



**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET  
POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**  
**UNIVERSITE BATNA-2- MOSTEFA BEN BOULAIID**  
**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE DES ORGANISMES**



## **THESE**

Pour l'obtention du diplôme de

# **Doctorat en sciences**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Option : Biologie et Physiologie Animale**

**Présentée par :**

**M<sup>elle</sup>. DJAARA Hayat**

**Thème**

---

**Étude du Polymorphisme Génétique C677T et  
A1298C du gène MTHFR chez les patients  
ayant une Athérosclérose Coronarienne, dans  
une partie de la population des Aurès (Algérie)**

---

Devant le jury

<b>Président :</b> Pr. KEBIECHE Mohamed	Professeur	Université Batna- 2-
<b>Rapporteur :</b> Pr. YAHIA Mouloud	Professeur	Université Batna-2-
<b>Examineur :</b> Mr. ZOUAGHI Youcef	MCA	Université Constantine -1-
<b>Examinatrice :</b> Mme. AMEDDAH Souad	Professeur	Université Constantine -1-
<b>Examinatrice :</b> Mme. OUARHLENT Yamina	MCA	Université Batna- 2-
<b>Examineur :</b> Mr. Benoune Omar	MCA	UniversitéBatna- 1-

**Année Universitaire: 2018/2019**



# REMERCIEMENTS

A mon Directeur de thèse, le défunt Professeur **YAHIA Mouloud**, Je vous remercie d'avoir accepté de diriger ce travail. Votre sympathie, votre disponibilité, vos encouragements soutenus et votre aide m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance et ma profonde gratitude envers ma Directrice de thèse administrative, la Professeur **HAMBABA Leila**, je vous remercie de m'avoir conseillé et surtout de m'avoir encouragé.

Mes sincères remerciements vont également à la Professeur **Rosa-Maria Guéant-Rodriguez** pour sa disponibilité, sa gentillesse et le degré d'humanisme dont elle a fait preuve, son implication avec enthousiasme et son esprit de responsabilité tout au long de la réalisation des travaux de cette thèse. Veuillez trouver ici, Madame, l'expression de ma profonde gratitude et la grande estime que je porte pour vous.

Je tiens à remercier très sincèrement le Professeur **Jean-Louis Guéant**, directeur de l'unité Inserm U 1256 et chef de service du laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire du CHU de Nancy, pour m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir fourni tous les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail. Qu'il trouve ici, l'expression de ma gratitude et de ma reconnaissance.

Je remercie chaleureusement **Mme Renée Debard** pour son aide précieuse et sa disponibilité, ainsi que tout le personnel du laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire du CHU de Nancy.

Au Présidente de jury, le Professeur **KEBIECHE Mohamed**; vous m'avez fait le grand honneur d'accepter la Présidence de cette thèse et je vous en suis reconnaissante. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

J'adresse également tous mes remerciements aux membres de jury; Le Pr **AMEDAH Souad**, Le Dr **ZOUAGHI Youcef**, Le Dr **OUAHLENT Yamina** et Le Dr **BENOUNE Omer**.

Je tiens également à remercier vivement **Dr BOUSSIF Abdelali**, pour toute son aide, son soutien et pour tous ses conseils pertinents.

**À mes parents**, nul mot ne pourra exprimer ma reconnaissance, gratitude et reconnaissance envers vous. Vous m'avez apporté un soutien sans faille et témoigné toute votre confiance en moi durant toutes mes années d'étude. Vous m'avez toujours appris que le meilleur héritage est la bonne instruction.

**À mon frère**, Merci pour ton encouragement et accompagnement durant mes stages en France.

**À mes oncles et mes tantes** à Paris et à Nancy, vous étiez présents lorsque j'avais besoin de vous.

Ce travail n'aurait jamais pu avoir le jour si non la participation des malades et témoins, les médecins et les laborantins. Je vous remercie infiniment.

Pour tous ceux qui ont contribué de près ou de loin, à la réalisation de ce travail, malgré les évènements de la vie. Un grand merci!

*Hayat*



# SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale

## *Revue Bibliographique*

<b>I. Physiopathologie de l'athérosclérose</b> .....	01
I.1. L'infarctus du Myocarde .....	01
I.2. Données épidémiologiques.....	01
I.3. Facteur de risque de l'IDM.....	02
I.4. Etiologie .....	03
I.5. L'Athérosclérose.....	03
I.5.1. Physiopathologie.....	04
I.6. Lipides et lipoprotéines.....	08
I.6.1. Principaux lipides .....	08
I.6.2. Transport plasmatique des lipides.....	09
I.6.2.1. Principaux acteurs du transport plasmatique des lipides.....	09
I.6.2.2. Métabolisme des lipoprotéines.....	10
<b>II. Facteurs nutritionnels et génétiques de l'hyperhomocystéinémie</b> .....	14
II.1. L'homocystéine.....	13
II.2. Métabolisme de l'homocystéine.....	15
II.2.1. La voie de la reméthylation.....	15
II.2.2. La voie de Trans-sulfuration.....	16
II.3. Classification des hyperhomocystéinémies.....	17
II.4. Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie.....	17
II.4.1. Les facteurs nutritionnels.....	18
II.4.2. Facteurs génétiques.....	21
II.4.3. Facteurs environnementaux .....	21
II.5. Mécanismes de la pathogénicité de l'hyperhomocystéinémie.....	22
III.1. Gène MTHFR (Méthylène-tétrahydrofolate-réductase).....	27
III.2. Enzyme MTHFR.....	28
III.3. Polymorphismes du gène MTHFR.....	30
III.3.1. Le polymorphisme C677T de la MTHFR.....	31
III.3.2. Le polymorphisme A1298C de la MTHFR.....	33
III.4. Les polymorphismes: C677T, A1298C et maladies.....	33

## *Etude expérimentale*

<b>IV. Matériels et Méthodes</b> .....	35
IV.1. Matériels.....	35
IV.1.1. Population d'étude.....	35
IV.2. Méthodes.....	35
IV.2.1. Méthode de dosage des différents paramètres biochimiques.....	36
IV.2.1.1. Dosage des triglycérides.....	36
IV.2.1.2. Dosage du cholestérol total.....	36
IV.2.1.3. Dosage du cholestérol LDL.....	37

IV.2.1.4. Dosage du cholestérol HDL.....	38
IV.2.1.5. Dosage de l'urée.....	38
IV.2.1.6. Dosage de la protéine C-réactive (CRP).....	39
IV.2.1.7. Dosage de la BNP (Brain natriuretic peptide).....	39
IV.2.1.8. L'activité aspartate aminotransférase (ASAT).....	40
IV.2.1.9. L'activité alanine aminotransférase (ALAT).....	40
IV.2.1.10. Dosage de l'homocystéine par le système IMx.....	42
IV.2.1.11. Dosage quantitatif et simultané de la vitamine B12 (Cobalamine) et des folates (vitamine B <sub>9</sub> ) .....	42
IV.2.2. Recherche de la mutation.....	42
IV.2.2.1. Extraction d'ADN .....	41
IV.2.2.2. Détermination de la pureté et la concentration de l'ADN.....	44
IV.2.2.3. Amplification d'ADN par PCR.....	45
IV.2.2.4. Recherche de la mutation C677T et A1298C du gène MTHFR par PCR en temps réel (RT- PCR).....	46
IV.2.2.5. Analyse des polymorphismes C677T et A1298C de la MTHFR.....	47
IV.2. Analyse statistique.....	50
<b>V. Résultats.....</b>	<b>51</b>
V.1. Description de la population témoin et fréquences de différents facteurs de risque.....	51
V.1.1. Les caractéristiques cliniques et biochimiques des sujets témoins selon le polymorphisme du MTHFR C677T.....	51
V.1.1.1. Répartition des fréquences génotypiques et alléliques de la mutation C677T du gène MTHFR selon le sexe dans la population témoin.....	52
V.1.1.2. L'influence du sexe sur les concentrations du folate, vitamine B <sub>12</sub> et de l'homocystéine totale chez les témoins.....	53
V.1.1.3. La distribution de la concentration plasmatique du folate, vitamine B <sub>12</sub> et de l'homocystéine totale selon les génotypes du polymorphisme C677T MTHFR... ..	54
V.1.1.4. Corrélation entre l'homocystéine totale, folate et l'âge moyen.....	55
V.1.2. Les caractéristiques cliniques et biochimiques des sujets témoins selon le polymorphisme du MTHFR A1298C.....	55
V.1.2.1. Répartition des fréquences génotypiques et alléliques de la mutation A1298C du gène MTHFR selon le sexe dans la population témoin.....	56
V.1.2.2. Fréquence de la coexistence des polymorphismes C677T et A1298C du gène MTHFR.....	57
V.1.2.3. La distribution de la concentration plasmatique du folate, vitamine B <sub>12</sub> et de l'homocystéine total selon les génotypes du polymorphisme A1298C MTHFR.....	58
V.2. Description de la population malade représentée par des patients coronariens et différentsfacteursde risque.....	59
V.2.1. Les caractéristiques cliniques et biochimiques des patients selon le polymorphisme du MTHFR C677T.....	59
V.2.2. Effet de la mutation C677T de la MTHFR sur les facteurs de risque biochimiques chez les sujets coronariens (avec un IDM).....	60
V.2.2.1. Association du génotype C677T MTHFR avec l'homocystéine totale, la vitamine B <sub>12</sub> et B <sub>9</sub> .....	60
V.2.3. Les caractéristiques cliniques et biochimiques des patients selon le polymorphisme A1298C da la MTHFR.....	62
V.2.4. Effet de la mutation A1298C de la MTHFR sur les facteurs de risque	

biochimiques chez les sujets coronariens.....	64
V.2.4.1. Association du génotype A1298C MTHFR avec l'homocystéine totale, la vitamine B <sub>12</sub> et B <sub>9</sub> .....	64
VI. Discussion.....	66
VI.1. Description de la population témoin et fréquence de différents facteurs de risque.....	66
VI.1.1. Les caractéristiques cliniques et biochimiques des sujets témoins selon le polymorphisme du MTHFR C677T.....	66
VI.1.2. Répartition des fréquences génotypiques et alléliques de la mutation C677T du gène MTHFR selon le sexe dans la population témoin.....	68
VI.1.3. L'influence du sexe sur les concentrations du folate, vitamine B <sub>12</sub> et de l'homocystéine totale chez les témoins.....	71
VI.1.4. La distribution de la concentration plasmatique du folate, vitamine B <sub>12</sub> et de l'homocystéine totale selon les génotypes du polymorphisme C677T MTHFR.....	71
VI.1.5. Corrélation entre l'homocystéine totale, folate et l'âge moyen.....	74
VI.1.6. Les caractéristiques cliniques et biochimiques des sujets témoins selon le polymorphisme du MTHFR A1298C.....	74
VI.1.7. Répartition des fréquences génotypiques et alléliques de la mutation A1298C du gène MTHFR selon le sexe dans la population témoin.....	75
VI.1.8. Fréquence de la coexistence des polymorphismes C677T et A1298C du gène MTHFR.....	76
VI.1.9. La distribution de la concentration plasmatique du folate, vitamine B <sub>12</sub> et de l'homocystéine totale selon les génotypes du polymorphisme A1298C MTHFR...	79
VI.2. Description de la population pathologique représentée par des patients coronariens et différents facteurs de risque.....	80
VI.2.1. Les caractéristiques cliniques et biochimiques des patients selon le polymorphisme du MTHFR C677T et A1298C.....	80
VI.2.2. Effet de la mutation C677T de la MTHFR sur les facteurs de risque biochimiques chez les sujets coronariens (avec un IDM).....	84
VI.2.2.1. Association du génotype C677T MTHFR avec l'homocystéine totale, la vitamine B <sub>12</sub> et B <sub>9</sub> .....	84
VI.2.3. Effet de la mutation A1298C de la MTHFR sur les facteurs de risque biochimiques chez les sujets coronariens .....	88
VI.2.3.1. Association du génotype A1298C MTHFR avec l'homocystéine totale, la vitamine B <sub>12</sub> et B <sub>9</sub> .....	88

## **Conclusions et perspectives**

### **Annexes**

### **Références bibliographiques**

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ABCA1</b>	Adenosine triphosphate Binding Cassette Transporter classe A type 1
<b>ABCG1</b>	Adenosine triphosphate Binding Cassette Transporter classe G type 1
<b>ADP</b>	Adenosine Diphosphate
<b>Apo</b>	Apolipoprotein
<b>CDK</b>	Cyclin-dependent kinase
<b>CDKI</b>	Cyclin-dependent kinase inhibitor
<b>CETP</b>	Cholesteryl Ester Transfer Protein
<b>HDL</b>	High Density Lipoprotein
<b>IDL</b>	Intermediate Density Lipoprotein
<b>IL-1</b>	Interleukin-1
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferon-gamma
<b>LCAT</b>	Lécithine Cholestérol Acyl transférase
<b>LDL</b>	Low Density Lipoprotein
<b>LDLox</b>	Oxidized low density lipoprotein
<b>LDL-R</b>	Low density lipoprotein - receptors
<b>LPL</b>	Lipoprotein lipase
<b>LRP-1</b>	Low density lipoprotein receptor-related protein 1
<b>LT</b>	Lymphocytes T
<b>MMP</b>	Matrix metalloproteinase
<b>MCP-1</b>	Monocyte chemoattractant protein-1
<b>M-CSF</b>	Macrophage colony-stimulating factor
<b>MTP</b>	Microsomal triglyceride transfer protein
<b>PDGF</b>	Platelet - Derived Growth Factor
<b>SR-BI</b>	Scavenger receptor class B type 1
<b>TNF-alpha</b>	Tumor necrosis factor- alpha
<b>TXA2</b>	Thromboxane A2
<b>VLDL</b>	Very -Low-Density Lipoprotein
<b>UV</b>	Ultra-violet
<b>BNP</b>	Brain Natriuretic Peptide
<b>CRP</b>	C-reactive protein
<b>Hcy</b>	Homocystéine
<b>MET</b>	Méthionine
<b>CBS</b>	La cystathione- $\beta$ -synthase
<b>MTHFR</b>	Méthylène tétrahydrofolate réductase
<b>Cbl</b>	Cobalamin
<b>SHMT</b>	La sérine hydroxy-méthyltransférase
<b>DHF</b>	Dihydrofolate
<b>THF</b>	Tetrahydrofolate
<b>5-10 MTHF</b>	La 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase
<b>MS</b>	La methionine synthase
<b>MSR</b>	La Methionine synthase reductase
<b>SAM</b>	La S-adenosylméthionine
<b>SAH</b>	S-Adenosylhomocysteine
<b>MAT</b>	La méthionine adénosyltransférase
<b>Hhcy</b>	L'hyperhomocystéinémie
<b>tHcy</b>	Total homocysteine
<b>PLP</b>	Le pyridoxal 5'-phosphate
<b>NO</b>	Nitric oxide

<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>CMLVs</b>	Cellules musculaires lisses vasculaires
<b>VCAM-1</b>	Vascular cell adhesion molecule 1
<b>FT</b>	Facteur tissulaire
<b>HMG-CoA</b>	3-hydroxy-3- methylglutaryl coenzyme A
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
<b>FAD</b>	Flavine adenine dinucleotide
<b>CAD</b>	Coronary artery disease
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>RT- PCR</b>	Real-time polymerase chain reaction
<b>FRET</b>	Fluorescence Resonance Energy Transfert
<b>IDM</b>	Infarctus Du Myocarde
<b>IMC</b>	Indice de masse corporelle

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure.</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Figure01.</b>	Vue schématique des couches de la paroi artérielle.....	04
<b>Figure02.</b>	Principales étapes de la peroxydation des lipides.....	05
<b>Figure03.</b>	Athérosclérose et ses conséquences cliniques.....	07
<b>Figure04.</b>	Structure générale des lipoprotéines plasmatiques.....	09
<b>Figure05.</b>	Formation et sécrétion (A) des chylomicrons par les cellules intestinales et (B) des VLDL par la cellule hépatique.....	10
<b>Figure06.</b>	Voie exogène et endogène du cholestérol.....	12
<b>Figure07.</b>	Le transport inverse du cholestérol.....	13
<b>Figure08.</b>	Structures de l'homocystéine et de la cystéine. (A) Homocystéine, (B) Cystéine.....	13
<b>Figure09.</b>	Formes circulantes d'homocystéine plasmatique.....	14
<b>Figure10.</b>	Métabolisme de l'homocystéine.....	15
<b>Figure11.</b>	Structure des folates naturels.....	18
<b>Figure12.</b>	Structure des cobalamines (isoformes cellulaires et circulantes de la vitamine B <sub>12</sub> ).....	19
<b>Figure13.</b>	Principales étapes du métabolisme de la vitamine B <sub>12</sub> .....	20
<b>Figure14.</b>	Aperçu schématique du stress oxydatif induit par l'Hhcy.....	23
<b>Figure15.</b>	Différents transcrits du gène MTHFR.....	28
<b>Figure16.</b>	Schéma du gène MTHFR.....	28
<b>Figure17.</b>	Un modèle de la structure du MTHFR humain.....	29
<b>Figure18.</b>	Représentation schématique de 41 mutations du gène MTHFR et de 2 polymorphismes particulièrement étudiés.....	30
<b>Figure19.</b>	Comparaison de la structure sauvage (normale) et mutée de la MTHFR ...	31
<b>Figure 20.</b>	Détermination du polymorphisme génétique de la MTHFR 1 avec PCR en temps réel (courbe de fusion pour les génotypes de l'enzyme) (polymorphismeC677T).....	49
<b>Figure 21.</b>	Détermination du polymorphisme génétique de la MTHFR 2 avec PCR en temps réel (courbe de fusion pour les génotypes de l'enzyme).....	50

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau.01</b>	Sévérité de l'hyperhomocystéinémie selon les facteurs étiologiques...	17
<b>Tableau.02</b>	Les caractéristiques cliniques et biochimiques des sujets témoins selon le polymorphisme du MTHFR C677T.....	52
<b>Tableau.03</b>	Répartition des fréquences génotypiques et alléliques de la mutation C677T du gène MTHFR selon le sexe dans la population témoin.....	52
<b>Tableau.04</b>	L'influence du sexe sur les concentrations du folate, vitamine B <sub>12</sub> et de l'homocystéine totale chez les témoins.....	53
<b>Tableau.05</b>	La distribution de la concentration plasmatique du folate, vitamine B <sub>12</sub> et de l'homocystéine total selon les génotypes du polymorphisme C677T MTHFR.....	54
<b>Tableau.06</b>	Corrélation entre l'homocystéine totale, folate, vitamine B <sub>12</sub> et l'âge moyen.....	55
<b>Tableau.07</b>	Les caractéristiques cliniques et biochimiques des sujets témoins selon le polymorphisme du MTHFR A1298C.....	56
<b>Tableau.08</b>	Répartition des fréquences génotypiques et alléliques de la mutation A1298C du gène MTHFR selon le sexe dans la population témoin....	57
<b>Tableau.09</b>	La fréquence de la coexistence des polymorphismes C677T et A1298C du gène MTHFR.....	58
<b>Tableau.10</b>	La distribution de la concentration plasmatique du folate, vitamine B <sub>12</sub> et de l'homocystéine totale selon les génotypes du polymorphisme A1298C MTHFR.....	58
<b>Tableau.11</b>	Les caractéristiques cliniques et biochimiques des patients selon le polymorphisme du MTHFR C677T.....	60
<b>Tableau.12</b>	Association du génotype C677T MTHFR avec l'homocystéine totale, la vitamine B <sub>12</sub> et B <sub>9</sub> chez les sujets coronariens.....	61
<b>Tableau.13</b>	L'association des génotypes C677T du MTHFR avec l'homocystéinémie, la vitamine B <sub>12</sub> et les folate chez les patients coronariens.....	62
<b>Tableau.14</b>	Les caractéristiques cliniques et biochimiques des patients selon le polymorphisme du MTHFR A1298C.....	63
<b>Tableau.15</b>	Association du génotype A1298C MTHFR avec l'homocystéine totale, la vitamine B <sub>12</sub> et B <sub>9</sub> chez les sujets coronariens.....	64
<b>Tableau.16</b>	L'association des génotypes A1298C du MTHFR avec l'homocystéinémie, la vitamine B <sub>12</sub> et les folate chez les patients coronariens.....	65

## Résumé

Nous avons étudié, dans ce travail, l'éventuelle association entre l'homocystéinémie et les différents génotypes des polymorphismes C677T et A1298C du gène de la méthylène tetrahydrofolate réductase (MTHFR), leurs fréquences, leurs corrélations avec certains paramètres cliniques, biochimiques ainsi que certains facteurs de risques, et cela chez une population de la région *Aurès*, au Nord-est de l'Algérie. Notre étude a porté sur 94 sujets volontaires sains et 14 patients en phase chronique de l'infarctus du myocarde (IDM). Notre travail, est le premier dans la région des *Aurès* qui a analysé l'influence de ces deux polymorphismes chez les sujets jeunes coronariens dans cette la population.

Nos résultats montrent que les fréquences alléliques et génotypiques dans la population saine sont de (11,70% TT et 32,45% T) pour le polymorphisme C677T, et de (7,44% CC et 21,81% C) pour le polymorphisme A1298C. La fréquence de coexistence C677T/A1298C est de 11,70% pour le double hétérozygote CT/AC. Alors que, les génotypes TT/AC, CT/CC et le double mutant homozygote TT/CC n'ont pas été retrouvés. Cependant, dans la population pathologique, les fréquences sont de 35,71%, 57,14% et 7,14% pour les génotypes CC, CT et TT du polymorphisme C677T, respectivement. Concernant le polymorphisme A1298C, les fréquences sont de 78,75% AA et 21,42% AC, alors que le mutant homozygote CC n'a pas été retrouvé.

Notre étude montre également une association très significative de l'hyperhomocystéinémie (Hhcy) et le polymorphisme C677T du gène MTHFR dans la population saine, liée majoritairement au sexe masculin. La distribution de l'homocystéine total (tHcy) et de folate selon les différents génotypes du polymorphisme C677T, était non significative, une hyperhomocystéinémie modérée a été enregistrée pour le génotype (CT) et intermédiaire pour le génotype muté (TT), avec un faible taux de folate, témoignant l'effet délétère du variant muté (T), et soutenant l'hypothèse de l'interaction de gène -nutriment entre MTHFR et le statut folate. En outre, les corrélations entre l'tHcy, folate, vitamine B<sub>12</sub> et l'âge en fonction des génotypes du polymorphisme C677T ont montré que les taux de tHcy étaient au total, inversement proportionnels à la concentration du folate, à la B<sub>12</sub> et à l'âge. En revanche, nos résultats n'ont montré aucune corrélation significative des paramètres étudiés et les génotypes du polymorphisme A1298C. Cette observation est due au faible effet de ce polymorphisme sur l'activité de l'enzyme MTHFR.

Dans la population pathologique, nos résultats ne montrent pas d'association significative de l'Hhcy et les différents génotypes du polymorphisme C677T. Cependant une diminution du taux de folate et de la B<sub>12</sub> a été enregistrée avec l'Hhcy modérée pour le génotype TT, mais qui reste non significative. Cela pourrait témoigner de l'effet délétère du génotype muté sur les concentrations de tHcy, B<sub>12</sub> et B<sub>9</sub> chez les patients. Similairement, la distribution de l'homocystéinémie en fonction du polymorphisme A1298C, montre une association non significative de l'Hhcy modérée avec les génotypes AC et AA. Ainsi, aucune différence significative n'a été observée pour la distribution de B<sub>9</sub> et B<sub>12</sub>.

En conclusion, notre étude soutient l'hypothèse que le polymorphisme C677T et A1298C MTHFR peuvent être un facteur de risque important pour l'IDM, en présence d'une Hhcy modérée. Nous suggérons ainsi une stratégie d'exploration biologique de l'Hhcy pour permettre l'évaluation d'une Hhcy modérée ou intermédiaire le plus rapidement possible, afin d'informer le grand public dans notre région (*Aurès*) et pays, sur les risque de l'évolution de cette maladie. Ainsi que l'investigation génétique des divers marqueurs de l'IDM pour traiter et prédire les risques de cette maladie.

**Mots clés :** Athérosclérose coronarienne, Infarctus du myocarde, polymorphismes génétiques, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, Hyperhomocystéinémie, RT-PCR, *Aurès*, Algérie.

# **Introduction**

## Introduction

Les maladies cardiovasculaires (MCV) constituent aujourd'hui un véritable problème de santé publique, elles demeurent la première cause de mortalité dans la plupart des pays industrialisés, et apparaissent en nette progression dans les pays en voie de développement. Selon l'organisation mondiale de la santé, on recense 17,5 millions de décès liés aux maladies cardio-vasculaire, soit 30% de la mortalité mondiale totale. Selon les estimations, 7,5 millions de ces décès sont dus aux cardiopathies coronariennes (OMS, 2015). En 2014, l'OMS a placé les MCV comme première cause de décès en Algérie avec un taux de 41% de l'ensemble des décès. Ces maladies tuent deux fois plus que le cancer et le diabète, dont les taux de mortalité sont de 10 et 8%, respectivement. Ainsi, en Algérie, l'infarctus du myocarde ou syndrome coronarien aigu (SCA), touche de nombreux hommes et femmes, et même les jeunes sujets ne sont pas épargnés de cette pathologie (**le 20<sup>ème</sup> Congrès International de la société Algérienne de cardiologie, 2016**).

L'athérosclérose fait partie des principales maladies cardiaques. Retrouvée pourtant dès l'Égypte ancienne, elle apparaît comme une maladie dégénérative de l'homme (**Bonnet, 2001**). C'est une maladie multifactorielle caractérisée par le durcissement de la paroi artérielle, et dont la genèse fait intervenir des déterminants génétiques et environnementaux (**Demuth et al., 2000**). Outre la suspicion d'une influence de la génétique, les chercheurs ont montré l'effet de divers facteurs de risque prépondérants dans l'apparition de la maladie anciennement connus tels que l'âge, le sexe, le tabagisme, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie, le diabète, la sédentarité, l'obésité et consommation excessive d'alcool. D'autres sont plus récentes et leur évaluation est en cours (CRPus, Homocystéine, Interleukines...). Cependant, les modifications nutritionnelles et le tabac restent les causes essentielles de l'augmentation de la fréquence de cette maladie (**Baudin et al., 2009**).

L'homocystéine est l'un des marqueurs biochimiques des MCV, de nombreuses études ont déjà démontré une relation entre l'homocystéine et les MCV (**Vesin et al., 2007**). L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé soufré qui intervient dans le métabolisme de la méthionine (**Roblin et al., 2007**). Elle est synthétisée par toutes les cellules de l'organisme et peut être catabolisée selon deux voies métaboliques; la voie de la transulfuration et la voie de la reméthylation (**Mudd et al., 1995**). La deuxième voie a pour cofacteur la vitamine B<sub>12</sub> et utilise comme donneur de méthyle soit un dérivé de l'acide folique, le N<sup>5</sup>-méthyltétrahydrofolate, soit la bétaine (**Guilland et al., 2002**).

La 5,10-méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR) est l'une des principales enzymes régulatrices du métabolisme de l'Hcy (**Frosst et al., 1995; Klerk et al., 2002**), cette enzyme catalyse la réduction irréversible du 5,10-méthylènetétrahydrofolate en 5-méthyltétrahydrofolate qui agit comme donneur de méthyle pour la synthèse de méthionine à partir de l'homocystéine (reméthylation) (**Goyette et al., 1998**). Toute perturbation métabolique de l'une de ces deux voies entraîne une hyperhomocystéinémie (Hhcy) qui pourrait être un facteur de risque quantitatif et indépendant pour la survenue d'infarctus du myocarde et d'accident vasculaire cérébral (**Malinow et al., 1999**).

L'Hhcy est fréquente, et peut avoir pour origine des troubles d'ordre génétique, nutritionnel ou thérapeutiques. Une Hhcy modérée est observée à jeun soit du fait de la mutation du gène codant pour la MTHFR soit à cause d'une altération du statut vitaminique B<sub>9</sub> ou B<sub>12</sub> (**Guilland et al., 2002**). Deux mutations dans le gène de MTHFR peuvent contribuer à l'Hhcy modérée, celle en position 677, échangeant un C à un T (substitution 677TT) (**Frosst et al., 1995**) et celle en position A1298C, échangeant un A à un C (substitution 1298CC) (**Hernandez-Diaz et al., 2000**). Au cours de ces dernières années, l'attention a été focalisée sur l'étude des polymorphismes du gène MTHFR, un intérêt considérable s'est développé sur l'association des deux variantes majeures de ce gène (C677T et A1298T) à un risque accru de maladies cardiovasculaires, notamment l'infarctus du myocarde (IDM) et en particulier chez les individus homozygotes et hétérozygotes.

De ce fait, plusieurs études ont été menées dans différentes régions du monde, notamment en Europe (**Guéant-Rodriguez et al., 2005**). Cependant, les études menées dans les populations du grand Maghreb (**Bennouar et al., 2007; Belkahla et al., 2008**) et en particulier en Algérie restent rares (**Houcher et al., 2012**). Les résultats rapportés concernant ces recherches sont tout autant controversés.

À l'heure actuelle, aucune étude n'est réalisée sur les jeunes coronariens ayant subi un Infarctus du Myocarde au Nord - Est de l'Algérie, dans la région des *Aurès*, pour déterminer la fréquence génotypique et allélique de ces deux polymorphismes et leur effet sur le profile biochimiques. L'objectif principal de notre travail est de mettre en évidence une éventuelle association entre les concentrations plasmatique de l'homocystéine et les différents génotypes des polymorphismes C677T et A1298C du gène MTHFR, et de déterminer leurs fréquences tout en se basant sur des données cliniques, biochimiques (le folate et la vitamine B<sub>12</sub> notamment) ainsi que certains facteurs de risques. Cette première étude, a concerné deux populations; des

volontaires sains et des sujets malades avec une athérosclérose coronarienne. Tous les participants dans cette étude étaient parmi les habitants de la région des *Aurès* (Nord-Est de l'Algérie).

Dans la première partie de ce travail, nous ferons une revue de la littérature sur la physiopathologie de l'athérosclérose coronarienne, les lipides et métabolisme des lipoprotéines, l'homocystéine et son métabolisme ainsi que les deux mutations du gène MTHFR (C677T et A1298C). Dans la seconde partie, nous décrirons les méthodes de l'étude avec les travaux réalisés. Enfin, la troisième partie sera consacrée à une discussion des résultats obtenus tout au long de ce travail, et nous terminons avec une conclusion générale et des perspectives.

# **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

# I. Physiopathologie de l'athérosclérose

## I.1. L'infarctus du Myocarde

L'Infarctus du Myocarde ou 'IDM' est une nécrose systématisée du muscle cardiaque d'origine ischémique. Il se manifeste quand une plaque d'athérome se rompt et un thrombus obstrue totalement ou partiellement l'artère coronaire athéromateuse et limitant alors, l'accès **(Liakos et Parikh, 2018; Aydin et Aydin, 2016)**.

Après le début de la thrombose, les cardiomyocytes meurent rapidement en raison de plusieurs facteurs: phénomène d'hypoxie et épuisement des ressources énergétique en l'absence de réserve aérobie (déséquilibre entre l'apport et la demande), réoxygénation, acidose, stress oxydatif et stimulation des cytokines **(Olivier, 2011)**.

Tous les processus se déroulent en quelques minutes, mais se développent progressivement car l'environnement acide ralentit toutes les voies. En raison du manque de voies métaboliques anaérobies, le myocarde est très sensible à l'ischémie, qui provoque donc une diminution rapide de l'ATP intramyocardique **(Olivier, 2011)**; la glycolyse anaérobie prédominante dans le myocarde ischémique, entraînant une diminution rapide du pH intracellulaire et la désactivation de la sensibilité de la troponine C à la phosphofruktokinase et à la  $Ca^{+2}$ . En quelques minutes, cette diminution entraîne un arrêt contractile et un gonflement cellulaire **(Sanada et al., 2011)**. Après les 30 à 45 premières secondes, un dysfonctionnement systolique et diastolique apparaît, suivi de l'apparition de modifications électrocardiographiques. Le diagnostic clinique et les marqueurs biochimiques de la nécrose myocardique comportent selon les critères de l'OMS deux des trois caractéristiques suivantes: douleur thoracique évocatrice, modifications électrocardiographiques et élévations enzymatiques (myoglobine, créatine kinase MB, troponines T et I, ...etc) **(Laperche et al., 1995)**.

Les infarctus du myocarde font partie, avec l'angor instable, des syndromes coronaires aigus; ceux-ci répondent à un mécanisme physiopathologique largement commun **(Libby, 1995)**.

## I.2. Données épidémiologiques

L'infarctus du myocarde constitue un problème majeur de santé publique par sa fréquence, sa létalité et ses répercussions socio-économiques. En pratique, l'épidémiologie de l'IDM se caractérise par une grande disparité dans le temps et du point de vue géographique et cela est grâce à la prises en charge thérapeutiques.

Selon des données OMS (organisation mondiale de la santé), sur 50 millions de décès annuels dans le monde, les cardiopathies ischémiques sont la première cause dont 7.2 millions sont d'origine coronaire **(Perlemuter et al., 2005)**.

La prise de conscience de l'accroissement, parallèle au niveau de vie, de l'incidence de l'IDM et de sa mortalité a motivé la mise en oeuvre d'études telles que le projet Monitoring of trends

and determinants of cardiovascular disease (MONICA) initié par l'OMS qui a ainsi mis en évidence un gradient nord-sud dans la mortalité coronaire en Europe (**Cambou, 1991**).

En 2014, l'OMS a placé les maladies cardiovasculaires (MCV) comme la première cause de décès en Algérie avec un pourcentage de 41% de l'ensemble des décès (près de 20 000 à 25 000 Algériens décèdent chaque année).

### I.3. Facteur de risque de l'IDM

L'athérosclérose est à l'origine de la plupart des maladies cardiovasculaires. Maladie progressive multifactorielle (**Laraqui et al., 2002**).

L'intervention des facteurs susceptibles d'être impliqués dans le déroulement d'un tel processus peut se placer à différents niveaux (facteurs d'initiation, d'accélération, d'évolution des lésions pariétales, facteurs de déclenchement des complications, d'aggravation ...) (**Ducimetière, 1989**).

- **L'hypercholestérolémie** est l'un des principaux facteurs de risque de la maladie, directement liée au taux plasmatique de cholestérol-LDL et inversement liée au taux de cholestérol-HDL (**Assmann et al., 1999 ; Braunwald, 1997**). Ainsi, le métabolisme du cholestérol est un élément clé du développement des maladies cardiovasculaires (**Russell, 1992**).
- **Age et Sexe**: Avec l'âge, le changement graduel de l'environnement *redox* vers un état pro-oxydant contribue à une redistribution progressive des facteurs endothéliaux menant à la dysfonction endothéliale (**Thorin-Trecases et al., 2010**). La fréquence de l'athérosclérose est plus élevée chez l'homme que chez la femme, jusqu'à l'âge de la ménopause où cette différence disparaît (**Brooker, 2000**).
- **Stress oxydant** : Tous les facteurs de risque cardiovasculaires sont associés à une augmentation du stress oxydant. Par exemple, les ROS (Reactive oxygen species) participent à la modification fonctionnelle de plusieurs protéines, à l'oxydation des LDL (light densitylipoproteins), à des changements de perméabilité membranaire, à des dommages moléculaires (ADN, lipides, protéines), à la dysfonction endothéliale, toutes conditions qui prédisposent à l'athérogenèse (**Thorin-Trecases et al., 2010**).
- **L'homocystéine** a un rôle important dans le développement de l'athérosclérose (**Ambrosi, 2007**). Les études expérimentales de **Blacher et al., (2005)**, ont permis de mettre en évidence que l'hyperhomocystéinémie induisait une prolifération de cellules musculaires lisses, une dysfonction endothéliale, une synthèse de collagène avec destruction du composant élastique du mur artériel, une peroxydation lipidique, une inflammation vasculaire et enfin une élévation de l'activité procoagulante (**Vesin et al., 2007**).

D'autres auteurs; **Stevens et Lowe, (1997)** classent les facteurs de risques prédisposant à des lésions sévères d'athérosclérose en facteurs constitutionnels, en facteurs ayant une incidence majeure sur la formation d'athérome ou facteurs de risque majeurs; Hyperlipidémie, hypertension, tabagisme, diabète, et en facteurs ayant une moindre importance ou facteurs de risque mineurs; Manque d'exercice physique, obésité, Mode de vie "stressant".

## I.4. Etiologie

L'athérosclérose est la cause la plus fréquente d'IDM (90%) (**Akoudad et Benamer, 2004**). La physiopathologie de l'IDM dépend principalement de la description de l'athérosclérose et fait intervenir les différents stades évolutifs successifs.

## I.5. L'Athérosclérose

À un certain moment, l'athérosclérose était considérée comme une maladie dégénérative qui était une conséquence inévitable du vieillissement. La recherche au cours des deux dernières décennies a montré qu'elle n'est pas une maladie dégénérative ni inévitable (**Berliner et al., 1995**). Au contraire, l'athérosclérose semble être une condition inflammatoire chronique qui est convertie en un événement clinique aigu par l'induction de la rupture de la plaque, qui à son tour conduit à une thrombose (**Fuster et al., 1992**). L'athérosclérose est une maladie artérielle silencieuse (**Lusis, 2000 ; Tedgui et Mallat, 2001**), immuno-inflammatoire (**Caligiuri, 2004**) chronique des gros vaisseaux localisée dans l'espace sous-intimal (**Hansson, 2005**), caractérisée par une plaque faite de dépôts lipidiques et dans laquelle s'accumulent différents types cellulaires et des éléments de fibrose (**Ait-Oufella et al., 2007**).

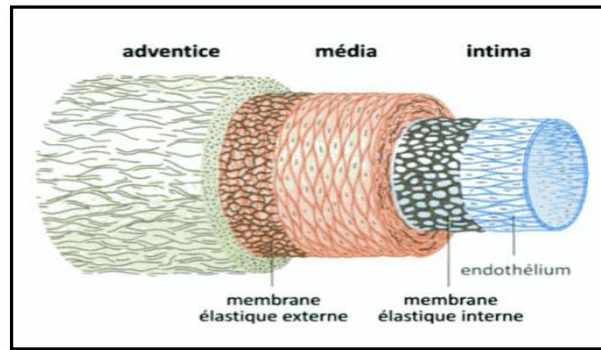
Les lésions initiales consistent en stries lipidiques visibles macroscopiquement ; ce type de lésion évolue progressivement en plaque puis en athérome (**Hennen, 2001**). C'est la cause majeure des maladies cardiovasculaires et de leurs complications cliniques (accident cérébrovasculaire, infarctus du myocarde) (**Masson et Yvan-Charvet., 2008**).

Dans les pays industrialisés, l'athérosclérose, responsable d'environ 50% des décès, est la première cause de mortalité (**Morozova et al., 2004**). Pour faire comprendre la lésion athéromateuse, il faut d'abord rappeler la structure des artères :

Le sang est transporté dans l'organisme par un réseau de vaisseaux sanguins. Les artères envoient le sang hors du cœur et les veines l'y ramènent.

La paroi des artères et des veines sont construites suivant le même principe (**Bommas et al., 2008**). La structure de base comporte trois tuniques de l'intérieur à l'extérieure, l'intima, la média, l'adventice (**Figure.01**) (**Calas et al., 2016**) :

La structure et l'épaisseur de la paroi vasculaire diffèrent d'un segment à l'autre et s'adaptent aux conditions locales, aux exigences fonctionnelles, à la pression sanguine, etc. (**Coujard et Poirier, 1980**).



**Figure.01.** Vue schématique des couches de la paroi artérielle (Lüllmann-Rauch,2008).

- **L'endothélium**, épithélium pavimenteux simple reposant sur une lame basale, est le caractère essentiel et permanent de l'intima. Il tapisse la surface interne du mur de tout le système circulatoire et s'interpose comme une membrane mince entre le sang et les tissus ( **Coujard et Poirier, 1980**). Il contrôle le passage des composants du plasma et empêche tout contact entre les cellules sanguines et la matrice extracellulaire (**Lüllmann-Rauch, 2008**).
- **Réactivité de l'endothélium**

L'endothélium intervient dans l'histophysiologie vasculaire par sa position, sa structure et ses propriétés :

- a) Protection des tissus sous-jacents en tant qu'épithélium de revêtement;
- b) Intervention dans les échanges métaboliques et gazeux entre le sang et les tissus;
- c) Participation au renouvellement des structures ambiantes sclérotiques et glycoprotéiques;
- d) Rôle anticoagulant et fibrinolytique;
- e) Sensibilité aux stimuli humoraux (**Coujard et Poirier, 1980**).

Les modifications de l'intégrité morphologique et fonctionnelle de l'endothélium sont en corrélation avec le développement de l'athérosclérose et de la thrombose (**Coujard et Poirier, 1980**).

### **I.5.1. Physiopathologie**

L'athérosclérose est caractérisée par une inflammation qui est initiée par la rétention des lipoprotéines LDL dans la paroi artérielle (**Aikawa et Libby, 2004**). Une fois infiltrées dans la paroi artérielle, les LDL natives sont piégées par les protéoglycanes et subissent des modifications regroupées sous le terme générique d'oxydation, qui altèrent ces molécules du soi et qui génèrent les LDL oxydées ou LDLox (**Varthaman et al., 2008**).

L'oxydation des LDL, se déroule *in situ*, dans l'espace intimal, et fait intervenir différents mécanismes enzymatiques et non enzymatiques (**Bauters et al., 2001**).

Les LDL peuvent être oxydées par des radicaux oxydants,  $\bullet\text{OH}$ ,  $\text{HO}_2/\text{O}\bullet$ , générés par voie chimique (impliquant des oxydants et des ions de métaux de transition) ou par voie

enzymatique, cette initiation de la peroxydation touche en premier les molécules les plus facilement oxydables (les antioxydants puis les acides gras polyinsaturés AGPI) qui forment des radicaux peroxydes  $\text{LOO}\cdot$  et d'autres dérivés oxygénés (radical alkoyle, endoperoxyde, époxyde, cétone...) qui peuvent provoquer une propagation (réaction en chaîne) de la peroxydation lipidiques (Esterbauer et al., 1990 ; Stocker, 1994) (Figure 2).

La terminaison de la réaction d'oxydation survient, soit par épuisement du substrat, soit par formation de dérivés stables (alcanes, alcools, cétones, acides carboxyliques, aldéhydes et de dérivés de polymérisation). L'oxydation des lipides peut aussi résulter de l'action d'oxygénases (lipoxygénases, cyclooxygénases, cholestérol hydroxylases) (Figure 02) (Esterbauer et al., 1990 ; Stocker, 1994).

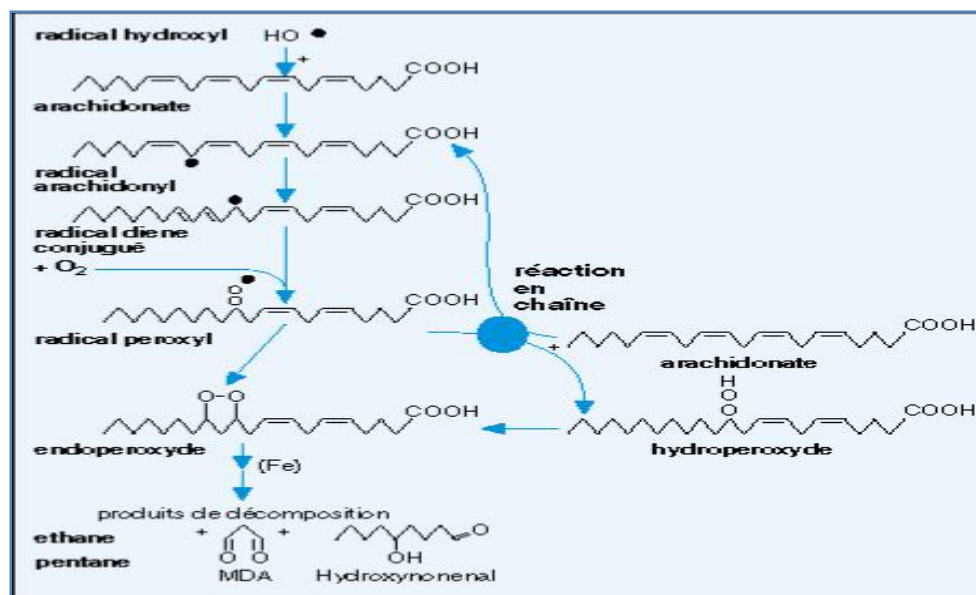


Figure.02. Principales étapes de la peroxydation des lipides (Favier, 1997).

