6): 458-9.

Quadros EV, Regec AL, Khan KM, Quadros E, Rothenberg SP. Transcobalamin II synthesized in the intestinal villi facilitates transfer of cobalamin to the portal blood. *Am J Physiol* 1999; 277: G161-G166.

Raccach D, Blandine JD, Vague P. Diabète non insulino dépendant. *Rev 221 Prat* 1999; 49: 629-34.

Rajan S, Wallace JI, Beresford SA, Brodtkin KI, Allen RA, Stabler SP. Screening for cobalamin deficiency in geriatric outpatients: prevalence and influence of synthetic cobalamin intake. *J Am Geriatr Soc* 2002; 50(4): 624-30.

Rapport de l'approche Step Wise - OMS, Algérie. Mesure des facteurs de risque des maladies non transmissibles dans deux zones pilotes (Approche Step Wise), Algérie 2003. République Algérienne Démocratique et Populaire. Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière. Direction de la Prévention, Alger 2004.

Refsum H, Nurk E, Smith D, Ueland PM, Gjesdal CG, Bjelland I, Tverdal A, Tell GS, Nygard O, Vollset SE. The Hordaland Homocysteine study: A community-Based Study of homocysteine, its determinants, and associations with disease. *J Nutr* 2006; 136:1731S-40S.

Refsum H, Smith D, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J, Johnston C, Engbaek F, Schneede J, McPartlin C, Scott JM. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: An expert opinion. *Clinical Chemistry* 2004; 50: 3-32.

Refsum U, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998; 49: 31-63.

Regland B, Andersson M, Abrahamsson L, Bagby J, Dyrebag LE, Gottfries CG. Increased concentrations of homocysteine in the cerebrospinal fluid in patients with fibromyalgia and chronic fatigue syndrome. *Scand J Rheumat* 1997; 26: 301–7.

Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein (a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA* 2001; 285: 2481-5.

Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein, inflammation, and cardiovascular risk: from concept to clinical practice to clinical benefit. *Am Heart J* 2004; 148: 19-26.

Robinson K, Mayer EL, Miller DP, Green R, van Lente F, Gupta A, Kottke-Marchant K, Savon SR, Selhub J, Nissen SE, Kutner M, Topol EJ, Jacobsen DW. Hyperhomocysteinemia and low pyridoxal phosphate. Common and independent reversible risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 1995; 92: 2825-30.

Rodgers GM, Kane WH. Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *J Clin Invest* 1986, 77: 1909-1916.

Rosenberg N, Murafa M, Ikeda Y, **Opere-Sem O**, **Zivelin A**, **Geffen E**, **Uri Seligsohn**. The frequent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with a common haplotype in Whites, Japanese and African. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 758–62.

Roubenoff R, Dellaripa P, Nadeau MR, Abad LW, Muldoon BA, Selhub J, Rosenberg IH. Abnormal homocysteine metabolism in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997, 40: 718-22.

Russell-Jones GJ and Alpers DH. Vitamin B12 transporters. *Pharm Biotechnol* 1999; 12: 493-520.

Russo GT, Friso S, Jacques PF, Rogers G, Cucinotta D, Wilson PW, Ordovas JM, Rosenberg IH, Selhub J. Age and gender affect the relation between methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype and fasting plasma homocysteine concentrations in the Framingham Offspring Study Cohort. *J Nutr* 2003; 133(11): 3416-21.

Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* 2004, 14: 20-8.

Saito I, Ishimitsu T, Minami J, Ono H, Ohru M, Matsuoka H. Relation of plasma high-sensitivity C-reactive protein to traditional cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis* 2003; 167: 73-9.

Saweda AH, Sunarti, Sutomo R, Hayashi C, Lee MJ, Ayaki H. The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene among the Indonesian Japanese population. *Kobe J Med Sci* 2002; 48: 137-44.

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.

Schlienger JL. Homocystéine et consommation d'alcool une relation ambiguë et un nouveau paradoxe. *Presse Med* 2003; 32: 262-7.