L'oxydation des LDL modifie considérablement leur composition et leurs fonctions. Ainsi, les LDL natives perdent leur affinité pour leur récepteur ApoB/E et sont captés par les récepteurs spécifiques des LDLox, qui sont les récepteurs « éboueur » dit Scavenger situés à la surface des macrophages (Brown et Goldstein, 1983).

L'interaction cellule endothéliale-LDLox augmente la production des chimiokines attirant les monocytes et les macrophages, tels que MCP-1 et M-CSF (Quinn et al., 1987; Leonard et Yoshimura, 1990) par l'endothélium dysfonctionnel (Greer et al., 2006).

Les macrophages sous-endothéliaux captent des quantités importantes de cholestérol en incorporant les Ox-LDL par l'intermédiaire de récepteurs dits éboueurs (*scavenger*) (SRAI, SRAII,  $\text{CD}\gamma 6$ ,  $\text{CD}68$ ). Il n'existe pas de mécanisme de régulation capable de limiter la capture des Ox-LDL par les macrophages, de ce fait les macrophages se surchargent de cholestérol et se transforment en cellules spumeuses, dans lesquelles il est possible d'observer des dépôts de cholestérol (Emmerich, 1998).

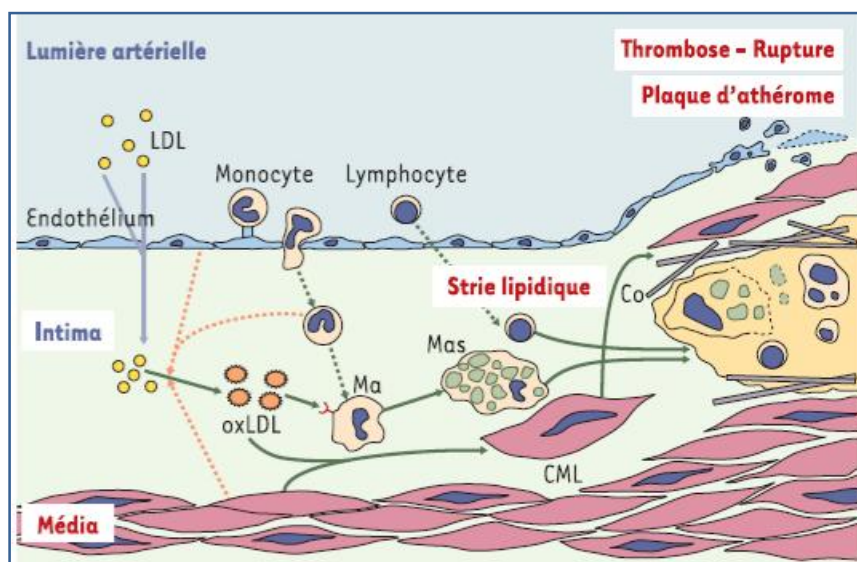
L'accumulation de cellules spumeuses s'accompagne de phénomènes chimiotactiques attirant les lymphocytes T et des monocytes. Des cellules fibroblastiques se transforment localement en cellules à caractère contractile au travers de la capture des LDL et d'ester de cholestérol pour se transformer également en cellules spumeuses additionnelles donnant naissance au cœur lipidique ou centre athéromateux (**Hennen,2001**).

Les macrophages produisent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (TNF-alpha, IL-1 etc.) qui augmentent l'activation endothéliale, favorisent l'adhésion de nouveaux monocytes ainsi que leur passage entre les jonctions endothéliales (**Amarenco et al., 2001**), et la PDGF (Platelet-derived growth factor) qui stimule la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses (CML) (**Jawien et al., 1992**).

L'activation des CML induit leur changement phénotypique, qui est associé à une altération des mécanismes contrôlant le cycle cellulaire. Alors que les cellules de la paroi artérielle normale sont en phase G0 du cycle cellulaire (état quiescent, différencié et contractile), leur activation induit leur progression à travers la phase G1 et l'entrée en phase S, phase de duplication des chromosomes (état dédifférencié, synthétique et prolifératif, ressemblant à un phénotype de cellules embryonnaires) (**Hao et al., 2003**). La transition G1 à S est principalement contrôlée par la phosphorylation de pRB (produit du gène du rétinoblastome) par les kinases dépendantes des cyclines (CDK) (**Gizard et Staels, 2006**). Ces CDK sont activées par leur liaison avec des cyclines et inhibées par des inhibiteurs des CDK (CDKI), qui sont exprimés transitoirement et spécifiquement au cours du cycle cellulaire (**MacLachlan et al., 1995**). Ainsi, l'augmentation de la phosphorylation de pRB est considérée comme le point de départ de la formation de l'hyperplasie intimale (**Dzau et al., 2002**).

La migration intimale des CML est accompagnée par l'activation des gènes responsables de la production des protéines matricielles comme les collagènes et les protéoglycanes (**Shanahan et Weissberg, 1998; Owens, 1995**), formant par la suite la chape fibreuse qui isole le centre lipidique de la lumière artérielle (**Greer et al., 2006**). Donc, les CML assurent la résistance et la stabilité mécanique de la plaque athéroscléreuse (**Libby, 1995**).

Les manifestations cliniques de l'athérosclérose sont essentiellement dues à l'instabilité de la plaque athéroscléreuse (**Constans et al., 2012**) (**Figure 3**)



**Figure.03.** Athérosclérose et ses conséquences cliniques (Arnal *et al.*, 2003).

L'évolution de la plaque d'athérosclérose se déroule sur de nombreuses années (Amarencio *et al.*, 2001), elle commence dès la vie fœtale (Napoli *et al.*, 1997) jusqu'à l'expression clinique sous forme de manifestations ischémiques (Amarencio *et al.*, 2001).

La rupture de la plaque est l'évènement le mieux caractérisé, susceptible de conduire aux accidents thrombotiques aigus (Amarencio *et al.*, 2001). Plusieurs facteurs aboutissent à la rupture de la plaque, tels que les facteurs extrinsèques (poussée hypertensive ou un effort important par exemple) et les facteurs intrinsèques qui dépendent de la structure de la plaque et représentent sa vulnérabilité, il s'agit de l'INF $\gamma$  et les métalloprotéinases (MMPs) (Amarencio *et al.*, 2001) sécrétées par de nombreuses cellules de la plaque mais essentiellement par les macrophages situés en périphérie du centre lipidique. Ces MMPs et INF $\gamma$  fragilisent la plaque en dégradant la matrice extra cellulaire.

Autres facteurs sont également souvent incriminés dans la déstabilisation des plaques d'athérosclérose : l'apoptose des cellules de la plaque, la rupture de néovaisseaux à l'intérieur même de la plaque et l'infection (Amarencio *et al.*, 2001) (par Chlamydia pneumoniae et CMV ...etc, favorisent la réaction inflammatoire et la croissance de la plaque d'athérome).

Certaines hypothèses physiopathologiques disent que l'apoptose des cellules endothéliales pourrait être un facteur de déstabilisation en favorisant l'érosion et/ou la libération de microparticules pro-coagulantes. L'apoptose des CML de la chape fibreuse pourrait aussi considéré comme facteur de déstabilisation par fragilisation de la chape fibreuse (Amarencio *et al.*, 2001).

L'apoptose des macrophages de la plaque est interprétable de différentes manières ; diminution de la production des MMPs, à l'inverse, l'apoptose des macrophages entraîne une libération dans l'espace extracellulaire de substances pro-coagulantes telles que le facteur tissulaire, et donc d'augmenter la vulnérabilité de la plaque (Amarencio *et al.*, 2001).

La rupture ou l'érosion de la plaque met en contact direct le centre lipidique ; plus spécifiquement le facteur tissulaire avec le sang, ce qui déclenche la cascade de coagulation et donc la formation d'une thrombose.

Le thrombus peut être occlusif et provoquer un infarctus aigu ou s'organiser progressivement en une lésion fibrotique réduisant considérablement la section de l'artère ; par voie de conséquence, le flux sanguin à ce niveau devient insuffisant, ce qui provoque une ischémie du tissu normalement irrigué par ce tronc d'artère (**Hennen, 2001**).

## I.6. Lipides et lipoprotéines

### I.6.1. Principaux lipides

Les lipides constituent un groupe de composés dont la nature chimique est extrêmement variée. Néanmoins, ils ont en commun la propriété d'être solubles dans les solvants dits organiques (benzène, éther ...) et insolubles dans l'eau (**Brisson, 1982**). Les principaux lipides étudiés sont les suivants :

- ❖ **Acides gras** : constitués exclusivement de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Les atomes de carbone sont reliés les uns aux autres pour former une chaîne dont la longueur varie de 4 à 26 atomes de carbone (nombre paire). Selon la nature de la chaîne carbonée (**Goudet et Yindoula, 2008**) et le nombre de doubles liaisons, on distingue : - les acides gras saturés (sans double liaison), et les acides gras insaturés (avec une ou plusieurs doubles liaisons : les acides gras mono- et polyinsaturé) (**Moussard, 2006**).

Les acides gras libres sont extrêmement rapidement retirés du sang et oxydés (cela couvre 25% à 50% des besoins énergétiques durant le jeûne), ou estérifiés en triacylglycérol dans les tissus (**Botham et al., 2017**). La formule chimique générale des acides gras saturés est la suivante:  $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{COOH}$  (**Cuvelier et al., 2004**).

- ❖ **Cholestérol** : constitué presque exclusivement de carbone et d'hydrogène, plusieurs atomes de carbone sont reliés les uns aux autres pour former quatre anneaux (**Brisson, 1982**), possède une chaîne hydrocarbonée fixée sur le C-17 (en  $17\beta$ ) et un groupe hydroxyle au niveau du C-3 (en  $3\beta$ ) et présente une double liaison (**Weinman et Méhul, 2004**).

Le cholestérol constitue environ 0.2% du poids corporel d'une personne en santé, il entre dans la composition des membranes cellulaires et est donc présent dans la majorité des tissus, en plus d'être un composant important de la gaine de myéline qui entoure les fibres nerveuses (**Ferland, 2012**). Par ailleurs, le cholestérol participe à la synthèse de certaines hormones, et de la vitamine D. il entre également dans la synthèse des sels biliaires (**Menard, 2018**).

L'hypercholestérolémie est un important facteur de risque cardiovasculaire (**Moussard, 2006**).

- ❖ **Triglycérides** : constituent le stock d'acides gras le plus important de l'organisme, localisé essentiellement dans le tissu adipeux. Les substrats de la synthèse des triglycérides sont les acides gras et le glycérol (**Moussard, 2006**). Le glycérol contient 3 groupes hydroxyles (-OH) susceptibles de réagir avec un, deux ou trois acides gras (**Rebstein et Soerensen, 2011**), pour former des mono-, des di- ou des triglycérides (**Weill et al., 1975**).

Les triglycérides représentent plus de 90% des graisses alimentaires. Outre leur apport énergétique important, ils sont le véhicule des vitamines liposolubles (vitamine A, D, E et K) et source d'acides gras polyinsaturés essentiels (**Moussard, 2006**).

L'élévation des triglycérides est associée à la survenue plus fréquente de complication cardiovasculaire (**Larifla, 2002**).

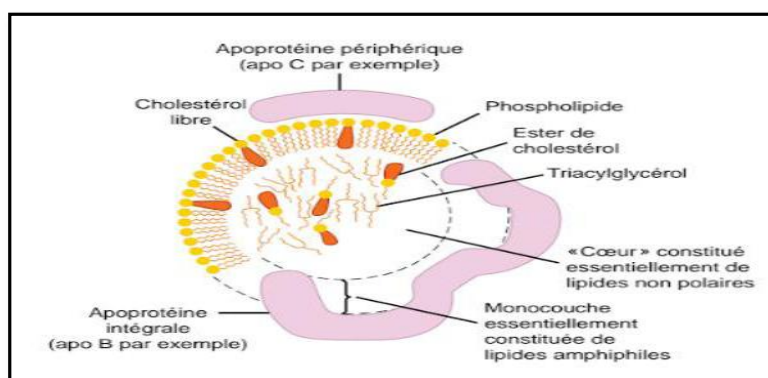
## I.6.2. Transport plasmatique des lipides

### I.6.2.1. Principaux acteurs du transport plasmatique des lipides

Les lipides représentent une famille de molécules hydrophobes (**Gautier et al., 2011**), insolubles dans les milieux biologiques aqueux. Ils sont transportés à travers les différents compartiments de l'organisme dans des macromolécules appelées lipoprotéines (**Saïle et Taki, 2007**).

#### ✚ Structure générale des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des particules globulaires de type micelles, leur structure générale est identique (**Saïle et Taki, 2007**), constituées d'un cœur non polaire de triacylglycérol et d'ester de cholestérol (**Voet et Voet, 2016**), enrobés d'une monocouche de lipides polaires constituée de phospholipides et de cholestérol libre. Des protéines spécifiques, nommées apolipoprotéines (apo), à la surface des lipoprotéines assurent la stabilité de la macromolécule et en contrôlent le devenir métabolique (**Figure 4**) (**Saïle et Taki, 2007**).



**Figure.04.** Structure générale des lipoprotéines plasmatiques (**Botham et al., 2017**).

Les lipoprotéines sont caractérisées par la présence des apolipoprotéines à leurs surfaces, protéines spécifiques de poids moléculaire variable (**Bruckert et Thomas, 1997**). Elles ont

une double fonction de structure et de régulation métabolique : elles assurent la cohésion du complexe lipidique et sa solubilisation et agissent également comme activateurs des enzymes du métabolisme des lipides à la surface de ces lipoprotéines et aussi en tant que ligands pour des récepteurs à la surface cellulaire (Saïle et Taki, 2007).

Il y'a au moins neuf (09) apolipoprotéines réparties en quantités significatives dans les différentes lipoprotéines humaines (Voet et Voet, 2016).

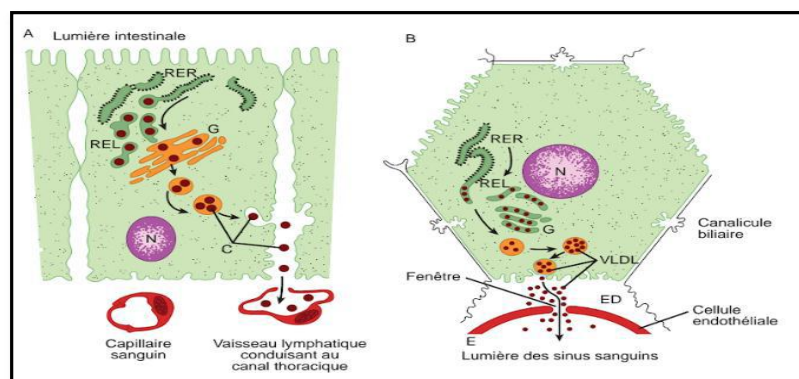
### I.6.2.2. Métabolisme des lipoprotéines

Les lipoprotéines plasmatiques servent au transport des lipides dans le sang (Therrien, 2014). Diverse enzymes et des protéines d'échange, qui interagissent avec les lipoprotéines, participent à la lipolyse et au remodelage des lipoprotéines (Lacoley et al., 2007). Le métabolisme des lipoprotéines s'articule autour de trois voies essentielles : la voie entéro-hépatique, assure la distribution des lipides exogènes de l'intestin vers le foie (Dallongeville, 2006), la voie d'apport, assurant le transport centrifuge des lipides hépatiques (endogènes) vers les tissus périphériques, et la voie de retour ou Reverse Cholesterol Transport (RCT), permettant le transport centripète du cholestérol des tissus périphériques vers le foie (Gautier et al., 2011).

#### a. Voie exogène

L'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides (chylomicron et VLDL) résultent d'un procédé complexe (Figure 5) qui aboutit à une particule mature grâce à la lipidation progressive d'une molécule d'apoB. La maturation s'effectue dans la lumière du réticulum endoplasmique et est dépendante de l'activité d'une enzyme spécifique : la MTP (Microsomal Triglyceride Transfer Protein) (Cano et al., 2006). La MTP est nécessaire pour l'association des triglycérides avec l'apoB et pour la stabilisation de cette apoB (Lacoley et al., 2007).

L'apoB est synthétisée sous forme d'apoB100 dans le foie et d'apoB48 dans l'intestin. Chaque particule de chylomicron ou de VLDL contient respectivement une seule molécule d'apoB48 ou d'apoB100 (Cano et al., 2006).



**Figure.05.** Formation et sécrétion (A) des chylomicrons par les cellules intestinales et (B) des VLDL par la cellule hépatique (Voet et Voet, 2016).

**C** :Chylomicrons ;**E** :Endothélium ;**G** : Appareil de Golgi ;**N** : Noyau ;**RER** : Réticulum endoplasmique rugueux ;**ED** : Espace de Disse contenant du plasma sanguin ;**REL** : Réticulum endoplasmique. L'apoB synthétisée dans le RER est incorporée dans les particules avec le triacylglycérol, le cholestérol et les phospholipides au sein du REL. Après l'addition de résidu de glucides, dans l'appareil de Golgi, les lipoprotéines sont libérées de la cellule par pinocytose inverse. Les chylomicrons dans la lymphe. Les VLDL sécrétées dans l'espace de Disse dans les sinusoides hépatiques à travers les fenêtres de l'endothélium des vaisseaux sanguins (**Voet et Voet., 2016**).

Les chylomicrons sont d'origine intestinale (**Voet et Voet., 2016**) constituent les formes de transport des lipides alimentaires (**Beaudeau et Durand, 2011**). Après leur synthèse par les entérocytes, ils passent dans le vaisseau Chylifère de la villosité et empruntent ainsi la voie lymphatique qui les amène, par le canal thoracique, dans la circulation générale (**Beaudeau et Durand, 2011**). Où ils sont considérablement remodelés par lipolyse des triglycérides par la lipoprotéine lipase (LPL) (**Lacoley et al., 2007**), qui est activée par les phospholipides et l'apoC-II (**Botham et al., 2017**), et est inhibée par l'apoC-III (**Lacoley et al., 2007**).

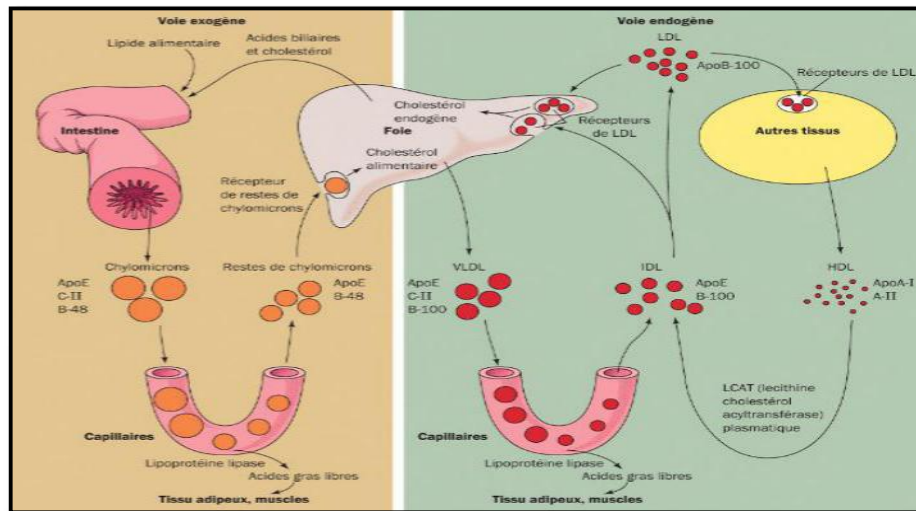
Au cours de cette hydrolyse, des éléments de l'enveloppe des chylomicrons se détachent et rejoignent le pool des HDL (**Beaudeau et Durand, 2011**) et les acides gras non estérifiés sont libérés et rapidement captés par les tissus.

Les restes des chylomicrons (remnants) sont donc appauvris en triglycérides et proportionnellement plus riches en cholestérol. Ils s'enrichissent également en apoB et E puis sont transportés jusqu'au foie (**Martin et al., 2017**), où, ils seront capturés via deux récepteurs dépendant d'apoE : le récepteur des LDL (apoB100, E) et LRP-1 (LDL relatedprotein 1).

### **b. Voie endogène**

Les VLDL sont des lipoprotéines qui se forment au niveau du foie et qui permettent d'exporter dans le sang les triglycérides qu'il synthétise. Comme les chylomicrons, les VLDL vont subir au niveau des tissus l'action de la lipoprotéine lipase (**Dupin, 1992**) avec formation de résidus de VLDL ou IDL (Intermediate density lipoprotein) (**Botham et al., 2017**) (**Figure 6**).

Les restes de VLDL passent dans la circulation d'abord comme IDL, puis comme LDL. Au cours de la transformation de VLDL en LDL, toutes leurs protéines sont éliminées sauf l'apoB100 et la plupart de leur cholestérol sont estérifiée par l'enzyme associée au HDL ; la Lécithine-cholestérol acyltransférase (LCAT). Selon **Goldstein et Brown (2009)**, les cellules captent les LDL riches en cholestérol et en phospholipides nécessaires à leur métabolisme (**Martin et al., 2017**), grâce aux récepteurs spécifiques LDL-R qui se lient spécifiquement aux apoB100 (**Voet et Voet., 2016**). En cas d'excès de cholestérol intracellulaire, les cellules diminuent le nombre de leurs récepteurs LDL de surface (**Andreelli et Jacquier, 2006**).



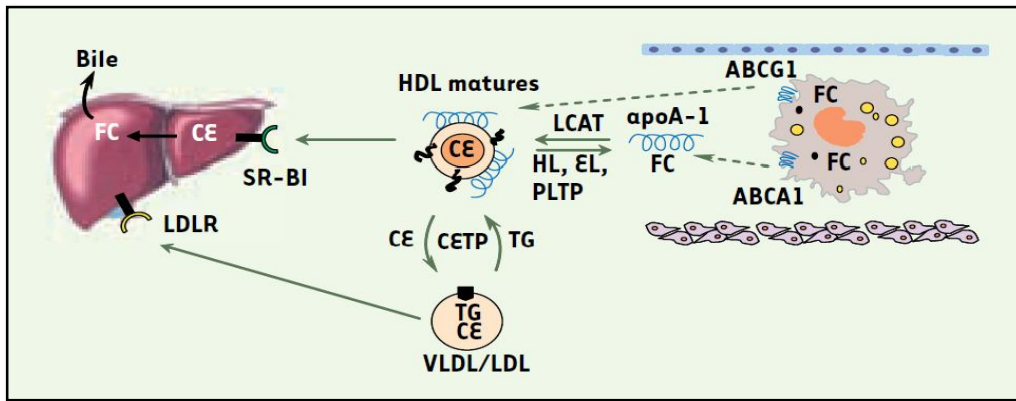
**Figure.06.** Voie exogène et endogène du cholestérol (Voet et Voet, 2016).

### c. Voie de retour

Les HDL naissantes, d'origine hépatique ou provenant du catabolisme des chylomicrons, contiennent du cholestérol très peu estérifié et ont une forme discoïdale (**Beaudeau et Durand, 2011**).

Sous l'influence de la LCAT, les ester de cholestérol formés migrent au centre des édifices et transforment les HDL discoïdale en sphériques. Les sites de surface du cholestérol non estérifiés étant ainsi libérés grâce à l'action de la LCAT, la particule peut à nouveau accepter du cholestérol non estérifié à partir des lipoprotéines à apoB (Chylomicron, VLDL, LDL) et des membranes cellulaires des tissus périphériques. Une fois estérifié, le cholestérol des HDL est en partie échangé avec des triglycérides des chylomicrons et des VLDL. Cet échange est facilité par une protéine spécifique : la CETP (Cholesteryl-ester transferprotein) (**Beaudeau et Durand, 2011**).

Le foie est le seul organe qui peut éliminer des quantités significatives de cholestérol. Ceci fait intervenir le LDLR et un récepteur spécifique des HDL appelé SR-BI (Il s'agit d'un récepteur "scavenger" de classe B et de type 1) (**Acton et al., 1996**). Les hépatocytes captent les esters de cholestérol des HDL par un mécanisme tout différent. Plutôt que d'être endocytés et dégradés, les HDL liées au SR-BI font passées sélectivement ces esters dans la cellule (**Figure 7**). Les HDL dépourvues de lipides se dissocient alors de la cellule et retournent dans la circulation (**Voet et Voet, 2016**).



**Figure 07.** Le transport inverse du cholestérol (Andreelli et Jacquier, 2006).

**FC** : Cholestérol libre ;**CE** : Ester de cholestérol ;**HL** : Lipase hépatique ;**EL** : Lipase endothéliale ;**PLTP** : Phospholipetrasferprotein.

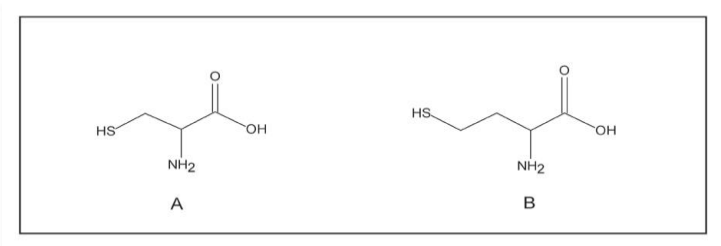
Un deuxième mécanisme important dans le transport inverse du cholestérol met en jeu les transporteurs ABCA1 (ATP Binding Cassette Transporter classe A type 1) et G1 (ABCG1) (Repa et al., 2000). Le transporteur ABCA1, assure l'efflux de cholestérol et de phospholipides vers l'apoA-1 non lipidée participant ainsi à la formation des HDL (Oram et al., 2000). Les transporteurs ABCG1 quant à eux, permettent l'efflux de cholestérol spécifiquement vers les HDL matures (Wang et al., 2004 ; Yvan-Charvet et al., 2007 ; Matsuura et al., 2006) (Figure.07).

Dans le foie, une partie du cholestérol sera recyclée mais une autre partie sera éliminée par les voies biliaires dans le tube digestif (Andreelli et Jacquier, 2006).

## II. Facteurs nutritionnels et génétiques de l'hyperhomocystéinémie

### II.1. L'homocystéine

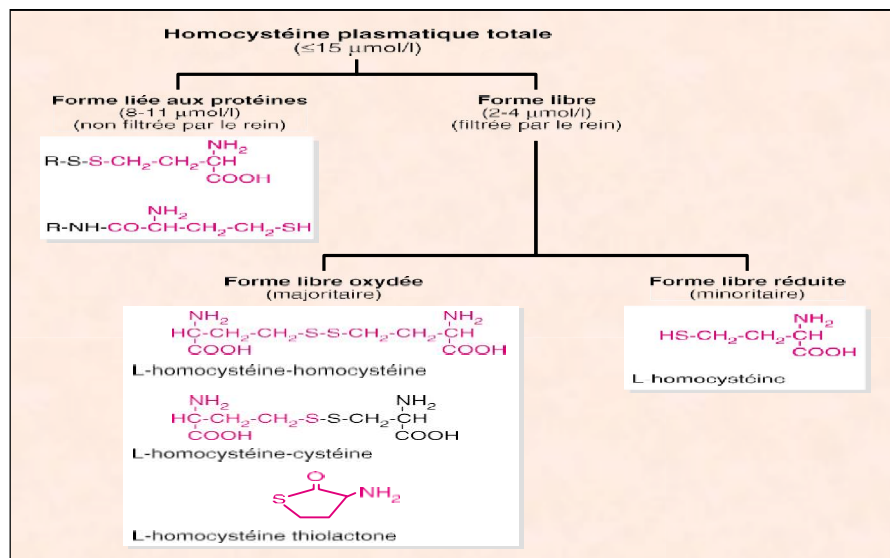
soufré provenant exclusivement du catabolisme de la méthionine alimentaire qui est abondante dans les protéines animales, il est dégradé par reméthylation et transsulfuration (Stipanuk, 2004). Cet acide aminé naturel, non protéique, est potentiellement important sur le plan clinique, ainsi, c'est un homologue de l'acide aminé cystéine (Kaluzna-Czaplińska et al., 2013) (Figure 8).



**Figure 08.** Structures de l'homocystéine et de la cystéine. (A) Homocystéine, (B) Cystéine. (Kaluzna-Czaplińska et al., 2013).

L'homocystéine est synthétisée par toutes les cellules de l'organisme, il circule lié à 75% à 80 % aux protéines plasmatiques (principalement à l'albumine) par l'intermédiaire de ponts disulfures réversibles ou de ponts peptidiques (Figure 9). Deux formes libres de l'Hcy ont été isolées ; la forme majoritaire dite oxydée est essentiellement représentée par le disulfide homocystéine-homocystéine (homocystine), par des disulfides mixtes (tels que le disulfide homocystéine-cystéine) et par l'homocystéine thiolactone. Une deuxième forme libre réduite, correspondant à l'homocystéine proprement dite (Demuth et al., 2000).

L'Hcy totale représente donc toutes les formes existantes de l'Hcy libres ou liées.



**Figure 09.** Formes circulantes d'homocystéine plasmatique (Demuth et al., 2000).

## II.2. Métabolisme de l'homocystéine

L'homocystéine (Hcy) est un intermédiaire important dans le métabolisme de la méthionine. Cet acide aminé peut être catabolisé selon deux voies métaboliques ; la voie de la transulfuration et la voie de la reméthylation (Mudd *et al.*, 1995). L'homocystéine est en équilibre avec ces deux cycles métaboliques distincts (Figure10).

L'homocystéine est transformée en cystéine, cette étape est sous le contrôle de la cystathionine- $\beta$ -synthase (CBS), la vitamine B<sub>6</sub> (pyridoxine) intervient comme cofacteur dans cette réaction. L'homocystéine peut ainsi être reméthylée et produire la méthionine par l'intermédiaire soit de la méthionine synthase soit de la bétaine-homocystéine méthyltransférase. La méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) est une enzyme du cycle des folates (considéré comme source de groupes méthyl) qui joue un rôle essentiel dans cette reméthylation.

### II.2.1. La voie de la reméthylation

Les activités enzymatiques de la CBS et la MTHFR et de leurs cofacteurs vitaminiques (folates, vitamine B<sub>6</sub>, vitamine B<sub>12</sub>) sont les principaux facteurs limitants les plus importants, intervenants dans le métabolisme de l'homocystéine.

La reméthylation va intégrer le cycle des folates et le métabolisme intracellulaire de la vitamine B<sub>12</sub> ou cobalamine (Cbl):

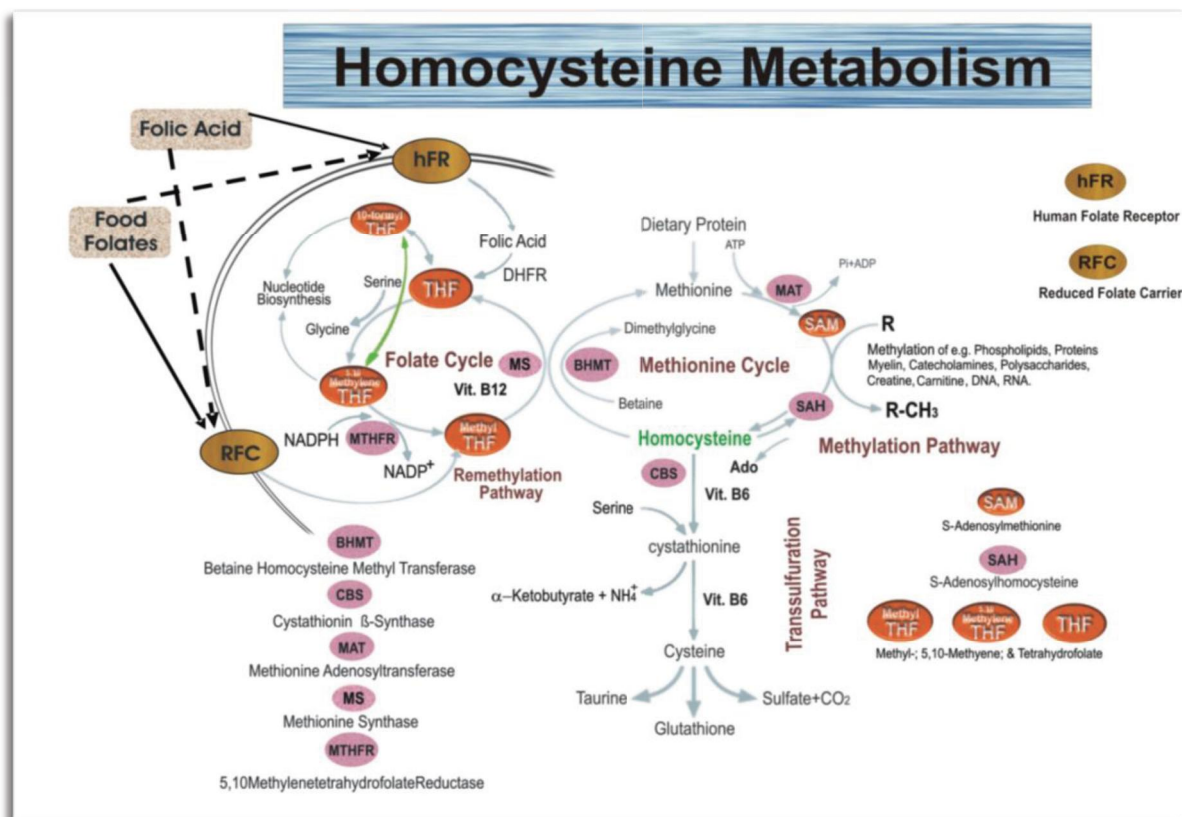


Figure 10. Métabolisme de l'homocystéine (Afaque, 2016).

Dans le cycle des folates, le THF (tétrahydrofolate) reçoit une unité carbonée à partir de la sérine hydroxy-méthyltransférerase (SHMT), enzyme vitamine B6-dépendante, afin de se convertir en 5,10-méthylène-THF (5-10 MTHF) (**Blom et Smulders, 2011**), qui est utilisé pour la synthèse de thymidine et de purines ou convertit en 5-méthyltétrahydrofolate (5-MTHF). Le 5-méthyltétrahydrofolate est la principale forme circulante du folate, cette conversion irréversible est catalysée par la méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR), enzyme vitamine B<sub>2</sub> (riboflavine)-dépendante (**Porter et al., 2016**).

La reméthylation de l'Hcy en méthionine implique le 5-méthyltétrahydrofolate comme donneur du groupe méthyle à l'homocystéine, cette réaction est catalysée par la méthionine synthase (MTR), ce qui conduit à la formation de la méthionine et de THF. Le MTR nécessite de la vitamine B<sub>12</sub> (cobalamine) comme cofacteur et le complexe résultant, est le Cbl (I) MTR, qui se lie avec le groupe méthyle du 5-méthyl-THF pour former le méthyl cbl (III) MTR (**Hiraoka et Kagawa, 2017**).

Une partie de l'Hcy est reméthylée dans le foie grâce à l'action de la bétaine-homocystéine méthyltransférerase à partir de la bétaine comme donneur de méthyl (**Aubard et al., 2000**).

L'homocystéine résultant du catabolisme de la méthionine, durant cette conversion, deux enzymes peuvent intervenir ; le SAM synthetase (S-adénosylmethionine) et le S-adénosylhydrolase (SAH). Premièrement, la méthionine (après consommation de l'ATP) conduit à la synthèse de la S-adénosylméthionine (SAM) sous l'action de la méthionine adénosyltransférerase (MAT) (**Kaluźna-Czaplińska et al., 2013**). La S-adénosylmethionine (SAM) activée est le donneur de groupements méthyle (-CH<sub>3</sub>) le plus important pour de nombreuses réactions biologiques (ADN, protéines, neurotransmetteurs, hormones, phospholipides) (**Eisenstein et al., 2001**). Deuxièmement, la (SAM) est déméthylé en S-adénosylhomocystéine (SAH) puis hydrolysée (par adénosylhomocystéinase) en adénosine et homocystéine qui est soit reméthylée en méthionine, soit métabolisée dans la voie de trans-sulfuration pour former la cystéine par un autre mécanisme dépendant de la vitamine B<sub>6</sub> (**McGarel et al., 2015**).

### **II.2.2. La voie de Transsulfuration**

L'Hcy peut suivre la voie de trans-sulfuration, voie irréversible, qui conduit à la dégradation de l'Hcy en cystéine (**Veyrat-Durebex et al., 2013**). Cette voie permet à la méthionine d'apporter un atome de soufre pour la formation de la cystéine (**Demuth et al., 2000**). La trans-sulfuration est la principale voie d'élimination de la méthionine, elle se produit principalement dans le foie et les reins et commence par la condensation de l'Hcy avec la sérine pour former de la cystathionine, sous l'action de la cystathionine β-synthase (CBS) dont le cofacteur est le phosphate de pyridoxal (vit B<sub>6</sub>) (**Castro et al., 2006**). La cystathionine, elle-même est clivée et désaminée en cystéine et en alpha céto- butyrate (**Demuth et al., 2000**). En outre, la cystéine est à l'origine d'un acide aminé soufré antioxydant majeur, le glutathion, et d'autres acides aminés tels que la taurine (**Mouchabac, 2008**).

## ❖ Le système de régulation

Un équilibre adéquat entre les taux de l'homocystéine, la méthionine et le SAM, est physiologiquement maintenu par l'autorégulation de ces différents cycles. Ainsi un taux de SAM élevé diminue l'activité de la méthionine synthétase et de MTHFR. Inversement, SAM stimule la cystathionine beta-synthétase (**Roblin et al., 2007**).

### II.3. Classification des hyperhomocystéinémies

Les valeurs normales de l'homocystéine totale varient en fonction de la technique de dosage employée ;

La concentration plasmatique de l'homocystéine totale chez les sujets sains à jeun est faible, elle se situe entre 5.0 et 15.0  $\mu\text{mol} / \text{L}$ , valeurs obtenus par HPLC, ou de 5,0 à 12,0  $\mu\text{mol} / \text{l}$  lorsque les méthodes de dosage immunologique ont été utilisé (**Baszczuk et Kopczynski, 2014**). Ces valeurs peuvent varier selon le sexe et l'âge; chez les enfants (3-14 ans) les concentrations normales sont plus basses et se situent autour de 6  $\mu\text{mol}/\text{l}$  (**Mouchabac, 2008**).

L'hyperhomocystéinémie est classé comme modérée lorsque les taux de l'homocystéine oscillent entre 15 à 30  $\mu\text{mol} / \text{L}$ , et considéré comme intermédiaire quand les valeurs se situent entre 30 à 100  $\mu\text{mol} / \text{L}$  et pour des concentrations supérieure à 100  $\mu\text{mol} / \text{L}$ , l'hyperhomocystéinémie est considérée comme sévère (**Mouchabac, 2008**).

### II.4. Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie

De nombreuses situations peuvent être à l'origine d'une augmentation des taux de l'homocystéine classées dans le **tableau 01**:

**Tableau 01.** Sévérité de l'hyperhomocystéinémie selon les facteurs étiologiques d'après **Bottiglieri, (2005)**.

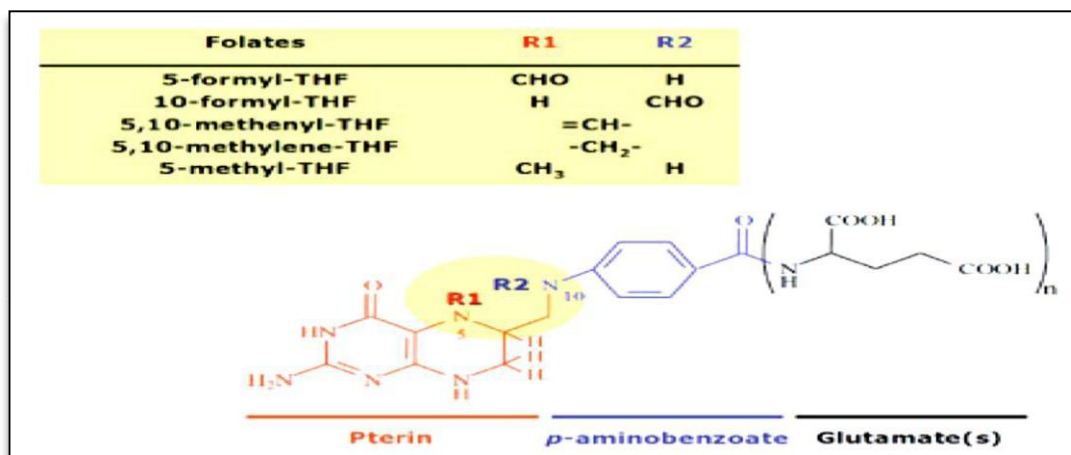
Etiologie	Sévérité
<b>Altération de la voie de reméthylation de l'homocystéine</b>	
Déficit d'absorption de la vitamine B <sub>12</sub>	Sévère
Déficit de la MTHFR d'origine génétique	Intermédiaire à sévère
Carence alimentaire en folates ou en vit B <sub>12</sub>	Intermédiaire
<b>Déficit de l'activité de la CBS</b>	
Carence en vitamine B6	Modérée
Déficit fonctionnel de la CBS	sévère
<b>Pathologies médicales</b>	
Insuffisance rénale	Intermédiaire
Diabète, Hypothyroïdie, Cancers	Modérée
Atrophie gastrique	Modérée à intermédiaire
<b>Toxiques</b> : alcool, tabac, caféisme (> 6 tasses / j)	Modérée
<b>Médicaments</b>	Modérée à intermédiaires

Les déterminants des taux de l'homocystéine sont complexes et comprennent des facteurs environnementaux (exposition à certains toxiques ou médicaments) ou pathologiques, nutritionnels (déséquilibre du statut en folates, vitamines B<sub>12</sub>, B<sub>2</sub> et B<sub>6</sub>), et génétiques (par mutations des gènes codant pour les enzymes des voies de trans-sulfuration et de reméthylation):

#### II.4.1. Les facteurs nutritionnels

##### II.4. 1.1. Les folates ou vitamine B<sub>9</sub>

L'acide folique est une vitamine hydrosoluble du groupe B (vitamine B<sub>9</sub>), également appelée folate et ptéoylmonoglutamate (PteGlu). Sa structure chimique est constituée de 3 parties: un noyau de ptéridine, acide para-aminobenzoïque et acide glutamique (**Figure 11**) (**Cosar et al., 2014**).



**Figure 11.** Structure des folates naturels d'après **Taiz et Zeiger, (2010)**.

La présence d'acide folique a été constatée initialement dans les légumes verts à feuilles, les légumineuses, les agrumes, le jus d'orange et les produits céréaliers enrichis (pâtes alimentaires, céréales, farines) (**Wilson et al., 2007**), il est aussi trouvé dans les fromages affinés, le foie, le pâté de foie et les graines (**Guilland, 2011**).

Après la consommation, les folates alimentaires présents dans les intestins sont principalement hydrolysés en monoglutamates et absorbés par transport actif à travers la muqueuse de l'intestin grêle (**Liew, 2016**).

Le monoglutamate est ensuite réduit en tétrahydrofolate (THF) dans le foie et transformé en méthylor ou en formyle avant de pénétrer dans la circulation sanguine. Le folate se trouve généralement dans le sang sous forme de 5-méthyl-tétrahydrofolate (**Bailey et al., 2006; Yetley et al., 2011**).

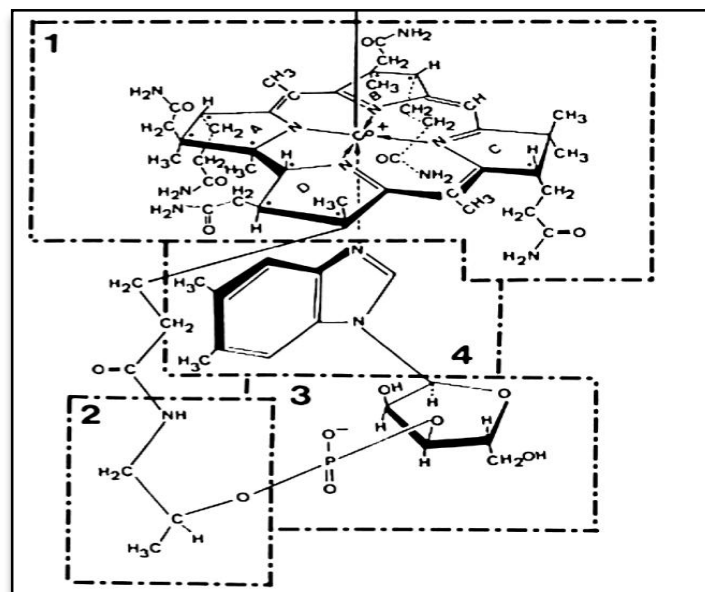
En outre, l'acide folique pour être actif doit être transformé en dihydrofolate (DHF) puis en tétrahydrofolate (THF), sous l'action de la dihydrofolate réductase. Les dérivés du THF

servent d'accepteurs et de donneurs d'unités monocarbonées dans un grand nombre de réactions du métabolisme des acides aminés et des nucléotides. Ces dérivés ont en position N5 et/ou N10, différents radicaux monocarbonés (**Figure 11**). (**Guilland, 2011**).

Alors, les folates jouent un rôle essentiel dans la stabilité génomique en régulant la synthèse, la réparation et la méthylation de l'ADN grâce à leurs actions en tant que cofacteur des enzymes dépendant du folate, impliquées dans la synthèse des nucléotides et la méthylation de l'ADN (**Williams, et al., 2012**). Par conséquent, le statut en folates module simultanément la stabilité génétique et la méthylation de l'ADN, qui sont déterminés à la fois par l'apport alimentaire et par l'activité des divers enzymes intervenants dans le métabolisme du folate (**Piskac-Collier et al., 2011**).

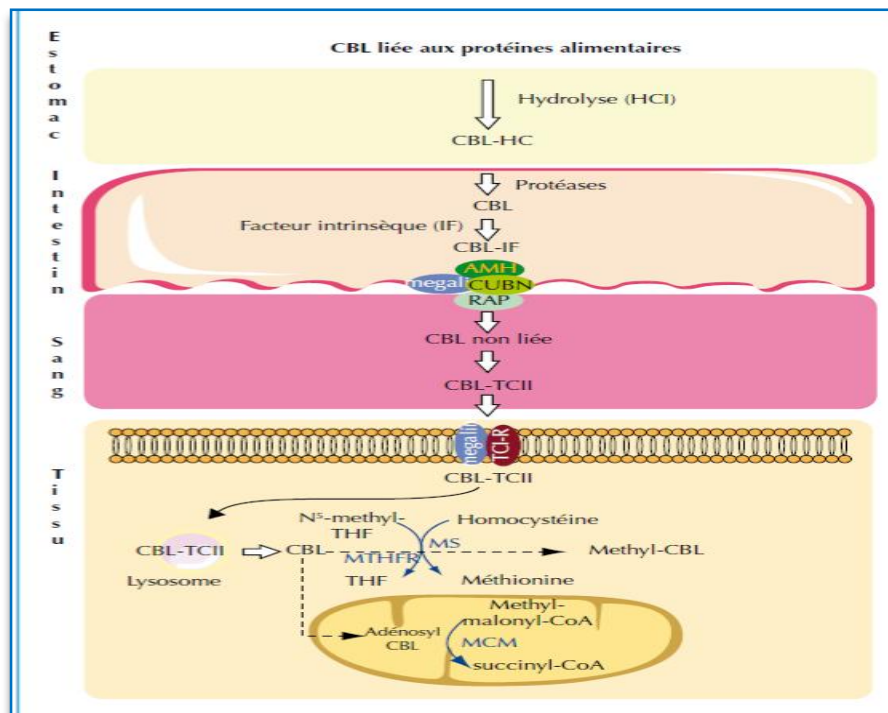
#### II.4. 1.2. La vitamine B<sub>12</sub> ou Cobalamine

La vitamine B<sub>12</sub> est une vitamine hydrosoluble qui a une structure chimique proche de celle de l'hème avec un atome central constitué par du cobalt, d'où le nom de cobalamine (**Loup-Leuciuc et al., 2011**) (**Figure 12**). Les besoins journaliers préconisés en vitamine B<sub>12</sub> se situent entre 2 et 5 µg selon les pays. L'apport est exclusivement alimentaire d'origine animale (**Serraj et al., 2010**).



**Figure 12.** Structure des cobalamines (isoformes cellulaires et circulantes de la vitamine B<sub>12</sub>). La vitamine B<sub>12</sub> est une 5,6-diméthylbenzimidazole-cobamide. Les cobamides sont obtenus par addition, sous la structure plane tétrapyrrolique (position alpha), d'un ribonucléotide lié au cobalt et d'un pyrrol Daminopropanol, et au-dessus du plan (position beta) d'un second ligand coordonnant l'atome de cobalt. Une de ces caractéristiques structurales de la vitamine B12 est d'être la seule molécule connue dans la nature ayant un ribonucléotide incorporant une base 5,6-diméthyl-benzimidazole. 1: groupe Tétrapyrrol ; 2: amino-1-propanol-2, 3: groupe ribose-3P ; 4: groupe 5,6-diméthyl-benzimidazole, X: groupe hydroxyle, méthyle, 5'-désoxy, cyanate ou adénosyle. (**Guéant et al., 2014**).

L'existence d'un cycle entérohépatique permet une épargne des cobalamines (Serraj *et al.*, 2010). L'absorption digestive de la Cobalamine est dépendante de sa liaison au facteur intrinsèque (FI), glycoprotéine sécrétée par les cellules pariétales, dont le rôle est d'assurer une protection contre les dégradations enzymatiques (Veyrat-Durebex *et al.*, 2013). Trois protéines, le facteur intrinsèque (FI), l'haptocorrine (HC) et la transcobalamine (TC), ainsi que leurs récepteurs spécifiques sont impliqués dans les mécanismes (extrêmement complexes), par lesquels cette vitamine est transportée et assimilée (Guéant *et al.*, 2014). La figure 13 résume les principales étapes du métabolisme de la vitamine B<sub>12</sub>.



**Figure 13.** Principales étapes du métabolisme de la vitamine B<sub>12</sub> d'après Serraj *et al.*, (2010).

La vitamine B<sub>12</sub> agit comme cofacteur dans deux réactions enzymatiques. Dans la première, la méthyl-cobalamine (Méthyl - CBL) est le coenzyme de la méthionine synthase permettant la conversion de l'Hcy en méthionine ainsi que du méthyl-THF en THF (Veyrat-Durebex *et al.*, 2013). La vitamine B<sub>12</sub> intervient également comme cofacteur nécessaire à la conversion du L-méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA (Schrier, 2011 ; Dali-Youcef et Andrés, 2009). Cette réaction biochimique est indispensable au métabolisme des lipides et des protéines.

Ce rôle physiologique explique la plupart des manifestations cliniques liées au déficit en vitamine B<sub>12</sub>.

#### II.4. 1.3. La vitamine B<sub>6</sub>

La vitamine B<sub>6</sub> est un groupe de trois composés naturellement présents dans les aliments, à savoir la pyridoxine (PN), la pyridoxamine (PM) et le pyridoxal (PL). La pyridoxal kinase (PDXK), catalyse la conversion des trois précurseurs de la vitamine B<sub>6</sub> non phosphorylés ; la

pyridoxine (PN), la pyridoxamine (PM) et le pyridoxal (PL), en leurs homologues phosphorylés ; la pyridoxine-5'-phosphate (PNP), pyridoxamine-5'-phosphate (PMP) et PLP (le pyridoxal 5'-phosphate), respectivement (**Galluzzi et al., 2013**).

La vitamine B<sub>6</sub> est un co-facteur enzymatique nécessaire à plus de 140 réactions biochimiques, y compris les transaminations, les clivages de l'aldol, les α-décarboxylations, les racémisations,...etc (**Hellmann et Mooney, 2010**). La forme de coenzyme métaboliquement active de la vitamine B<sub>6</sub> est le pyridoxal 5'-phosphate (P5P) ou (PLP) (**Oka, 1990**). Le PLP est la principale forme circulante exportée du foie et est considérée comme la mesure directe la plus pertinente du statut en vitamine B<sub>6</sub> (**Leklem, 1990**).

Dans la voie de la trans-sulfuration, l'homocystéine est convertie en cystathionine, cette réaction est catalysée par la cystathionine β-synthase (CBS) dont le cofacteur est la vitamine B<sub>6</sub> (PLP) (**Guilland, 2011**).

Par conséquent, la vitamine B<sub>6</sub>, avec la vitamine B<sub>12</sub> et les folates, est l'un des coenzymes clés du métabolisme de l'homocystéine et une carence en vitamine B<sub>6</sub> peut se traduire par une hyperhomocystéinémie, conjointement à une augmentation de la cystathionine sérique (**Ubbink et al., 1993 ; Joosten et al., 1993**). Cependant, des régimes riches en fruits et légumes et des suppléments vitaminiques en acides foliques, en vitamines B<sub>6</sub> et B<sub>12</sub> font diminuer les taux de l'homocystéine (**Aubard et al., 2000**).

De plus, la riboflavine (vitamine B<sub>2</sub>), cofacteur de MTHFR, catalyse la formation de MTHF et lutte contre l'accumulation d'homocystéine, en synergie avec les folates.

#### **II.4.2. Facteurs génétiques**

Des anomalies des gènes codants pour les enzymes impliquées dans le cycle de l'Hcy peuvent être responsables d'une hyperhomocystéinémie. Les deux enzymes les plus communes sont notamment, la CBS et la MTHFR ;

Le déficit complet en CBS est un trouble autosomique récessif et produit une hyperhomocystéinémie et une homocystinurie (**Guthikonda et Haynes et al., 2006**). Il existe une forme homozygote (plutôt rare : 1/200000 environ), qui est associée à une atteinte sévère, alors que la forme hétérozygote (environ 1%) pour laquelle l'augmentation de l'homocystéine est plus modérée et non systématique (environ 40% des cas) (**Mouchabac, 2008**).

Quant à la MTHFR, la mutation la plus fréquente du gène MTHFR est celle de (C677T) (rs1801133) qui provoque une substitution alanine-valine (**Kang et al., 1993**), aboutit à un variant thermolabile de la MTHFR (**Boers et al., 1985**). Une autre mutation fréquente du gène MTHFR, est (A1298C) (rs1801131), qui ne provoque pas d'augmentation des taux d'homocystéine chez les individus hétérozygotes ou homozygotes (**van der Put et al., 1998**).

#### **II.4.3. Facteurs environnementaux**

L'homocystéine plasmatique augmente avec le sexe masculin, l'âge et la ménopause (**Jacques et al., 1999**). L'insuffisance rénale est une cause importante d'hyperhomocystéinémie (**Guthikonda et Haynes et al., 2006**). Certain nombre de médicaments, interférant avec le métabolisme des vitamines B, y compris, par exemple les anticonvulsivants et phénothiazines (avec les folates), oxyde nitrique (avec la vitamine B<sub>12</sub>), ces médicaments peuvent augmenter

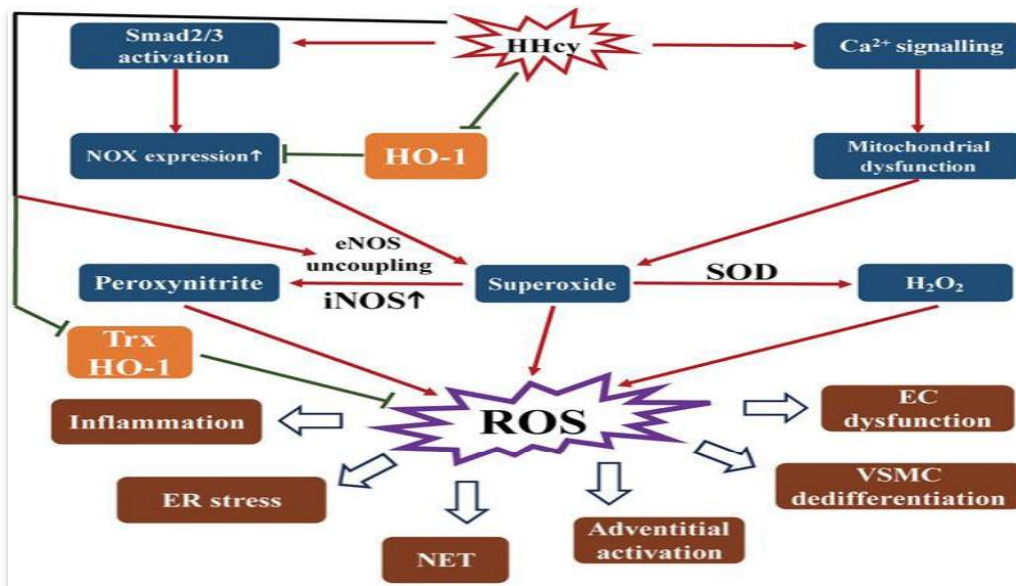
les niveaux d'homocystéine, (Aubard Y et al., 2000). De même, l'alcool, le tabac et le café (Mouchabac, 2008).

## II.5. Mécanismes de la pathogénicité de l'hyperhomocystéinémie

Nous nous limiterons à décrire différentes hypothèses physiopathologiques qui peuvent sous-tendre la pathogénicité de l'hyperhomocystéinémie dans le cas de certaines maladies vasculaires : coronaropathies et infarctus, thromboses veineuses, artériopathies, atteintes cérébrovasculaires. En effet, il existe de multiples actions de l'homocystéine, sur la paroi vasculaire comme; l'induction d'un stress oxydant, dysfonctionnement endothéliale et diminution de la production de NO (l'oxyde nitrique), l'altération du métabolisme des LDL et des lipides, altération de l'hémostase, effets sur la musculature lisse vasculaire.

### II.5.1. Homocystéine et production d'un stress oxydant

*espèces réactives de l'oxygène* (ROS) et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premières (Haleng et al., 2007). L'homocystéine à une concentration pathogène conduit à une *espèces réactives de l'oxygène* (ROS) dans les cellules vasculaires et les leucocytes circulants (Zhang et al., 2001; Zhang et al., 2002). Il existe plusieurs moyens par lesquels l'homocystéine peut favoriser l'accumulation des (ROS), ceux-ci inclus, l'auto-oxydation de l'Hcy en homocystine et en Hcy-thiolactone, génère des (ROS) et contribue ainsi, à la toxicité vasculaire de homocystéinémie (Andersson et al., 1995). Dans oxyde nitrique (NO), induite par l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) qui joue un rôle vasoprotecteur, l'Hcy provoque ainsi un découplage de (eNOS), les deux génèrent de manière synergique une production de peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), un fort oxydant, dérivée du superoxyde et de (NO) (Fu et al., 2017), ce qui aboutit à une diminution de la biodisponibilité de (NO) (Antoniades, et al., 2009). En outre, l'Hcy inhibe l'activité des enzymes antioxydantes importantes, telles que la glutathion peroxydase 1 (GPx-1) ou la superoxyde dismutase (SOD) (Cheng et al., 2009; Armitage et al., 2010; Handy et al., 2005). Par ailleurs, une régulation positive des enzymes NADPH oxydases (NOXs), intervenants dans la production des (ROS), et un dysfonctionnement mitochondrial ont été envisagé (Figure14). (Fu et al., 2017). De plus, des niveaux élevés d'homocystéine ont également été associés à une augmentation de la diméthylarginine asymétrique (ADMA), un inhibiteur endogène de (NO) synthases, dans les cellules endothéliales (Dayal et Lentz , 2005).



**Figure 14.** Aperçu schématique du stress oxydatif induit par l'HHcy d'après **Fu et al., (2017)**. ■ HHcy régule à la hausse l'expression de NOX par activation Smad 2/3, tandis que l'HHcy induit un dysfonctionnement mitochondrial par l'activation de la signalisation calcique. Ces deux effets de l'HHcy entraînent une production de superoxyde. Le superoxyde est converti en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalysé par la SOD. De plus, l'HHcy régule à la hausse *Inducible nitric oxide synthas*) et renforce le découplage eNOS, qui induit davantage à la formation de peroxynitrite par le NO et le superoxyde. Le superoxyde, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le peroxynitrite sont tous des ROS. L'HHcy inhibe également l'activité des antioxydants, tels que la thiorédoxine (Trx) et haem oxygenase-1(HO-1), pour réguler à la hausse l'expression des NOX et atténuer l'élimination des ROS par les antioxydants. NET, neutrophil extracellular trap, (des pièges extracellulaire des neutrophiles).

Les ROS ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxynitrite provenant de l'oxydation de l'homocystéine peuvent engendrer des lésions au sein de l'ADN et altérer le message génétique; et même entrainer des modifications structurales sur diverses protéines comme le collagène ou l'élastine.

Par conséquent, de nombreux effets du stress oxydatif induit par l'homocystéine, peuvent être observé, notamment, le dysfonctionnement endothélial, la différenciation des CMLVs (cellules musculaires lisses vasculaires), (**Figure 14**), (troubles déclenchant de l'inflammation et favorisant l'athérosclérose de plusieurs manières.

## II.5. 2. L'homocystéine et la dysfonction endothéliale

L'endothélium joue un rôle capital dans la régulation du tonus vasculaire et du contrôle de l'hémostase ainsi que l'inflammation dépendante de l'endothélium. Le terme «dysfonctionnement endothélial» se réfère à la détérioration de ces propriétés homéostatiques normales.

Une diminution de la biodisponibilité du (NO) et une altération de l'équilibre rédox cellulaire sont des caractéristiques majeures de la dysfonction endothéliale (**Barroso, et al., 2017**). L'oxyde nitrique inhibe l'adhésion des monocytes et des plaquettes à la paroi vasculaire, ainsi que la prolifération des cellules musculaires lisses et l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL), donc, il est considéré comme un puissant vasodilatateur anti-athérosclérotique

(Naseem, 2005 ; Zhou et Austin, 2009). De plus, une augmentation des taux d'un vasoconstricteur très puissant ; l'endothéline-1 (ET-1), a été trouvée en cas d'homocystéinémie chronique, cette molécule est impliquée aussi dans l'athérogenèse (Cox et al., 1999).

Les mécanismes par lesquels l'homocystéine favorise la dysfonction endothéliale ne sont pas complètement compris. D'un point de vue qualitatif, l'influence de l'Hcy sur la production, l'activation ou l'expression membranaire de médiateurs endothéliaux est dépendante de son groupement thiol libre (Fryer et al., 1993 ; Demuth et al., 1999). L'impact de l'Hcy est lié, d'un côté, à la production de radicaux libres oxygénés durant son auto-oxydation, et d'un autre côté, à son action réductrice entraînant des modifications structurales sur diverses protéines (Koch et al., 1998). Ainsi, le stress oxydatif induit par l'Hcy est connu pour activer les métallo-protéinases de la matrice (MMP), ce qui perturbe le métabolisme de la matrice extracellulaire (ECM) et augmente le dépôt de collagène conduisant à la fibrose vasculaire (Sen et al., 2010).

L'effet pro-inflammatoire de l'Hcy est lié à la génération des (ROS) et implique l'activation du facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B), responsable de la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes pro-inflammatoires (Papatheodorou et Weiss, 2007). Ceci conduit à l'activation des cellules endothéliales et à l'expression des molécules d'adhésion cellulaire vasculaire-1 (VCAM-1), (Carluccio et al., 2007), la protéine (monocyte-chemoattractant-protein-1) (MCP-1), (Wang et al., 2000) et même entraînant une augmentation de concentration des cytokines pro-inflammatoires circulantes (Zhang et al., 2006), qui contribuent tous, à l'athérogenèse. Ces molécules d'adhésion et cytokines améliorent la liaison des leucocytes à l'endothélium et favorisent leur transmigration vers la paroi vasculaire (Barroso et al., 2017), et par conséquent, participent également à l'activation des processus inflammatoires à l'intérieur de la paroi vasculaire.

### II.5. 3. L'Homocystéine et l'hémostase (Altération de l'hémostase)

Différentes études ont trouvé que l'homocystéine favorise la thrombose vasculaire, par de multiples mécanismes. Les cellules endothéliales exposées à l'homocystéine ont présenté une augmentation des taux de facteur tissulaire (FT) et une activation accrue du facteur V à Va, le taux du facteur de von Willebrand, a également été augmenté dans le plasma des patients atteints d'hyperhomocystéinémie et ayant une maladie artérielle prématurée, ces résultats suggèrent que l'homocystéine favorise un état pro-coagulant et une adhésion plaquettaire (Durand et al., 2001).

Par ailleurs, il a été démontré que l'Hcy réduit la liaison de l'activateur tissulaire du plasminogène aux cellules endothéliales cultivées d'une manière dose-dépendante et en fonction du temps, diminuant ainsi, l'activité fibrinolytique (Hajjar, 1993).

En outre, l'homocystéine inactive indirectement les substances anticoagulantes, la protéine C et la thrombomoduline, favorisant ainsi la formation de la thrombine (Lentz et Sadler, 1991). De plus, l'Hcy stimule la génération plaquettaire du thromboxane A<sub>2</sub>, qui est un vasoconstricteur et pro-agrégant (Graeber et al., 1982).

Donc, l'hyperhomocystéinémie semble altérer le phénotype anti-thrombotique physiologique des cellules endothéliales et promouvoir ainsi, leurs activités pro-coagulantes, conduisant à la thrombose dans plusieurs cas.

#### **II.5. 4. L'Homocytéine et lipides**

Des résultats d'études cliniques sont en faveur de l'existence d'un lien entre l'hyperhomocystéinémie et la peroxydation lipidique chez l'homme. Les radicaux libres oxygénés issus de l'auto oxydation de l'Hcy ou par la dérégulation du statut thiol-redox, interagissent avec les LDL en les oxydant, ce qui pourrait avoir des effets nocifs sur la paroi artérielle (**Demuth et al., 1996**). La peroxydation des LDL, s'accompagne d'une modification covalente de l'apo B100 avec augmentation de sa charge négative, entraînant une perte de la reconnaissance par le récepteur des LDL natives, mais lui conférant la capacité de se lier au récepteur *scavenger* des macrophages (**Steinberg et al., 1989**). Par ailleurs, la thiolation des LDL par l'Hcy leur confère certaines propriétés pro-athérogènes semblables à celles des LDL oxydées (**Naruszewicz et al., 1994**).

En outre, les (ROS) générées, initient la peroxydation lipidique dans les membranes cellulaires (potentiellement responsables de la dysfonction endothéliale) et dans les lipoprotéines circulantes ; les LDL oxydées (LDL<sub>ox</sub>) peuvent déclencher l'activation des plaquettes ainsi que certaines anomalies hémostatiques rapportées chez les patients homocystinuriques, ainsi, le stress oxydatif induit par l'HHcy, peut être un processus clé dans la pathogenèse de la thrombose (**Coppola et al., 2000**).

En revanche, une étude ultérieure a révélé la présence d'une activation de 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase dans le foie d'un rat hyperhomocystéinique (HHcy induite par un régime alimentaire) (**Woo et al., 2005**). Une enzyme qui catalyse la conversion de l'HMG-CoA en mévalonate, durant la biosynthèse du cholestérol (**Hylemon et al., 2001; Qureshi et al., 1976**). Ceci entraîne une accumulation des lipides hépatiques et une élévation des taux sériques de cholestérol, et de ce fait une augmentation du risque de développement d'une future plaque d'athérome.

#### **II.5. 5. L'Homocytéine et CMLVs (cellules musculaires lisses vasculaires)**

Il a été suggéré que l'Hcy peut directement, favoriser la croissance et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (**Nicolas et Chango, 1997 ; Beaudoux et al., 2001**). L'expression du gène de la cycline (A) induite par l'homocystéine peut jouer un rôle important dans la prolifération des cellules musculaires lisses aortiques (RASMCs) (**Ross, 1993**).

Des études de culture cellulaire ont montré que le stress oxydatif et l'Hcy, proprement dits, ont un effet mitogène sur les cellules musculaires lisses vasculaires (**Kartal Ozer et al., 2005**). L'homocystéine peut activer les NAD (P) H oxydases dans les CMLVs en favorisant la phosphorylation de p47phox d'une manière dépendante à la protéine kinase activée par un mitogène p38 (la voie p38 MAPK), donc, l'homocystéine a entraîné une prolifération des CMLVs par un mécanisme impliquant des (ROS), (**Zou et al., 2010**). Ainsi, indirectement, les LDL<sub>ox</sub> stimulent, également la prolifération des CMLVs via diverses voies de signalisation (**Chisolm et Chai, 2000**).

oxyde nitrique (NO) (**Fu et al., 2017**). En dehors de son activité sur la vaso-relaxation, le (NO) possède la propriété d'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses (**Elbazi et Arnal, 2006**).

Les changements dans les CMLVs, y compris la prolifération et la production de collagène, jouent un rôle important dans l'étiologie de l'athérosclérose (**Zou et Banerjee, 2005**).

Nous pouvons donc conclure que les mécanismes de la pathogénicité de l'hyperhomocystéinémie, semblent être complexes et multifactorielle. Alors, l'interaction entre l'homocystéine et la paroi vasculaire soit à considérer, afin d'appréhender les effets de l'homocystéinémie sur l'endothélium vasculaire et ainsi, pour comprendre plus précisément les mécanismes moléculaires intervenant dans la physiopathologie de l'athérosclérose et la survenue d'un infarctus du myocarde.

### III. Méthylènetétrahydrofolate-réductase (MTHFR)

#### III.1. Gène MTHFR (Méthylènetétrahydrofolate-réductase)

##### III.1.1. Structure et localisation

Le gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) humain est localisé sur le bras court du chromosome 1 dans la région 1p36.3, et consiste environ 17 kb, dont 11 exons, couvrant 2,2 kb allant de 102 pb à 432 pb (cDNA GenBank accession number U09806) (**Figure 15**), (**Goyette et al., 1994, 1998**). La taille des introns sont rangée de 250 à 1,5 kb, avec une exception de 4,2 kb (**Goyette et al., 1998**). Néanmoins, des nouvelles études ont révélé plus de 11 exons (**Aneji et al., 2012**).

Le promoteur du gène MTHFR ne possède pas de boîte (TATA), mais contient des îlots (CpG) et de multiples sites de liaison potentiels Sp1 (**Gaughan et al., 2000**). En effet, il existe plusieurs séquences consensus pour les sites de liaison potentiels des facteurs de transcription, par exemple les SP1, AP1, AP2, CAAT ou GC-boîtes (**Homberger et al., 2000**).

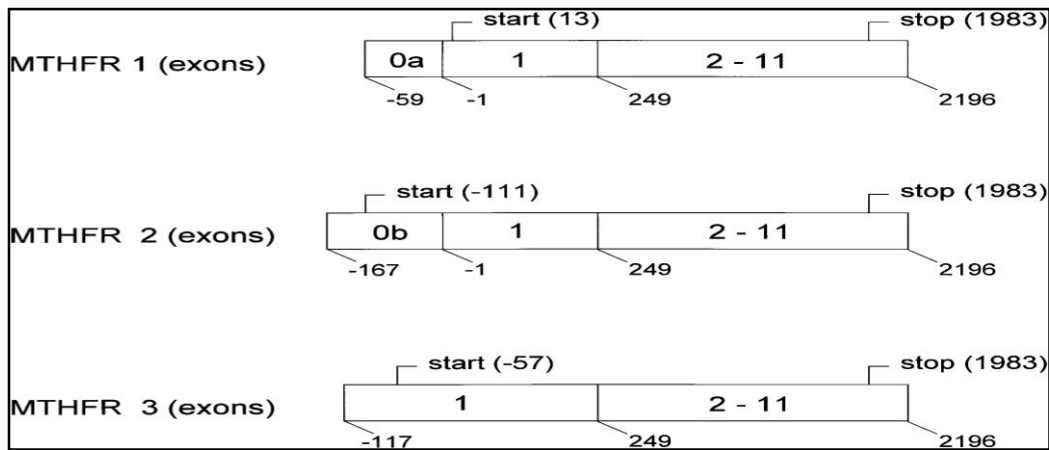
Plusieurs sites d'amorce de la transcription, d'épissage alternatif et de polyadénylation ont été observés pour *MTHFR* et *Mthfr* (**Tran et al., 2002**). Les sites de début de la transcription sont localisés dans deux régions et deux promoteurs ont été caractérisés (**Pickell et al., 2005**).

##### III.1.2. Transcrits du gène MTHFR

L'analyse à l'aide de la technique 'Northern blot' a révélé des transcriptions de MTHFR d'environ 2,8 et 7,2-7,7 kb dans tous les tissus testés, et un autre d'environ 9,5 kb dans le cerveau, les muscles, le placenta et l'estomac (**Figure15**) (**Goyette et al.,1998; Tran et al., 2002; Gaughan et al., 2000**). Donc, le MTHFR produit trois transcrits différents (MTHFR 1, 2 et 3), qui correspondent, aux 2.8, 7.2 et 9.8 kb (**Gaughan et al., 2000**).

En effet, ces transcriptions de différentes tailles, résultent de sites alternatifs de démarrage de la transcription et de multiples signaux de polyadénylation (**Leclerc et al., 2005**). L'abondance totale est faible et la proportion de chaque transcription diffère selon les tissus; l'expression globale est plus intense dans les testicules, intermédiaire dans le cerveau et les reins, et plus faible dans les autres tissus examinés (**Leclerc et al., 2005**).

L'existence de différents premiers exons est plus probablement due à l'initiation de la transcription alternative, les premiers codons ATG individuels de tous les transcrits ont été identifiés (**Homberger et al., 2000**). Les ARNm à 2,8 et 7,2 kb proviennent de l'un des deux sites d'initiation de la transcription qui sont 206 et 243 pb en amont du codon d'initiation ATG, tandis que la transcription de l'ARNm de 9,8 kb est initiée à un site de départ situé à 2,8 kb en amont du codon d'initiation de la traduction (**Gaughan et al., 2000**).



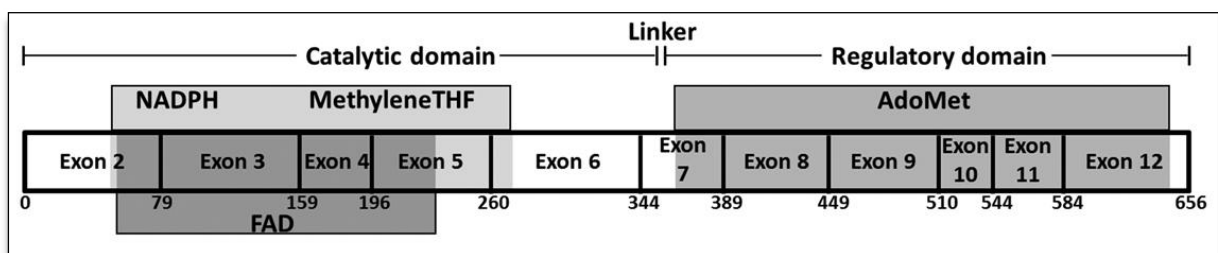
**Figure15.** Différents transcrits du gène MTHFR. D’après **Homberger et al., (2000)**. Les différents transcrits (MTHFR 1, 2 et 3) du gène MTHFR humain sont déterminés par l’utilisation spécifique des premiers exons respectifs. Les chiffres en dessous indiquent la bordure 5' de chaque exon ou la fin de la transcription. Les transcriptions révèlent des cadres de lecture ouverts individuels avec des sites de démarrage uniques mais des codons stop constants. Les positions nucléotidiques indiquées se réfèrent à **Goyette et al., (1998)**.

## III.2. Enzyme MTHFR

### III.2.1. Structure et fonction

L’enzyme MTHFR humaine est un dimère de 150 kDa possédant deux isoformes; l’un de poids moléculaire de 77 kDa et l’autre de 70 kDa. L’expression de l’ADNc humain de 2,2 kpb donne une protéine de 70 kDa (**Frosst et al., 1995**). Le site de démarrage de la traduction de l’isoforme de 77 kDa permet l’ajout de codons additionnels en amont de la séquence de l’isoforme de 70 kDa (**Tran et al., 2002**).

Alors, MTHFR humaine est un homodimère, dont chaque sous-unité consiste un domaine catalytique, N-terminal (acides aminés, aa ~1–356) - qui lie le méthylène THF, le NADPH (donneur d’électrons), et le FAD (cofacteur), - et un domaine de régulation C-terminal (aa~363–656), reliés par une courte région de liaison (linker) (aa 357–362) (**Figure16**), le domaine catalytique semble être suffisant pour effectuer toute la réaction enzymatique (**Froese et al., 2016**).



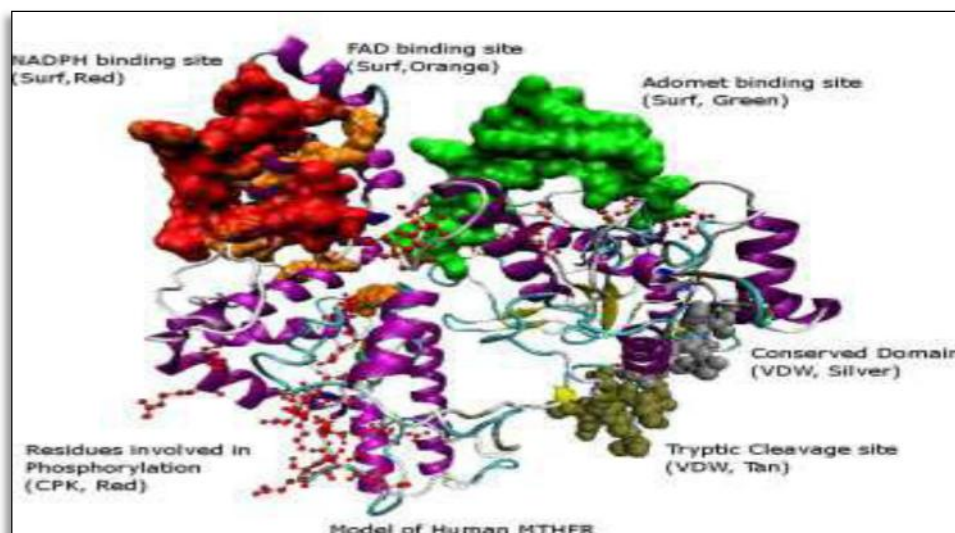
**Figure16.** Schéma du gène MTHFR. D’après **Froese et al., (2016)**. La position du domaine catalytique, de liaison, et le domaine régulateur. Les domaines de liaison NADPH, méthylène THF,

FAD et AdoMet sont présentés pour la visualisation, mais ne représentent pas des sites de liaison exacts. Le nombre des acides aminés sont indiqués ci-dessous.

Le domaine de régulation se lie à S-adenosylmethionine (AdoMet), entraînant une inhibition allostérique de l'enzyme (**Sumner et al., 1986**), un effet qui peut être inversé par la liaison à l'adénylhomocystéine (AdoHcy) (**Daubner et Matthews, 1982; Yamada et al., 2001**), (**Figure17**). AdoHcy bloque l'effet inhibiteur d'AdoMet sur l'activité de la *MTHFR* (**Kutzbach et Stokstad, 1971**) mais ne modifie pas lui-même l'activité enzymatique (**Matthews, 1990**).

Entre les deux domaines de la MTHFR se trouve une forte région hydrophobe constituant un site de clivage par la trypsine. Après un traitement tryptique, la MTHFR des mammifères reste toujours actif mais a perdu sa sensibilité à AdoMet (**Yamada et al., 2005**). Ainsi, il a été démontré que la modification post-traductionnelle du MTHFR humain par phosphorylation est régulée par le rapport AdoMet / AdoHcy dans la cellule ; la phosphorylation entraîne une diminution de l'activité et une sensibilité accrue à l'inhibition allostérique par AdoMet (**Yamada et al., 2005**), sachant que la phosphorylation de la MTHFR a été démontrée pour la plus petite isoforme de MTHFR (70 kDa); la phosphorylation de la plus grande isoforme (77 kDa) n'a pas été examinée (**Yamada et al., 2005**).

De plus, il a été souligné que la MTHFR peut être régulée positivement par le facteur (NF- $\kappa$ B), un médiateur important de la survie cellulaire activé par le stress du réticulum endoplasmique (RE) (**Leclerc et Rozen, 2008**).



**Figure17.** Un modèle de la structure du MTHFR humain. D'après **Shahzad et al., (2013)**.

La méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR) catalyse la réduction du 5,10-méthylène-tétrahydrofolate ( $\text{CH}_2\text{THF}$ ) en 5-méthyl-tétrahydrofolate ( $\text{CH}_3\text{THF}$ ) en utilisant la flavine adénine dinucléotide (FAD) comme cofacteur (**Guenther et al., 1999**). Le NADPH et le 5,10-MTHF sont des substrats physiologiques, NADPH réduit le FAD, le FAD réduit assure la réduction du 5,10-MTHF (**Igari et al., 2011**).

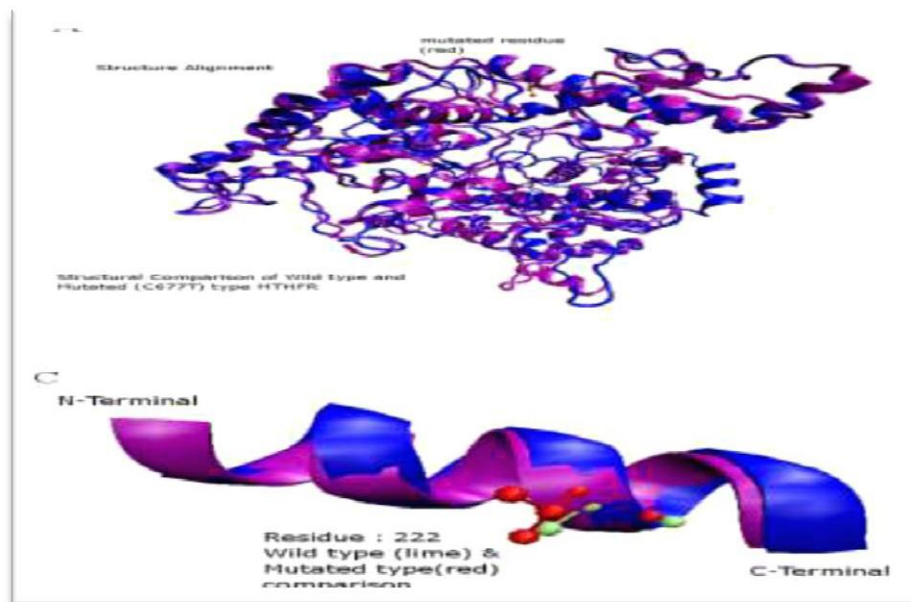


mutation 459C → T (indiquée par « \* ») est muette et elle est représentée ici à titre indicatif car elle accompagne exclusivement la mutation 458G → T (G149V, surmontée par « \* »).

### III.3.1. Le polymorphisme C677T de la MTHFR

**Kang et ses collaborateurs (1988)** ont identifié un variant de l'enzyme MTHFR caractérisé par une activité enzymatique réduite et une thermolabilité, qui a été nommé «MTHFR Thermolabile». Encore appelé variant *thermolabile*.

**Fross et al., (1995)** ont trouvé une mutation faux-sens dans l'exon 4, dans laquelle un résidu cytosine en position 677 du gène MTHFR est remplacé par la thymine, cette mutation commune (C677T), autosomique récessive, entraîne une substitution de l'alanine par la valine, les sujets homozygotes de cette mutation ont une activité spécifique réduite de la MTHFR avec une thermolabilité accrue de l'enzyme (**Figure19**).



**Figure19.** Comparaison de la structure sauvage (normale) et mutée de la MTHFR (polymorphisme C677T). **A)** Alignement structurel des acides aminés normaux (Bleu) et mutés (Violet) de MTHFR. **B)** Observation rapprochée de structure mutée A222V (Hélice de couleur bleue montre la structure normale/ l'hélice de couleur violet représente la structure mutée). **D'**après **Shahzad et al., (2013)**.

Chaque homodimère de l'enzyme MTHFR contient deux molécules de FAD (cofacteur) liées de façon non covalente au dimère et utilise NADPH (**Shahzad et al., 2013**). La mutation C677T chez l'homme (A222V) et chez *E. coli* (A177V) augmente le taux de dissociation du FAD (perte du FAD), entraînant des modifications structurales de l'enzyme (**Yamada et al., 2001**), cette perte s'accompagne d'une dissociation des sous-unités et d'une sensibilité à la dénaturation thermique (**Igari et al., 2011**).

La mutation C677T affecte un résidu dans le domaine catalytique de l'enzyme (**Matthews, 2002; Guenther et al., 1999**). Bien que plusieurs résidus d'acides aminés importants sur le plan catalytique dans le site actif de MTHFR ont été identifiés à partir d'études structurales et

biochimiques utilisant l'enzyme E. coli (**Trimmer et al., 2001; Lee et al., 2009**), les détails concernant le mécanisme de réaction ne sont pas encore complètement compris. De plus, il n'a pas encore été déterminé comment AdoMet régule l'activité du MTHFR chez les mammifères (**Igari et al., 2011**).

Le SNP (*single-nucleotide polymorphism*) de ce gène réduit la thermostabilité de l'enzyme MTHFR en raison de la diminution de l'activité de l'enzyme à 37°C ou plus (**Liew et Gupta , 2015**) par conséquent l'enzyme classique est instable. Des résultats ont montré que l'activité dans MTHFR C677T homozygote a diminué de 50-60% à 37 ° C et de 65% à 46 °C par rapport au groupe témoin (**Reitsma, 2007**). In vitro, les individus avec le génotype (TT) ont présenté une activité enzymatique de MTHFR de 30% par rapport au type sauvage, tandis que ceux ayant le génotype hétérozygote (CT), ont été trouvés avec une activité enzymatique de 60% de la protéine MTHFR (**Frosst et al., 1995**).

La fréquence de l'allèle T varie considérablement en fonction de l'ethnie géographique des populations, les valeurs allant de moins de 10% chez les Africains (**Botto et Yang, 2000**) à environ 57% chez les Mexicains (**Vilkaitis et al., 2003**).

### **III.3.1.1. Le polymorphisme C677T de la MTHFR et l'hyperhomocystéinémie**

En effet, pour la reméthylation de Hcy en méthionine, l'enzyme MTHFR est responsable de la conversion du 5,10-méthyltétrahydrofolate en 5-méthyltétrahydrofolate, la forme circulante et physiologiquement active du folates et des donneurs de groupements méthyles primaire pour la reméthylation (**Williams et Schalinske , 2007**).

Avec une réduction significative de l'activité enzymatique de MTHFR, l'Hcy ne peut pas être reméthylé en Méthionine et s'accumule (**Škovierová et al., 2016**).

Plusieurs rapports ont constamment démontré que l'allèle T est associé à une concentration élevée de tHcy dans le plasma. L'effet sur la concentration de tHcy est le plus prononcé chez les sujets homozygotes (TT) présentant de faibles concentrations de folate (**Brattstrom et al., 1998**) , ceci suggère que le statut en folate joue un rôle important dans la détermination de l'expression phénotypique de la protéine thermolabile. Cette observation est due peut être à la capacité du folate à maintenir l'enzyme MTHFR sous sa forme active (**Jacques et Furlong Choumenkovitch, 2005**). Le folate peut stabiliser l'holoenzyme en augmentant l'affinité de l'enzyme pour un cofacteur critique, la flavine adénine dinucléotide (FAD), qui transfère les équivalents réducteurs du NAD (P) H au méthylène tétrahydrofolate (**Ueland et al., 2001 ; Matthews, 2002 ; Guenther et al., 1999**).