Schneider JA, Rees DC, Liw YT, Clegg JB. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet* 1998, 62: 1258-1260.

Schnyder G, Roffi M, Flammer Y, Pin R, Hess OM. Effect of homocysteine-lowering therapy with folic acid, vitamin B12, and vitamin B6 on clinical outcome after percutaneous coronary intervention: the Swiss Heart study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288(8): 973-9.

Scott JM, Weir DG. Folate/vitamin B12 interrelationships. *Essays in Biochemistry* 1994; 28: 63–72.

Searcy RL. Diagnostic biochemistry . New york: Mc Graw-Hill 1969; pp. 223-228, 573-582.

Seetharam B and Li N. Transcobalamin II and its cell surface receptor. *Vitam Horm* 2000; 59: 337-366.

Seetharam B, Bose S, Li N. Cellular import of cobalamin (Vitamin B-12). *J Nutr* 1999; 129: 1761-1764.

Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rosenberg IH. Relationship between plasma homocysteine and vitamin status in the Framingham study population. Impact of folic acid fortification. *Public Health Rev* 2000; 28 (1-4): 117-45.

Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 1999; 19: 217-46.

Selzer RR, Rosenblatt DS, Laxova R, Hogan K. Adverse effect of nitrous oxide in a child with 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *N Engl J Med* 2003; 349: 45-50.

Sen U and Tyagi SC. Homocysteine and hypertension in diabetes: Does PPAR γ have a regulatory role? *Hindawi Publishing Corporation PPAR Research*, 2010, ID 806538, 12 pages doi:10.1155/2010/806538

Sengupta S, Wehbe C, Majors AK, Ketterer ME, DiBello PM, Jacobsen DW. Relative roles of albumin and ceruloplasmin in the formation of homocysteine, homocysteine-cystine mixed disulfide and cystine in circulation. *J Biol Chem* 2001, 276: 46896– 904.

Seyoum E, Selhoub J. Properties of food folates determined by stability and susceptibility to intestinal pteroylpolyglutamate hydrolase action. *J Nutr* 1998; 128: 1956-1960.

Shane B and Stokstad EL. Vitamin B12-folate interrelationships. *Annu Rev Nutr* 1985; 5: 115-141.

Shane B. Polypolyglutamate synthesis and role in the regulation of one carbon metabolism. *Vitamins and Hormones* 1989; 45: 263-335.

Shiliang Liu et al. Évaluation de la fortification en acide folique des produits alimentaires pour la prévention primaire des anomalies du tube neural Cat. No. H39-4/57-2003-1F-PDF- ISBN 0-662-78307-7. http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/faaf/pdf/folic_acid_f.pdf

Singal R, Ferdinand L, Das PM, Reis IM, Schlesselman JJ. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and prostate cancer risk. *Int J Oncol* 2004; 25: 1465–71.

Smith RM and Osborne-White WS. Folic acid metabolism in vitamin B12-deficient sheep. Depletion of liver folates. *Biochem J* 1973; 136: 279-293.

Smulders YM and Stehouwer CDA. Folate metabolism and cardiovascular disease. *Semin Vasc Med* 2005, 5(2): 87-97.

Soinio M, Marniemi J, Laakso M, Lehto S, Rönnemaa T. Elevated Plasma Homocysteine Level Is an Independent Predictor of Coronary Heart Disease Events in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Ann Intern Med* 2004; 140: 94-100.

Souci SW, Fachmann W, Kraut H. Food Composition and Nutrition Tables, 5th ed, CRC Press, Boca Raton and Medpharm Scientific Publishers, 1994 Stuttgart.

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.

Stamler J, Wentworth DN, Neaton JD, for the MRFIT group. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356 222 primary screenees of the MRFIT. *JAMA* 1986; 256: 2823-2828.

Stampfer MJ, Grodstein F. Can homocysteine be related to physical functioning? *Am J Med* 2002; 113(7): 610-1.

Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, Tishler PV, Hennekens CH. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA* 1992; 268: 877-81.

Stanger O. Physiology of folic acid in health and disease. *Curr Drug Metabol* 2002; 3: 211-223.

Stehouwer CDA and van Guldener C. Does homocysteine cause hypertension? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2003, 41(11): 1408-141.

Suliman ME, Qureshi AR, Bárány P, Stenvinkel P, Filho JCD, Anderstam B, Heimbürger O, Lindholm B, Bergström J. Hyperhomocysteinemia, nutritional status and cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2000; 57: 1727-35.

Sunden SL, Renduchintala MS, Park EI, Miklasz SD, Garrow TA. Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. *Arch Biochem Biophys* 1997, 345: 171-4.

Tawakol A, Omland T, Gerhard M, Wu JT and Creager MA. Hyperhomocysteinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilatation in humans. *Circulation* 1997; 95: 1119-21.

The Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med* 2006; 354: 1567-77.

The Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke a meta-analysis. *JAMA* 2002, 288: 2015-22.

The Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke. *JAMA* 2002; 288: 2015-22.

The WAFACS study. Late breaking clinical trials. Albert CM. AHA, 2006.

Thogersen AM, Nilsson TK, Dahlen G, Jansson JH, Boman K, Huhtasaari F, Hallmans G. Homozygosity for the C 677 →T mutation of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and total plasma homocyst(e)ine are not associated with greater than normal risk of a first myocardial infarction in northern Sweden. *Coron Artery Dis* 2001; 12(2): 85-90.

Tonetti C, Saudubray JM, Echenne B, Landrieu P, Giraudier S, Zittoun J. Relations between molecular and biological abnormalities in 11 families from siblings affected with methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Eur J Pediatr* 2003; 162(7-8): 466-75.

Trabetti E. Homocysteine, MTHFR gene polymorphisms, and cardio-cerebrovascular risk. *J Appl Genet* 2008, 49: 267-282.

Tran P, Leclerc D, Chan M, Pai A, Hiou-Tim F, Wu Q, Goyette P, Artigas C, Milos R, Rozen R. Multiple transcription start sites and alternative splicing in the methylenetetrahydrofolate reductase gene result in two enzyme isoforms. *Mamm Genome* 2002; 13(9): 483-92.

Tsai JC, Perella M, Yoshizumi M, Hsiao CM, Haber E, Schlegel R, Lee ME. Promotion of vascular smooth cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 6369-73.

Tsai MY, Bignell M, Welge BG, Graham KJ, Hanson N. Polygenic influence on plasma homocysteine: association of two prevalent mutations, the 844ins68 of cystathionine b synthase and A2756G of methionine synthase, with lowered plasma homocysteine levels. *Atherosclerosis* 2000; 149: 131-7.

Tyagi N, Ovechkin AV, Lominadze D, Tyagi SC. Mitochondrial mechanism of microvascular endothelial cells apoptosis in hyperhomocysteinemia. *J Cell Biochem* 2006, 98: 1150-62.

Ubbink JB, Fehily AM, Pickering J, El Wood PC, Wermaak WJH. Homocysteine and ischemic heart disease in the Caerphilly cohort. *Artherosclerosis* 1998; 140:349-56.

Ueland PM and Rozen R. MTHFR polymorphisms and disease. Georgetown: Landes Bioscience/Eurekah.com, 2005: 210 p.

Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H and Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Pharmacological Sciences* 2001; 22 (4): 195-201 (a).

Ueland PM, Nygard O, Vollset SE, Refsum H. The Hordaland homocysteine studies. *Lipids* 2001; 36: S33-9 (b).

Ueland PM, Refsum H, Brattström L. Plasma homocysteine and cardiovascular disease. In: Francis Jr RB Ed. Atherosclerotic cardiovascular disease 1992. Marcel Dekker, Inc. hemostasis, and endothelial function. New York, 183-236.