En outre, **Stern et al., (2000)** ont montré que le génotype (TT) est associé à une méthylation plus faible de l'ADN dans les leucocytes périphériques comparativement au génotype (CC), cela est due à la diminution de la biodisponibilité du 5-MTHF nécessaire à la biosynthèse de la S-adénosylméthionine. Ce qui pourrait avoir des effets métaboliques secondaires en plus de l'hyperhomocystéinémie.

### III.3.2. Le polymorphisme A1298C de la MTHFR

Un second polymorphisme génétique du gène MTHFR, A1298C, résulte de la transition de l'adénine en cytosine sur le nucléotide (1298) dans l'exon 7, conduisant à la substitution du glutamate en alanine au codon 429 au niveau du domaine C-terminal régulateur de l'enzyme, cette mutation est également associée à une activité réduite de la MTHFR (in vitro), mais pas à la thermolabilité (**Weisberg et al., 1998; van der Put et al., 1998**). En effet, cette mutation se situe dans l'extrémité C-terminale de l'enzyme, le domaine de régulation de la S-adénosylméthionine, et peut entraîner une diminution de 40% de l'activité enzymatique du génotype variant (**Weisberg et al., 2002**).

Contrairement à la mutation C677T, la mutation A1298C, seule ne semble pas être associée à des concentrations plasmatique élevée de tHcy ou à des concentrations plasmatiques basse du folate (**Jacques et Furlong Choumenkovitch, 2005**).

Cependant, l'hétérozygotie combinée (la coexistence) pour ces deux polymorphismes, qui produit un génotype de 677 (CT) / 1298 (AC), conduit à une élévation significative de l'homocystéine plasmatique (**Van der Pat et al., 1998**) et un profil biochimique similaire à celui observé chez les homozygotes C677T présentant des taux élevés d'homocystéine et des taux basses de folate (**Khaleghparast A et al., 2014**). De plus, les individus avec les génotypes 677 CT et 1298 AC ont révélé une activité de 50 à 60% de la MTHFR de type sauvage (**Weisberg et al., 1998; van der Put et al., 1998**).

La mutation A1298C du gène MTHFR a été moins étudiée que celle de C677T, le mutant A1298C n'a fait l'objet que d'un nombre restreint d'études. Similairement, la prévalence de l'allèle C varie en fonction de l'origine ethnique et de la race des populations. Les prévalences allant de 10 à 23% chez les Indiens du Nord (**Alam et al., 2008**) à environ (36%) chez les Canadiens et Européens (**Sun et al., 2005**).

### III.4. Les polymorphismes: C677T, A1298C et maladies

Les polymorphismes du gène MTHFR sont directement liés à de nombreuses maladies. La relation entre le polymorphisme C677T de la MTHFR et la maladie comporte deux aspects;

1. La maladie peut influencer les concentrations de tHcy, cet effet est modifié par ce polymorphisme.
2. le génotype pourrait être associé à un risque de maladie, médié éventuellement par un métabolisme altéré des folates et de l'Hcy (**Ueland et al., 2001**).

L'allèle 677T a été associé à des taux plasmatiques élevés d'homocystéine (**Kluijtmans et al., 1997**). Des méta-analyses suggèrent que le génotype 677TT peut être un facteur de risque pour les accidents vasculaires cérébraux, la thrombose veineuse et les maladies coronariennes, notamment s'il y'a un déficit en folates (**Ueland et Rozen, 2005**). Cependant une métaanalyse récente n'a pas trouvé une association entre le polymorphisme C677T et la maladie coronarienne (**Clarke et al., 2012**).Egalement, en Algérie, **Houcher et al., (2012)** ont révélé que la mutation du gène MTHFR C677T, ne semble pas être associée à une élévation du taux de l'tHcy plasmatique chez les patients cardiaques.

A propos du polymorphisme A1298C, chez les Marocains, il semble influencer les niveaux de tHcy et agit en tant que facteur de risque indépendant de la CAD (Coronary artery disease) (**Laraqui et al., 2007**) alors que la plupart des études n'ont pas pu trouver une association entre A1298C MTHFR et les niveaux de tHcy (**Botto et al., 2003 ; Hanson et al., 2001**).

Deux études cas-témoins portant sur un groupe de recherche américain ont été publiées en 1999 (**James et al., 1999**) et 2000 (**Hobbs et al., 2000**), montrant une forte association entre le génotype TT du polymorphisme 677C → T et le syndrome de Down (DS). Cependant, trois études européennes, menées en France, en Irlande et en Italie, n'ont mis en évidence aucune preuve d'une telle association. (**Chadefaux-Vekemans et al., 2002; Stuppia et al., 2002**). L'effet de l'Hcy sur le risque maternel de DS a montré des concentrations de l'Hcy significativement plus élevées chez les mères DS que chez celles du groupe témoin. Ce résultat a montré que les concentrations de Hcy étaient significativement différentes chez les mères porteuses du génotype MTHFR1298CC (les mères DS) par rapport aux mères témoins (**Biselli et al., 2008**).

Des études ont montré que les carences en folate pouvaient augmenter l'incidence des cancers. Avec l'épuisement croissant de la thymidine en raison d'une carence en folate, la mauvaise incorporation continue de l'uracile dans l'ADN finira par entraîner une réparation «inutile» ou «catastrophique» de l'ADN (**Liew et Gupta, 2015**). La déstabilisation de l'ADN peut conduire à des aberrations chromosomiques et à une transformation potentiellement maligne (**McKinnon et Caldecott, 2007**).

En outre, le génotype (TT) est un facteur de risque établi pour les anomalies du tube neural (ATN) (**Van der Putet al., 1995; Botto et Yang, 2000**). Il convient de noter que l'association entre le génotype A1298C et le risque de NTD, suggérée par l'estimation du risque global, était essentiellement tirée d'une seule étude (**De Marco et al., 2001**) Cette étude a révélé une relation dose-réponse très significative entre le nombre d'allèles C et le risque de NTD, tant pour le génotype de la mère que du nouveau-né (**De Marco et al., 2001**) . Cependant, toutes les autres études ne montrent aucune relation de ce type, chez les patients et les mères. Certains auteurs ont suggéré que les individus qui sont hétérozygotes pour les deux allèles variants (677C.T et 1298A.C) peuvent présenter un risque accru de NTD (**van der Put et al., 1998 ; Richter et al., 2001**).

Une étude japonaise a confirmé l'existence d'une association entre le génotype MTHFR 677T et la schizophrénie (**Arinami et al., 1997**). Le génotype homozygote 677T était significativement surreprésenté chez les schizophrènes. Cependant, cette étude a été suivie de deux études négatives, une japonaise (**Kunugi et al., 1998**) et une espagnole (**Virgos et al., 1999**), qui n'ont pas pu trouver une telle association chez les patients schizophrènes relativement âgés (moyenne de 58 ans).

**Étude**  
**EXPÉRIMENTALE**

## IV. Matériels et Méthodes

### IV.1. Matériels

#### IV.1.1. Population d'étude

L'étude que nous avons entreprise a porté sur deux populations; une population de malades regroupe 14 jeunes patients ayant subi un infarctus du myocarde (IDM), dont l'âge est inférieur à 40 ans, (allant de 14 ans à 40 ans, de rares cas de patients), ainsi l'âge moyen était de  $33.35 \pm 6.35$  (ans). Sujets des deux sexes provenant de différentes régions des *Aurès* (ville de Batna, Khenchela, Oum El Bouaghi...). Tous ces patients ont présenté une athérosclérose coronarienne (phase chronique), et qui ont été diagnostiqués par des médecins cardiologues du service de cardiologie, lors de leurs hospitalisations.

Une deuxième population témoins de référence, comprenant des sujets sains des deux sexes, présumé en bonne santé, qui se répartissent en 64 hommes et 30 femmes (au total; 94 individus), leurs âge moyen est ;  $29.46 \pm 15.68$  (ans),  $43.03 \pm 15.28$  (ans) respectivement.

#### Critères d'inclusion :

- Pour la population de référence; Sujets sains des deux sexes résidants dans les différentes régions des '*Aurès*'.
- Pour la population pathologique: Les patients avec une athérosclérose coronarienne (en phase chronique).

#### Critères d'exclusion:

- Pour la population pathologique; Tous les sujets refusant de faire le prélèvement.
- Pour la population de référence; Les sujets ayant des ATD personnels et familiaux (HTA, IDM, AVC, les artériopathies des membres inférieurs...etc), les sujets ayant une insuffisance rénale ou hépatiques ou sous traitement médical, femme enceinte ou celles prenant des œstrogènes au moment de l'enquête.

Un questionnaire clinique a été établi pour le recueil de toutes les données nécessaires pour tous les sujets de la population d'étude (**Annexe I**).

Le prélèvement sanguin est appliqué, au niveau de la veine du pli du coude, à l'aide d'un matériel stérile chez les sujets à jeun depuis au moins 12 heures. Les prélèvements sanguins ont été réalisés dans les centres de recrutement respectifs, dans différentes villes (les centres hospitaliers universitaires et les clinique privées) et leur conservation adéquate a été effectuée au sein du laboratoire 'LMPBC' à l'université de Batna 2.

Le sang total a été recueilli dans différents tubes puis centrifugés à 4000 tr/mn pendant 15 mn le jour même du prélèvement, afin de récupérer ; du sérum, si le prélèvement a été effectué sur un tube sec, donc, le caillot est éliminé, ou du plasma, si un tube à anticoagulant 'EDTA, Ethylène Diamine Tétra-Acétique' (l'héparine inhibant l'action de la Taq polymérase) qui a

été utilisé, le culot sera gardé dans ce cas, afin de réaliser l'extraction de l'ADN en vue de  
L'étape d'échantillonnage influence directement la qualité des résultats analytiques obtenus.

Tous nos échantillons doivent être conservés sous une température de -20°C jusqu'à leur transport vers le laboratoire de Nutrition Génétique et Exposition aux Risques Environnementaux du CHU de Nancy (France) pour l'extraction de l'ADN, le génotypage (étude des polymorphismes) et le dosage de divers paramètres biochimiques. Le transport des échantillons est effectué dans une glacière hermétique afin d'éviter la rupture du cycle thermique et la décongélation de nos échantillons. L'étape pré-analytique, entre autres, est primordiale pour assurer la validité du résultat. De plus, lors des analyses génétiques et biochimiques, tous les protocoles ont été rigoureusement suivis et respectés.

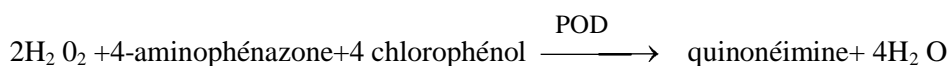
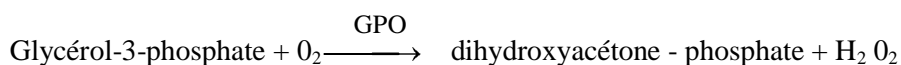
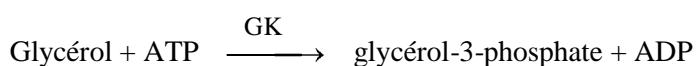
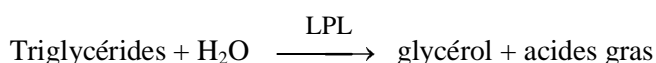
## **IV.2. Méthodes**

### **IV.2.1. Méthode de dosage des différents paramètres biochimiques**

#### **IV.2.1.1. Dosage des triglycérides**

Par méthode enzymatique, colorimétrique (GPO/PAP) utilisant la glycérol-phosphate-oxydase et la 4-aminophénazone (mesuré sur un Analyseur AU5800; Beckman Coulter):

Les triglycérides subissent une hydrolyse enzymatique par la lipoprotéine-lipase (LPL) en glycérol et acides gras, le glycérol formé est phosphorylé ensuite en glycérol-3-phosphate par l'ATP en présence de la glycérolkinase (GK). L'oxydation du glycérol-3-phosphate est catalysée par la glycérol-phosphate-oxydase (GPO) pour former du dihydroxyacétone-phosphate et du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) :

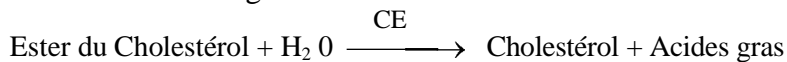


En présence de peroxydase (POD), le peroxyde d'hydrogène formé entraîne le couplage oxydatif du 4-chlorophénol et de la 4-aminophénazone pour former un colorant quinonéimine rouge, qui est mesuré à 512 nm. L'intensité de la coloration développée est directement proportionnelle à la concentration des triglycérides dans l'échantillon. Les valeurs normales sont inférieures à 1,50 g/l.

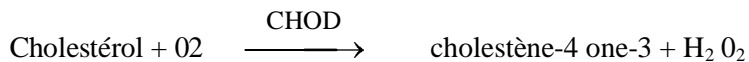
#### **IV.2.1.2. Dosage du cholestérol total**

Par méthode enzymatique, colorimétrique (CHOD/PAP) utilisant la cholestérol-estérase, la cholestérol-oxydase et la 4-aminoantipyrine (Analyseur AU5800; Beckman Coulter):

La cholestérol-estérase (CE) hydrolyse les esters du cholestérol pour former du cholestérol libre et des acides gras :



La cholestérol-oxydase (CHOD) catalyse ensuite l'oxydation du cholestérol en cholestène-4 one-3 et en  $\text{H}_2\text{O}_2$  :



Le peroxyde d'hydrogène formé conduit au couplage oxydatif du phénol et de la 4-aminoantipyrine (4-AAP) pour former un colorant quinonéimine rouge, la peroxydase (POD) catalyse cette réaction.

L'intensité de la couleur du colorant quinonéimine rouge est directement proportionnelle à la concentration de cholestérol dans l'échantillon. On la mesure avec l'augmentation de l'absorbance à 520 nm.

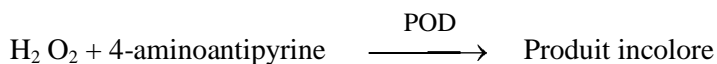
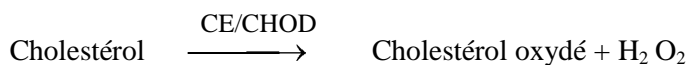
Les valeurs normales: le taux de cholestérol total doit être inférieur ou égal à 2 g/l.

#### IV.2.1.3. Dosage du cholestérol LDL

Par méthode enzymatique colorimétrique (CHOD/PAP) sans prétraitement des échantillons. Le taux du LDL-C peut être dosé directement par l'utilisation des détergents sélectifs, les réactions suivantes résument les deux étapes du dosage (Analyseur AU5800; Beckman Coulter):

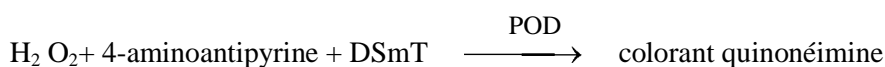
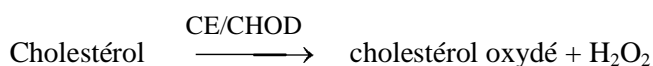
*1<sup>ère</sup> étape:*

HDL, VLDL, chylomicrons + détergent 1  $\longrightarrow$  cholestérol libéré.



*2<sup>ème</sup> étape:*

LDL + détergent 2  $\longrightarrow$  cholestérol libéré



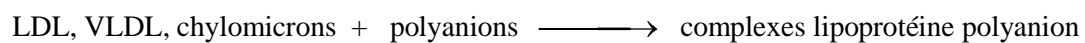
Le second détergent libère le cholestérol des particules de LDL qui sont soumises à la réaction enzymatique en présence du coupleur pour former un produit coloré. L'intensité de la couleur

du colorant quinonéimine rouge est directement proportionnelle à la concentration de cholestérol LDL. On la mesure avec l'augmentation de l'absorbance à 552 nm. Les valeurs normales sont inférieures à 1,30 g/l.

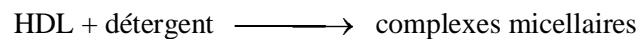
#### IV.2.1.4. Dosage du cholestérol HDL

Par méthode enzymatique colorimétrique (CHOD/PAP) sans prétraitement des échantillons (Analyseur AU5800; Beckman Coulter):

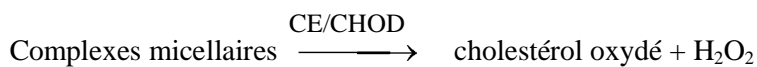
La méthode HDL-Cholesterol direct est basée sur l'adsorption de polyanions synthétiques à la surface des lipoprotéines. Les LDL, les VLDL et les chylomicrons sont ainsi transformés en une forme résistante au détergent, tandis que les HDL ne le sont pas:



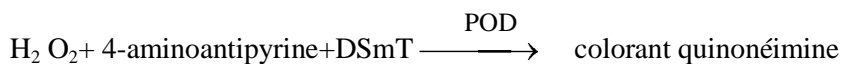
L'action combinée de polyanions et de détergent solubilise le cholestérol des HDL, mais pas celui des LDL, des VLDL et des chylomicrons :



Le cholestérol solubilisé est oxydé par action enzymatique séquentielle de la (CE) et de la (CHOD).



Le peroxyde d'hydrogène formé réagit avec le N, N-bis (4-sulfobutyl)-m-toluidine (DSBmT) et la 4-aminoantipyrine (4-AAP) en présence de peroxydase (POD) pour former un colorant quinoneimine rouge:

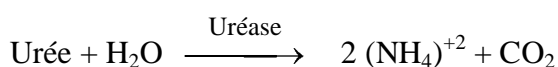


L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de HDL présente dans l'échantillon testé et fait l'objet d'une mesure photométrique (à 552 nm). Les valeurs de références ne doivent pas dépasser au minimum 0,40 g/l. Un HDL-cholestérol inférieur à 0,40 g/l, quel que soit le sexe, constitue un facteur de risque cardiovasculaire.

#### IV.2.1.5. Dosage de l'urée

Dosage par méthode cinétique enzymatique, sur un Analyseur AU5800; Beckman Coulter:

Au cours de la réaction, l'urée est hydrolysée en présence de l'uréase en ammoniacque ( $\text{NH}_4^+$ ) et ( $\text{CO}_2$ ):



L'ammoniac formé réagit ensuite avec l' $\alpha$ -cétoglutarate et le NADH ( $\beta$ -nicotinamide-adénine-dinucléotide réduite) en présence de GLDH (glutamate déshydrogénase) avec formation de L-glutamate et de NAD<sup>+</sup> ( $\beta$ -nicotinamide adénine dinucléotide):



La diminution de NADH est directement proportionnelle à la concentration de l'urée contenue dans l'échantillon. Les valeurs normales de l'urée dans le sang varient de 0,2 à 0,5 g/l.

#### **IV.2.1.6. Dosage de la protéine C-réactive (CRP)**

Les taux de protéine C-réactive dans le plasma peuvent augmenter fréquemment après un infarctus du myocarde, un stress, un traumatisme, une infection, ou une inflammation.

Avec "Beckman Coulter AU System CRP Latex reagent", la CRP peut être mesurée à de très faibles concentrations. La technique est de type immuno-turbidimétrique sur particules de latex recouvertes d'anticorps monoclonaux et présentant des affinités différentes vis-à-vis de la CRP. La concentration en CRP est déterminée par mesure photométrique en point final de la réaction antigène- anticorps.

Les complexes immuns formés en solution dispersent la lumière proportionnellement, à leur taille, leur forme et leur concentration. Les turbidimètres mesurent la réduction de l'incidence de la lumière due à la réflexion, à l'absorption ou à la dispersion. Dans cette procédure, la mesure du taux de diminution de l'intensité lumineuse transmise (augmentation de l'absorbance) par les particules en suspension dans la solution résulte des complexes formés lors de la réaction immunologique entre la CRP du sérum du patient et des anticorps anti-CRP de lapin recouvert de particules de latex. Par conséquent, le résultat de la réaction immunologique du mélange du réactif de latex avec le sérum contenant la CRP conduit à une réaction «Ag-Ac» qui forment un précipité qui est mesuré en turbidimétrie.

La limite critique est: (< 5mg/L).

#### **IV.2.1.7. Dosage de la BNP (Brain natriuretic peptide)**

La concentration plasmatique de BNP; brain natriuretic peptide ou peptide natriuretique humain de type B, augmente physiologiquement ou lors d'insuffisance cardiaque, ou d'un syndrome coronariens aigus (SCA), en réponse à une augmentation de la pression pariétale et de l'étirement du muscle cardiaque.

C'est un dosage immunoenzymatique à deux sites « sandwich », (Analyseur AU5800; Beckman Coulter).

Dans un premier temps, l'échantillon et un conjugué anticorps monoclonal de souris anti-BNP humain – phosphatase alcaline et des particules paramagnétiques revêtues d'un anticorps Omniclonal de souris anti-BNP humain, sont mis en présence. Le BNP présent dans l'échantillon se lie aux microparticules recouvertes d'anticorps de souris anti-BNP immobilisés sur la phase solide, alors le conjugué anticorps de souris anti-BNP réagit spécifiquement avec le BNP lié. Dans un deuxième temps, les matériaux liés à la phase solide

sont retenus grâce à un champ magnétique alors que les matériaux non liés sont éliminés par lavage, après une incubation dans le récipient réactionnel.

L'addition d'un substrat chimiluminescent, le Lumi-Phos®\* 530, au mélange réactionnel permet de produire une lumière par la réaction (réaction chimiluminescente) et est mesurée à l'aide d'un luminomètre.

La production de lumière est directement proportionnelle à la concentration en BNP de l'échantillon.

La valeur référence de BNP est inférieurs ou égale à 100 pg/ml.

#### **IV.2.1.8. L'activité aspartate aminotransférase (ASAT)**

Les transaminases sont des enzymes ayant une activité métabolique à l'intérieur des cellules. Ils existent en deux types (ASAT, ALAT), ces enzymes sont présentes dans plusieurs tissus (foie, cœur, reins, muscles...), reflétant ainsi l'activité du foie et du cœur biologiques, de ce fait, leur augmentation témoigne d'une lésion cellulaire dans ces organes.

Une détermination quantitative de la ASAT et l'ALAT est mesurée sur Analyseur AU5800; Beckman Coulter:

L'aspartate aminotransférase (ASAT) catalyse la transamination de l'aspartate et de l' $\alpha$ -oxoglutarate pour former du L-glutamate et de l'oxalacétate :



L'oxalacétate est ensuite réduit en L-malate par la malate déshydrogénase (MDH), tandis que le NADH est converti simultanément en NAD<sup>+</sup>:



La diminution de l'absorbance due à la consommation de NADH est mesurée à 340 nm et est proportionnelle à l'activité ASAT dans l'échantillon.

Les valeurs usuelles de l'ASAT s'échelonnent de 10 à 40 UI/L pour hommes et de 10 à 35 UI/L pour femmes. Les valeurs de références de l'ALAT oscillent entre 10 et 45 pour hommes et entre 10 et 35 pour femmes.

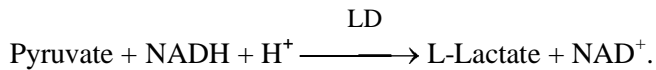
#### **IV.2.1.9. L'activité alanine aminotransférase (ALAT)**

Le principe du dosage du l'ALAT est présenté dans le schéma réactionnel suivant ( Analyseur AU5800; Beckman Coulter):

ALAT transfère le groupe amino de l'alanine à l' $\alpha$ -oxoglutarate pour former du pyruvate et du glutamate:



Le pyruvate entre dans une réaction catalysée par lactate déshydrogénase (LD) avec le NADH pour produire du L-lactate et du NAD<sup>+</sup> :



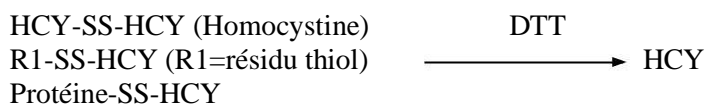
La diminution de l'absorbance due à la consommation de NADH est mesurée à 340 nm et est proportionnelle à l'activité ALAT dans l'échantillon.

#### IV.2.1.10. Dosage de l'homocystéine par le système IMx (Fiche technique, CHU Nancy).

Le dosage de l'homocystéine est déterminé par polarisation de fluorescence (methode FPIA) sur IMx (ABOTT, France) selon une technique immunoenzymatique, basée sur deux principes ; la fixation compétitives à des anticorps et la polarisation de la fluorescence. Ce test inclut une première étape dans laquelle l'homocystéine liée (forme oxydée) est réduite en homocystéine libre, sous l'action de DTT (dithiothreitol). Dans la deuxième étape, l'homocystéine libre est convertie en S-adénosyl-L-Hcy (SAH). Une troisième étape consistant à une compétition entre le SAH et le traceur marqué à la fluorescence :

##### 1. Réduction au DTT

Le DTT est un agent réducteur qui clive les liaisons HCY-HCY, HCY-CYS et HCY-protéines, permettant le dosage de l'Hcy totale. Alors, des formes disulfures de l'homocysteine ou liée aux protéines dans l'échantillon à tester, sont réduites en Hcy libre :



##### 2. Conversion enzymatique

La conversion enzymatique de l'Hcy libre totale en S-adénosyl-L-homocystéine(SAH) en utilisant de la SAH-hydrolase et en présence de l'adénosine en excès:



##### 3. La compétition entre le SAH et le traceur marqué à la fluorescence

L'ajout d'un traceur marqué à la fluorescence à des anticorps monoclonaux, permet à la SAH et au marqueur d'entrer en compétition pour occuper les sites de liaison sur la molécule d'anticorps monoclonal. La concentration en tHcy présente dans l'échantillon est déterminée par la mesure de l'intensité de polarisation de la fluorescence, mesurée par le système optique FPIA.

Le logiciel (Modules système IMx – version 6.0 ou nsupérieure) et le logiciel (Modules Dosages IMx d'exploitation du métabolisme – version 4.0 ou supérieure), sont nécessaires pour le fonctionnement de l'appareil, et ainsi pour effectuer ce dosage

#### **IV.2.1.11. Dosage quantitatif et simultané de la vitamine B12 (Cobalamine) et des folates (vitamine B9) (Fiche technique, CHU Nancy).**

Le dosage radioimmunologique des Vitamine B<sub>12</sub> [<sup>57</sup>Co] / Folates [<sup>125</sup>I] est effectués, grâce au coffret commercial SimulTRAC-SNB de MP Biomedicals. Les taux de vitamine B<sub>12</sub> et de folates sont simultanément déterminés dans un seul tube. Lors de ce test, un complexe de marqueurs de la vitamine B<sub>12</sub> et des folates, les réactifs de liaison et les étalons, disponible sous forme combiné, a été utilisé. Les folates sous forme d'acide ptéroyglutamique (PGA) sert à la fois comme étalon et comme marqueur. Une incubation du mélange à pH de 9,5 (pH de liaison) est nécessaire; l'acide 5-méthyl-tetrahydrofolique (MTFA) de l'échantillon du patient et le PGA des étalons ont une affinité égale pour le réactif de liaison lacté (produit à partir de lait de vache).

En se basant sur le principe de compétition, la vitamine B<sub>12</sub> ou les folates non marquées entrent en compétition avec leurs homologues marqués liés au réactif vis-à-vis un nombre constant de sites de fixation. De ce fait, le taux de radioactivité liée est inversement proportionnel à la concentration de l'échantillon du patient ou de l'étalon. A l'aide d'un compteur gamma de type COBRA-II<sup>TM</sup> autogamma (Packard) à double canal, on pourrait facilement séparer l'énergie produite (les taux) par chacun des deux marqueurs: [<sup>57</sup>Co] pour la vitamine B<sub>12</sub> et [<sup>125</sup>I] pour les folates.

Ce coffret (SimulTRAC-SNB de MP Biomedicalis) utilise un facteur intrinsèque purifié (FT), qui se lie spécifiquement à la cobalamine. Après élimination de protéine R (qui possède une forte affinité aux analogues de la cobalamine dans le plasma humain) par chromatographie d'affinité il ne restera que le (FT) purifié disponible pour cette liaison. Par conséquent, le (FT) permet de mesurer de façon exacte le taux de la cobalamine dans le plasma à tester. Ainsi, le même principe est appliqué pour les folates, le (FT) purifié et le réactif de liaison lacté des folates ont été fixés de façon covalente sur un support solide.

Notant que durant cette procédure, les réactifs de liaison sériques endogènes pour la vitamine B<sub>12</sub> et pour les folates sont détruits après incubation de 15 minutes avec le marqueur/DTT, suivie d'une réaction d'extraction durant 10 minutes à un pH alcalin.

Les dosages sont déterminés par référence aux courbes d'étalonnage. La courbe pour la vitamine B<sub>12</sub> et les résultats sont calculés à partir des valeurs obtenus par comptage du Cobalt 57 ; et par comptage de l'Iode 125 pour les folates (**Fiche technique, CHU Nancy**).

#### **IV.2.2. Recherche de la mutation**

##### **IV.2.2.1. Extraction d'ADN (annexe II)**

L'ADN génomique a été isolé des leucocytes (cellules nucléées) à partir de 5 ml de sang total prélevé sur des tubes EDTA. L'extraction se fait grâce au kit BACC nucléon 3 ® commercialisé par Amersham Biosciences.

Après hémolyse du sang par une solution hypotonique dans des tubes coniques (Falcon), les étapes de l'extraction sont les suivantes:

**Protocole d'extraction (Extraction ADN, kit BACC nucléon 3 ®, Fiche technique CHU Nancy).**

**Lyse des Globules rouges (hémolyse),** la lyse est réalisée comme suit;

- Ajouter 4 volumes de réactif A (solution hypotonique) dilué (1/4) à un volume du culot sanguin, mélanger 4 mn à température ambiante sur la plaque tournante.
- Centrifuger pendant 5 mn à 1300 g.
- Rejeter le surnageant à la pompe à vide.
- Ajouter 1 ml de réactif A, puis agiter et mettre dans la glace pendant 5mn.
- Centrifuger pendant 5 mn à 1300.
- Rejeter le surnageant à la pompe à vide.
- Garder le culot

**Lyse des globules blancs (destruction des membranes des globules blancs)**

NB : En fonction du culot faire un ½ protocole ou un mini protocole.

Pour le demi-protocole:

- ┆ Ajouter 1ml réactif B (limpide).
- ┆ Vortexer jusqu'à dissocier le culot.
- ┆ Rajouter 250 µl du perchlorate.
- ┆ Agiter par retournement 7 fois environ.

Pour le mini-protocole:

- ┆ Ajouter 350 µl réactif B (limpide).
- ┆ Vortexer jusqu'à dissocier le culot.
- ┆ Rajouter 100 µl perchlorate.
- ┆ Agiter par retournement 7 fois environ.

**Élimination des protéines**

Pour le demi-protocole:

- ┆ Ajoutez 1 mL du chloroforme.
- ┆ Agiter par retournement 7 fois environs.
- ┆ Ajoute 150 µl de résine vortéxée.
- ┆ Centrifuger pendant 5 mn à 1300 g.
- ┆ Formation de deux phases; une phase supérieur à la résine, la phase aqueuse contenant l'ADN et une phase organique comprends les protéines hydrophobes et les lipides à éliminer.

Pour le mini-protocole

- ┆ Ajoutez 600 µl du chloroforme (solvant des protéines hydrophobes et piège les protéines au fond du tube).
- ┆ Agiter par retournement 7 fois environs.
- ┆ Ajoute 100 µl de résine vortéxée.
- ┆ Centrifuger pendant 5 mn à 1300 g.

- ‡ Formation de deux phases; une phase supérieure à la résine, la phase aqueuse contenant l'ADN et une phase organique comprends les protéines hydrophobes et les lipides à éliminer.

### **Récupération de l'ADN**

- ‡ Dans un autre falcon de 15 ml, on récupère la phase aqueuse (ADN).
- ‡ Ajouter le même volume d'éthanol absolu froid (à  $-20^{\circ}\text{C}$ ) pour 400  $\mu\text{l}$  à 2 ml de la phase aqueuse récupérée dans l'étape précédente puis agiter.
- ‡ Récupération du filament d'ADN avec une tige en plastique, et le transvaser dans un eppendorf.

### **Solubilisation de l'ADN extrait**

- ‡ Dans un gros eppendorf, ajouter du TE Buffer 1X (de 50  $\mu\text{l}$  à 600 $\mu\text{l}$  selon la pelote d'ADN).
- ‡ Agiter 2 heures sur la plaque tournante.

#### **IV.2.2.2. Détermination de la pureté et la concentration de l'ADN**

La qualité et la concentration de l'extrait sont cruciales pour une analyse réussie par la PCR en temps réel (RT-PCR). Dans le cas où l'ADN est contaminé, ce dernier ne laisserait pas aboutir à un bon résultat dans les étapes suivantes, il est donc nécessaire de procéder à la réextraction de la pelote de l'ADN afin d'obtenir la pureté souhaitée. Aussi, une surconcentration de l'ADN peut conduire à une inhibition de la réaction de PCR.

#### ***Détermination de la pureté***

- L'ADN absorbe à 260 nm alors que les protéines (témoins de contamination) absorbent à 280 nm.
- Une dilution de l'échantillon au 1/100 dans l'eau distillée (10  $\mu\text{L}$  de l'ADN solubilisé dans 990  $\mu\text{L}$  de l'eau stérile).
- Les DO (densité optique) sont lues par spectrophotométrie UV-visible, dans le même type de cuve que celle ayant servi à faire le zéro (eau stérile) à 260 et à 280 nm.

La pureté de l'extrait est évaluée par le rapport  $\text{DO}_{260} / \text{DO}_{280}$ , 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  $R = \text{DO}_{260} / \text{DO}_{280}$  se situe entre 1.8 et 2. ce qui est le cas de tous nos échantillons.
- ‡ L'ADN est contaminé par des protéines si  $R < 1.8$
- ‡ L'ADN est contaminé par les ARN quand  $R > 2$ .

NB; Si le  $R < 1.8$  ou  $> 2$ : indique une contamination par les protéines ou prélèvement de mauvaise qualité. Ces contaminations diminuent l'activité des enzymes utilisées lors de la PCR et créent des hybridations non souhaitables.

### ***Détermination de la concentration***

La concentration d'ADN a été mesurée par lecture de l'absorbance à 260 nm sur un spectrophotomètre UV-Visible couplé à une imprimante, en utilisant des cuves en quarts. Elle est donnée par le tableau directement, et calculer par la formule suivante;

$$ADN \text{ (ng/}\mu\text{l)} = A_{260\text{nm}} \times \text{facteur de dilution} \times 50$$

Sachant que;

- 1 unité de  $DO_{260 \text{ nm}} = 50 \mu\text{g/ml}$  d'ADN double brin.
- Dans notre protocole, le facteur de dilution est égal à 19, la concentration était comprise entre 200 et 900  $\mu\text{g/ml}$ .

### **IV.2.2.3. Amplification d'ADN par PCR**

La PCR est l'abréviation anglaise de polymerase chain reaction, l'amplification en chaîne par polymérase, est une méthode de biologie moléculaire conduit à l'amplification *in vitro* de plusieurs millions de fois une séquence spécifique d'acide nucléique. Cette technique mise au point par le scientifique américain Karry Mullis en 1985 (Prix Nobel dès 1993). Depuis son invention, la PCR est devenue la technique la plus utilisée pour la détection de l'ADN et de l'ARN.

#### ***Principe de la technique***

La technique de PCR permet de réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN, en multipliant spécifiquement le segment d'ADN d'intérêt (aussi appelé ADN cible). Pour initier le processus, des amorces (ou *primer*) oligonucléotidiques de 20 à 25 nucléotides, dont les extrémités 3' pointent l'une vers l'autre s'hybrident de part et d'autre de la séquence à amplifier. La synthèse du nouveau brin se fait à l'aide de l'ADN polymérase (Taq polymérase), dans le sens 5' vers 3'. Le nombre de brins obtenus à la fin du premier cycle est le double du nombre de brins initialement présents. Chaque brin servira à son tour de matrice pendant le second cycle. De ce fait, la PCR permet à chaque cycle de

L'ADN bicaténaire est déroulé en ADN monocaténaire, puis dupliqué et ré-enroulé, selon des cycles répétitifs comprenant les trois étapes suivantes:

**La dénaturation thermique de l'ADN:** C'est la séparation des deux brins d'ADN, obtenue par élévation de la température comprise entre 93 et 96°C. les liaisons d'hydrogènes sont rompues et les 2 brins de l'ADN se séparent et l'ADN passe sous forme simple brin dans le milieu.

**Hybridation des amorces** à l'ADN cible, de deux oligonucléotides utilisés comme amorces, chacune complémentaire d'un des 2 brins. La température permettant la fixation des amorces sur les monobrins d'ADN est comprise entre 50°C et 65°C. Il

s'agit d'un couple d'amorces, complémentaire encadrant le fragment d'ADN à amplifier.

- **Extension des amorces** de la chaîne d'ADN par addition de nucléotides à partir des amorces en utilisant une enzyme polymérase, la Taq polymérase qui allonge les amorces en y incorporant les désoxyribonucléotides complémentaires de la séquence de la matrice auquel elle est hybridée. Cette étape s'effectue à une température de 72°C.

#### **IV.2.2.4. Recherche de la mutation C677T et A1298C du gène MTHFR par PCR en temps réel (RT-PCR)**

##### **a. Principe du RT-PCR**

En 1992, Russell Higuchi fut l'un des premiers à faire l'analyse des cinétiques de la PCR en élaborant un système qui détectait le produit de la PCR au fur et à mesure qu'il s'accumulait. La PCR quantitative en temps réel repose sur la possibilité de suivre au cours du temps « en temps réel » le processus de PCR à l'aide de la fluorescence. Elle est basée sur la détection et la quantification d'un «reporter» fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à (portion d'ADN définie par un couple d'amorces) générés durant chaque cycle, à l'opposé de la PCR quantitative conventionnelle où les amplicons ne sont (Elyse Poitras et Alain Houde, 2002). Donc, on suit la cinétique de formation d'amplicons en temps réel via un signal fluorescent. Le développement de la PCR quantitative en temps réel a permis de recueillir les données quantitatives avec précision, et de façon fiable et routinière. Le processus complet est automatisé du début à la fin rendant cette technologie très performante pour des applications d'analyses à grande échelle.

##### ➤ *Courbe de fusion*

La courbe de fusion est obtenue par dénaturation des duplex produits de PCR/sondes d'hybridation en fin de PCR. L'analyse de cette courbe de fusion permet de détecter une variation nucléotidique grâce à la température de fusion de ces duplex.

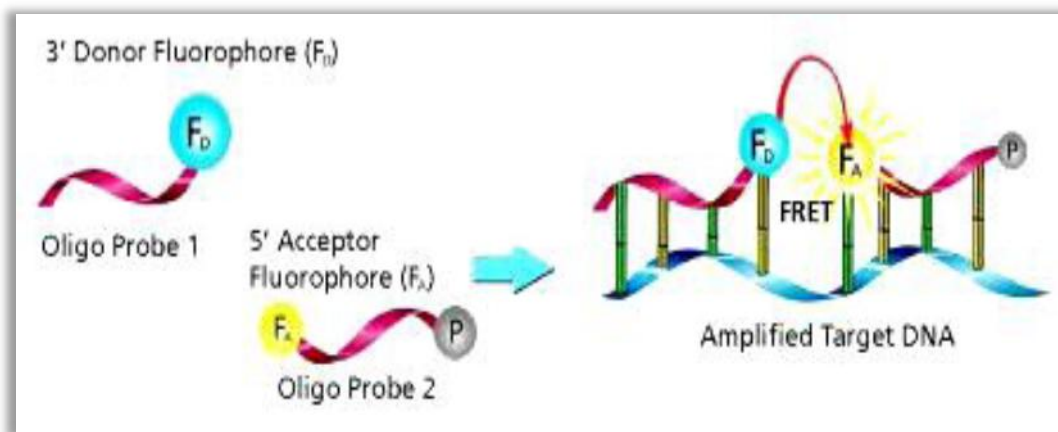
Après la PCR, la température est rapidement élevée à 95°C pour dénaturer les produits de PCR, puis la température est abaissée progressivement pour favoriser l'hybridation des sondes avec les produits de PCR. La température est ensuite élevée très lentement de 45°C à 85°C (0,1°C/sec). La fluorescence est lue en continu pendant cette dénaturation très progressive des duplex : on obtient une courbe de fusion.

1. pour les températures faibles (inférieures à la température de fusion), les sondes sont hybridées sur la région cible, le fluorochrome émet une fluorescence par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert);
2. quand la température augmente, une partie des duplex commencent à se dénaturer, les sondes s'éloignent les unes des autres, le phénomène de FRET diminue progressivement;

3. Une fois la température de fusion atteinte, 50 % des duplex sont dénaturés. Lorsque la séquence de la région cible est différente de celle d'une des deux sondes d'hybridation, il y a formation d'un hétéroduplex avec une température de fusion plus faible que celle de l'homoduplex (**Fiche technique; utilisation Light Cycler 480 II, CHU de Nancy**).

➤ *FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert)*

Les deux sondes (donneur et accepteur) s'hybrident sur leur région cible spécifique, elles sont très proches l'une de l'autre. Le fluorochrome de la sonde donneur est excité par une longueur d'onde adéquate, l'énergie est transférée par FRET du donneur à l'accepteur. L'appareil détecte la fluorescence émise par l'accepteur. L'intensité de fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'ADN cible (**Fiche technique; utilisation Light Cycler 480 II, CHU de Nancy**).



#### IV.2.2.5. Analyse des polymorphismes C677T et A1298C de la MTHFR

Le génotypage des mutations C677T, et A1298C du gène MTHFR a été déterminés en utilisant la PCR en temps réel-FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) (Real-Time PCR-FRET), il est réalisé sur l'instrument Light Cycler® 480 II (Roche Diagnostic, Meylan, France) (**Ririe et al., 1997; Vossen et al., 2009**). L'analyse génétique des polymorphismes a été effectuée pour la population saine et pour la population des malades d'après une courbe d'analyse de fusion performée dans des tubes capillaires Light Cycler® préalablement refroidi, avec un Kit de détection de chaque polymorphisme.

Un fragment de 233 bp du gène de la MTHFR est amplifié à partir d'ADN génomique humain, à l'aide d'un couple d'amorces spécifiques, et avec l'utilisation de deux sondes fluorescentes; HybProbe spécifiques et complémentaire du fragment recherché, afin de détecter et de définir le génotype de l'ADN amplifié:

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

Amorce sens: 5'TGGCAGGTTACCCCAAAGG 3'

Amorce anti -sense : 5'TGATGCCCATGTCGGTGC 3'

Les séquences hybridation probe sont :

Prob Flu 5'- TGAGGCTGACCTGAAGCACTTGAAGGAGAAGGTGTC 3'

Prob Red 5'- CGGGAGCCGATTTTCATCAT 3'

Concernant le polymorphisme de la MTHFR A1298C, les amorces sens et anti-sens utilisées sont :

Amorce sens : 5'- CTTTTGGGAGCTGAAGGACTACTAC 3'

Amorce anti-sens : 5'- CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG 3'

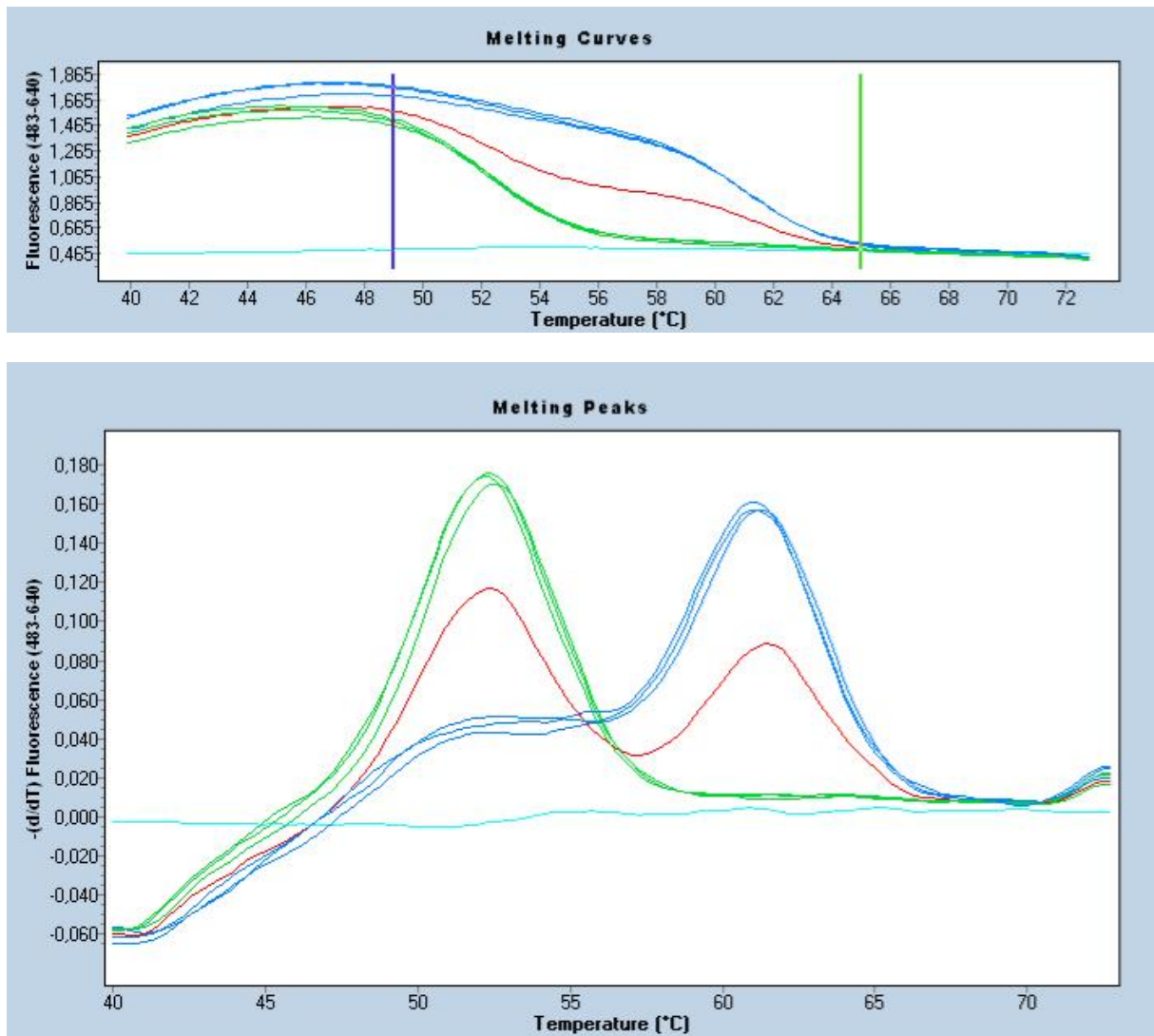
Les séquences hybridation probe sont :

Prob Flu : 5'- AAGGAGGAGCTGCTGAAGATGTGGGGGGAGGAGCT 3'

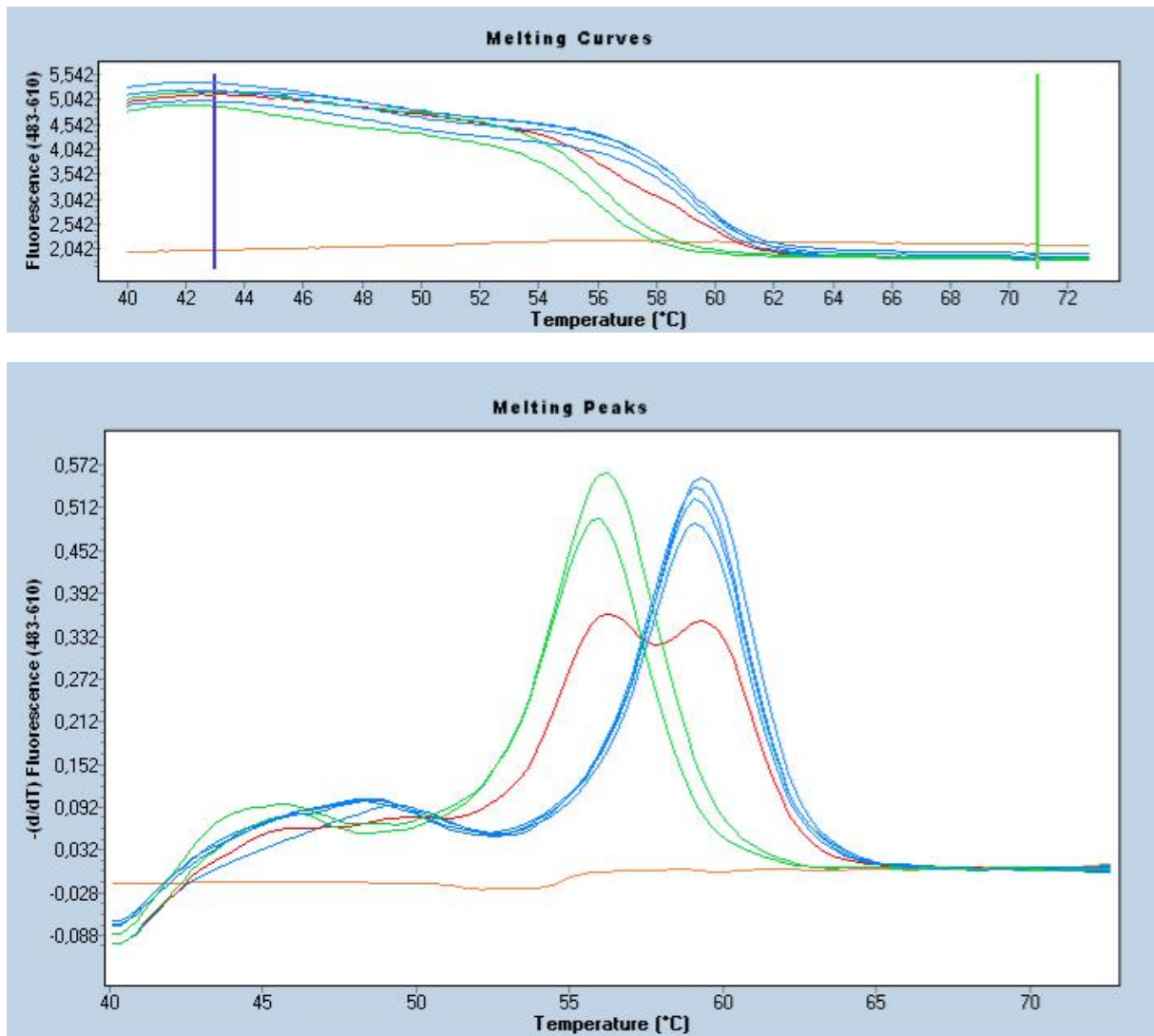
Prob Red: 5'- ACCAGTGAAGAAAGTGTCTTTGA 3'

Dans chaque capillaire, déposer 8µl de mixture d'amplification (la quantité de chaque composant est multipliée par le nombre de tubes voulu plus un autre), et rajouter ensuite 2µl de DNA (la concentration comprise entre 50 et 100 ng /analyse). Enfin, centrifuger la plaque rapidement à 1500g (2730rpm) pendant 2mn; la placer dans le portoir du Light Cycler®. Les protocoles d'amplification sont résumés sur les fiches techniques (n°2), annexe III.

la PCR comprend un cycle initial de dénaturation à 95 °C durant 10 minutes (mn) suivi de 45 cycles de PCR comprenant chacun; une dénaturation à 95 ° C pendant 10 (sec), une hybridation à 55 ° C durant 10 (sec) et une extension à 72 ° C durant 10 (sec). La courbe de fusion (*melting curves*) nécessite une étape de 30 (sec) à 95°C, de 2 (mn) à 40°C et de 0 (sec) à 73°C puis, enfin un refroidissement à 40 ° C pendant 30 (sec) termine le cycle, afin de permettre la fusion progressive des doubles brins d'ADN et des sondes. Les températures de fusion ou (*melting Temperature*) (Tm) pour les trois génotypes de MTHFR1 C677T sont respectivement: Génotype sauvage (CC): 61° C; homozygote muté (TT): 53° C; hétérozygote (CT): 51°C + 63°C. Les températures de fusion pour les trois génotypes de MTHFR2 A1298C sont respectivement: Génotype sauvage (AA): 59°C; homozygote mutée (CC): 56°C; hétérozygote (AC): 56°C + 59°C. Le résultat de l'analyse des polymorphismes est présenté sous forme d'un profil de courbe de fusion (*melting curves*) pour le génotype homozygote sauvage, homozygote mutant ou hétérozygote, et se différencie par divers pics de fusion (Tm). **Figure 20, 21.**



**Figure 20.** Détermination du polymorphisme génétique de la MTHFR 1 avec PCR en temps réel (courbe de fusion pour les génotypes de l'enzyme). En vert ; l'homozygote muté (TT), en bleu ; l'homozygote sauvage (CC), en rouge ; l'hétérozygotes (CT).



**Figure 21.** Détermination du polymorphisme génétique de la MTHFR 2 avec PCR en temps réel (courbe de fusion pour les génotypes de l'enzyme). En vert ; l'homozygote muté (CC), en bleu ; l'homozygote sauvage (AA), en rouge; l'hétérozygotes (AC).

## IV.2. Analyse statistique

Les données ont été exprimées en pourcentage et fréquences pour les variables qualitatives. Le test du Chi-deux de Pearson a été utilisé pour comparer ces variables qualitatives.

Pour les variables quantitatives les données ont été exprimées en moyenne  $\pm$  écart type, les multiples comparaisons entre les variables continues ont été calculé par le test Kruskal Wallis, one-way analysis of variance (ANOVA) et Mann-Whitney.

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

Tous les données ont été analysées à l'aide du logiciel (SPSS) (*Statistical Package for the Social Sciences*) (version 23.0.0.0-2015 pour Windows, SPSS Inc., Chicago, IL).tics.

Le seuil de significativité a été fixé à 0.05. (Une valeur P inférieure à 0.05 est considérée comme statistiquement significative).

## V. Résultats

### V.1. Description de la population témoin et fréquences de différents facteurs de risque

#### V.1.1. Les caractéristiques cliniques et biochimiques des sujets témoins selon le polymorphisme du MTHFR C677T

L'échantillon de la présente étude regroupe 94 sujets sains (témoins) répartis en 64 hommes (68,08%) et 30 femmes (31,91%). La proportion des femmes est comparativement faible. L'âge dans notre population s'échelonne de 18 à 83 ans, avec une moyenne générale de  $33,79 \pm 16,72$  (ans), l'âge moyen des hommes est  $29,46 \pm 15,6843$  (ans) et celui des femmes; est de  $43,03 \pm 15,28$  (ans). **Le tableau 02** ne montre aucune différence significative des moyennes d'âge entre les différents génotypes CC, CT, TT du polymorphisme C677T, leurs résultats sont comme suit : CC (n=44),  $33,70 \pm 16,79$  (ans), CT (n= 39)  $34,25 \pm 17,03$  (ans), TT (n=11)  $32,54 \pm 17,13$  (ans), (P=0,753).

La classification de nos sujets témoins en deux groupes selon l'homocystéinémie (**Tableau 02**), a permis d'enregistrer une différence très significative de distribution du nombre des cas de l'hyperhomocystéinémie modérée (16-30  $\mu\text{mol/L}$ ) et intermédiaire (31-100  $\mu\text{mol/L}$ ) entre les différents génotypes du polymorphisme C677T du MTHFR (P=0,005): un bon nombre de cas (21 cas) ont été observés chez le génotype hétérozygote (CT), 8 et 24 cas pour l'homozygote muté (TT) et sauvage (CC) respectivement. L'hyperhomocystéinémie modérée et intermédiaire étaient significativement associées au polymorphisme C677T.

L'analyse de comparaison des moyennes des différents paramètres lipidiques plasmatiques ne montre aucune différence significative entre ces sous-groupes : Chol T (P= 0,649), Trigly (P=0,719), HDL Chol (P=0,506), LDL Chol (P=0,711). Leurs valeurs se situent dans l'intervalle d'un bilan normal.

En revanche, la différence entre les concentrations des moyennes de l'Urée, la BNP ne semble pas statistiquement significative (P=0,787, P= 0,9480, P=0,128 respectivement), les mêmes résultats ont été trouvés concernant les transaminases ASAT, ALAT, (P=0,151, P=0,777 respectivement). Ce qui exclut l'existence d'une association significative entre l'ensemble de ces paramètres biochimiques et le polymorphisme C677T chez nos sujets témoins. Les concentrations moyennes obtenues sont de la catégorie d'un bilan normal ceci indique que la fonction rénale, cardiaque et hépatique est intacte. A propos du taux de la CRP, il est légèrement supérieur à la limite critique (< 5mg/L). Cependant la différence de la concentration entre les trois génotypes reste non significative (P= 0,128).

**Tableau 02.** Les caractéristiques cliniques et biochimiques des sujets témoins selon le polymorphisme du MTHFR C677T.

Génotype	CC (n=44)	CT (n= 39)	TT (n=11)	Total (n=94)	P value
Age (ans)	33,70±16,79	3 4,25±17,03	32,54±17,13	33,79±16,72	0,753 <sup>a</sup>
Hyperhomocystéinémie modérée (16-30 µmol/L), n	20	16	2	38	<b>0.005<sup>b**</sup></b>
Hyperhomocystéinémie Intermédiaire (31-100 µmol/L), n	4	5	6	15	
Chol T (g/L)	1.47±0.35	1.51±0,45	1.56±0.31	1.50±0.39	0.649 <sup>a</sup>
Trigly (g/L)	1.18±0.69	1.09±0.48	1,13±0,75	1.13±0.61	0.719 <sup>a</sup>
HDL Chol (g/L)	0.36±0.09	0.40±0.13	0,42±0,13	0.38±0.11	0.506 <sup>a</sup>
LDL Chol (g/L)	0.87±0.30	0.89±0.42	0,91±0,25	0.88±0.35	0.711 <sup>a</sup>
ASAT( UI/L)	43.86±16.61	43.07±13.11	49,09±9,84	44.06±14.62	0.151 <sup>a</sup>
ALAT( UI/L)	17.52±14.70	14.48±6.67	13,90±4,67	15.88±11.26	0.777 <sup>a</sup>
Urée (g/L)	0.34±0.15	0.33±0.12	0,32±0,04	0.33±0.13	0.787 <sup>a</sup>
BNP (pg/mL)	1.59±1.97	1.64±2.50	1,52±1,18	1.58 ±1.88	0.948 <sup>a</sup>
CRP(mg/L)	9.25±24.91	7.06±18.53	1,70±2,16	7.44±20.50	0.128 <sup>a</sup>

Tous les paramètres sont exprimés en (moyenne ± sd). (<sup>a</sup>) Test de Kruskal-Wallis. (<sup>b</sup>) Test de Chi-carré.  $P < 0,05$  est considéré comme statistiquement significatif (\*).

#### V.1.1.1. Répartition des fréquences génotypiques et alléliques de la mutation C677T du gène MTHFR selon le sexe dans la population témoin.

Les résultats issus de l'analyse génétique de la distribution des différents génotypes du polymorphisme MTHFR C677T en fonction du sexe sont représentés dans le **tableau 03** ci-dessous.

**Tableau 03.** Répartition des fréquences génotypiques et alléliques de la mutation C677T du gène MTHFR selon le sexe dans la population témoin.

	Hommes (n= 64)	Femmes (n= 30)	Total	P value
<b>Fréquence</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	
<b>Génotype sauvage</b>	32 (50)	12(40)	44(46.48)	
<b>CC</b>				
<b>Hétérozygote</b>	24 (37.5)	15 (50)	39 (41.8)	0.518 <sup>a</sup>
<b>CT</b>				
<b>Homozygote</b>	8 (12.5)	3 (10)	11(11.70)	
<b>TT</b>				
<b>Allèle C</b>	88 (68.75)	39 (65)	127(67.55)	
<b>Allèle T</b>	40 (31.25)	21(35)	61(32.45)	

(<sup>a</sup>) Pearson Chi-square test.  $P < 0,05$  est considéré comme statistiquement significatif (\*).

Chez 94 sujets témoins de la présente étude, les porteurs du polymorphisme C677T MTHFR étaient: 32 (50%) hommes et 12 (40%) femmes ayant le génotype homozygote sauvage (CC). 24 (37. 5%) hommes et 15 (50%) femmes avaient le génotype hétérozygotes (CT). 8 (12. 5%) hommes et 3 (10%) femmes portaient le génotype homozygotes muté (TT), comme le montre

le tableau ci-dessus **03**. La fréquence allélique de l'allèle T et C dans cette population d'étude est respectivement 40 soit 31.25% pour les hommes, 21 soit 35% pour les femmes, celle de l'allèle C était 88 soit 68.75% pour les hommes, 39 soit 65% pour les femmes.

Le génotype le plus fréquemment observé chez les hommes était l'homozygote sauvage (CC), suivi par l'hétérozygote (CT), le génotype homozygote muté (TT) avait la fréquence la plus basse. Cependant chez les femmes, le premier génotype noté était l'hétérozygote (CT), suivi par le génotype sauvage (CC) et enfin le dernier génotype c'était l'homozygote (TT).

Nous avons comparé les fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme C677T du gène MTHFR entre les hommes et les femmes, comme indiqué dans le **tableau 03**, aucune différence statistiquement significative n'a été trouvée dans les distributions des fréquences génotypiques entre les deux sexes dans cette population ( $P = 0.518$ ).

#### V.1.1.2. L'influence du sexe sur les concentrations du folate, vitamine B<sub>12</sub> et de l'homocystéine totale chez les témoins

Les résultats de la variation des paramètres biochimiques en fonction du sexe sont décrits dans le **tableau 04**, ci- dessous:

**Tableau 04.** L'influence du sexe sur les concentrations du folate, vitamine B<sub>12</sub> et de l'homocystéine totale chez les témoins.

	<b>Hommes</b> (n= 64)	<b>Femmes</b> (n= 30)	<b>P value</b> (P pour différence par sexe)
<b>Age (ans)</b>	29.46±15.68	43.03±15.28	0.112 <sup>a</sup>
<b>Folate (nM)</b>	10.22±4.94	24.04±69.73	0.192 <sup>a</sup>
<b>Vitamine B<sub>12</sub> (pM)</b>	191.06±156.13	220.08±92.35	<b>0.001</b> <sup>a **</sup>
<b>Homocystéine Total</b> <b>(µmol/L)</b>	23.21±11.90	14.56±7.21	0.114 <sup>a</sup>

Tous les paramètres sont exprimés (moyenne ± sd).<sup>(a)</sup> test ANOVA .( $P < 0.05$ ) (\*).

D'après nos résultats, l'âge moyen de nos sujets du sexe masculin était 29,46±15,68 (ans), avec un âge minimal de 18 ans et un âge maximal de 83 ans. Chez le sexe féminin, l'âge moyen était 43,03±15,28, avec un âge minimal de 19 ans et un âge maximal de 82 ans.

L'analyse biochimique du statut en folate, vitamine B<sub>12</sub> et homocystéine total (tHcy) de l'échantillon de la présente étude en fonction du sexe, n'a montré aucune différence significative du taux de folate et d'homocystéine totale, entre les deux sexes ( $P=0.192$   $P=0,114$  respectivement). En effet, il y'a une augmentation du taux de folate chez les femmes (24.04±69.73 nM) par rapport aux hommes (10.22±4.94 nM), ainsi qu'une augmentation du folate chez les hommes (23.21±11.90 µmol/L) comparativement aux femmes (14.56±7.21µmol/L), l'hyperhomocystéinémie de grade modérée observée, était associée au sexe masculin. Cependant, ces augmentations de concentrations notées restent statistiquement non significatives.

Tandis que le niveau de la vitamine B<sub>12</sub> révèle une augmentation très significative (P=0,001), chez les femmes (220.08±92.35 pM) par rapport aux hommes (191.06±156.13 pM). Alors, l'élévation de la vitamine B<sub>12</sub> est significativement liée au sexe féminin, chez nos témoins.

(La variation du taux de folate reste dans l'intervalle des valeurs normales (2,3 - 45 nM. Ainsi les concentrations de la vitamine B<sub>12</sub> oscillent dans l'intervalle des valeurs de référence ;74 - 1480 pM).

### V.1.1.3. La distribution de la concentration plasmatique du folate, vitamine B<sub>12</sub> et de l'homocystéine totale selon les génotypes du polymorphisme C677T MTHFR

La distribution des concentrations plasmatique de l'homocystéine totale, folate et vitamine B<sub>12</sub> selon les génotypes du polymorphisme C677T de la MTHFR tel qu'illustré dans le **tableau 05**, ci -dessous :

**Tableau 05.** La distribution de la concentration plasmatique du folate, vitamine B<sub>12</sub> et de l'homocystéine total selon les génotypes du polymorphisme C677T MTHFR

	CC (n= 44 )	CT(n= 39 )	TT(n= 11 )	Total (n=94)	P value
<b>Folate (nM)</b>	18.50±5.92	12.10±6.47	8.07±4.40	14.63±5.31	0.063 <sup>a</sup>
<b>Vitamine B<sub>12</sub> (pM)</b>	191.52±166.50	196.30±103.64	198.54±145.71	194.32±139.66	0.827 <sup>a</sup>
<b>Homocystéine Total(µmol/L)</b>	18.54±7.71	18.33±8.55	36.84±19.59	20.42±11.33	0.062 <sup>a</sup>

Tous les paramètres sont exprimés (moyenne ± sd). (<sup>a</sup>) Test de Kruskal-Wallis. (P<0.05) (\*).

La comparaison de la concentration du folate entre les trois génotype du polymorphisme C677T, représentée sur le **tableau 05**, ne montre aucune différence significative (P=0.063) entre ces différents sous-groupes, néanmoins nous avons enregistré des taux plus bas chez les variants mutés CT et TT (12.10 ± 6.4 nM, 8.07±4,40 nM) en respectives, comparativement aux homozygotes sauvages (CC) 18.50±5.92 (nM), cela témoigne l'effet délétère du polymorphisme C677T MTHFR, notamment du variant muté (T) sur les taux du folate.

Similairement, les niveaux de l'homocystéine totale ne diffèrent pas statistiquement, entre les divers génotypes du polymorphisme C677T MTHFR, une hyperhomocystéinémie de grade modérée a été enregistrée pour les génotypes (CC), (CT) et intermédiaire pour le génotype muté (TT), un taux élevé de l'homocystéine total a été observé notamment chez les porteurs du génotype (TT) (36.84±19.59µmol/L) contre chez ceux de génotypes (CC) et (CT), 18.54±7,71µmol/L, 18.33±8,55µmol/L respectivement, cela témoigne aussi un effet délétère du variant muté (T) de ce polymorphisme sur les concentration de l'homocystéine.

En revanche, nous constatons que le taux de la vitamine B<sub>12</sub> n'est pas significativement différent entre les trois génotypes du polymorphisme C677T de MTHFR (P =0,827).

Il est utile de mentionner que les concentrations du folate et de la vitamine B<sub>12</sub> oscillent dans l'intervalle des valeurs de référence.

#### V.1.1.4. Corrélation entre l'homocystéine totale, folate et l'âge moyen.

Les corrélations entre l'homocystéine totale, folate, vitamine B<sub>12</sub> et l'âge moyen en fonction de différents génotypes du polymorphisme C677T, ont été calculées par les coefficients de corrélation de Pearson, qui ont été ajustés avec l'homocystéine totale (**Tableau 06**):

**Tableau 06.** Corrélation entre l'homocystéine totale, folate, vitamine B<sub>12</sub> et l'âge moyen

	CC (n=44 )		CT(n=39 )		TT(n= 11 )		Total (n= 94 )	
	r	P	r	P	r	P	r	P
<b>Folate (nM)</b>	-0.174	0.295	-0.207	0.213	-0.490	0.151	-0.129	0.220
<b>Vitamin B-12 (pM)</b>	0.086	0.586	-0.115	0.510	-0.724	0.925	-0.077	0.484
<b>Age</b>	0.053	0.734	-0.160	0.331	-0.662	<b>0.035*</b>	-0.157	0.133

*Le test de corrélation de Pearson a été utilisé pour établir les relations entre le tHcy, le folate et l'âge moyen, (\*) significatif à P<0.05.*

Les taux de tHcy étaient inversement proportionnels à la concentration du folate; les corrélations dans les génotypes CC, CT, TT du gène MTHFR étaient toutes non significatives (r= -0.174, P= 0.295, r= -0.207, P= 0.213, r= -0.490, P= 0.151 respectivement), ainsi que pour le nombre total des sujets (r= -0.129, P=0.220).

De même, les taux de tHcy étaient inversement proportionnels à la vitamine B<sub>12</sub> dans les génotypes (CT, TT), mais corrélée positivement pour le génotype (CC) et cette corrélation reste non significatives (r=-0.115, P=0.510, -0.724, P=0.925, r=0.086, P=0.586 respectivement). Une corrélation négative non significative a été observée pour l'ensemble des sujets (r= -0.077, P=0.484).

De plus, l'analyse statistique a révélée qu'il y avait un lien significatif entre le tHcy et l'âge et cela a été corrélé négativement dans le génotype (TT), (r=-0,662, P=0.035). Cependant, le tHcy s'élève continuellement avec l'âge dans le génotype (CC), mais cette corrélation n'apparaît pas significative, (r=0.053, P= 0.734). Une relation négative non significative a été remarquée pour la totalité des sujets témoins (r= -0.157, P= 0.133).

#### V.1.2. Les caractéristiques cliniques et biochimiques des sujets témoins selon le polymorphisme du MTHFR A1298C.

Les caractéristiques cliniques et biochimiques des sujets sains selon le polymorphisme A1298C de la MTHFR sont décrites dans le tableau suivant (**Tableau 07**) :

**Tableau 07.** Les caractéristiques cliniques et biochimiques des sujets témoins selon le polymorphisme du MTHFR A1298C

Génotype	AA (n=60)	AC (n=27)	CC (n=07)	Total (n=94)	P value
Age (ans)	33.88±16.91	33.14±15.96	35.57±20.29	33.79±16.72	0.915 <sup>a</sup>
Hyperhomocystéinémie modérée (16-30 umol/L), n	24	11	3	38	0.409 <sup>b</sup>
Hyperhomocystéinémie Intermédiaire (31-100 umol/L), n	12	3	0	15	
Chol T (g/L)	1.50±0.41	1.48±0.35	1.56±0.37	1.50±0.39	0.662 <sup>a</sup>
Trigly (g/L)	1.04±0.49	1.29±0.81	1.38±0.51	1.13±0.61	0.096 <sup>a</sup>
HDL Chol (g/L)	0.39±0.12	0.37±0.10	0.37±0.05	0.38±0.11	0.822 <sup>a</sup>
LDL Chol (g/L)	0.90±0.38	0.85±0.29	0.90±0.29	0.88±0.35	0.813 <sup>a</sup>
ASAT (U/L)	41.83±12.67	45.40±14.03	58.00±24.39	44.06±14.62	0.089 <sup>a</sup>
ALAT(U/L)	13.93±5.59	20.14±18.55	15.57±6.75	15.88±11.26	0.365 <sup>a</sup>
Urée(g/L)	0.33±0.13	0.33±0.11	0.37±0.16	0.33±0.13	0.894 <sup>a</sup>
BNP (pg/mL)	1.39±1.89	1.27±1.23	3.07±3.00	1.58 ±1.88	0.326 <sup>a</sup>
CRP(g/L)	5.34±15.72	6.26±11.96	2.85±2.22	7.44±20.50	0.334 <sup>a</sup>

Tous les paramètres sont exprimés en (moyenne ± sd). (<sup>a</sup>) Test de Kruskal-Wallis. (<sup>b</sup>) Test de Chi-carré.  $P < 0,05$  est considéré comme statistiquement significatif (\*).

Sur l'ensemble de la population d'étude, la distribution des moyennes d'âge entre les sujets porteurs des génotypes AA, AC, CC du polymorphisme A1298C était respectivement : 33.88±16.91 (ans), 33.14±15.96 (ans), CC 35.57±20.29 (ans) sans aucune différence significative (P=0.915).

D'après le **tableau 07**, la distribution des fréquences de l'hyperhomocystéinémie modérée et intermédiaire entre les différents génotypes du polymorphisme A1298C MTHFR n'a montré aucune différence significative (P=0.409). Alors, aucune association significative au polymorphisme A1298C MTHFR n'a été trouvée.

Les valeurs des paramètres biochimiques obtenues, ne diffèrent pas significativement entre les divers génotypes de A1298C MTHFR: Chol T (P=0,662), HDL Chol (P=0,822), LDL Chol (P=0,813), Trigly (P=0.096), ASAT (P=0,089), ALAT (P=0,365), Urée (P=0,894), BNP (P=0,326) CRP (P=0,334). Donc, il y'avait une absence de toute association significative entre ces variables biochimiques et le polymorphisme A1298C.

Les concentrations de ces deux variables restent en dessous de la limite supérieure.

#### V.1.2.1. Répartition des fréquences génotypiques et alléliques de la mutation A1298C du gène MTHFR selon le sexe dans la population témoin.

La distribution des différents génotypes du polymorphisme A1298C sont indiqué dans le **tableau 08** (Tableau ci-après):

**Tableau 08.** Répartition des fréquences génotypiques et alléliques de la mutation A1298C du gène MTHFR selon le sexe dans la population témoin.

	Hommes (n= 64)	Femmes(n=30)	Total	<i>P value</i>
<b>Fréquence</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	
<b>Génotype sauvage</b>	39 (60,93)	21(70)	60(63,82)	
<b>AA</b>				
<b>Hétérozygote</b>	19( 29,68)	8 (26,66)	27 (28,72)	0,514 <sup>a</sup>
<b>AC</b>				
<b>Homozygote</b>	6 (9,37)	1 (3,33)	7 (7,44)	
<b>CC</b>				
<b>Allèle A</b>	97 (75,78)	50 (83,33)	147 (78,19)	
<b>Allèle C</b>	31(24,21)	10 (16,66)	41 (21,81)	

(a) *Pearson Chi-square test. P <0,05 est considéré comme statistiquement significatif (\*)*.

La distribution des génotypes MTHFR pour la mutation A1298C est résumée dans **Tableau 08**, les fréquences des génotypes AA, AC et CC de ce polymorphisme dans les sous-groupes des hommes et des femmes ont été trouvées comme suit: 39 hommes (60.93%) et 21 femmes (70%) avaient de génotype sauvage AA. 19 (29.68%) hommes et 8(26.66%) femmes avaient hétérozygotes. Les 6 hommes (9.37%) restants étaient homozygotes mutés CC et une seule femme (3.33%) qui a été détectée avec le même génotype (CC).

Comme indiqué précédemment (**Tableau 08**), les fréquences alléliques des allèles 1298A et 1298C dans cette population étaient: [pour l'allèle A; 97 hommes soit 75.78%, 50 femmes soit 83.33%. L'allèle C; 31 hommes soit 24.21%, 10 femmes soit 16.66%].

Le même ordre de la distribution des fréquences génotypiques du polymorphisme A1298C a été observé pour les deux sexes, premièrement le génotype AA, suivie de génotype AC et enfin, le génotype CC. Chez les hommes, les porteurs du génotype homozygote sauvage et du génotype hétérozygote de cette mutation étaient les plus représentés par rapport aux femmes, ainsi, nous avons remarqué une fréquence plus basse du génotype homozygote muté (CC) chez les femmes 1 (3.33%).

En outre, dans cette population étudiée, aucune différence significative n'a été observé concernant la différence de distribution génotypiques entre le groupe d'hommes et femmes ( $p= 0,514$ ).

Globalement, l'analyse a fait ressortir que 11 participants (11.70%) de nos sujets portaient le génotype 677 TT et 7 personnes (7. 44%) avaient le génotype 1298 CC. Le génotype hétérozygote du le polymorphisme C677T (CT : 41. 8%) était plus fréquent que ce du polymorphisme A1298C (AC: 28. 72%).

#### **V.1.2.2. Fréquence de la coexistence des polymorphismes C677T et A1298C du gène MTHFR**

Les résultats de la combinaison de génotypes MTHFR C677T et MTHFR A1298C pour générer des génotypes composites sont représentés dans **le tableau 09**.

**Tableau 09.** La fréquence de la coexistence des polymorphismes C677T et A1298C du gène MTHFR.

Génotypes		C677T MTHFR			
		CC	CT	TT	Total
A1298C MTHFR	AA	21 (22,34)	21 (29,78)	11 (11,70)	60 (63,82)
	AC	16 (17,02)	11 (11,70)	00 (00,00)	27 (28,72)
	CC	07 (7,44)	00 (00,00)	00 (00,00)	7 (7,44)
	<b>Total</b>	44 (46,80)	39 (41,48)	11 (11,70)	94 (100,00)

D'après ces données (**le tableau 09**), les génotypes coexistant les plus fréquents étaient: 677CT / 1298AA (29,78%), 677CC / 1298AA (22,34%), 677CC / 1298AC (17,02%) et les génotypes moins fréquents étaient: 677TT / 1298AA (11,70%), 677CT / 1298AC (11,70%), 677CC / 1298 CC (7,44%). Le génotype homozygote muté 677TT était associé au génotype homozygote sauvage 1298AA chez tous les individus, un cas similaire a été observé pour le génotype muté 1298CC qui était toujours associé au génotype homozygote sauvage 677CC.

Dans notre population d'étude, les génotypes suivants: 677TT / 1298AC, 677CT / 1298CC, 677TT / 1298CC (le double mutant homozygote) n'ont pas été retrouvés.

### V.1.2.3. La distribution de la concentration plasmatique du folate, vitamine B<sub>12</sub> et de l'homocystéine total selon les génotypes du polymorphisme A1298C MTHFR

Dans une approche biochimique et génétique, les paramètres retenus étaient: folate, vitamine B<sub>12</sub>, homocystéine total.

Les résultats sont représentés dans **le tableau 10**

**Tableau 10.** La distribution de la concentration plasmatique du folate, vitamine B<sub>12</sub> et de l'homocystéine totale selon les génotypes du polymorphisme A1298C MTHFR

	AA (n=60)	AC(n=27)	CC(n=07)	Total (n=94)	P value
<b>Folate (nM)</b>	10.50±5.67	24.58±73.18	11.62±4.27	14.63±5.31	0.544 <sup>a</sup>
<b>Vitamine B12 (pM)</b>	204.25±161.84	181.00±94.12	160.71±57.40	194.32±139.66	0.833 <sup>a</sup>
<b>Homocystéine Total (µmol/L)</b>	21.94±12.89	18.21±7.77	16.12±5.79	20.42±11.33	0.482 <sup>a</sup>

Tous les paramètres sont exprimés (moyenne ± sd). (<sup>a</sup>) Test de Kruskal-Wallis. (P<0.05) (\*).

En comparant les taux du folate, vitamin B<sub>12</sub> et de l'homocystéine totale entre les différents génotypes du polymorphisme A1298C de la population témoin, on observe qu'il n'y a pas de différence significative (P=0.544, P=0.833, P= 0.482 respectivement). Donc, les concentrations du folate, vitamine B<sub>12</sub> et tHcy semblent indépendante aux polymorphismes A1298C de la MTHFR.

Il est notable que les taux du folate observés étaient plus bas et similaires chez les génotypes (CC)  $11.62 \pm 4.27$  (nM) et (AA)  $10.50 \pm 5.67$  (nM), en comparaison à ceux de AC ( $24.58 \pm 73.18$ ) (nM), de même pour l'homocystéine total, un niveau élevé (une hyperhomocytéinémie modérée) a été observé chez le génotype (AA)  $21.94 \pm 12.89$   $\mu\text{mol/L}$  et (AC)  $18.21 \pm 7.77$   $\mu\text{mol/L}$  vs (CC)  $16.12 \pm 5.79$   $\mu\text{mol/L}$ . Cependant, les concentrations de la vitamine B<sub>12</sub> étaient plus amoindrie chez les génotypes mutés CC et AC ( $160.71 \pm 57.40$  pM,  $181.00 \pm 94.12$  pM) en comparaison au génotype sauvage AA ( $204.25 \pm 161.84$  pM), malgré cela, aucun effet significatif de ce polymorphisme n'a été remarqué, cette observation est due en partie au faible effet de la mutation A1298C MTHFR sur l'activité de l'enzyme MTHFR. Les concentrations du folate et de la vitamine B<sub>12</sub> chez tous les génotypes, se situent dans de variation du taux normal.

## V.2. Description de la population pathologique représentée par des patients coronariens et différents facteurs de risque

### V.2.1. Les caractéristiques cliniques et biochimiques des patients selon le polymorphisme du MTHFR C677T.

Quatorze jeunes patients ayant subi un infarctus du myocarde (IDM), ont été trouvés lors de cette enquête menée dans les différentes régions des Aurès (Batna, Khenchela, Oum El Bouaghi...), ces malades sont tous en phase chronique. Ils sont ainsi répartis en 13 hommes (92.85%) et une seule femme (7.14 %), avec une proportion plus importante des hommes. L'âge dans notre population s'échelonne de 14 à 40 ans (une population jeune et rare de moins de 40 ans;  $\leq 40$ ans), l'âge moyen était  $33.35 \pm 6.35$  (ans). La distribution des moyennes d'âge en fonction des différents génotypes du polymorphisme C677T (**Le tableau 11**) est la suivante: CC (n=05),  $31.40 \pm 9.83$  (ans), CT (n=08)  $33.75 \pm 3.24$  (ans), TT (n=01) 40 (ans), sans aucune différence significative (P=0.263).

Comme il ressort du **tableau 11**, aucune différence significative dans les caractéristiques cliniques et démographiques des patients selon les différents génotypes du polymorphisme C677T de la MTHFR n'a été révélée: le sexe masculin (P= 0.688), l'indice de masse corporelle (P= 0.197), le tabagisme (P= 0.640), l'ancienneté du tabagisme (P= 0.122) ainsi que la répartition du nombre des patients ayant des antécédents familiaux cardiovasculaires (P= 0.433). Il est utile de mentionner que nous avons trouvés une seule femme diabétique lors de cette recherche et elle est de génotype CT.

A propos de la distribution du nombre des cas de l'hyperhomocystéinémie modérée (16-30  $\mu\text{mol/L}$ ), aucune différence significative n'a été observée entre les différents génotypes du polymorphisme C677T de MTHFR (P=0.183). Alors, aucune association significative entre l'hyperhomocystéinémie modérée et ce polymorphisme n'a été notée chez nos patients.

Concernant les concentrations des différents paramètres lipidique plasmatiques, nos résultats ne montrent aucune différence significative entre les sous-groupes de génotypes (CC, CT, TT) pour les Trigly (P=0.138) et HDL Chol (P=0.821), Chol T (P= 0.088) et LDL Chol (P=0.063) chez nos malades.

Les mêmes résultats ont été observés pour les variables: ASAT, ALAT, Urée, BNP, CRP (P=0.189, P=0.170, P=0.453, P=0.256, P=0.293 respectivement). Alors, aucune association significative au polymorphisme C677T n'a été révélée pour ces variables.

Les concentrations moyennes obtenues se situent dans la catégorie d'un bilan normal, ce qui est probablement lié en partie aux patients coronariens qui sont en stade chronique ou en raison du faible effectif de nos échantillons.

La fonction rénale et hépatique s'avère normale chez nos malades et aucune association ne peut être suscitée entre ces fonctions et l'infarctus du myocarde en fonction de différents génotypes de polymorphisme C677T MTHFR. Une légère augmentation de la CRP a été observée, mais comme noté auparavant la différence reste non significative.

Les caractéristiques cliniques et biochimiques des patients selon le polymorphisme C677T de la MTHFR sont indiquées dans le tableau suivant (**Tableau 11**) :

**Tableau 11.** Les caractéristiques cliniques et biochimiques des patients selon le polymorphisme de la MTHFR C677T.

N=14/ Génotype	CC (n=05)	CT (n=08)	TT (n=01)	Total	P value
Age (ans)	31.40±9.83	33.75±3.24	40	33.35±6.35	0.263 <sup>a</sup>
sexe, masculin, n	05	07	01	13	0.688 <sup>b</sup>
Indice de masse corporelle (IMC), kg/m <sup>2</sup>	24.36±9.83	28.90±2.82	19.53	26.65±4.92	0.197 <sup>a</sup>
Diabète, n	00	01	00	01	-
Tabagisme, n	04	05	01	10	0.640 <sup>b</sup>
Ancienneté du tabagisme, n	03	08	01	12	0.122 <sup>b</sup>
Antécédents familiaux cardiovasculaires, n	03	07	01	11	0.433 <sup>b</sup>
Hyperhomocystéinémie modérée (16-30 µmol/L), n	03	02	01	6	0.183 <sup>b</sup>
Chol T (g/L)	1.36±0.31	1.68±0.57	1.11	1.51±0.50	0.088 <sup>a</sup>
Trigly (g/L)	1.02±0.37	1.67±0.95	0.95	1.37±0.87	0.138 <sup>a</sup>
HDL Chol (g/L)	0.32±0.062	0.33±0.075	0.34	0.32±0.065	0.821 <sup>a</sup>
LDL Chol (g/L)	0.83±0.25	1.08±0.45	0.67	0.96±0.37	0.063 <sup>a</sup>
ASAT (U/L)	23.40±6.10	36.62±15.49	28.00	31.28±13.52	0.189 <sup>a</sup>
ALAT (U/L)	9.60±4.33	24.62±15.56	23.00	19.14±13.81	0.170 <sup>a</sup>
Urée (g/L)	0.26±0.021	0.30±0.077	0.32	0.29±0.062	0.453 <sup>a</sup>
BNP (pg/mL)	10.40±6.06	11.00±6.18	36.00	12.57±8.80	0.256 <sup>a</sup>
CRP (g/L)	3.46±3.76	10.78±16.05	6.10	7.83±12.49	0.293 <sup>a</sup>

(a) Kruskal-Wallis test. (b) Khi-Square test.  $p < 0.05$  is considered significant (\*).

## V.2.2. Effet de la mutation C677T de la MTHFR sur les facteurs de risque biochimiques chez les sujets coronariens (avec un IDM)

### V.2.2.1. Association du génotype C677T MTHFR avec l'homocystéine totale, la vitamine B<sub>12</sub> et B<sub>9</sub>

Les résultats de l'association des génotypes du polymorphisme C677T de la MTHFR et l'homocystéine totale, la vitamine B<sub>12</sub> et les folates, sont indiqués dans le tableau suivant:

**Tableau 12.** Association du génotype C677T MTHFR avec l'homocystéine totale, la vitamine B<sub>12</sub> et B<sub>9</sub> chez les sujets coronariens

Génotype	CC	CT	TT	<i>P value</i>
<b>N=14</b>	05	08	01	
<b>Fréquence (%)</b>	35,71	57,14	7,14	
<b>Homocystéine Total(μmol/L )</b>	16.55±2.35	14.56±5.50	19.50	0.330 <sup>a</sup>
<b>Vitamine B<sub>12</sub> (pM)</b>	125.85±70.12	142.09±61.42	82.50	0.733 <sup>a</sup>
<b>Folate (nM)</b>	12.07±3.14	14.42±4.90	5.25	0.250 <sup>a</sup>

Tous les paramètres sont exprimés (moyenne ± sd). (<sup>a</sup>) Test de Kruskal-Wallis. ( $P < 0.05$ ) (\*)

Chez notre population pathologique, un seul patient qui a été trouvé avec le génotype homozygote muté TT (7.14%), **le tableau 12**. Cependant, les fréquences des génotypes homozygotes normaux (CC) et hétérozygotes (CT) étaient respectivement de 35.71% et 57,14%.