Ueland PM, Refsum H, Schneede J. Clinical Pharmacology Unit Central Laboratory Haukeland Hospital, University of Bergen, Bergen, Norway. Determinants of plasma homocysteine. *Developments in Cardiovascular Medicine* 2000; 230: 59-84.

Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993; 39: 1764-79.

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.

Upchurch GR Jr, Welch GN, Fabian AJ, Freedman JE, Johnson JL, Keaney JF Jr, Loscalzo J. Homocysteine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1997, 272: 17012-17017.

Upchurch GR, Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine, EDRF, and endothelial function. *J Nutr* 1996; 126: 1290.

Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 2000, 287: 664-6.

Urgert R, Vliet TV, Zock PL, Katan MB. Heavy coffee consumption and plasma homocysteine: a randomized controlled trial in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 1107-10.

van Baal WM, Kenemans P, van der Mooren MJ, Kessel H, Emeis JJ, Stehouwer CDA. Increased C-reactive protein levels during short-term hormone replacement therapy in healthy postmenopausal women. *Thromb Haemost* 1999; 81: 925-8.

Van Beynum IM, den Heijer M, Thomas CM, Afman L, Oppenraay-van Emmerzaal D, Blom HJ. Total homocysteine and its predictors in Dutch children. *Am J Clin Nutr* 2005, 81: 1110-6.

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.

van der Put NM, van der Molen EF, Kluijtmans LA, Heil SG, Trijbels JMF, Eskes TK, Van Oppenraaij-Emmerzaal D, Banerjee R, Blom HJ. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinemia in neural-tube defects and vascular disease. *Q J Med* 1997; 90: 511-7.

van der Put NMJ, Steegers-Theunissen RPM, Frosst P, Trijbels FJM, Eskes TKAB, van den Heuvel LP, Mariman ECM, den Heyer M, Rozen R, Blom HJ. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995; 34(6): 1070- 1071.

Van der Put NMJ, Van den Heuvel LP, Steegers-Theunissen RPM, Trijbels FJM, Eskes TKAB, Mariman ECM, Den Heyer M, Blom HJ. Decreased methylenetetrahydrofolate reductase activity due to the C677T mutation in families with spina bifida offspring. *J Mol Med* 1996; 74: 691-694.

- van Guldener C, Nanayakkara PWB, Stehouwer CDA. Homocysteine and blood pressure. *Current Hypertension Reports* 2003; 5(1): 26–3.
- Vangelder E, Delecourt F, Cardozo MB, Dhondt JL, Forzy G. Hyperhomocystéinémie et diabète de type 2. *Ann Biol Clin* 2006; 64: 485-9.
- Verhoef P, Kok FJ, Kruysen DA, Schouten EG, Witteman JC, Grobbee DE, Ueland PM, Refsum H. Plasma total homocysteine, B vitamins, and risk of coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(5): 989-95.
- Vermeulen EGJ, Niessen HWM, Bogels M, Stehouwer CDA, Rauwerda JA, van Hinsbergh VWM. Decreased smooth muscle cell/extracellular matrix ratio of media of femoral artery in patients with atherosclerosis and hyperhomocysteinemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2001, 21(4): 573–577.
- Verroust PJ, Kozyraki R. Cubiline : rôle physiopathologique et relations avec la mégaline. *Médecine Sciences* 2003; 19(3): 337-343.
- Vesin C, Horellou MH, Mairesse S, Conard J, Safar M, Blacher J. Homocystéine et risque cardiovasculaire. *STV* 2007; 19 (3): 143-149.
- Voet D, Voet JG. Biochimie. Traduction française de la 2ème édition américaine. Paris , Bruxelles : DeBoeck Université 1998; pp. 419,674-677,713,736-741,762,763,815.
- Vollset SE, Refsum H, Tverdal A, Nygård O, Nordrehaug JE, Tell GS, Ueland PM. Plasma total homocysteine and cardiovascular and noncardiovascular mortality: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 2001; 74(1): 130-6.
- Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a metaanalysis. *Br Med J* 2002; 325: 1202–8.
- Wald NJ, Watt HC, Law MR, Weir DG, McPartlin J, Scott J. Homocysteine and ischaemic heart disease: results of a prospective study with implications regarding prevention. *Arch Intern Med* 1998; 158:862-67.
- Wang G and O K. Homocysteine stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 receptor (CCR2) in human monocytes: possible involvement of oxygen free radicals. *Biochem J* 2001, 357: 233-40.
- Wang G, Siow YL, O K. Homocysteine stimulates nuclear factor kappaB activity and monocyte chemoattractant protein-1 expression in vascular smooth-muscle cells: a possible role for protein kinase C. *Biochem J* 2000, 352: 817–826.
- 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.
- Wang X, Qin X, Demirtas H, Li J, Mao G, Huo Y, Sun N, Liu L, Xu X. Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: a meta-analysis. *Lancet* 2007; 369: 1876-82.