Aucune différence significative n'a été observée entre les différents génotypes de C677T MTHFR en ce qui concerne les taux de l'homocystéine totale, la vitamine B<sub>12</sub> et les folate ( $P=0.330$ ,  $P=0.733$ ,  $P=0.250$ , respectivement), alors, les concentrations de ces paramètres n'étaient pas significativement dépendantes au polymorphisme C677T MTHFR. Néanmoins, un taux élevé de tHcy (une hyperhomocystéinémie modérée) est associé *au* génotype muté TT (19.50 μmol/L) contre le génotype CC et CT (16.55±2.35 μmol/L, 14.56±5.50 μmol/L, respectivement). Ainsi qu'un faible taux de la vitamine B<sub>12</sub> et B<sub>9</sub> a été enregistré chez le génotype muté (TT) (82.50 pM pour vit B<sub>12</sub>, 5.25 nM pour vit B<sub>9</sub>) comparativement aux génotypes sauvages et hétérozygotes (**le tableau 12**), cela témoigne l'effet délétère du génotype muté sur les concentrations de tHcy, vitamine B<sub>12</sub> et B<sub>9</sub> chez nos patients. Toutefois, cet effet reste non significatif. (Les concentrations moyennes des vitamines B<sub>12</sub> et B<sub>9</sub> se situent dans l'intervalle de référence).

avec l'homocystéinémie, la vitamine B<sub>12</sub> et les folate chez les patients coronariens, sont décrite dans **le tableau 13**.

**Tableau 13.** L'association des génotypes C677T du MTHFR avec l'homocystéinémie, la vitamine B<sub>12</sub> et les folate chez les patients coronariens

Génotypes (N=14)	CC	CT	TT	P value
<b>Groupe01. Homocystéinémie Normale (5-15 µmol/L)</b>	14,45±1,06	11,94±3,03	-	0,182 <sup>a</sup>
<b>Groupe02. Hyperhomocystéinémie modérée (16-30 µmol/L)</b>	17,96±1,78	22,45±0,92	19,50	0,117 <sup>a</sup>
<b>Vitamin B<sub>12</sub> (pM) (groupe 01)</b>	115,75±41,75	151,08±26,51	-	1,00 <sup>a</sup>
<b>Vitamin B<sub>12</sub> (pM) (groupe 02)</b>	132,58±51,39	115,13±41,13	82,50	0,304 <sup>a</sup>
<b>Folate (nM) (groupe 01)</b>	13,81±0,31	15,08±2,15	-	0,402 <sup>a</sup>
<b>Folate (nM) (groupe02)</b>	10,92±2,21	12,44±3,06	5,25	0,901 <sup>a</sup>

- Tous les paramètres sont exprimés (moyenne ± sd). (<sup>a</sup>) Test de Kruskal-Wallis. (P <0,05 est considéré comme statistiquement significatif (\*)).

Nos résultats (**tableau 13**) ont révélé qu'aucune différence significative des moyennes d'homocystéine n'a été trouvée entre les différents génotypes du polymorphisme C677T MTHFR, et cela pour les deux groupes; d'homocystéinémie normale et de l'hyperhomocystéinémie modérée (P= 0.182, P= 0.117, respectivement).

Lorsque les concentrations des vitamines B<sub>12</sub> et B<sub>9</sub> des patients ayant une Hhcy modérée ont été comparées entre les sous groupes des trois génotypes précédents, aucune différence significative n'a été remarquée (P= 0.304, P=0.901) en respectives, le même résultat a été noté pour les deux groupes d'homocystéinémie normale (pour la vit B<sub>12</sub>, P= 1.00/ pour la vit B<sub>9</sub>, P= 0.402).

Il est notable que les concentrations du folate et de la vitamine B<sub>12</sub> dans les groupes d'Hhcy modérée sont plus amoindries chez les génotypes mutés, (TT: 5.25 nM, CT: 12,44±3,06 nM) pour la vit B<sub>9</sub>/ (TT; 82.50 pM, CT: 115,13±41,13 pM) pour la vit B<sub>12</sub>, comparativement à ceux des groupes d'homocystéinémie normale. De même, un niveau élevé de tHcy a été observé notamment chez les porteurs des génotypes mutés : (CT) 22,45±0,92 µmol/L et (TT) 19,50 µmol/L en comparaison avec ceux du groupe d'homocystéinémie normale, ces constatations révèlent un effet délétère du génotype muté sur les taux des vitamines B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub> et de l'homocystéine total, chez nos patients. Néanmoins, cette action n'était pas significative comme mentionnée précédemment.

### V.2.3. Les caractéristiques cliniques et biochimiques des patients selon le polymorphisme A1298C de la MTHFR

Les caractéristiques cliniques et biochimiques des patients selon le polymorphisme A1298C de la MTHFR sont présentées dans le tableau suivant (**Tableau 14**) :

**Tableau 14.** Les caractéristiques cliniques et biochimiques des patients selon le polymorphisme du MTHFR A1298C.

N=14/ Génotype	AA (n=11)	AC (n=03)	CC (n=00)	Total	P value
Age (ans)	32.72±7.07	35.66±3.24	-	33.35±6.35	0.555 <sup>a</sup>
Sexe masculin, n	10	03	00	10	0.588 <sup>b</sup>
Indice de masse corporelle (IMC), kg/m <sup>2</sup>	27.32±4.88	24.20±5.42	-	26.65±4.92	0.225 <sup>a</sup>
Diabète, n	01	00	00	01	-
Tabagisme, n	08	02	00	10	0.837 <sup>b</sup>
Ancienneté du tabagisme, n	08	02	00	10	0.837 <sup>b</sup>
Antécédents familiaux cardiovasculaires, n	08	03	00	11	0.308 <sup>b</sup>
Hyperhomocystéinémie modérée (16-30 µmol/L), n	04	02	00	06	0.347 <sup>b</sup>
Chol T (g/L)	1.53±0.56	1.44±0.26	-	1.51±0.50	0.769 <sup>a</sup>
Trigly (g/L)	1.25±0.50	1.80±1.66	-	1.37±0.87	0.938 <sup>a</sup>
HDL chol (g/L)	0.33±0.073	0.32±0.032	-	0.32±0.065	0.555 <sup>a</sup>
LDL Chol (g/L)	0.94±0.41	0.89±0.15	-	0.96±0.37	0.885 <sup>a</sup>
ASAT (U/L)	28.54±9.08	41.33±24.17	-	31.28±13.52	0.456 <sup>a</sup>
ALAT ( U/L)	16.45±10.54	29.00±22.33	-	19.14±13.81	0.368 <sup>a</sup>
Urée (g/L)	0.28±0.04	0.33±0.11	-	0.29±0.062	0.456 <sup>a</sup>
BNP (pg/mL)	14.18±9.19	6.66±3.78	-	12.57±8.80	0.170 <sup>a</sup>
CRP (g/L)	9.60±13.66	1.33±0.73	-	7.83±12.49	0.225 <sup>a</sup>

(<sup>a</sup>) Mann-Whitney U test. (<sup>b</sup>) Khi-Square test.  $p < 0.05$  is considered significant (\*).

D'après le **tableau 14**, aucune différence significative n'a été notée concernant la distribution des moyennes d'âge selon les différents génotypes du polymorphisme A1298C (**Le tableau 14**): AA (n=05) 32.72±7.07 (ans), AC (n=08) 35.66±3.24 (ans), (P=0.555).

En revanche, aucune différence significative entre les différents génotypes de A1298C MTHFR n'a été remarquée pour les paramètres cliniques suivants: le sexe masculin (P= 0.588), l'indice de masse corporelle (P= 0.225), le tabagisme (P= 0.837), l'ancienneté du tabagisme (P=0.837), la distribution des fréquences des antécédents familiaux cardiovasculaires (P= 0.308). La seule femme diabétique était de génotype (CC).

Aucune association significative entre l'hyperhomocystéinémie modérée et le polymorphisme A1298C n'a été observée chez nos patients (P= 0.347).

Nos résultats montrent également qu'aucun effet significatif de ce polymorphisme n'a été révélé sur les variables biochimiques suivants : Chol T (P= 0.769) et Trigly (P=0.938), HDL Chol (0.555) et LDL Chol, (P=0.885), ASAT (P= 0.456), ALAT (P= 0.368), Urée (P= 0.456), la BNP (P= 0.170), la CRP (P= 0.225). Les concentrations moyennes obtenues se situent dans les limites de la normal, la fonction rénale et hépatique semble normale chez nos patients.

## V.2.4. Effet de la mutation A1298C de la MTHFR sur les facteurs de risque biochimiques chez les sujets coronariens

### V.2.4.1. Association du génotype A1298C MTHFR avec l'homocystéine totale, la vitamine B<sub>12</sub> et B<sub>9</sub>

Le tableau suivant montre l'association du génotype MTHFR A1298C et l'homocystéine totale, la vitamine B<sub>12</sub> et B<sub>9</sub> chez les patients coronariens.

**Tableau 15.** Association du génotype A1298C MTHFR avec l'homocystéine totale, la vitamine B<sub>12</sub> et B<sub>9</sub> chez les sujets coronariens

Génotypes	AA	AC	CC	P value
N=14	11	03	-	
Fréquence (%)	78,57	21,42	-	
Homocystéine T ( μmol/L )	14.56±3.90	19.53±5.09	-	0.170 <sup>a</sup>
Vitamine B <sub>12</sub> (pM)	132.79±67.02	129.25±47.85	-	0.885 <sup>a</sup>
Folate (nM)	12.90±5.17	13.00±3.21	-	0.938 <sup>a</sup>

(<sup>a</sup>) Les paramètres sont exprimés (moyenne ± sd). (<sup>a</sup>) Test de Mann-Whitney U . P<0.05) (\*)

Comme le montre le **tableau 15**, les fréquences des génotypes homozygotes sauvages (AA) et hétérozygotes (AC) étaient: 78.75% et 21,42%.

La comparaison des taux de l'homocystéine totale, la vitamine B<sub>12</sub> et folate entre les différents génotypes de ce polymorphisme n'a révélée aucune différence significative (P=0.170, P=0.885, P=0.938 respectivement), donc le polymorphisme A1298C MTHFR n'a montré aucune influence significative sur la concentration de tHcy, vitamines B<sub>12</sub> et B<sub>9</sub>.

Une hyperhomocystéinémie modérée est associée *au* génotype muté AC (19.53±5.09 μmol/L) contre le génotype AA (14.56±3.90 μmol/L). Quant à la vitamine B<sub>12</sub>, des taux légèrement faible ont été observés chez le génotype AC (129.25±47.85 pM) contre le génotype AA (132.79±67.02 pM), pour la vitamine B<sub>9</sub> une légère diminution du taux a été notée dans le génotype (AA). Il semble qu'il y'avait un effet délétère du variant muté de ce polymorphisme sur la concentration de tHcy, vitamine B<sub>12</sub> chez nos patients, cependant cette action du génotype muté reste non significative. (Les concentrations moyennes des vitamines B<sub>12</sub> et B<sub>9</sub> se situent dans l'intervalle de référence).

L'association des génotypes A1298C du MTHFR avec l'homocystéinémie, la vitamine B<sub>12</sub> et les folate chez les patients coronariens, sont présentées dans le tableau suivant:

**Tableau 16.**  
vitamine B<sub>12</sub> et les folate chez les patients coronariens

avec l'homocystéinémie, la

Génotypes (N=14)	AA	AC	CC	P value
<b>Groupe01. Homocystéinémie Normale (5-15 umol/L)</b>	12,41±1,35	13,70	-	0,827 <sup>a</sup>
<b>Groupe02. Hyperhomocystéinémie modérée (16-30 umol/L)</b>	18,34±0,82	22,45±0,65	-	0,064 <sup>a</sup>
<b>Vitamin B<sub>12</sub> (pM) (groupe 01)</b>	140,07±29,54	157,50	-	0,825 <sup>a</sup>
<b>Vitamin B<sub>12</sub> (pM) (groupe 02)</b>	120,06±38,43	115,13±41,13	-	0,355 <sup>a</sup>
<b>Folate (nM) (groupe 01)</b>	14,86±2,17	14,13	-	0,82 <sup>a</sup>
<b>Folate (nM) (groupe02)</b>	9,50±2,11	12,44±3,06	-	0,814 <sup>a</sup>

Tous les paramètres sont exprimés (moyenne ± sd). (<sup>a</sup>) Test de Kruskal-Wallis. (P < 0,05 est considéré comme statistiquement significatif (\*)).

D'après nos résultats (**tableau 16**), aucune différence significative n'a été trouvée dans la distribution des moyennes de l'homocystéine totale entre les différents génotypes du polymorphisme A1298C MTHFR dans le groupe d'Hhcy modérée (P=0,064). Néanmoins, un niveau élevé de tHcy a été enregistré notamment chez le génotype muté (AC), ce qui témoigne l'effet délétère de ce polymorphisme sur la concentration de l'homocystéine. Ainsi, si on compare les taux de l'homocystéine du groupe d'homocystéinémie normale, nous ne trouvons pas de différence significative (P= 0,827).

Par ailleurs, la comparaison des taux des vitamines B<sub>12</sub> et B<sub>9</sub> dans les groupes d'Hhcy modérée n'a montrée aucune différence significative (P=0,355, P=0,814) respectivement. Des résultats similaires ont été remarqués chez les deux groupes d'homocystéinémie normale : P= 0,825 (pour la vit B<sub>12</sub>), P= 0,82 (pour la vit B<sub>9</sub>). Notant que les niveaux des vitamines B<sub>12</sub> et B<sub>9</sub> dans les groupes de l'Hhcy modérée étaient légèrement inférieurs à ceux observés dans les groupes d'homocystéinémie normale, notamment chez les génotypes mutés: (AC 157,50 vs 115,13±41,13 (pM) pour la vit B<sub>12</sub>) / (AC) (14,13 vs 12,44±3,06 (nM) pour la vit B<sub>9</sub>). Il paraît qu'il y'avait un effet délétère du génotype muté sur les niveaux de B<sub>9</sub> et B<sub>12</sub>. Cependant cette action n'était pas significative.

## VI. Discussion

### VI.1. Description de la population témoin et fréquence de différents facteurs de risque

#### VI.1.1. Les caractéristiques cliniques et biochimiques des sujets témoins selon le polymorphisme du MTHFR C677T.

On a enregistré une prévalence totale de (56, 38%) d'Hhcy ( $>15 \mu\text{mol/L}$ ) chez notre population témoins, elle est nettement plus supérieure que celle observée dans plusieurs pays, comme, Brazil avec 23.1% (n= 52 sujets) (**Mello et al., 2012**), Libon; une hyperhomocystéinémie était présente chez 59/233 (25,3%) des sujets (**Rami et al., 2012**). les résultats d'une méta-analyse de la prévalence de l'Hhcy en Chine, basée sur 60 754 sujets issus de 36 études couvrant 19 provinces et municipalités, a trouvé une prévalence de 27,5% (**Yang et al., 2015**).

En revanche, nos résultats sont inférieurs à ceux rapportés par **Misra et al. (2002)** à New Delhi (Inde du Nord) avec 84% (n=72), et intermédiaires entre ceux trouvées en Savanna 29,4% (n= 68) et les région côtières 62,3% (n=208) du Togo et Bénin dans l'ouest d'Afrique (**Amouzou et al., 2004**).

Cependant, une prévalence proche de celle de la présente étude, (54 %) a été observée dans étude Indienne réalisée par **Gheye et al. (1999)** à Hyderabad, Inde du sud-est sur 58 sujets sains, et dans une autre étude Iranienne (47,6%), portée sur 1214 sujets sains, (**Fakhrzadeh et al., 2006**). Notant que la prévalence de l'hyperhomocystéinémie est estimée à 5% dans la population générale (**Conri et al., 2000**).

**Li et al. (2017)**, ont rapporté que le polymorphisme C677T MTHFR peut augmenter le risque de l'Hhcy chez les sujets porteurs du génotype 677TT qui présentaient un risque d'Hhcy plus de 6 fois supérieure à celui des porteurs de 677CC + CT (TT vs CC + CT).

L'hyperhomocystéinémie peut avoir pour origine des troubles d'ordre génétique, nutritionnel et thérapeutique, elle peut également être associée à différents états pathologiques (**Demuth et al., 2000**).

De nombreuses études ont exploré l'association entre le polymorphisme MTHFR C677T et les profils lipidiques sériques ou plasmatiques chez l'homme (**Zhi et al., 2016**).

Nos résultats rejoignent ceux de **Liang et al., (2014)** qui n'ont pas trouvé une association entre le tHcy plasmatique et le polymorphisme C677T MTHFR avec l'hyperlipidémie ou les taux de lipides sériques.

Contrairement à nos résultats, **Frelut et al., (2014)** ont montré que MTHFR C677T peut augmenter significativement le taux de LDL-C et peut également être associé à des taux élevés de cholestérol total et de triglycérides, et des niveaux bas du HDL-C, mais sans

atteindre un niveau significatif. **Liu et al., (2015) et Jiang et al., (2014)** ont confirmé l'association de l'allèle T avec les désordres lipidiques.

En outre, chez les femmes âgées polonaises, les génotypes 677CT / TT de la MTHFR étaient associés à des taux élevés du Chol T et à des taux bas de HDL-C par rapport au génotype CC (**Chmurzynska et al., 2013**).

Les transaminases sont des enzymes intracellulaires. Un taux élevé de transaminases (TGO ou TGP) est le reflet d'une lésion cellulaire généralement au niveau du foie, du cœur, des reins ou des muscles.

L'ALAT (TGP) est une enzyme qui se trouve majoritairement dans le foie. Ce test est beaucoup plus spécifique d'une lésion hépatique que l'ASAT (TGO) (**Pratt et Kaplan, 2000**). L'ASAT se trouve non seulement dans le foie mais également dans d'autres organes : le muscle cardiaque, les muscles squelettiques, les reins, le cerveau, le pancréas, ...etc. (**Jaunin-Stalder et al., 2009**).

Contrairement à nos résultats **Li et al., (2016)** ont montré que la mutation MTHFR C677T était associée à une diminution significative du taux sérique d'AST (TGO), et non significative de l'ALT (TGP).

En outre, un statut faible en folate a été démontré indépendamment, augmente le taux sérique de la TGP (**Welzel et al., 2007**). Ainsi, **Li et al., (2016)** dans leurs investigation (analyse de régression multiple) ont montré que la carence en folates était associée à des taux sériques élevés de l'ALT (TGP) ( $\beta$  (SE): 0,13 (0,06),  $P = 0,031$ ). Cependant le mécanisme moléculaire de cette action du folate sur les fonctions hépatiques reste inconnu (**Li et al., 2016**).

Les résultats du dosage de l'urée, des trois sous-groupes des polymorphismes C677T et A1298C n'a pas porté une différence significative entre eux. La fonction rénale est normale.

urée est une molécule qui résulte d'un processus de dégradation des protéines. Le dosage de l'urée permet d'apprécier le fonctionnement du rein. L'urée varie donc en fonction de l'état du rein de l'apport en protéine et du niveau d'hydratation.

La BNP est produite par les cardiomyocytes des oreillettes et des ventricules en réponse à une augmentation de la pression pariétale et de l'étirement des fibres myocardiques comme c'est le cas dans l'insuffisance cardiaque (**Hall, 2005**). Il constitue également un des plus puissants marqueurs pronostiques tant au cours d'une décompensation que lors du suivi de l'insuffisance cardiaque chronique (**Logeart D, 2007**).

La C-reactive protein (CRP) est un membre de la très ancienne et très conservée famille des pentraxines caractérisée par une structure homopentamérique. Par ses mécanismes d'action la CRP apparaît ainsi comme une molécule charnière entre immunité innée et immunité adaptative (**Dupuy et al., 2003**). Il a été démontré expérimentalement que la CRP a des effets directs pro-inflammatoires et pro-athérosclérotiques (**Verma et al., 2002**).

Contrairement à nos résultats, une étude menée en Japon par **Nojima et al., (2018)** chez 384 femmes japonaises en bonne santé étaient inscrites en tant que groupe témoin dans une étude cas-témoins sur le cancer du sein (de 2001 à 2005), a révélée que l'interaction entre un polymorphisme de MTHFR C677T et la CRP était statistiquement significative: l'effet de la

CRP était significatif dans le groupe CT / TT (individus ayant l'allèle mineur T), mais aucune association n'a été observée dans le groupe CC (type sauvage).

### **VI.1.2. Répartition des fréquences génotypiques et alléliques de la mutation C677T du gène MTHFR selon le sexe dans la population témoin.**

Il existe des polymorphismes fonctionnels dans les gènes codant pour les enzymes pouvant être associés à la susceptibilité aux maladies. Parmi les polymorphismes génétiques les plus étudiés, ceux du gène MTHFR, notamment le polymorphisme A1298C et C677T.

La fréquence des allèles du polymorphisme C677T varie selon les régions géographiques et les groupes ethniques (**Wang et al., 2016**). Nos résultats corroborent ceux d'autres études qui n'ont pas trouvé une association au sexe. Des résultats similaires ont été obtenus en Chine continentale, sur un total de 88255 échantillons, sur la base de tous ces échantillons les auteurs n'ont trouvé aucune différence entre les hommes [19% (12-25%)] et les femmes [21% (19-24%)] en termes de fréquence de génotype 677TT (**Wang et al., 2016**). Aucune différence des fréquences de génotypes C677T de la MTHFR selon le sexe, n'a également été observée dans la population libanaise (**AL-Habboubi et al., 2003**). Ainsi, une étude de la fréquence allélique et génotypique du polymorphisme C677T, sur 207 sujets sains de la population bosniaque n'a révélé aucune différence significative entre les deux sexes (**Amela et al., 2013**).

Par contre, une autre étude portant sur des sujets sains libanais a montré une différence significative corrélée au sexe (**Amira et al., 2008**). Dans la majorité des études menées sur les différences de fréquence des génotypes par sexe, aucun commentaire n'a été rapporté dans la littérature. Ainsi les auteurs n'ont pas précisé le sexe de leur cohorte (**Botto et Yang, 2000**).

Il existe certaines preuves de gradients géographiques en Europe (augmentation du nord au sud) de la prévalence du génotype homozygote TT dans les zones d'étude, par exemple: La prévalence du génotype TT était de 4% en Finlande et de 7% en Russie, des valeurs intermédiaires (8 à 10%) ont été notées en France et en Hongrie et des valeurs plus élevées dans le sud de l'Europe (12-15% en Espagne et au nord de l'Italie), avec des valeurs maximales dans le sud de l'Italie (20-26% en Campanie et en Sicile) (**Wilcken B et al., 2003**). En outre, **Nishio et al., (1996)** ont rapporté que la prévalence du génotype TT trouvée en Allemagne était de (10.4%) et en Grèce de (10.0%).

Un gradient similaire a été observé en Amérique du Nord, où la fréquence du génotype (TT) augmente de l'ouest du Canada (Alberta) jusqu'au sud-est des États-Unis (Atlanta), avec un pic au Mexique (**Wilcken et al., 2003**). Pourquoi des taux aussi élevés d'homozygotie (TT) se produisent-ils dans ces régions (nouveau-nés du Mexique et de l'Italie du Sud) ? N'est pas clair, étant donné les points communs apparemment limités en termes d'origine ethnique, génétique ou environnementale entre ces zones. Par conséquent, cette étude suggère la présence de pressions sélectives conduisant à une variation géographique et ethnique marquée dans les fréquences génotypique et alléliques de C677T MTHFR (**Wilcken et al., 2003**).

Une autre étude comparative portant sur la prévalence des allèles MTHFR C677T et A1298C et le statut en folates entre les populations mexicaines, ouest africaines et européennes, a révélé que la fréquence de l'allèle T677 était plus élevée à Mexico, intermédiaire dans l'Est de la France et la Sicile et plus faible dans l'Afrique de l'Ouest. Les fréquences du génotype (TT) et de l'allèle 677T observées étaient les suivantes: en Afrique de l'Ouest (0.8 à 9.0%), en France (14.2 à 36.1%), en Italie (Sicile) (19.9 à 47.3%) et à Mexico (35.7%). 58.0%), un apport suffisant en acide folique a supposé une augmentation de la fréquence de l'allèle 677T MTHFR dans ces populations (**Guéant-Rodriguez et al., 2006**).

Il est utile de mentionner que dans l'Asie du Sud-Est, la prévalence du génotype (TT) était; (12.0%) en Corée du Sud, (11.0%) au Japon (**Nishio et al., 1996**) et (6.9%) à Taiwan (**Wassim et al., 2004**).

Dans les 23 provinces chinoises étudiées, **Wang et al., (2016)** ont observé une augmentations des fréquences de l'allèle 677T et du génotype (TT), le long du gradient géographique, dans la direction sud-centre-nord sur le continent, de valeurs inférieures à intermédiaires, à des valeurs supérieures, respectivement. Les auteurs de cette étude ont supposé que les apports en acide folique étaient plus importants dans les populations du nord que dans les populations du sud; cependant, une enquête nutritionnelle a révélé une tendance inverse, elle a trouvé que la moyenne géométrique de la concentration sanguine en folates est plus basse dans les populations du nord que dans les populations du sud (**Hao et al., 2003**). Parce qu'en Chine, l'apport en folates est plus faible dans le régime alimentaire des populations du Nord que celui des populations du Sud en raison de différences dans les habitudes alimentaires (**Wang et al., 2011; Hao et al., 2003**).

Dans une étude indienne, des résultats ont montré de grandes variations, avec une fréquence plus élevée de l'allèle 677T chez la population de Sindhi (23.8%). Au contraire, l'allèle 677T est absent des populations de Kom, Thadou et Munda et sa fréquence moyenne est de 10,1% sur l'ensemble de 23 populations indiennes (**Saraswathy et al., 2012**). La faible fréquence de l'allèle 677T chez les groupes tribaux (les populations Kom, Thadou et Munda) peut avoir été influencée par les carences en acide folique, car la majorité de la population en Inde sont des végétariens avec un faible apport en vitamine B<sub>12</sub> (**Wang et al., 2016**).

Dans une autre évaluation de sujets colombiens, des individus sains ont été inclus, différentes fréquences de génotype ont été trouvées: le génotype le plus fréquemment observé était l'hétérozygote (CT) (80 individus, 52.6%), suivi par le génotype (CC) homozygote avec 52 individus (34.2%) et le génotype (TT) avaient la fréquence la plus basse dans cette population étudiée (20 individus, 13.2%) (**Romero-Sánchez et al., 2015**).

Selon une étude publiée sur l'association entre les polymorphismes C677T et A1298C et l'élévation de l'homocystéine, chez 117 volontaires sains de la population portugaise (sud-ouest de l'Europe), la distribution des fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme C677T était de 33.3% pour l'allèle T et de 66.7%. % pour l'allèle C, 10.3% des sujets portaient le génotype 677TT; le statut hétérozygote et homozygote sauvage étaient; 46.2% et 43.6% respectivement. Par conséquent, ces résultats montrent que les fréquences relatives de l'allèle 677T et du génotype 677TT sont inférieures à celles rapportées dans deux

autres pays de l'Europe du Sud, l'Espagne et l'Italie, et de ce fait ne correspondent pas à l'idée de gradient nord-sud et confirment la notion selon laquelle des études de la population géographique locale sont nécessaires (**Castro et al., 2003**).

Une étude importante réalisée sur 408 Libanais en bonne santé et 152 sujets sains bahreïniens a révélé que 159 (39,0%) libanais et 26 (17,1%) étaient des porteurs hétérozygotes (CT), tandis que 10 (2,50%) libanais et 4 (2,63%) étaient porteurs du génotype homozygote muté (TT) qui sont relativement faibles (**AL-Habboubi et al., 2003**). Une autre étude libanaise menée sur des sujets sains, a trouvée la distribution des génotypes CC, CT et TT suivante: 65,3%, 30,8% et 3,9% respectivement (**Saraswathy et al., 2012**). Dans la population jordanienne, **Eid et Rihani, (2004)** ont observé que la fréquence du génotype TT était 8 et la fréquence de l'allèle T était 0,16. Ces valeurs sont inférieures à celles observées dans notre étude. Les différences entre les fréquences des allèles MTHFR dans les groupes africains et ethniques restent encore inconnues (**Atadzhanov et al., 2014**). Des études menées au cours de la dernière décennie avaient émis l'hypothèse que la fréquence 677T pourrait résulter en partie des interactions gènes - nutriments, et ces associations semblent être influencées par la localisation géographique et l'état nutritionnel des sujets (**Guéant et al., 2004; Guéant et al., 2003**) et les chercheurs ont montré ainsi, une corrélation positive entre la concentration en folate et la fréquence de l'allèle 677 T (**Guéant-Rodriguez et al., 2006; Botto et Yang, 2000**).

Peu d'études dans la région du Maghreb arabe ont examiné le polymorphisme MTHFR C677T. Au Maroc, une étude portant sur 182 personnes apparemment saines et sélectionnées au hasard parmi des arabes et berbères (Marocains), la fréquence des génotypes du polymorphisme C677T suivante a été trouvée: génotype CC dans 97 (53.3%), génotype CT dans 74 (40.7%), Génotype TT dans 11 (6%), l'allèle T était (26.4%) (**Paluku They-They et al., 2009**). Une étude en Tunisie visant à déterminer les fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme C677T dans une population tunisienne en bonne santé a trouvé les résultats suivants: CC (69.7%), CT (24.9%) et TT (5.4%). La fréquence de l'allèle T estimée dans l'échantillon de 185 individus était de 17.8%, ces valeurs sont intermédiaires entre celles observées en Afrique et celles notées dans les pays occidentaux (**Jerbi et al., 2005**).

**Bourouba et al., (2009)** ont montré, dans une population en bonne santé de la ville de Sétif (Algérie), que le génotype MTHFR 677CC a été trouvé chez 67 individus (45.6%), 59 personnes étaient hétérozygotes (40.1%) et 21 étaient homozygotes (TT: 14.3%). La fréquence de l'allèle 677T était 34.3%. Ces valeurs restent intermédiaires entre celles observées en Afrique et celles observées à l'Ouest et en Amérique du sud. Une autre étude Algérienne réalisée par **Hambaba et al., (2008)** a trouvé une fréquence génotypique (TT) de 6% et allélique (T) de 30.5%, une fréquence intermédiaire qui rejoint le gradient mondial Nord-Sud avec une prévalence élevée d'hyperhomocystéinémie. Ces derniers résultats sont comparables à nos résultats obtenus; T (32.45%), TT (11.70%).

Les habitudes économiques et alimentaires peuvent jouer un rôle important dans la propagation de l'allèle 677T dans le monde entier (**Wang et al., 2016**). La prévalence du polymorphisme de MTHFR C677T varie chez les sujets africains et méditerranéens, ce qui

n'est pas facile à expliquer, toutefois, les facteurs sociaux et environnementaux pourraient constituer un avantage ou un désavantage en affectant la sélection des génotypes de MTHFR. Ainsi, des apports adéquats en acide folique ont supposé une augmentation de la fréquence du 677T MTHFR, alors qu'un apport insuffisant pourrait entraîner une diminution de la fréquence (**Chillemi et al., 2005**). De plus, l'avantage résultant d'un apport alimentaire élevé en folate par les porteurs de l'allèle 677T peut être dû aux divers mécanismes, tels que la synthèse accrue de purines et de pyrimidines nécessaires à la réplication de l'ADN (**Ueland et al., 2001**). Dans la présente étude, nos résultats corroborent ceux d'autres études menées à travers le monde et cohérents avec l'hypothèse d'un gradient nord-sud.

### **VI.1.3. L'influence du sexe sur les concentrations du folate, vitamine B<sub>12</sub> et de l'homocystéine totale chez les témoins**

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Castro et al., (2003)** qui n'ont pas enregistré une différence significative des concentrations des folates plasmatique entre les sexes. Cependant, un taux significativement élevé de tHcy a été observé chez les hommes par rapport aux femmes.

Par ailleurs, le même résultat a été trouvé par **Devlin et al., (2006)** chez 1041 sujets sains, (42% étaient des hommes et 58% étaient des femmes) concernant les résultats de la vitamine B<sub>12</sub>.

L'étude de **Ni et al., (2016)** a montré l'influence du sexe sur les concentrations sériques de tHcy, de la vitamine B<sub>12</sub> et du folate. Les hommes avaient une concentration de tHcy significativement plus élevée que chez les femmes, et un taux sérique moyen du folate significativement inférieur à celui des femmes et contrairement à nos résultats, il n'y avait pas de différence significative des taux de la vitamine B<sub>12</sub> entre les deux sexes.

De nombreux facteurs peuvent entraîner une augmentation des taux du tHcy chez les hommes comparativement aux femmes, en particulier, la différence de la masse musculaire, le statut hormonal et le statut vitaminique (**Refsum et al.,2004**). L'tHcy peut augmenter aussi avec l'âge (**Stanslawska-Sachadyn A, et al., 2008**).

Il est possible que cette différence du statut en vitamines B soit due probablement à l'apport alimentaire de ces vitamines qui est généralement plus faible chez les hommes que chez les femmes (**Ni et al., 2016**). De plus, la diminution du taux du folate peut évoquer une malabsorption héréditaire ou une atrophie villositaire par exemple. Le 5- méthyl-THF étant une des formes circulantes principales des folates, ils pourront aussi être diminués dans les déficits en MTHFR (**Stanger O et al., 2004**).

### **VI.1.4. La distribution de la concentration plasmatique du folate, vitamine B<sub>12</sub> et de l'homocystéine totale selon les génotypes du polymorphisme C677T MTHFR**

Le polymorphisme C677T de la MTHFR est le facteur génétique le plus important qui influence les concentrations sanguines de tHcy dans la population générale (**Klerk M et al., 2002 ; Frosst P et al., 1995**).

Le polymorphisme de MTHFR C677T est un facteur prédictif indépendant de l'tHcy plasmatique. Cette association est modifiée par plusieurs vitamines B, qui ne possèdent pas qu'un seul impact sur l'expression phénotypique du polymorphisme MTHFR C677T mais ce sont des prédicteurs de l'tHy plasmatique également (**Hustad et al., 2007**). Cela a été démontré dans plusieurs études sur le folate (**Jacques et al., 2001 ; Molloy, 2004**) et la cobalamine (**Jacques et al., 2001 ; Monsen et al., 2003**).

Nos résultats sont conformes à ceux montrée par **Jacques et ses collaborateurs (1996)** concernant l'effet interactif du statut en folates et du génotype MTHFR 677TT sur les concentrations sanguines de tHcy.

Nos résultats confirment ceux des études antérieures, y compris les études de **Kauwell et al., (2000)** et de **Shelnutt et al., (2003)**, qui ont révélée que le génotype (TT) est associé à une concentration plasmatique élevée d'homocystéine lorsque le statut en acide folique est faible. Et dans le même sens, ceux de **De Bree et al. (2003)** et de **Ozarda et al., (2009)** qui ont constaté également, que les individus sains avec le génotype TT avaient une concentration en tHcy significativement plus élevée que ceux ayant les génotypes CC et CT.

**Yakub et al., (2012)** et ses collaborateurs ont déterminé, que les chances d'avoir une hyperhomocystéinémie avec le génotype 677TT MTHFR étaient de 10 fois supérieures à celles du génotype 677CC MTHFR [OR (IC à 95%); 10,17 (3,6 à 28,67) :et le risque d'association augmente, [si la folatémie est <3.5 ng/mL, l'OR (CT ou TT) est 4.84 (2.80–8.37) P< 0.001], [et si la vitamine B<sub>12</sub> est <200 pg/mL) l'OR (CT ou TT) est 4.33 (1.7–10.86) P< 0.05].

Une étude antérieur portée chez des femmes japonaise saine (n= 192) a montrée que chez les porteurs du génotype TT, les taux de folate et de tHcy étaient respectivement inférieurs ou supérieurs que ceux d'autres génotypes. Bien qu'il n'existe pas de différences significatives dans la consommation de folate entres les différents génotypes (**Taguchi et al., 2012**).

**Abdssemed, (2008)** a montrée que le taux de l'homocystéine plasmatique est significativement plus élevée chez les sujets porteurs du génotype (TT) par rapport a ceux avaient le génotype (CT) et (CC). De même pour les taux sériques de folates, les homozygotes (TT) avaient des concentrations plus basses comparativement aux homozygotes mutés (CC).

Une métaanalyse publiée par **Yang et al., (2008)** a trouvé, que parmi tous les polymorphismes des gènes étudiées, chez tous les groupes ethniques (Population américaine), seulement le génotype C677T MTHFR avait un effet significatif sur les concentrations du folate et de l'homocystéine sériques, notamment chez les porteurs du génotype (TT).

Une autre mét-analyse rapporté par **Guéant-Redriguez et al., (2006)**, qui ont comparé les concentrations de l'tHcy, folate, et de la vitamine B<sub>12</sub> en fonction de différents génotypes du polymorphisme C677T MTHFR entre trois groupes ethniques (Afrique de l'Ouest, France, Italie et Mexique). Dans l'analyse de régression multiple, le folate était un prédicteur indépendant significatif de l'tHcy dans toutes les zones étudiées (Afrique de l'ouest, France, Italie, Mexique) et tHcy était également associé significativement à la vitamine B<sub>12</sub> chez les Siciliens et les Mexicains. Le génotype TT était associé à une concentration de tHcy

considérablement plus élevée en Afrique de l'ouest. Il a entraîné une légère élévation mais significative de l'tHcy en France et en Italie et aucun effet n'a été noté au Mexique.

Malgré l'effet établi du polymorphisme C677T MTHFR sur le statut en folates, les résultats cliniques restent contradictoires, et cela est souvent due à l'impact variable du statut en folate (**Bueno et al., 2016**). Chez les noirs Africains, en dépit d'une faible fréquence de l'allèle T, cela n'a aucun effet bénéfique sur les concentrations de tHcy, en raison d'une carence en folate et d'une prévalence élevée des maladies infectieuses qui compromettent l'assimilation du folate (**Rosenberg et al., 2002; Rosenblatt et al., 1999**).

Certains chercheurs ont rapporté que les régimes alimentaires riches en folate augmentent significativement les concentrations de folate dans le sang ou diminué de manière significative le taux du tHcy (**Brouwer et al., 1999 ; Silaste et al., 2003**). Ces résultats concorde bien avec ceux trouvé par **Taguchi et al., (2012)** qui ont révélé que l'tHcy a diminué significativement avec la consommation du folate et les concentrations sérique des folates. Il est utile de mentionner qu'une réduction significative de l'tHcy a été enregistré, après supplémentation en folate, chez les sujets porteurs du génotype TT par rapport à ceux avec le génotype CC du polymorphisme C677T MTHFR (**Yang et al., 2008**).

Des apports en acide folique de (0.2 mg soit 200 µg ou 0.4 soit 400 µg) / j ont été associés à une réduction de (60% ou 90% respectivement) du taux de l'tHcy, (**Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration, 2005**).

Par conséquent, le folate alimentaire joue un rôle clé face aux risques de l'hyperhomocystéinémie, donc il peut annuler le risque associé au polymorphisme MTHFR C677T en contrôlant directement les niveaux de l'tHcy (**Kumudini et al., 2014**).

Cette association n'est pas absolue, ce qui suggère que d'autres facteurs environnementaux et génétiques pourraient également jouer un rôle. L'effet du polymorphisme MTHFR C677T sur statut du folate est modifié par d'autres polymorphismes communs, ceux qui affectent le métabolisme ou le transport du folate. Le statut en folates était plus faible dans les génotypes 677TT MTHFR et SLC19A1 80AA par rapport aux génotypes de référence correspondants (**Bueno et al., 2016**).

L'augmentation des concentrations de tHcy pourrait être attribuée à la thermolabilité induite dans l'enzyme MTHFR, qui se traduit par la dissociation du dimère actif en monomères inactifs avec une perte ultérieure de la capacité de liaison à la flavine adénine dinucléotide (FAD) (**Yamada et al., 2001**). La FAD est un cofacteur de la MTHFR, il protège l'enzyme . Alors que le folate sert de substrat pour MTHFR et stabilise l'enzyme (**Yamada et al., 2001**).

En conséquence, le remplacement de l'alanine par la valine dans cette mutation (C677T) peut altérer l'interaction entre l'enzyme MTHFR et le folate, et entraîner une perturbation de la conversion du 5,10-méthylènetétrahydrofolate en 5-méthyltétrahydrofolate, la forme circulatoire majeure du folate (**Chango et al., 2000**). Ce qui est nécessaire à la conversion de l'homocystéine en méthionine. De plus, ce changement d'acides aminés, se situe au fond de ( $\alpha\beta$ )<sub>8</sub> barrel du domaine catalytique N-terminal de la protéine, qui joue un rôle vital dans la

stabilité de la structure de MTHFR et l'activité enzymatique (**Pejchal et al., 2006; Jacques et al., 1996**).

Les résultats de la présente étude concordent avec ceux de la littérature et supportent l'hypothèse «interaction gène-nutriments», entre le polymorphisme de MTHFR C677T et le statut en folate. L'hyperhomocystéinémie apparaît être un facteur de risque chez notre population témoin.

L'hyperhomocystéinémie reste alors un facteur de risque vasculaire dont le traitement réside en premier dans l'amélioration de la qualité des apports alimentaires en folate. Une supplémentation systématique en folates dans la nourriture doit être recommandée au moins dans la région étudiée (*Aurès*).

#### **VI.1.5. Corrélation entre l'homocystéine totale, folate et l'âge moyen.**

Nos résultats concordent avec ceux de **Ni et ses collaborateurs (2016)** qui ont trouvé des corrélations négatives mais significatives, entre l'tHcy, folate et vitamine B<sub>12</sub>. Ainsi, ils ont suggéré qu'aucune corrélation significative ne soit observée entre les taux sériques moyens de tHcy et le polymorphisme quand les taux de folates sont élevés (>34 nM); cependant, à un faible taux de folate (<34 nM), les porteurs du génotype TT présentaient des taux de tHcy significativement plus élevés.

En outre, **Hustad et al., (2007)** ont démontré que l'tHcy plasmatique était inversement proportionnel à toutes les vitamines B (Folate, Riboflavine, Cobalamine) et les relations entre tHcy- vitamines B ont été modifiées par le polymorphisme MTHFR et étaient les plus fortes chez les sujets porteurs du génotype TT, en particulier pour les folates et la riboflavine.

Par ailleurs, les taux de tHcy étaient inversement proportionnels aux concentrations de folate sérique; les corrélations dans les génotypes CC, CT, TT de la MTHFR étaient au total, toutes significatives (**Taguchi et al., 2012**).

Contrairement à nos résultats l'tHcy était corrélé positivement avec l'âge (**Taguchi et al., 2012**). Cette constatation est due à une diminution de la contribution des faibles concentrations de folate aux concentrations élevées d'homocystéine avec l'âge, mais pas à la faible concentration de la vitamine B<sub>12</sub> (**Selhub et al., 1999**). Probablement, la prévalence des faibles concentrations de la vitamine B<sub>12</sub> augmente avec l'âge, et avec une éventuelle association d'autres facteurs de risque connus à affecter le métabolisme de l'tHcy, tels que la réduction physiologique de la fonction rénale ou le statut oestrogénique chez la femme (**Refsum et al., 1998**).

#### **VI.1.6. Les caractéristiques cliniques et biochimiques des sujets témoins selon le polymorphisme du MTHFR A1298C.**

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature et qui ont montré que l'impact du polymorphisme A1298C seul, n'était pas associé à l'hyperhomocystéinémie (**Hanson et al., 2001; Friedman et al., 1999**).

**Devlin et al., (2006)** ont constaté qu'aucun effet significatif individuel du polymorphisme C677T. Il a été démontré que l'effet de cette mutation est plus important lorsqu'elle est associée au polymorphisme A1298C (**Weisberg et al., 1998**).

Les publications concernant l'effet du polymorphisme A1298C MTHFR sur le profil lipidique sanguin étaient relativement faibles (**Li et al., 2015**). Nos données viennent en accord avec ceux rapportés par **Friedman et al., (1999)** qui ont trouvé que le polymorphisme A1298C de la MTHFR n'affecte pas le taux de cholestérol total. De plus, l'effet du polymorphisme A1298C indépendant ne révèle aucune association avec les taux de lipides sériques et également aucune action sur la dyslipidémie (**Li et al., 2015**).

Contrairement à nos résultats, **Li et al., (2016)** ont observé une augmentation significative de l'ASAT, cette mutation a augmenté également le taux de l'ALAT.

Similairement à nos résultats, aucune association significative n'a été remarquée entre le polymorphisme A1298C et la CRP (l'effet de la CRP était non significatif dans le groupe CC/AA) dans l'étude de **Nojima et al., (2018)**.

#### **VI.1.7. Répartition des fréquences génotypiques et alléliques de la mutation A1298C du gène MTHFR selon le sexe dans la population témoin.**

La distribution de fréquence du polymorphisme A1298C n'a pas largement été étudiée, comme celui de C677T. Nos résultats rejoignent ceux de **Amira et al., (2008)** qui ont révélé que le sexe n'affecte pas la distribution de la mutation A1298C, car les fréquences des génotypes trouvées, étaient comparables entre les hommes et les femmes.

Une étude intéressante réalisée par des chercheurs a montré que les pays d'Afrique de l'Ouest et Mexico étaient les deux régions présentant les fréquences les plus basses de l'allèle 1298C et du génotype 1298CC, la fréquence la plus élevée a été rapportée en France. Le génotype CC et la fréquence de l'allèle C observés étaient: chez les sujets d'Afrique de l'ouest, CC (1,9%), C (13,9%), à Mexico City CC (2,3%), C (14,7%), en France CC (11,5%), C (35,7%), en Italie (Sicile), les fréquences étaient CC (7,5%) et C (28,1%) (**Guéant-Rodriguez et al., 2006**). Sur les 120 participants irlandais en bonne santé, 56 étaient des porteurs hétérozygotes AC, avec une fréquence de 46,7%, tandis que 11 (14,2%) étaient homozygotes (CC). La prévalence des homozygotes 1298CC dans cette étude est nettement supérieure à celle rapportée dans la plupart des populations européennes (**Rita et Thomas, 2004**).

Les fréquences des génotypes MTHFR 1298AA, 1298 AC et 1298 CC en Turquie étaient respectivement de 43,7%, 46,3% et 10,0% (**Sazci et al., 2005**). Globalement, les fréquences de l'allèle 1298C allant de 24% à 40% en Europe, de 0% à 15% en Amérique du Sud et de 14,7% en Amérique du Nord (**Amouzou et al., 2004**). Des fréquences plus basses ont été observées dans la population asiatique CC (1,9%), C (0,16) (**Esfahani et al., 2003**) et dans la population chinoise CC (3,8%), C (0,176) (**Shrubsole et al., 2004**).

Cependant, il est important de noter qu'au Liban, où la prévalence du polymorphisme MTHFR A1298C était la plus élevée parmi différentes populations ethniques; la prévalence du génotype AC était de 50,2%, suivie du génotype sauvage (AA) 25,9%, et le génotype homozygote (CC) était de (23,9%), avec une fréquence allélique (C): 0,49 (la fréquence la plus élevée) (**Amira et al., 2008**). De plus, la fréquence du génotype CC et de l'allèle C était également plus élevée chez les Tamiliens ; CC (10%), C (0,35) (**Angeline et al., 2004**) et les Arabes de Bahreïn ; CC (7,3%), C (0,34) (**Al-Habboubi et al., 2004**). La population Indienne avec CC (3%), C (0,10) (**Markan et al., 2007**) et japonaise avec CC (0,16), C (1,3%) (**Hiraoka et al., 2004**), avaient enregistré les fréquences les plus basses.

Le mode de vie et les facteurs environnementaux, tels que l'apport alimentaire en folate, varient selon les différents groupes ethniques et peuvent influencer la distribution des polymorphismes du gène MTHFR et les fréquences des allèles de C677T et A1298C (**Wang et al., 2016**). De plus, l'influence de la latitude et du rayonnement ultraviolet, les histoires migratoires et les maladies peuvent également affecter les distributions de fréquence des deux allèles (**Yang et al., 2013; Wang et al., 2012**).

Chez notre population d'étude, les fréquences alléliques et génotypiques, semblent être inférieure à celle observées dans d'autres populations arabes (libanaise, arabe de Bahreïn) et la population Tamilienne. La fréquence des allèles de la mutation A1298C est moins documentée, mais semble plus uniforme dans la majorité des populations étudiées (**Lievers et al., 2001; Peng et al., 2001; Weisberg et al., 2001**). Contrairement à la mutation C677T, l'effet biochimique de la mutation A1298C sur la fonction de MTHFR reste controversé (**Van der Put et al., 1998; Friso et al., 2002**), en effet, la relation entre le polymorphisme du gène MTHFR A1298C et les niveaux de Hcy reste controversée (**Wang et al., 2017**).

En conclusion, de faibles fréquences de l'allèle C et du génotype CC du polymorphisme A1298C ont été trouvés chez notre population témoins par rapport aux autres groupes ethniques; ce polymorphisme n'a pas fait l'objet d'études approfondies dans le monde et en particulier en Algérie.

#### **VI.1.8. Fréquence de la coexistence des polymorphismes C677T et A1298C du gène MTHFR**

Peu de chercheurs fondent leurs analyses sur l'examen de la coexistence des variants de C677T et de A1298C dans différentes populations et leur corrélation avec l'activité du MTHFR, ainsi que le changement du niveau de folate (**Guéant-Rodriguez et al., 2006**).

Une des premières études a été réalisée sur la population néerlandaise (**Van der Put et al., 1998**). L'étude n'a pas révélé la coexistence des génotypes 677CT / 1298CC, 677TT / 1298AC, 677TT / 1298CC, des résultats similaires ont été obtenus dans notre groupe étudié et dans plusieurs études européennes. Il a été suggéré que la distance physique qui sépare les polymorphismes MTHFR C677T et A1298C sur le chromosome est courte (2,1 kb), ce qui pourrait réduire la recombinaison des génotypes CT / CC, TT / AC et TT / CC (**Stegmann et al., 1999; Hanson et al., 2001**). Les génotypes coexistant les moins fréquente qui ont été trouvé dans la population néerlandaise étaient; 677TT / 1298AA (9%), 677CC / 1298CC

(9.4%), sont comparables à nos résultats: 677TT / 1298AA (11,70%), 677CC / 1298 CC (7.44%). Les génotypes coexistant les plus fréquents étaient 677CT / 1298AA (20.1%), ainsi que ceux trouvés dans notre groupe 677CT / 1298AA (29.78%), alors que les génotypes 677CT / 1298AC étaient (20.1%) dans la population néerlandaise, ont été détectés à faible fréquence dans notre étude (11.70%), et également les génotypes 677TT / 1298AA (11.70%).

Une exploration de l'activité du MTHFR en fonction de la présence de polymorphismes C677T et A1298C a été soulignée par **Van der Put et al., (1998)** et **Weisberg et al.,(1998)**. Les auteurs ont révélé une diminution significative de l'activité de la MTHFR dans le cas des génotypes coexistant MTHFR 677TT / 1298AA (30 à 40%, environ 70% de moins), une diminution de 50% de l'activité de la MTHFR dans les génotypes 677CT / 1298AC. Près de 40% de réduction de l'activité enzymatique a été observée pour les autres génotypes (677CC / 1298CC, 677CT / 1298AA).

Contrairement à nos résultats, des cas exceptionnels ont été rapporté dans la population turque comme la présence des génotypes coexistant suivant: 677CT / 1298CC, 677TT / 1298AC (**Ergul et al., 2003; Sazci et al., 2005**). Dans l'une de ces deux études, portant sur 1004 femmes et 680 hommes (1684), la fréquence des génotypes doubles hétérozygotes 677CT / 1298AC était de (21.6%) (**Sazci et al., 2005**). Les génotypes 677TT / 1298AC ont été également détecté dans la population de Hundo (**Rai et al., 2006**) et aussi à Canada par **Isotalo et ces collaborateurs (2000)** qui ont étudié 119 nouveau-nés; TT / AC: 2 (1.70%), pour les autres génotypes coexistant, sont les suivants: CC / AA: 17 (14.30%), CC / AC: 42 (35.30%), CC / CC: 9 (7.60%) , CT / AA: 14 (11.70%), CT / AC: 23 (19.30%), TT / AA: 12 (10.10%), les génotypes TT / CC et CT / CC n'ont pas été observés dans cette étude.

**De Re et ces collaborateurs (2010)** ont démontré la coexistence des génotypes 677CT / 1298AC dans (30.20%), chez des 454 sujets italiens (315 hommes et 139 femmes). Dans une étude de population irlandaise portant sur les combinaisons de génotypes MTHFR C677T / A1298C, 28 participants (23.3%) étaient des doubles hétérozygotes (**Rita et Thomas, 2004**). Dans une autre population composée de 1684 sujets réparties de manière aléatoire en Turquie (1004 femmes et 680 hommes), la fréquence de l'hétérozygotie 677CT / 1298AC était la plus élevée (21.6%), par rapport au Canada (15%), aux États-Unis (17%) et aux Pays-Bas (20%) (**Sazci et al., 2005**), ces prévalences sont plus élevés que ceux obtenus dans notre analyse (11,70%). En outre, des génotypes 677TT / 1298AA ont été trouvés dans (12.60%) (**De Re et al., 2010**), ces résultats proche de ceux obtenus dans notre étude (11,70%). Ainsi, une étude a examiné la fréquence de ces deux polymorphismes de MTHFR dans une population portugaise, chez 117 volontaires sains étudiés (71 femmes et 46 hommes); 21,4% des sujets étaient des hétérozygotes composites (677CT / 1298AC), la fréquence de l'allèle 1298C était de 28.2%, ce qui démontre que cette mutation est également fréquente dans cette population (**Castro et al., 2003**).

Il convient de noter qu'une fréquence plus élevée de coexistences de génotypes avec l'allèle muté suggère un rôle important du régime alimentaire riche en folates dans le sud de l'Europe (Italie, Turquie) qui pourrait affecter la capacité des individus à survivre avec les génotypes mutés des polymorphismes du MTHFR (**Hubert et al., 2015**). Il semble que les

polymorphismes C677T et A1298C peuvent agir de manière synergique, étant donné que l'hétérozygotie (doubles hétérozygotes) pour les deux polymorphismes entraîne une diminution importante de l'activité de la MTHFR comparativement à l'hétérozygotie de l'une des deux mutations (**Van der Put et al., 1998**). De plus, une association entre le statut de double hétérozygote et des taux élevés de tHcy en présence de faible concentration de folate a été observée (**Van der Put et al. 1998**). Des études antérieures ont montré que la combinaison des polymorphismes A1298C et C677T semble affecter l'activité enzymatique de la MTHFR et les taux de tHcy (**Weisberg et al., 1998; Weisberg et al., 2001**). Cependant, d'autres auteurs n'ont pas trouvé une influence du folate sur la distribution du génotype combiné 677CT / 1298AC dans les 7 zones étudiées; Afrique de l'Ouest, zones côtières et de savanes du Togo, la côte du Bénin, la France, la Sicile et Mexico City (**Guéant-Rodriguez et al., 2006**).

Certains facteurs environnementaux, notamment le facteur climatique; les rayons ultraviolet (UV), peuvent servir comme une pression de sélection naturelle sur le polymorphisme du MTHFR C677T au cours de l'histoire de l'évolution humaine. Les auteurs ont démontré leur association et influence sur la fréquence du polymorphisme C677T dans de nombreuses populations (**Hubert et al., 2015**). Depuis plusieurs années, **Cordain et Hickey (2006)** ont été les premiers à émettre l'hypothèse que les rayons UV pourraient affecter négativement le statut en acide folique et le modèle de la distribution mondiale du polymorphisme C677T de la MTHFR. Le folate est une vitamine UV-labile, essentielle au maintien de la synthèse de l'ADN et aux mécanismes de réparation, il a été démontré qu'un certain nombre d'enzymes dépendant du folate réagissaient aux UV (**Patrice et al., 2016**). Une couleur de peau plus claire et une exposition accrue aux rayons UV peuvent constituer un désavantage pour les porteurs d'allèles 677T en raison de leur influence néfaste sur le statut en folate (**Jablonski et Chaplin 2000; Branda et Eaton 1978**).

Une étude réalisée par **Wang et al., (2012)** a montré qu'il existe une relation inverse entre la fréquence d'allèles T et le rayonnement UV. Leurs résultats soutenaient l'hypothèse selon laquelle le modèle de distribution du polymorphisme MTHFR C677T en Eurasie peut être le résultat de l'interaction de la sélection naturelle génétique et environnementale, notamment le rayonnement UV. Cependant, l'hypothèse UV ne peut toujours pas expliquer pourquoi les habitants du Nord (Chinois) ayant une peau plus claire et moins exposée aux rayons UV (**Branda et Eaton, 1978**) présentent une carence plus importante en folate (**Hao et al., 2003**) et une fréquence plus élevée d'allèle 677T par rapport aux habitants du sud (**Yang et al., 2013**).

La fréquence de la coexistence des génotypes du C677T et A1298C MTHFR notées chez notre groupe témoin est conforme aux données de la littérature avec une fréquence plus basse des doubles hétérozygotes.

### VI.1.9. La distribution de la concentration plasmatique du folate, vitamine B<sub>12</sub> et de l'homocystéine total selon les génotypes du polymorphisme A1298C MTHFR

Des résultats similaires ont été observés par **Kluijtmans et al., (2003)** qui n'ont pas trouvé, sur une cohorte de 452 jeunes adultes, une action du génotypes A1298C MTHFR sur les concentrations du folate, de la vitamine B<sub>12</sub> et de l'tHcy.

De même pour une population âgée, **Devlin et al., (2006)** ont rapporté qu'aucun effet individuel de ce polymorphisme n'a été noté sur les concentrations sériques de l'tHcy ou de folate.

Ces résultats concordent bien avec ceux obtenu par **Huemer et al., (2006)** sur deux cent soixante-quatre enfants sains et adolescents âgés de 2 à 17 ans. Aucun impact significatif sur les concentrations de tHcy, folate ou cobalamine n'a été remarquée concernant ce polymorphisme. En outre, ces auteurs n'ont pas trouvé un effet significatif du génotype homozygote muté 1298CC, sur les concentrations de tHcy, de folate ou de cobalamine ce qui est conforme aux résultats trouvés chez les adultes par **Van der Put et al.,(1998)**.

La distribution des concentrations plasmatiques / sériques circulaires des biomarqueurs, homocystéine, folate, et vitamine B<sub>12</sub> selon les divers génotypes du polymorphisme A1298C n'a montré aucune différence significative des taux de tHcy et folate, mais pas pour la vitamine B<sub>12</sub> (**Yakub et al., 2012**).

Nos résultats, concorde bien avec les observations de **Yakub et al., (2012)** qui n'ont révélé aucun risque significatif d'hyperhomocystéinémie avec le polymorphisme A1298C MTHFR, et cela pour le génotype (AC) et le génotype muté (CC), après ajustement avec l'âge, le sexe, le folate et la vitamine B<sub>12</sub>.

De plus, lorsque **Pereira et al., (2004)** ont étudié l'effet du polymorphisme A1298C MTHFR sur 209 personnes appartenant à une population urbaine (mélangée) caractérisée par une légère carence en folate, aucun effet significatif n'a été observé sur le taux du folate et l'tHcy, bien que le polymorphisme C677T MTHFR avait un effet très significatif sur l'tHcy, la vitamine B<sub>12</sub> et le folate .

Une méta-analyse menée par **Wang et al., (2017)** comprend 13 études avec des niveaux de tHcy rapportés comme l'une des mesures de l'étude. Dans l'ensemble, il n'y avait pas de différences significatives dans les concentrations de tHcy entre les participants avec 1298 CC MTHFR (12 essais, n = 129), AA (n = 2166), ou génotype AC (n = 958). Alors, ce polymorphisme n'a pas affecté les taux plasmatiques de l'tHcy chez cette population chinoise.

Les effets de la mutation A1298C MTHFR sur les concentrations plasmatiques de tHcy restent controversés. Des études récentes rapportent des effets significatifs de cette mutation sur les taux plasmatiques de tHcy.

Contrairement a nos résultats, **Zappacosta B et al., (2014)** ont trouvé chez des adultes italiens

observé chez le génotype sauvage (AA) et un taux plus faible chez l'homozygote muté (CC), et aussi, des concentrations plus élevées du folate ont été enregistrées chez les porteurs du génotype (CC) comparativement à ceux du génotype (AA) (une tendance opposée pour ces deux paramètres). Ces résultats rejoignent ceux trouvés auparavant par **Castro et ses collaborateurs (2003)**.

L'activité spécifique de la MTHFR chez les sujets porteurs du génotype (CC) n'était pas significativement différente de celle observée chez les porteurs (AA) ou chez les porteurs hétérozygotes (AC) lorsque le statut allèle en position 677 n'a été pas pris en compte (**Chango et al., 2000**). Le polymorphisme A1298C pourrait affecter la régulation enzymatique. Probablement par la S-adénosylméthionine, un inhibiteur allostérique de MTHFR, qui est connu pour se lier dans la région C-terminale (**Weisberg et al., 1998**). Cette mutation est associée à une diminution de l'activité enzymatique mais pas à la thermolabilité, les sujets avec le génotype 1298CC ont une activité enzymatique réduite, mais dans une moindre mesure que ceux du génotype 677TT (**van der Put et al., 1998**).

Alors, nos résultats sont conformes à ceux rapportés dans la littérature et soutiennent les conclusions qui indiquent que le polymorphisme C677T MTHFR à un impact plus important que le polymorphisme A1298C MTHFR.

## **VI.2. Description de la population pathologique représentée par des patients coronariens et différents facteurs de risque**

### **VI.2.1. Les caractéristiques cliniques et biochimiques des patients selon le polymorphisme du MTHFR C677T et A1298C.**

Les résultats obtenus pour l'âge, le sexe masculin et le tabagisme, viennent en accord avec les recherches qui ont été trouvées par **Li et al., (2017)**. Cependant, **Klerk et al., (2002)** ont trouvé dans une méta-analyse évaluant la relation entre le polymorphisme C677T et le risque de la maladie coronarienne, des différences significatives entre les divers génotypes en ce qui concerne les facteurs de risques; sexe masculin et tabagisme.

Contrairement à nos résultats, **Dhar et al., (2010)** ont constaté que le diabète, et les antécédents familiaux de coronaropathie étaient significativement associés aux génotypes (TT) et (CT).

, des résultats similaires ont été trouvés par **Klerk et al., (2002)**. Néanmoins, nous avons noté que les malades porteurs du génotype (CT) étaient en surpoids. **EE et al., 2014** ont enregistré dans une étude clinique sur une période entre 1992-2007, que les sujets malades atteints d'infarctus de myocarde étaient en surpoids.

Par ailleurs, **Bennouar et al., (2007)** ont observé que la distribution des fréquences des fonction des différents génotypes du polymorphisme C677T, étaient plus élevées chez les

patients coronariens que les témoins, à l'exception de la dyslipidémie et de l'obésité dans les génotypes (TT) notamment. Chez les patients, toutes les fréquences des facteurs de risque enregistrés étaient plus faibles chez les génotypes (TT) que chez le reste des génotypes.

Ces différences nous amènent à penser que les facteurs de risque conventionnels n'ont pas le même effet sur la maladie coronarienne en fonction des différents génotypes du polymorphisme C677T MTHFR. En effet, chez les sujets porteurs du génotype sauvage (CC), l'augmentation du risque de coronaropathie était significativement associée aux habitudes tabagiques, à l'obésité et à la dyslipidémie (**Bennouar et al., 2007**).

Nous avons trouvé quatorze jeunes patients lors de cette enquête. La maladie coronaire prématurée est rare (6 % des syndromes coronaires aigus [SCA]) (**Van Der Vynckt et al., 2012**).

D'après **Berenson et al., (1998)**, la prévalence des stries lipidiques, premier stade de l'athérosclérose, augmente avec l'âge (de 50 % dans le groupe des 2 à 15 ans à 85 % dans celui des 20 à 40 ans) et celle des plaques fibreuses passe de 8% dans le groupe des 2 à 15 ans à 69% dans le celui des 25 à 40 ans.

L'âge est le plus puissant des facteurs de risques de l'athérosclérose. En effet, il est absent chez l'enfant et presque toujours présent chez le vieillard (**Ambrosi, 2011**). Les principales altérations observées au cours du vieillissement dans les grandes artères, chez l'homme comme chez les animaux, sont l'augmentation de la lumière artérielle, l'épaississement de l'intima-média, l'augmentation de la rigidité artérielle et le dysfonctionnement des cellules endothéliales (**Lakatta et Levy, 2003**). Chez l'homme, l'épaisseur intima-média augmente d'un facteur deux à trois entre 20 ans et 90 ans (**Jacob, 2006**).

En outre, l'âge facilite l'expression de gènes délétères à pénétrance faible, c'est ce qui fait toute la difficulté et les incohérences des recherches actuelles sur les polymorphismes génétiques liés à l'infarctus, à l'insuffisance cardiaque, ou à l'hypertension (**Schwedler et al., 2009**).

A propos du sexe masculin, la proportion des hommes déclenchant une maladie coronaire, augmente dans les tranches d'âge les plus jeunes, 90 à 95 % des moins de 40 ans (**Fournier et al., 2004; Barbash et al., 1995**) et diminue pour les personnes âgées, dans les tranches d'âges suivant (55 % entre 75 et 85 ans, 40 % des plus de 85 ans (**Avezum et al., 2005**)). L'homme est nettement plus exposé aux accidents cardiovasculaires que la femme en période d'activité génitale. Cependant, cela a été longtemps ignoré, le niveau de risque chez la femme rejoint progressivement celui de l'homme, plusieurs années après la ménopause (**Ait- Oufella et al., 2014**).

De plus, la femme est protégée pour de multiples raisons : moindre stress, pression artérielle discrètement moins élevée chez la femme jeune, incidence du tabagisme moins élevée, rôle protecteur possible des œstrogènes (**Ambrosi, 2011**).

Le rôle des œstrogènes dans l'athérogenèse reste débattu. Ces hormones pourraient agir sur la perméabilité de la barrière endothéliale par leur capacité à stimuler la prolifération de

l'endothélium lésé. Elles exercent aussi un effet bénéfique sur le taux de la cholestérolémie et le profil lipidique (**Arnal et al., 2000**).

L'indice de masse corporelle est devenu la référence internationale pour définir l'obésité pour la pratique clinique et épidémiologique (**Basdevant, 2011**). L'obésité est un facteur de risque indirect des maladies cardiovasculaires passant par le développement d'une insulino-résistance et d'une hypertension artérielle (HTA) (**Baudin et al., 2009**).

Pour le facteur du risque ; tabagisme, une étude transversale incluant 19.000 participants a montré que, par rapport aux non-fumeurs, les fumeurs actuels ainsi que les anciens fumeurs ont des taux significativement plus élevés de la protéine C-réactive, du fibrinogène et de l'homocystéine (**Berlin, 2008**).

Les mécanismes de toxicité artérielle du tabac sont multiples et complexes. Ils associent un effet toxique direct des produits de dégradation sur l'endothélium, la production de radicaux libres de l'oxygène, une activation des plaquettes (**Benowitz et Gourlay, 1997**). De plus, la nicotine et le monoxyde de carbone produisent séparément une tachycardie, une hypertension et une vasoconstriction, et tous deux peuvent engendrer des lésions endothéliales directes (**Fryer et al., 1993**).

Selon **Sadeghian et al., (2006)** l'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque indépendant de la coronaropathie prématurée chez les jeunes hommes de moins de 45 ans , ces résultats viennent confirmer les recherches menées par **Foody et al., (2000)** aux Etats-Unis et ceux de **Pinto et al.,(2001)** en Espagne.

De plus, **EL Gezery et al., (2003)** ont observé après une analyse multivariée, que l'hyperhomocystéinémie reste un facteur de risque indépendant de la maladie coronaire. Donc, l'hyperhomocystéinémie plutôt que la mutation C677T de la MTHFR est un facteur de risque indépendant de la coronaropathie. Ainsi, l'hyperhomocystéinémie modérée est supposée être un facteur ou un marqueur (**Lonn et al., 2006; Milani et Lavie, 2008**) de l'athérosclérose et de ses complications. Par ailleurs, il existe une controverse sur le rôle causal de l'homocystéine, et un large soutien à l'idée qu'une concentration élevée de l'homocystéine plasmatique est une conséquence de la maladie coronarienne (**Chua et al., 2005**).

Il a été mentionné que l'hyperhomocystéinémie, lorsqu'elle résulte de carences vitaminiques ou d'un polymorphisme génétique est habituellement modérée ou moyenne (**Chango et al. 1999**). Une méta-analyse antérieure a suggéré qu'une augmentation de 5  $\mu\text{mol} / \text{L}$  du niveau de l'Hcy augmente le risque de la maladie coronarienne (CHD) d'environ 20% indépendamment des facteurs de risque traditionnels de la maladie coronarienne (**Humphrey et al., 2008**).

Les mécanismes par lesquels des taux élevés de l'homocystéine pourraient prédisposer les patients à l'athérosclérose coronarienne demeurent incertains. Des preuves expérimentales suggèrent que l'homocystéine pourrait faciliter le processus d'oxydation vasculaire et réduire la régulation vasomotrice de l'endothélium (**Hofmann et al., 2001**) ou même induire une agrégation plaquettaire (**Durand et al., 1997**). L'hyperhomocystéinémie peut aussi contribuer

à la fois aux processus athérosclérotique et thrombotiques (en favorisant l'activité prothrombique) (**Outinen et al., 1998**).

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Li et al., (2017)** qui n'ont rapporté aucune interaction significative entre le polymorphisme C677T MTHFR et le bilan lipidique chez les patients coronariens. Par contre, **Kerken et al., (2006)** ont souligné que le génotype MTHFR 677 TT était associé à des concentrations élevée de cholestérol total et des triglycérides, chez les malades coronariens. De plus, **Houcher et al., (2012)** ont ainsi trouvé des concentrations plus élevée de cholestérol total chez les patients atteints de MCV (maladies cardiovasculaires) avec des génotypes 677CT / TT comparativement aux porteurs de génotype (CC). **Hendy et al. (2011)** ont également signalé qu'il existe une relation étroite entre le polymorphisme génétique C677T MTHFR et l'hypertension, l'hypercholestérolémie et l'hyperhomocystéinémie.

L'effet de l'allèle muté (T) sur les concentrations de cholestérol total, de folate et de la vitamine B<sub>12</sub> peut être lié aux effets négatifs possibles de la concentration élevée de tHcy sur le profil lipidique et sur les vitamines B<sub>9</sub> et B<sub>12</sub> (**Houcher et al., 2012**). En outre, **Li et ses collaborateurs (2002)** ont montré dans des cellules endothéliales traitées avec l'homocystéine, une expression accrue de l'ARNm codant pour la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMGCR), enzyme limitant la vitesse dans la voie du cholestérol. Donc, l'homocystéine semble provoquer une augmentation de synthèse du cholestérol dans les cellules endothéliales.

Concernant les résultats des différent paramètres cliniques et biochimiques. Des résultats similaires ont été observé par **Ince et al., (2016)** en ce qui concerne; l'IMC, la dyslipédimie, la repartition des patients ayant des antécédents familiaux cardiovasculaires, et l'hyperhomocystéinémie modérée. Une étude menée par **Joubran et al., (1998)** a conclu que l'hyperhomocystéinémie, qui peut résulter de mutations du gène MTHFR, est indépendamment associée à la maladie coronarienne, chez les hommes arabes.

#### \*La CRP

Similairement a nos résultats, **Li et al., (2017)** n'ont trouvé aucun effet significatif du polymorphisme C677T MTHFR sur les concentrations de la CRP chez le les sujets du groupe coronariens.

Cependant, dans une antérieur menée par **Dedoussis et al., (2005)** évaluant la relation entre les taux des marqueurs inflammatoires liés aux maladies cardiovasculaires et les génotypes du polymorphisme C677T de la MTHFR, chez 574 sujets de la région de l'Attique, en Grèce, les concentrations de la protéine C-réactive (CRP), le fibrinogène, le nombre de leucocytes et le taux d'amyloïde étaient plus élevés chez les porteurs des génotypes (TT) comparativement aux génotypes (CC) et (CT). Cette association pourrait donner lieu à une hypothèse d'un mécanisme biopathologique commun entre le processus inflammatoire et le MTHFR.

La protéine C-réactive (CRP) et le complément, sont des médiateurs inflammatoires et des facteurs de risque cardiovasculaires possibles pouvant contribuer à la pathogenèse de l'athérosclérose (**Niessen et al., 2003; Krijnen et al., 2006**).

#### \*La BNP

Contrairement a nos résultats **Cho et al., (2006)**, ont trouvé sur un total de 227 patients atteint de maladie cardiovasculaire que les concentrations plasmatiques de BNP étaient significativement plus élevées chez les patients présentant une mutation MTHFR C677T que chez les patients sans mutation. Ainsi que les concentrations plasmatiques de BNP étaient positivement corrélées aux concentrations de tHcy. Cette étude a montré aussi que des concentrations élevées de BNP, CRP, tHcy et la présence de la mutation MTHFR C677T contribuaient indépendamment à la prédiction des maladies cardiovasculaires.

\*l'ASAT, l'ALAT et l'urée

Contrairement a nos résultats, **Shen et al., (2015)** ont trouvé chez 350 patients coronariens hospitalisés et 260 témoins, une augmentation significative de la concentration de l'ASAT et l'ALAT chez le groupe malade comparativement au groupe témoin. Les taux élevés d'ASAT et d'ALAT dans le sérum sont des marqueurs biochimiques qui peuvent être utilisés pour prédire la gravité de la maladie coronarienne et sont également des facteurs de risque indépendants de la maladie coronarienne.

Pour apprécier la fonction rénale, le dosage de d'urée dans le sang était alors utilisé pour qualifier les insuffisants rénaux, ainsi, un dysfonctionnement réinale pourrait affecter les entraîner une hyperhomocystéinémie, chez nos patients et d'après nos résultats la fonction physiologique rénale était normale.

## **VI.2.2. Effet de la mutation C677T de la MTHFR sur les facteurs de risque biochimiques chez les sujets coronariens (avec un IDM)**

### **VI.2.2.1. Association du génotype C677T MTHFR avec l'homocystéine totale, la vitamine B<sub>12</sub> et B<sub>9</sub>**

Les maladies coronaires (dont l'infarctus du myocarde fait partie) sont des pathologies chroniques multifactorielles. L'infarctus du myocarde (IDM) est un problème clinique important en raison de sa grande contribution à la mortalité.

Nos résultats concernant les concentrations de l'homocystéine totale, la vitamine B<sub>12</sub> et les folates s'expliquent probablement par la petite taille de nos échantillons pour tirer des conclusions sur les conséquences pour nos patients coronariens.

**Morita et ses collaborateurs, (1997)** ont rapporté que la fréquence du génotype muté (TT) du polymorphisme C677T MTHFR était significativement plus élevée chez les patients atteints d'une coronaropathie que chez les témoins dans une population japonaise. De plus, la fréquence de ce génotype était associée à la sévérité de la coronaropathie. Les mêmes résultats ont été également trouvés par **Heidari et al., (2015)** dans une population Iranienne.

Afin qu'on puisse préciser l'effet de ce polymorphisme sur certains paramètres biochimiques; tHcy, vitamine B<sub>9</sub> et B<sub>12</sub>, nous avons essayé de préparer un deuxième tableau (**tableau 13**), dont on a classé les malades en deux groupes selon l'homocystéinémie; normale et modérée. Nos résultats rejoignent ceux de **Eftychiou et al., (2012)** suggérant que l'hyperhomocystéinémie modérée n'est pas seulement associée à la coronaropathie, mais également à l'IDM et à la coronaropathie à vaisseaux multiples (multi-vessel CAD).

Récemment, une étude menée par **Liu et al., (2015)** incluant des patients atteints de coronaropathie, de différentes catégories, a révélée que l' Hhcy était indépendamment associée à la sévérité de la maladie coronarienne et corrélée significativement aux faibles taux d'acide folique.

En effet, il existe un débat sur la causalité, à la fois du génotype (TT) MTHFR et de l'hyperhomocystéinémie, dans leur association avec l'IDM (**Tanis et al., 2004**). Donc, afin d'établir clairement ce lien, de nombreux autres paramètres doivent être évalués, par exemple, le timing nécessaire au développement de la maladie au cours l'hyperhomocystéinémie doit être évalué plus précisément (**Kerken et al., 2006**).

Les résultats de **Tanis et ses collaborateurs (2004)** montrent que le génotype (TT) est associé à un risque accru d'IDM, uniquement lorsque le statut en acide folique est faible. Chez les jeunes patients avec un faible statut en folate et du génotype homozygote muté (TT), le risque d'infarctus du myocarde était 2 fois plus élevé que chez ceux homozygotes sauvage (CC) avec une statut élevée en folate. **Al Mawi et al., (2004)** ont démontré sur un échantillon de 96 malades cardiaques et 404 sujets témoins, que la fréquence de l'allèle T et du génotype muté (TT) était associée à la coronaropathie et à des taux élevés de l'homocystéine plasmatique chez une population de Bahreïn.

Une étude portée sur 452 jeunes adultes, a souligné que les facteurs génétiques contribuaient à 9% de la variance de l'tHcy, à comparer avec les 35% estimés pour les faibles taux de folate et de la vitamine B<sub>12</sub> (**Kluijtmans et al., 2003**).

Dans une étude Égyptienne portée sur 48 patients de sexe masculin atteints de coronaropathie confirmée et un groupe témoin comprend 20 sujets sains appariés selon l'âge. L'incidence de l'allèle T muté et du génotype (CT) était similaire chez les deux groupes. L'homocystéine plasmatique était significativement plus élevée et l'acide folique était significativement plus faible chez les patients comparativement aux témoins (**EL Gezery et al., 2003**).

En Tunisie, **Kerkeni et al., (2006)** ont observé que les fréquences de génotype MTHFR (CC, CT et TT) dans le groupe des patients coronariens (100 individus) étaient significativement différentes de celles observées dans le groupe témoin (120 individus) (49%, 35% et 16% vs 48,3%, 45,8% et 5,8%). Chez le groupe des patients, le génotype MTHFR 677 TT était associé significativement à des concentrations plus élevées de l'tHcy. De plus, une autre étude réalisée sur la population tunisienne atteinte de coronaropathie a montré que l'effet du génotype muté de la MTHFR était plus prononcé sur l'homocystéinémie et la maladie coronaire à faible folatémie (<ou = 6,1 ng / mL) (**Belkahla et al., 2008**).

En Algérie, **Houcher et al., (2012)** ont révélé que la mutation du gène MTHFR C677T, notamment les génotypes (CT / TT), ne semble pas être associée à une élévation du taux de l'tHcy plasmatique chez les patients cardiaques (à une folatémie <15.4 ng / ml et > 15.4 ng / ml), les auteurs ont suggéré que cette absence de corrélation pourrait être influencée par des concentrations plus élevées de folate dans cette étude.

Trois cent dix patients avaient un SCA (Syndrome Coronarien Aigu) ont été inclus dans l'étude de **Li et ses collaborateurs (2017)**, ces patients ont été classés en trois groupes ; CC (n = 78, 25.2%), CT (n = 137, 44.2%) et TT (n = 95, 30.6%). Les patients porteurs du génotype (TT) avaient un taux d'tHcy significativement plus élevé et des taux du folate significativement plus faibles que ceux ayant le génotype (CC) et (CT). Ainsi, les patients du génotype (TT) avaient des lésions coronariennes plus graves que ceux de génotypes (CC) et (CT).

Il est à noter qu'il existe de plus en plus de preuves mettant en évidence le rôle joué par la méthylation aberrante de l'ADN dans le développement de la maladie (**Andreassi et Botto, 2003; Heijmans et al., 2003**). Sachant que, par ailleurs, la source majeure du groupement méthyle utilisée par (SAM) pour les réactions de méthylation est la synthèse de novo, dépendant du folate, d'unités monocarbonées (**Selhub, 1999**). Les résultats de **Friso et al., (2002)** montrant que la méthylation génomique de l'ADN est en corrélation directe avec le statut en folate et inversement avec le taux d'homocystéine plasmatique (tHcy). Les génotypes (TT) avaient un niveau de méthylation de l'ADN bas par rapport au type sauvage (CC). Ces recherches ont été confirmées dans l'étude de **Castro R et ses collaborateurs (2004)**. En conséquence, ces anomalies de méthylation de l'ADN peuvent favoriser à la fois la carcinogenèse, notamment le cancer colorectal (**Shannon et al., 2002**), et la survenue des maladies cardiovasculaires (**Botto et al., 2003**).

Dans la mutation C677T du gène MTHFR, l'enzyme MTHFR devient thermolabile et l'activité MTHFR diminue respectivement de 65% et 30% chez les homozygotes mutés (TT) et hétérozygotes (CT) (**Frosst, et al., 1995**).

Certains résultats largement connus, comme ceux présentés par **Jeffrey et al., (1997)** n'ont pas trouvé une fréquence accrue de la mutation C677T du gène MTHFR chez 200 patients présentant un diagnostic d'IDM aux États-Unis, l'homozygotie était présente chez 11,5% des patients et 10,6% des sujets témoins. Notant que cette population est majoritairement de race blanche, bien nourrie, sans précision des tranches d'âge.

De plus, dans l'étude de **Gardemann et al., (1999)**, les auteurs n'ont pas réussi à détecter une association du polymorphisme C677T avec l'infarctus du myocarde non fatal. Il semble incohérent que, dans divers groupes à haut risque (présence des facteurs de risques habituels de la maladie coronarienne), le génotype (TT) était associé au score de maladie coronarienne mais pas à l'infarctus du myocarde. Néanmoins, dans cette étude, il convient de noter que les survivants d'infarctus du myocarde qu'ont été inclus et pas les patients avec l'issue fatale de cette maladie. Ce biais de sélection explique au moins en partie ces discordances.

De même, deux études cas-témoins suédoises (sur l'infarctus du myocarde et l'angine instable) ont confirmé que le taux d'tHcy élevée est un facteur de risque de maladie coronarienne dans les deux études. Dans 'SHEEP' (Stockholm Heart Epidemiology Programme), l'association entre tHcy et l'IDM a été observée chez les homozygotes CC et chez les hétérozygotes mais pas chez les T-homozygotes, indépendamment du tabagisme, activité physique et l'obésité (**Mehlig et al., 2013**).

Une méta-analyse actuelle comprend quarante-quatre études, 9 693 survivants d'IDM et 12 554 sujets témoins ont été inclus dans cette étude basée sur les informations les plus récentes, n'a montré aucune association significative entre le polymorphisme de MTHFR C677T et le risque d'infarctus du myocarde. Néanmoins, cette étude n'a pas investigué les interactions génétiques-nutritionnelles (**Li et al., 2016**).

Enfin, ces discordances entre les divers résultats peuvent être s'expliquer par les différences observées dans les populations d'échantillons, telles que l'origine ethnique et l'apport alimentaire en folate, dues à des aliments enrichis et / ou à une supplémentation en vitamines **Guéant-Rodriguez et al., (2005)**.

En 2001, les résultats d'une première étude d'intervention évaluant l'impact d'une réduction du taux d'homocystéine plasmatique sur le risque d'IDM et de mortalité cardiaque, suggéraient le bénéfice d'une supplémentation en acide folique et vitamine B<sub>12</sub> (**Tice et al., 2001**).

Plusieurs recherches portant sur l'importance de la supplémentation en acide folique a réduire les taux d'homocystéine plasmatique et a améliorer la fonction endothéliale, chez les sujets porteurs de l'allèle T muté notamment (**Title et al., 2000; Woo et al., 2002**).

Cependant, une autre méta-analyse, a révélé que la supplémentation alimentaire en acide folique pour abaisser les taux d'homocystéine n'a eu aucun effet significatif sur les événements cardiovasculaires ou sur le cancer global ou la mortalité dans les populations étudiées durant 5 ans (**Clarke et al., 2010**).

En effet, ces recherches controversées, nous amènent à suggérer un programme de supplémentation en acide folique systématique, qui doit être recommandée pour les patients atteints de coronaropathie, notamment chez ceux à haut risque et qui présentant un génotype T du gène MTHFR C677T, afin de réduire les taux élevé de l'tHcy et de ce fait l'incidence des coronaropathies. Par conséquent, a méta-analyse menée par **Yi et al., (2014)**, a pu souligner que des doses élevées d'acide folique (5 mg par jour durant 4 semaine) administrées par voie orale, améliorent la fonction endothéliale et réduisent la concentration d'homocystéine plasmatique chez les patients atteints de coronaropathie. Ainsi, cette étude a révélé l'importance d'une supplémentation en acide folique à forte dose pour l'amélioration de la fonction endothéliale. Des études ultérieures sont nécessaires, avec des doses efficaces afin de confirmer et/ou soutenir ces résultats intéressants, étant donné que la majorité des études ont été menées sur des patients à faible risque, et souvent, adoptées sans prendre en compte le génotype du polymorphisme MTHFR C677T.

Les recherches menées sur l'impact de l'tHcy et MTHFR C677T et leur interaction étaient très controversées entre les différents rapports. Une interaction gène-nutriment peut contribuer au risque élevé de coronaropathie seulement quand l'état nutritionnel est déséquilibré par un apport inadéquat en folate, avec des niveaux inférieurs à certains seuils. Des taux modérés d'homocystéine sont faiblement corrélés au risque de maladie coronarienne, mais la causalité demeure incertaine.

### **VI.2.3. Effet de la mutation A1298C de la MTHFR sur les facteurs de risque biochimiques chez les sujets coronariens**

#### **VI.2.3.1. Association du génotype A1298C MTHFR avec l'homocystéine totale, la vitamine B<sub>12</sub> et B<sub>9</sub>**

Peu d'études ont été faites concernant l'association du polymorphisme de MTHFR A1298C avec le risque de la maladie coronarienne.

Dans la présente étude, nos résultats concernant les concentrations de l'homocystéine totale, la vitamine B<sub>12</sub> et les folates s'expliqueraient probablement par la taille réduite de nos échantillons et/ou l'impact de ce polymorphisme. Cependant, nous avons pu remarquer des taux élevés de tHcy associés au génotype muté (AC).

Une étude portant sur 54 patients atteints de maladie coronarienne et 55 témoins dans une population Taiwanaise (Sud de Taiwan) a montré que la fréquence du génotype MTHFR 1298CC chez les patients était similaire à celle des sujets témoins, donc aucune association significative entre le génotype muté (CC) et la maladie coronarienne n'a été notée dans cette étude (**Kou et al., 2001**). Des résultats similaires ont été trouvés antérieurement en Europe centrale par **Meisel et al., (2000)**.

**Ranjith et al., (2003)** ont observé sur une cohorte de 195 jeunes patients ( $\leq 45$  ans) avec un IDM et leurs frères et sœurs (*Siblings*) (n=107) ainsi que 300 sujets sains ont été choisis comme témoins, qu'il n'y avait pas de différences significatives dans la fréquence génotypique ou allélique entre les patients, leurs frères et sœurs et les témoins. Vingt-deux pour cent des patients étaient homozygotes (CC), contre respectivement 13% et 15% ; pour les frères-sœurs (*Siblings*) et les témoins. Les patients porteurs du génotype hétérozygotes pour ce polymorphisme étaient moins nombreux que les témoins. Alors, le polymorphisme A1298C de la MTHFR ne semble pas être un facteur de risque de maladie coronarienne prématurée chez cette population.

Un deuxième tableau a été préparé pour illustrer l'effet de ce polymorphisme sur les paramètres biochimiques; tHcy, vitamine B<sub>9</sub> et B<sub>12</sub>, les malades ont été classés en deux groupes selon l'homocystéinémie; normale et modérée (**Le tableau 16**). Similairement à nos résultats **Ince et al., (2016)** ont rapporté dans une étude menée sur 53 patients survivants d'infarctus du myocarde qu'aucune différence significative n'a été trouvée entre les différents génotypes de MTHFR A1298C en ce qui concerne les taux sériques d'homocystéine, de la vitamine B<sub>12</sub> et du folate et l'étendue et la sévérité de la maladie coronarienne.