- Wang X. A theory for the mechanism of homocysteine-induced vascular pathogenesis. *Med Hypotheses* 1999; 53(5): 386-94.
- Wang XL, Duarte N, Cai H, Adachi T, Sim AS, Cranney G, Wilcken DE. Relationship between total plasma homocysteine, polymorphisms of homocysteine metabolism related enzymes, risk factors and coronary artery disease in the Australian hospital-based population. *Atherosclerosis* 1999, 146: 133-40.
- Waxman S, Schreiber C. Characteristics of folic acid binding protein in folate deficient serum. *Blood* 1973; 38: 219–301.
- Weiss N, Heydrick S, Zhang YY, Bierl C, Cap A, Loscalzo J. Cellular redox state and endothelial dysfunction in mildly hyperhomocysteinemic cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002, 22: 34-41.
- Weiss N, Zhang YY, Heydrick S, Bierl C, Loscalzo J. Overexpression of cellular glutathione peroxidase rescues homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98: 12503-8.
- Welch GN, Loscalzo J. Mechanisms of disease: homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 1998, 338: 1042–50.
- Welch GN, Upchurch GR, Farivar RS, Pigazz A, Vu K, Brecher P et al. Homocysteine-induced nitric oxide production in vascular smooth-muscle cells by NF-kappa B-dependent transcriptional activation of Nos2. *Proc Assoc Am Physicians* 1998; 110: 22-31.
- WHO/MONICA Project. Geographical variation in the major risk factors of coronary heart disease in men and women aged 35-64 years. *World Health Stat Q* 1988; 41:115-40.
- Widner B, Leblhuber F, Frick B, Laich A, Artner-Dworzak E, Fuchs D. Moderate hyperhomocysteinemia and immune activation in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2002, 109: 1445-52.
- Wiklund O, Fager G, Andersson A, Lundstam U, Masson P, Hultberg B. N-acetylcysteine treatment lowers plasma homocysteine but not serum lipoprotein(a) levels. *Atherosclerosis* 1996, 119:99-106.
- Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Renlund M, Stoll C, Alembik Y, Dott B, Czeizel AE, Gelman-Kohan Z, Scarano G, Bianca S, Ettore G, Tenconi R, Bellato S, Scala I, Mutchinick OM, López MA, de Walle H, Hofstra R, Joutchenko L, Kavteladze L, Bermejo E, Martínez-Frías ML, Gallagher M, Erickson JD, Vollset SE, Mastroiacovo P, Andria G, Botto LD. Geographical and ethnic variation of the 677 C → T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas worldwide. *J Med Genet* 2003; 40: 619-25.
- Wilcken DEL, Wilcken B. The natural history of vascular disease in homocystinuria and the effects of treatment. *J Inherit Metab Dis* 1997; 20: 295-300.

Wilcken DE, Wang XL, Adachi T, Hara H, Duarte N, Green K, Wilcken B. Relationship between homocysteine and superoxide dismutase in homocystinuria: possible relevance to cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20: 1199-202.

Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H, Gravel RA, Rosen R. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab* 1999; 67: 317-323.

Wolters M, Ströhle A, Hahn A. Age-associated changes in the metabolism of vitamin B(12) and folic acid: prevalence, aetiopathogenesis and pathophysiological consequences. *Z Gerontol Geriatr* 2004; 37: 109-135.

Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators (WGWHII). « Risks and benefits of estrogen plus progestin in health initiative investigators ». *JAMA* 2002; 288(3) (July). [Réf. du 31 janvier 2004]. Résumé disponible sur Internet: <http://jama.ama-assn.org/cgi/content/abstract/288/3/321>

Yahia-Berrouiguet A, Benyoucef M, Meguenni K, Brouri M. Enquête sur la prévalence des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires à Tlemcen (Algerie). *Médecine des maladies Métaboliques* 2009; 3 (3): 313-319.

Yamamoto M, Hara H, Adachi T. Effects of homocysteine on the binding of extracellular-superoxide dismutase to the endothelial cell surface. *FEBS Lett* 2000, 486: 159-62.

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.

Yap S, Naughten E. Homocystinuria due to cystathionine betasynthase deficiency in Ireland: 25 years' experience of a newborn screened and treated population with reference to clinical outcome and biochemical control. *J Inherit Metab Dis* 1998; 21: 738-47.

Yavasoglu I, Tombuloglu M, Kadikoylu G, Donmez A, Cagiran S, Bolaman Z. Cholesterol levels in patients with multiple myeloma. *Annals of hematology* 2008, 87(3): 223-8.

Yong W, Hong-Yang Z, Qiong-Lin L, Hui-Hua Y, Yi-Ming W, Qing-Fei L, Ping H, Xiao-Ying Z, Xin-Ming S, Gong C, Ting Z, Jian-Xin W, Guo-An L. Simultaneous quantification of 11 pivotal metabolites in neural tube defects by HPLC-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2008; 863: 94-100.

Zarychanski R, Houston DS. Plasma homocysteine concentration is not associated with activated protein C resistance in patients investigated for hypercoagulability. *Thromb Haemost* 2004, 91: 1115-22.

Zetterberg H, Regland B, Palmer M, Ricksten A, Palmqvist L, Rymo L, Arvanitis DA, Spandidos DA, Blennow K. Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneous aborted embryos. *Eur J Hum Genet* 2002; 10:113-8.

Zhang C, Cai Y, Adachi MT, Oshiro S, Aso T, Kaufman RJ, Kitajima S Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem* 2001; 276: 35867-74.

Zhang G and Dai C. Correlation analysis between plasma homocysteine level and polymorphism of homocysteine metabolism related enzymes in ischemic cerebrovascular or cardiovascular diseases. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2002; 23: 126-9.

Zhang G and Dai C. Gene polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes in Chinese patients with occlusive coronary artery or cerebral vascular diseases. *Thromb Res* 2001; 104: 187-95.

Zhang X, Li H, Jin H, Ebin Z, Brodsky S, Goligorsky MS. Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: 671-8.

Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic Biol Med* 2003; 34:1359-68.

Zhu H, Wicker NJ, Shaw GM, Lammer EJ, Hendricks K, Suarez L, Canfield M, Finnell RH. Homocysteine remethylation enzyme polymorphisms and increased risks for neural tube defects. *Mol Genet Metab* 2003; 78: 216-221.

Zimmet P, Alberti G, Shaw J. Nouvelle définition globale du syndrome métabolique : raisonnement et résultats. *Diabetes Voice* 2005; 50: 31-3.

Zittoun J. Folates et cobalamines. In Najman A, Verdy E, Proton G, Isnard-Grivaux F, eds. *Hématologie: Précis des maladies du sang*. Tom I. Paris: Marketing 1994; pp 79-87.

Zittoun J. Homocystéine et pathologie vasculaire. *Revue Hématologie* 1998; 4: 7-16.