De même, **Ghaedi et al., (2007)** n'ont pas trouvé une différence significative entre le niveau d'homocystéine plasmatique pour les génotypes (CC) et (AC) comparativement au génotype (AA), chez le groupe des patients coronariens et témoins.

Pareillement, **Sultan et al., (2006)** dans leur investigation, n'ont pas pu révéler de différence significative entre les valeurs moyennes de l'homocystéine dans le génotype (AA), le

génotype (AC) et le génotype (CC) chez les patients coronariens. Des résultats similaires ont été observé antérieurement par **Thogersen et al., (2001)**.

Dans une autre étude cas-témoins, 54 patients ayant des antécédents d'infarctus du myocarde et 54 sujets sains ont été inclus d'une population Iranienne. Aucune association significative du polymorphisme A1298C MTHFR avec le risque d'IDM n'a été observée ni avec le génotype (CC) ni avec le génotype (AC) comparativement aux témoins (**Nasiri et al., 2014**).

En outre, la plupart des études n'ont démontré aucune association significative entre le polymorphisme MTHFR A1298C et les maladies vasculair notamment la maladie coronarienne (**Chango et al., 2000; Castro et al., 2003**).

Cependant, l'homozygotie (CC) du polymorphisme A1298C MTHFR observée dans l'étude de **Butler et al., (2018)** incluant 159 patients coronariens et 166 témoins, semble augmenter la susceptibilité à la coronaropathie, mais cette association n'a pas atteint un niveau de signification statistique dans le modèle codominant pour les analyses non ajustées ou ajustées, dans le modèle récessif (CC vs AA + AC), l'effet était plus élevé dans l'analyse non ajustée.

En fait, nos résultats corroborent ceux de **Laraqui et al., (2007)** qui ont révélé que le polymorphisme A1298C MTHFR avait une influence sur les niveaux d'tHcy et se présente ainsi comme facteur de risque indépendant de la coronaropathie chez la population Marocaine.

Contrairement a nos résultats, **Perera et al., (2017)** ont observé une différence significative de la distribution des génotypes du polymorphisme A1298C entre les patients coronariens et les témoins a été observé, avec une fréquence élevée du génotype (AA) chez les témoins et du génotype (CC) chez les malades . Le génotype (AC) était aussi le prédominant dans le groupe des patients comparativement aux témoins, ce qui indique qu'un rôle possible peut être joué par les génotypes (CC) et (AC) dans cette maladie.

En outre, **Freitas et al., (2008)** ont analysé l'impact de MTHFR C677T et A1298C sur les concentrations de l'homocystéine chez 298 patients atteints d'une maladie coronaire et 510 sujets témoins de l'île de Madère (Portugal). Les deux polymorphismes de MTHFR étaient associés à une augmentation de l'homocystéine à jeun (génotypes 677TT et 1298AA). Néanmoins, le taux de l'homocystéine était significativement plus élevé chez les individus porteurs de génotype sauvage (AA) du polymorphisme A1298C. Donc, une seule association significative entre le génotype (AA) et la maladie coronaire qui a été établit, dans cette population.

Par ailleurs, **Yenilmez et al., (2012)** ont souligné l'importance du génotype (AC) du polymorphisme A1298C dans la progression de la maladie coronarienne chez 234 malades ayant une coronaropathie et 208 témoins. Chez ces patients une différence significative de la distribution des génotypes de MTHFR A1298C entre les deux populations a été observée. De plus, les patients porteurs des génotypes AC et CC présentaient des risques de coronaropathie

de 1,9 et 1,4 fois supérieurs à ceux du génotype AA. Donc, le génotype (AC) pourrait avoir un rôle important dans la progression de la maladie coronarienne.

Le rôle protecteur du polymorphisme A1298C s'explique probablement par la présence d'un éventuel polymorphisme en déséquilibre de liaison avec le polymorphisme A1298C MTHFR ou d'une synthèse d'ADN abondante et sans erreurs des purines et des pyrimidines engendrée par la baisse d'activité de l'enzyme MTHFR ou encore à la survie sélective de l'allèle (A) (**Hobbs et al., 2006**).

Récemment, l'analyse de la structure secondaire de l'ARN a montré que les allèles 677T et 1298C mutés peuvent modifier la conformation spatiale de la structure secondaire de l'ARN du gène MTHFR et influencer sa stabilité qui pourrait expliquer la forme thermolabile de l'enzyme, causée par l'allèle 677T et les changements conformationnels de l'enzyme, induite par l'allèle 1298C (**Zhang et al., 2018**).

L'athérosclérose coronarienne constitue un problème majeur de santé publique dans le monde entier et reste une maladie avec un risque fatal important et l'un des défis majeurs notamment en matière de prévention de cette maladie.

## **Conclusion et perspectives**

## Conclusion et perspectives

L'athérome est la cause dominante de la majorité des affections cardio-vasculaires.

des chercheurs est d'identifier des biomarqueurs prédictifs de savons pas précisément ce qui déclenche l'athérosclérose, cependant, une prédisposition génétique et un certain nombre de facteurs liés au mode de vie accélèrent le processus.

Il est difficile de mettre en évidence une relation génotype-maladie qui soit stable et suffisamment forte pour avoir un intérêt clinique. En d'autres termes, c'est l'objet de la médecine prédictive qui essaye de développer une prévention secondaire par la connaissance et l'identification du polymorphisme génétique susceptibles de favoriser la survenue de l'infarctus avec des facteurs de risques liés à l'environnement et au mode de vie, cela suppose d'avoir établi un lien direct entre un polymorphisme génétique et la maladie, afin d'avoir des mesures de prévention efficaces et accessibles en vue de diminuer la probabilité de survenue de l'athérosclérose ou d'en réduire la sévérité.

La problématique de notre recherche porte sur l'identification d'une éventuelle association entre l'homocystéinémie et le polymorphisme C677T et A1298C du gène MTHFR, en présence de différents facteurs de risques cliniques et biochimiques. Ce travail de thèse nous a permis de tirer les conclusions suivantes:

Chez notre population témoin:

- ❖ Il ressort de notre étude que la distribution allélique et génotypique du polymorphisme C677T reste intermédiaire dans la région des *Aurès* (Nord-Est de l'Algérie); elle soutient l'idée de gradient mondial Nord-Sud confirmant ainsi l'hétérogénéité de la distribution de ce génotype à travers le monde. Concernant les fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme A1298C, nos résultats obtenus semblent être inférieurs à ceux trouvés chez d'autres populations, ce polymorphisme n'a pas encore été bien exploré dans le monde et notamment en Algérie. De plus, aucune différence statistiquement significative n'a été trouvée dans les distributions des fréquences génotypiques du polymorphisme C677T et A1298C entre les deux sexes dans cette population. Par ailleurs, la fréquence et la coexistence des génotypes du polymorphisme C677T et A 1298C du gène MTHFR dans la région des *Aurès* est similaires à celles d'autres groupes ethniques, avec une faible fréquence de la double hétérozygotie.
- ❖ Cette étude a pu établir une association très significative de l'hyperhomocystéinémie (Hhcy) intermédiaire et modérée et le polymorphisme C677T du gène MTHFR chez notre population saine. Cette mutation aboutit à un variant thermolabile avec une activité enzymatique réduite, elle est bien établie en tant que déterminant génétique de l'hyperhomocystéinémie. Selon le sexe, une élévation non significative du taux de folate chez les femmes et de l'Hhcy chez les hommes ont été trouvés, donc l'hyperhomocystéinémie de grade modérée observée, était associée au sexe masculin, tandis que l'élévation de la vitamine B<sub>12</sub> est significativement liée au sexe féminin. En plus, la différence de la distribution des concentrations plasmatique de l'homocystéine total (l'tHcy), folate

en fonction des trois génotypes du polymorphisme C677T, étaient non significative avec un taux bas du folate et élevé de l'tHcy, qui ont été enregistré notamment chez le génotype TT, cela témoigne l'effet délétère du variant muté (T) de ce polymorphisme sur le taux du folate et de l'tHcy, et soutient donc, l'hypothèse de l'interaction gène - nutriment entre MTHFR et le statut folate. D'autre coté, aucune différence significative n'a été noté pour la vitamine B<sub>12</sub>. Les corrélations entre l'tHcy, folate, vitamine B<sub>12</sub> et l'âge moyen en fonction de différents génotypes du polymorphisme C677T; les taux de tHcy étaient au total, inversement proportionnels à la concentration du folate, à la vitamine B<sub>12</sub> et à l'âge.

❖ A propos du polymorphisme A1298C, nos résultats indiquent l'existence d'une association non significative de l'hyperhomocystéinémie intermédiaire et modérée et le polymorphisme A1298C. Plusieurs études qui n'ont pas réussi à trouver un risque significatif d'hyperhomocystéinémie de ce polymorphisme, cela est dû à son faible effet sur l'activité de l'enzyme MTHFR (cette mutation n'affecte pas le domaine catalytique de l'enzyme MTHFR, elle est associée à une activité enzymatique réduite mais pas à la thermolabilité). Nos résultats donc, rejoignent ceux trouvés dans la littérature.

Dans une approche biochimique et génétique, la comparaison des niveaux du folate, vitamine B<sub>12</sub> et tHcy, entre les différents génotypes de ce polymorphisme montre qu'il y'avait une absence de toute association significative entre ces variables biochimiques et le polymorphisme A1298C.

Chez notre population pathologique, sujets (jeunes) en phase chronique de l'infarctus du myocarde (IDM) :

❖ Pour le polymorphisme C677T MTHFR, une association non significative de l'hyperhomocystéinémie modérée a été enregistrée. Les concentrations de tHcy, la vitamine B<sub>12</sub> et B<sub>9</sub> n'étaient pas significativement dépendantes au polymorphisme C677T MTHFR. Néanmoins, une hyperhomocystéinémie modérée est associé au génotype muté (TT). Ainsi qu'un faible taux de la vitamine B<sub>12</sub> et B<sub>9</sub> a été enregistré chez ce génotype, cela témoigne l'effet délétère du génotype muté sur les concentrations de tHcy, vitamine B<sub>12</sub> et B<sub>9</sub> chez nos patients. Toutefois, cet effet reste non significatif.

✓ Aussi, les concentrations du folate et de la vitamine B<sub>12</sub> enregistrées dans les groupes d'Hhcy modérée sont plus amoindries chez les génotypes mutés. De même, un niveau élevé de tHcy a été observé notamment chez les porteurs des génotypes mutés (CT) et (TT) en comparaison avec ceux du groupe d'homocystéinémie normale. Mais, cette action n'était pas significative.

❖ Pour le polymorphisme MTHFR A1298C; aucune association significative entre l'hyperhomocystéinémie modérée et ce polymorphisme n'a été observée;

Une hyperhomocystéinémie modérée est associée au génotype muté AC. Des taux de la vitamine B<sub>12</sub> légèrement faible ont été observés chez ce génotype aussi. Il semble qu'il y'avait un effet délétère du variant muté de ce polymorphisme sur la concentration de tHcy et la vitamine B<sub>12</sub> chez nos patients, cependant cette action reste non significative.

✓ Dans le groupe d'Hhcy modérée, la distribution des concentrations de l'homocystéine en fonction de différents génotypes du polymorphisme A1298C, a montré une association non significative, avec un niveau élevé de tHcy enregistré notamment chez le génotype

muté (AC). Aussi les niveaux des vitamines B<sub>12</sub> et B<sub>9</sub> dans les groupes de l'Hhcy modérée étaient légèrement inférieurs à ceux observés dans les groupes d'homocystéinémie normale, notamment chez les génotypes mutés. Il paraît donc qu'il y'avait un effet délétère du génotype muté sur les niveaux de l'tHcy, la vitamine B<sub>9</sub> et B<sub>12</sub>. Cependant cette action reste non significative.

Notre étude soutient l'hypothèse indiquant que le polymorphisme C677T et A1298C MTHFR peuvent être un facteur de risque important pour l'Infarctus du myocarde en présence d'hyperhomocystéinémie modérée.

Ces deux constatations, nous laissent suggérer une stratégie d'exploration biologique de l'hyperhomocystéinémie dans notre région (*Aurès*) qui permet d'évaluer une Hhcy modérée le plus rapidement et simplement possible et ainsi au diagnostic étiologique des Hhcy intermédiaires à sévères qui peuvent être responsable de l'apparition et l'évolution de plusieurs maladies métaboliques sévères tel que l'athérosclérose coronarienne.

À la lumière de notre travail nous émettons comme perspectives l'importance de faire des diagnostics moléculaires ou génétiques concernant l'athérosclérose coronarienne en Algérie, particulièrement dans la région des *Aurès*, afin d'explorer les divers marqueurs qui pourraient ouvrir des perspectives en matière de détection, de prévention et de traitement de l'athérosclérose. D'après nos investigations, la détermination conjointe de l'homocystéinémie et du statut vitaminique est indispensables tant chez les sujets sains que chez les sujets malades afin d'améliorer la prise en charge des patients atteints de cette maladie. D'un autre côté, la correction des facteurs de risque permet de prévenir et réduire le risque de développement de l'athérosclérose et ses complications.

Des études plus approfondies avec une taille d'échantillons plus grands sont nécessaires, pour mieux clarifier la relation entre les génotypes du gène MTHFR et l'athérosclérose coronarienne chez les jeunes patients ayant subi un Infarctus de Myocarde dans notre région "*Aurès*" (Algérie).

# **Annexes**

## Annexes I : *Le questionnaire*

### --Fiche de patients atteints de l'IDM--

#### 1. Données relatives au patient :

- N° du Dossier:..... Sexe : 'F'ou 'M'
- Conditions de prélèvements :  à jeun  non à jeun. L'heure du prélèvement:.....
- Nom et prénom : ....., Age:.....
- Date et lieu de naissance : .....
- Origine (ville) : .....
- Adresse / Tel :.....

#### 2. Données sur le mode de vie :


- Indice de masse corporelle (IMC), kg/m<sup>2</sup>:.....
- Tabagisme : Non / Oui. Nbre de cigarettes / jour :.....
- Ancienneté du tabagisme:.....
- Présence de diabète: Non / Oui.
- Antécédents familiaux cardiovasculaire:.....
  
- HTA:..... mmHg.

#### 3. Bilan Biologique :

- + Homocystéinémie:.....
- + -Vitamine B<sub>12</sub>:.....
- + -Vitamine B<sub>9</sub>:.....
- + -Cholestérol:.....
- + Triglycérides:.....
- + **LDL**:.....
- + LDL:.....
- + TGO :.....
- + **TCG**:.....
- + Urée :.....
- + BNP :.....
- + CRP :.....

#### 4. Traitement :

- Médicament (s) utilisés:.....
  
- + La date d'entrée à l'hôpital: .....
- + La date de sortie de l'hôpital: .....

	Fiche technique	LABO4354-FITEC-0236
	<b>UF3545 - Fiche schématique de l'extraction de l'ADN sur sang total</b>	Version 1
		Applicable le : 30/06/2017
Approbateur		
Bernard NAMOUR		

**1. OBJET :** Cette fiche technique a pour objet de décrire schématiquement l'étape de l'extraction de l'ADN sur sang total.

**2. MATERIEL UTILISE :**

→ Cf FT : UF3545-Extraction d'ADN sur prélèvement EDTA (en cours)

**3. REACTIFS UTILISES :**

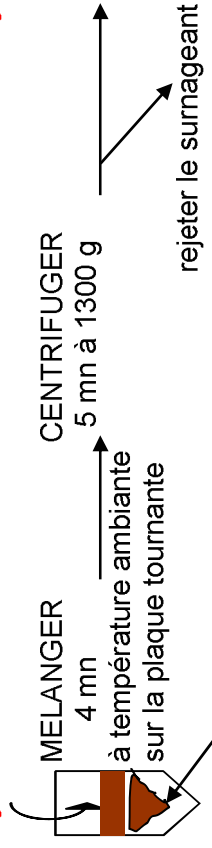
→ Cf FT : UF3545-Extraction d'ADN sur prélèvement EDTA (en cours)

**4. TECHNIQUE :**

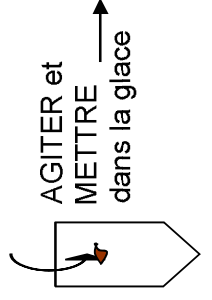
# EXTRACTION d'ADN - Kit BACC3 NUCLEON -

de 2 à 7 ml de sang total : mettre dans un falcon de **50 ml** / faire un **1/2 protocole** / Faire la dilution du réactif A au 1/4 : 300ml d'H<sub>2</sub>O milliQ + 100ml de réactif A  
 de 1 à 2 ml de sang total : mettre dans un falcon de **15 ml** / faire un **mini protocole** / Le réactif B doit être **limpide** à l'emploi

## Ajouter 4 volumes de réactif A dilué 1/4

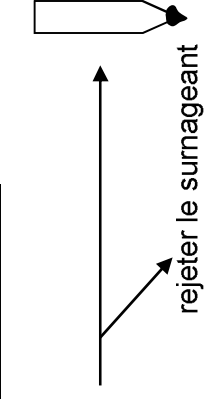


CENTRIFUGER  
5 mn à 1300 g



Transférer dans un falcon de 15 ml

CENTRIFUGER  
5 mn à 1300 g



## 1 volume de sang total

à la pompe à vide

pendant 5 mn

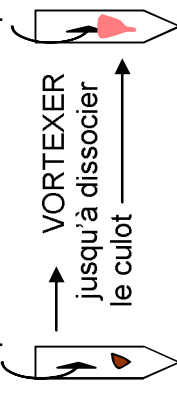
à la pompe à vide

en fonction du culot faire un **1/2 protocole** ou un **mini protocole**

réactif B (limpide) perchlorate

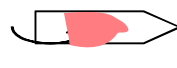
**1/2 protocole** ou **1 ml** ou **250 µl** ou **100 µl**

→ **mini protocole**



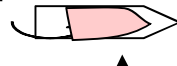
AGITER  
par retournement  
(7 fois environ)

chloroforme  
**1 ml** ou  
**600 µl**

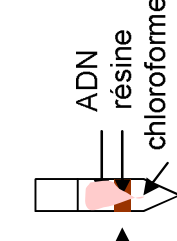


AGITER  
par retournement  
(7 fois environ)

résine vortexée  
**150 µl** ou  
**100 µl**



CENTRIFUGER  
5 mn à 1300 g



Dans un autre falcon de 15 ml

→ RECUPERATION  
de la phase supérieure  
à la résine (ADN)



ajouter le même volume  
d'**éthanol absolu froid** (à -20°C)

→ AGITER →



→ RECUPERATION  
du filament avec une tige  
en plastic



filament d'ADN

dans un gros eppendorf

ajouter du **TE Buffer 1X** (de 50 µl à 600µl  
selon la pelote d'ADN)



AGITER 2H

sur la plaque tournante

# **REACTIFS pour EXTRACTION d'ADN**

## **Lyse des globules rouges**

Prélèvement sur sang total / GR: cellules anucléées donc dépourvues d'ADN

- Réactif A: solution hypotonique au plasma → éclatement des cellules (hémolyse)

## **Destruction des membranes des globules blancs**

- Réactif B: contient du SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) → détergent qui lyse et solubilise les bicouches

## **Elimination des protéines**

La libération des protéines consécutive à la destruction des membranes des globules blancs perturbe la pureté de l'ADN

- le perchlorate: dénature les protéines qui précipitent
- le chloroforme (solvant des protéines hydrophobes): piège les protéines au fond du tube (chloroforme est plus dense que le perchlorate)

## **Résine**

Séparation

- phase supérieure (aqueuse): contient l'ADN, insoluble dans le chloroforme
- phase inférieure (organique): renferme les protéines hydrophobes emprisonnées dans le chloroforme (les hydrophiles étant piégées dans la résine)

## **Récupération de l'ADN extrait**

- Ethanol absolu froid: l'ADN précipite dans l'éthanol

## **Solubilité de l'ADN extrait**

- Tampon TRIS-EDTA pH = 8

→ Vérifier la pureté et la qualité (dosage spectrophotomètre)

## Annexes III : Fiches techniques n°2 : MTHFR C677T et A1298C LIGHT CYCLER :

### Méthylène Tétra Hydro Folate Réductase

MTHFR c.665 C>T rs59514310 Initialement noté 677 C>T rs1801133 (plaque 96 puits)

#### 1.PIECE B.01.E1A010 - AA10bis

COMPOSITION du MELANGE REACTIONNEL (MIX)	µl/tube	Concentration finale	MIX (Nb de tubes + 1)
<b>H2O PCR grade</b>	2,5	/	
<b>Amorce MTHFR 665 (677) Sens</b> à 4µM 5' TGG CAG GTT ACC CCA AAG G 3' T <sub>m</sub> =60°C	1,25 (4µl de SM100µM + 96µl H2O)	0,5µM	
<b>Amorce MTHFR 665 (677) Anti-sens</b> à 4µM 5' TGA TGC CCA TGT CGG TGC 3' T <sub>m</sub> =58°C	1,25 (4µl de SM100µM + 96µl H2O)	0,5µM	
<b>Sonde Flu MTHFR 665 (677)</b> à 4µM 5' TgA ggC TgA CCT gAA gCA CTT gAA ggA ggT gTC T FL	0,5 (2µl de SM100µM + 48µl H2O)	0,2µM	
<b>Sonde LCRed640 MTHFR 665 (677)</b> à 4µM 5' Cgg gAg CCg ATT TCA TCA T PH	0,5 (2µl de SM100µM + 48µl H2O)	0,2µM	
<b>LightCycler® 480 Genotyping Master 5X</b> (prêt à l'emploi)	2	1X	

Déposer 8µl de MIX dans chaque puits de la plaque 96 Multiwell selon le plan de plaque

#### 2.PIECE B.01.E1A010 – AA09

Ajouter 2µl d'ADN normalisé à 10ng/µL selon le plan de plaque - Filmer la plaque

#### 3.PIECE B.01.E1A027

Centrifuger la plaque à 1500g pendant 2min - Insérer la plaque dans le *Light Cycler 480 ROCHE*

Programme : MTHFR-C665T+MTHFR-A1298C-Plaque96-OK		Reaction volume : 10µl					
Detection format : Multi Color HybProbe		Selected Filter Combinations : Red610 ( 483-610) Red640 ( 483-640)					
Program Name	Denaturation						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per°C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:10:00	4,40		0	0	0
Program Name	PCR						
Cycles	45	Analysis Mode	Quantification				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per°C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4,40		0	0	0
55	Single	00:00:10	2,20		0	0	0
72	None	00:00:10	4,40		0	0	0
Program Name	Courbe de Fusion						
Cycles	1	Analysis Mode	Melting Curves				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per°C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:30	4,40		0	0	0
40	None	00:02:00	2,20		0	0	0
73	Continuous		0,06	5	0	0	0
Program Name	Refroidissement						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per°C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:30	2,20		0	0	0

#### 4.INTERPRETATION des RESULTATS :

CF logiciel du LightCycler ® 480 Instrument

CF Procédure : utilisation du LC480-version SW 1.5

CF LABO4354-FITEC-fait : UF3545-Utilisation du LC480

#### 5.RESULTATS :

MTHFR c.665 C>T	Génotypage	Témoins	Températures de fusion ( T <sub>m</sub> )
Homozygote sauvage	CC	LCAT 37	61°C
Hétérozygote	CT	LCAT 42	53°C+61°C
Homozygote muté	TT	LCAT 38	53°C

# MéthylèneTétraHydroFolateRéductase MTHFR1298 A>C rs1801131 (plaque 96 puits)

## 1. PIECE B.01.E1A010 - AA10bis

COMPOSITION du MELANGE REACTIONNEL (MIX)	µl/tube	Concentration finale	MIX (Nb de tubes + 1)
<b>H2O PCR grade</b>	2,5	/	
<b>Amorce MTHFR 1298 Sens à 4µM</b> 5' CTT TTg ggA gCT gAA ggA CTA CTA C 3' Tm=74°C	1,25 (4µl de SM100µM + 96µl H2O)	0,5µM	
<b>Amorce MTHFR 1298 Anti-sens à 4µM</b> 5' CAC TTT gTg ACC ATT CCg gTT Tg 3' Tm=68°C	1,25 (4µl de SM100µM + 96µl H2O)	0,5µM	
<b>Sonde Flu MTHFR 1298 à 4µM</b> 5' AAg gAg gAg CTg CTg AAg ATg Tgg ggg gAg gAg CT FL	0,5 (2µl de SM100µM + 48µl H2O)	0,2µM	
<b>Sonde LCRed610 MTHFR 1298 à 4µM</b> 5' ACC AgT gAA gAA AgT gTC TTT gA PH	0,5 (2µl de SM100µM + 48µl H2O)	0,2µM	
<b>LightCycler® 480 Genotyping Master 5X</b> (prêt à l'emploi)	2	1X	

Déposer 8µl de MIX dans chaque puits de la plaque 96 Multiwell selon le plan de plaque

## 2. PIECE B.01.E1A010 – AA09

Ajouter 2µl d'ADN normalisé à 10ng/µL selon le plan de plaque - Filmer la plaque

## 3. PIECE B.01.E1A027

Centrifuger la plaque à 1500g pendant 2min - Insérer la plaque dans le *Light Cycler 480 ROCHE*

Programme : MTHFR-C665T+MTHFR-A1298C-Plaque96-OK				Reaction volume : 10µl			
Detection format : Multi Color HybProbe				Selected Filter Combinations : Red610 ( 483-610) Red640 ( 483-640)			
Program Name	Denaturation						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per°C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:10:00	4,40		0	0	0
Program Name	PCR						
Cycles	45	Analysis Mode	Quantification				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per°C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4,40		0	0	0
55	Single	00:00:10	2,20		0	0	0
72	None	00:00:10	4,40		0	0	0
Program Name	Courbe de Fusion						
Cycles	1	Analysis Mode	Melting Curves				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per°C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:30	4,40		0	0	0
40	None	00:02:00	2,20		0	0	0
73	Continuous		0,06	5	0	0	0
Program Name	Refroidissement						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per°C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:30	2,20		0	0	0

## 4 .INTERPRETATION des RESULTATS :

CF logiciel du LightCycler ® 480 Instrument

CF Procédure : utilisation du LC480-version SW 1.5

CF LABO4354-FITEC-fait : UF3545-Utilisation du LC480

## 5. RESULTATS :

MTHFR 1298 A>C	Génotypage	Témoins	Températures de fusion ( Tm )
Homozygote sauvage	AA	LCAT 12	59°C
Hétérozygote	AC	LCAT 13	56°C+59°C
Homozygote muté	CC	LCAT 11	56°C



Université de Batna 2  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie des Organismes

---

## ENGAGEMENT

Batna le :    /    /20... (Algérie).

Je soussigné, Mr, Mme, Mlle :.....âgé  
de.....ans, en pleine possession de mes capacités mentales,  
j'autorise le personnel médical du laboratoire de Nutrition-  
Génétique et Exposition aux Risques Environnementaux  
(Université de Henri Poincaré, Faculté de médecine de Nancy-  
France) à effectuer des prélèvements de mon sang dans le but  
d'un suivi et de recherches concernant la pathologie dite  
"infarctus du myocarde".

Ce présent engagement pourra servir et valoir ce que de droit.

L'intéressé (e)

# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques:

- Abdsseed S, (2008).** Etude de l'origine génétique et nutritionnelle des hyperhomocystéinémie (facteur de risques des maladies cardiovasculaires).
- Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M, (1996).** Identification of scavenger receptor SR-B1 as a high density lipoprotein receptor. *Science* ;271:518-520.
- Afaque AM, (2016).** Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms and Cardiovascular Diseases. *Alam, Cell Dev Biol*; 5:2.
- Aikawa M and Libby P, (2004).** The vulnerable atherosclerotic plaque: pathogenesis and therapeutic approach. *Cardiovasc Pathol* ; 13 : 125-38.
- Ait-Oufella H, Mallat Z , Tedgui A, (2014).** [Lp-PLA2 and sPLA2: cardio-vascular biomarkers]. *Med Sci (Paris)*;30:526-31.
- Ait-Oufella H, Tedgui A, Mallat Z, (2007).** Les lymphocytes T régulateurs protègent contre le développement de l'athérosclérose. *mt cardio*, vol. 2, n° 6, novembre-décembre 2007.
- Akoudad H et Benamer H, (2004).** Physiopathology of myocardial infarction. *EMCCardiologie Angéiologie*;1 : 49-67.
- Al Mawi WY, Ameen G, Tamim H, Finan RR et al., (2004).** Factor V G1691A, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase [MTHFR] C677T gene polymorphism in angiographically documented coronary artery disease. *J Thromb Thrombolysis*;17(3):199–205.
- Alam MA, Husain SA, Narang R, Chauhan SS, Kabra M, et al. (2008).** Association of polymorphism in the thermolabile 5, 10-methylene tetrahydrofolate reductase gene and hyperhomocysteinemia with coronary artery disease. *Mol Cell Biochem* 310: 111-117.
- AL-Habboubi H, Tamim H, Ameen G, Almawi WY, (2003).** A common mutation in 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in two Arab communities ; *J Throm Haemost* 1: 2246-8.
- Al-Habboubi H, Tamim H, Ameen G, Almawi WY, (2004).** C677T and A1298C single nucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene among Bahraini Arabs. *Thromb Haemost* 91: 843-845.
- Amarengo P, Cacoub P, Drouet L, Vahanian A, (2001).** Athérombose. *John LibbeyEurotext*, N° 101. P 4, 5, 10, 13.
- Ambrosi Pierre, (2007).** La prévention cardiovasculaire. *John LibbeyEurotext*, 1 janv. 2007 - 160 pages.
- Ambrosi Pierre, (2011).** Cardiologie aux épreuves classantes nationale. *Edition Lavoisier*; Vol: 226, P: 66.
- Amela K, Rifet T, Zoran J, Jasminka MM (2013).** The Frequency of C677T Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Polymorphism in Southern East Bosnian Population ; *J Biomet Biostat* 4: 169.
- Amira S, Ziyad M, Ali T, Ghazi Z, Rose D, Rami AA M (2008).** High Prevalence of MTHFR Gene A1298C Polymorphism in Lebanon. *Mary Ann Liebert Inc* ; 6: 75-80.
- Amouzou EK, Chabi NW, Adjalla CE, Rodriguez-Guéant RM, Feillet F, Villaume C, Sanni A, Guéant JL, (2004).** High prevalence of hyperhomocysteinemia related to folate deficiency and the 677C->T mutation of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase in coastal West Africa. *Am J Clin Nutr* ; 79: 619-24.
- Andersson A, Lindgren A, Hultberg B.(1995).** Effect of thiol oxidation and thiol export from erythrocytes on determination of redox status of homocysteine and other thiols in plasma from healthy subjects and patients with cerebral infarction. *Clin Chem*;41:361–366.
- Andreassi MG et Botto N, (2003).** DNA damage as a new emerging risk factor in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*;13:270–5.
- Andreelli F and Jacquier D, (2006).** Place du foie dans le métabolisme des lipoprotéines. *Hépatogastro*, vol. 13, N° 3, mai-juin 2006.
- Aneji CU, Northrup H, Sing Au K, (2012).** Deep Sequencing Study of the MTHFR Gene to Identify Variants Associated with Myelomeningocele. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*: 94(2), 84-90.

- Angeline T, Jeyaraj N, Granito S, Tsongalis GJ, (2004).** Prevalence of MTHFR gene polymorphisms (C677T and A1298C) among Tamilians. *Exp Mol Pathol* ;77: 85-88.
- Antoniades C, Antonopoulos AS, Tousoulis D, Marinou K, Stefanadis C.(2009).** Homocysteine and coronary atherosclerosis: from folate fortification to the recent clinical trials. *Eur Heart J*;30(1):6-15.
- Arinami T, Yamada N, Yamakawa-Kobayashi K et al. (1997).** Methylene tetrahydrofolate reductase variant and schizophrenia/depression. *Am J Med Genet*; 74:526-8.
- Armitage JM, Bowman L, Clarke RJ, et al. (2010).** Effects of homocysteine-lowering with folic acid plus vitamin B12 vs placebo on mortality and major morbidity in myocardial infarction survivors: a randomized trial. *JAMA*; 303(24):2486-2494.
- Arnal JF, Elhage R, Brouchet L, Rami J, Maret A et Bayard F, (2000).** Œstrogènes et paroi artérielle. *Annales d'endocrinologie*; 61, 1 ; 80-84.
- Arnal J-F, Gourdy P, Garmy-Susini B, Delmas E et Bayard F, (2003). Effets vasculaires des œstrogènes. *M/S : médecine sciences*, 19 (12), 1226–1232.
- Assmann G, Cullen P, Jossa F, et al., (1999).** Coronary heart disease: Reducing the risk: The scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease. A worldwide view. International Task force for the Prevention of Coronary Heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 19 : 1819-24.
- Atadzhanyan M, Mwaba M H, Mukomena PN, Lakhi S, Mwaba P, Rayaprolu S, Meschia JF and Ross OA, (2014).** Frequency of APOE, MTHFR and ACE polymorphisms in the Zambian population. *BMC Research Notes*; 7:194.
- Aubard Y, Darodes N, Cantaloube M, Aubard V, Diallo D, Teissier MP, (2000).** Hyperhomocystéinémie et grossesse une association dangereuse. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* ; 29 :363 -372.
- Avezum A, Makdisse M, Spencer F et al., (2005).** Impact of age on management and outcome of acute coronary syndrome: observations from the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE). *Am Heart J*; 149: 67-73.
- Aydin S, Aydin S. (2016).** Irisin concentrations as a myocardial biomarker. In: Patel VB, Preedy VR, editors. *Biomarkers in Cardiovascular Disease*. Dordrecht: Springer;489–504.
- Bailey LB, Gregory JF, Bowman B, Russell R. (2006).** Present Knowledge in Nutrition. *Washington DC: International Life Sciences Institute*, p.278-301.
- Barbash GI, White HD, Modan M et al., (1995).** Acute myocardial infarction in the young: the role of smoking. *Eur Heart J*; 16: 313-6.
- Barroso M, Handy DE, Castro R, (2017).** The Link Between Hyperhomocysteinemia and Hypomethylation: Implications for Cardiovascular Disease. *Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening*. Volume 5: 1–15.
- Basdevant A, (2011).** Médecine et chirurgie de l'obésité. *Edition Lavoisier* ; Vol : 799, p : 4-5.
- Baszczuk A and Kopczynski Z. (2014).** Hyperhomocysteinemia in patients with cardiovascular disease. *Postepy Hig Med Dosw*;68:579.
- Baudin B, Cohen A, Berthelot-Garcias E, Meuleman C, Dufaitre G, Ederhy S, Haddour N, Boccara F, (2009).** Données épidémiologiques des maladies cardiovasculaires et prise en charge des accidents cardiovasculaires. *Revue Francophone des Laboratoires* ; N° 409.
- Bauters C, Amouyel P, Ferrieres J, Durand-Zaleski I, Amarenco P, Cacoub P, Drouet L, Vahanian A, (2001).** Athéromatose. *Edition John Libbey Eurotext*. Vol : 86. P: 02.
- Beaudeau JL, Durand G, (2011).** Biochimie médicale - Marqueurs actuels et perspectives (2e ed.). *Lavoisier*. N°601. P 143, 144.
- Beaudeau JL, Jacob N, Giral P et al. (2001).** Nouveaux marqueurs biologiques non-lipidiques de l'athérosclérose. *Ann Med Interne*, 152, 169-179.
- 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,(2008).** 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*; 57: 219–224.

- Bennouar N, Allami A, Azeddoug H, Bendris A, Laraqui A, El Jaffali A, El Kadiri N, Benzidia R, Benomar A, Fellat S and Benomar M, (2007).** Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism and Homocysteine Are Risk Factors for Coronary Artery Disease in Moroccan Population. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*; 80687, 9 pages.
- Benowitz NL et Gourlay SG, (1997).** Cardiovascular toxicity of nicotine: implications for nicotine replacement therapy. *J Am Coll Cardiol*; 29:1422-31.
- Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Neuman WP, Tracy RE and Wattigney WA, (1998).** Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. *N Engl J Med* ; 338 : 1650-6.
- Berlin I, (2008).** Smoking-induced metabolic disorders: A review. *Diabetes & Metabolism*; 34: 307–314.
- Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ, (1995).** Oxidation, Inflammation, and Genetics. *Circulation*; 91:2488-2496.
- Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Zampieri BL, Haddad R, Eberlin MN, Pavarino-Bertelli EC. (2008).** Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and elevated plasma concentrations of homocysteine: maternal risk factors for Down syndrome in Brazil. *Genet Mol Res*; 7(1):33–42.
- Blacher J, Czernichow S, Horellou MH, et al., (2005).** Homocystéine, acide folique, vitamines du groupe B, et risque cardiovasculaire. *Arch Mal Cœur Vaiss* ; 98 : 145-52.
- Blom HJ and Smulders Y, (2011).** Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *J Inherit Metab Dis*; 34: 75-81.
- Boers GH, Fowler B, Smals AG, Trijbels FJ, Lee markers AI, Kleijer WJ et al. (1985).** Improved identification of heterozygotes for homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency by the combination of methionine loading and enzyme determination in cultured fibroblasts. *Hum Genet* ; 69:164-9
- Bommas U, Teubner P, Voss R, (2008).** Cours d'anatomie. *De Boeck*. N°493 p : 20.
- Bonnet J, (2001).** L'athérosclérose: un défi commun du biologiste et du clinicien. *médecine/sciences* ; 151-4.
- Botham KM , Weil A, Rodwell VW , Kennelly PJ , Bender DA, (2017).** Biochimie de Harper. *De Boeck Supérieur*, N° 840. P 257, 258.
- Bottiglieri T. (2005).** homocysteine and folate metabolism in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* ; 29 : 1103-1112.
- Botto LD and Yang Q, (2000).** 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 151: 862–877.
- Botto N, Andreassi MG, Manfredi S, Masetti S, Cocci F, Colombo MG, Storti S, Rizza A, Biagini A, (2003).** Genetic polymorphisms in folate and homocysteine metabolism as risk factors for DNA damage. *Eur J Hum Genet*; 11:671–8.
- Bourouba R, Houcher B, Djabi F, Eğin Y, Akar N, (2009).** The Prevalence of Methylenetetrahydrofolate Reductase 677 C-T, Factor V 1691 G-A, and Prothrombin 20210 G-A Mutations in Healthy Populations in Sétif, Algeria. *Clin Appl Thromb Hemost* ; 5: 529-534.
- Branda RF et Eaton JW, (1978).** Skin color and nutrient photolysis: an evolutionary hypothesis. *Science* ; 201: 625–626.
- Brattstrom, L. et al. (1998).** Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation* 98, 2520–2526.
- Braunwald E, (1997).** Shattuck lecture. Cardiovascular medicine at the turn of the millennium: Triumphs, concerns, and opportunities. *N Engl J Med* ; 337 : 1360-9.
- Brisson G, (1982).** Lipides et nutrition humaine: analyse des données récentes sur les corps gras alimentaires. *Presses Université Laval*, 1982. N°192. P2, 17.
- Brooker Christine, (2000).** Le corps humain. Étude, structure et fonction. *De Boeck Supérieur*, 562 pages.
- Brouwer IA, van Dusseldorp M, West CE, Meyboom S, Thomas CM, Duran M and al., (1999).** Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled trial. *J Nutr*; 129:1135-9.

**Brown MS and Goldstein JL, (1983).** Lipoprotein metabolism in the macrophage: implication for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem*; 52: 223-61.

**Bruckert E and Thomas D, (1997).** Les hypercholestérolémies. *John Libbey Eurotext*. N°158 p: 28.

**Bueno O, Molloy AM, Fernandez-Ballart JD, Garcia-Minguillan CJ, Ceruelo S, Rios L, Ueland PM, Meyer K and Murphy MM, (2016).** Common Polymorphisms That Affect Folate Transport or Metabolism Modify the Effect of the MTHFR 677C > T Polymorphism on Folate Status. *J Nutr*; 146:1-8.

**Butler S, Young A, Akam EC, Sinha N, Agrawal S, Mastana S, (2018).** Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms with coronary artery disease (CAD) in a North Indian population. *Cogent Medicine*; 5: 1478477.

**Calas A, Boulouis HJ, Perrin JF, Plas C, Vanneste P, (2016).** Price en physiopathologie (2 ed) Doin. *John Libbey Eurotext*, - N°396 p103.

**Caligiuri G, (2004).** Role de l'immunité dans l'athérosclérose et dans les syndromes coronariens aigus. *M/S : médecine science*, vol. 20, n°2, p. 175-181.

**Cambou JP, (1991).** La maladie coronaire en France : données des registres MONICA (1985-1991). *Revue Epidém Santé Publique* 44 : S46-S52.

**Cano N, Barnoud D, Schneider SM, Vasson MP, Hasselmann M, Leverve X, (2006).** Traité de nutrition artificielle de l'adulte. *Springer Science & Business Media*. N°1191.

**Carluccio MA, Ancora MA, Massaro M, Carluccio M, Scoditti E, Distanti A, Storelli C, De Caterina R. (2007).** Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF- $\kappa$ B and NAD(P)H oxidase activation—protective role of Mediterranean diet polyphenolic antioxidants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 293: H2344-2354.

**Castro R, Rivera I, Blom H. J, Jakobs I, (2016).** Tavares de Almeida C. Homocysteine metabolism, hyperhomocysteinemia and vascular disease: An overview. *J Inher Metab Dis* ; 29: 3-20.

**Castro R, Rivera I, Ravasco P, Camilo ME, Jakobs C, Blom HJ, De Almeida IT (2004).** 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C mutations are associated with DNA hypomethylation. *Med Genet*; 41:454-458.

**Castro R, Rivera I, Ravasco P, Jakobs C, Blom HJ, Camilo ME, de Almeida IT, (2003).** 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutations are genetic determinants of elevated homocysteine. *Q J Med*; 96:297-303.

**Castro R, Rivera I, Ravasco P, Jakobs C, Blom JH and Camilo ME, (2003).** The effect of the 677C-7T and 1298A-7C mutations on plasma homocysteine and 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in cerebrovascular stroke patients ; *Br J Nutr*; 83(6):593-596.

**Chadefaux-Vekemans B, Coude M, Muller F et al., (2002).** Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in the etiology of Down syndrome. *Pediatr Res* ; 51:766-767.

**Chango A, Boisson F, Barbe AF, Quilliot D, Drosch S, Poster M, Fillon-Emery N, Lambert D, Frémont S, Rosenblatt DS and Nicolas J P, (2000).** The effect of C 677T and 1298A!C mutations on plasma homocysteine and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects. *British Journal of Nutrition*; 83, 593±596.

**Chango A, Boisson F, Barbé F, Quilliot D, Drosch S, Pfister M, Fillon-Emery N, Lambert D, Frémont S, Rosenblatt DS, Nicolas JP. (2000).** The effect of 677C-->T and 1298A-->C mutations on plasma homocysteine and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects. *Br J Nutr* ;83:593-596.

**Cheng Z, Yang X, Wang H, (2009).** Hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rev*; 5(2):158-165.

**Chillemi R, Angius A, Persico I, Sassu A, Prodi DA, Simpore J, Musumeci S, (2005).** Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) from Mediterranean to sub-Saharan areas. *Online Journal of Biological Sciences* 6 (1): 28-34.

**Chisolm GM, and Chai Y, (2000).** Regulation of cell growth by oxidized LDL. *Free Radic Biol Med*. 28 : 1697.

**Chmurzynska A, Malinowska AM, Twardowska-Rajewska J and Gawecki J, (2013).** Elderly women: homocysteine reduction by short-term folic acid supplementation resulting in increased glucose concentrations and affecting lipid metabolism (C677T MTHFR polymorphism). *Nutrition*; 29:841-4.

**Cho SE, Hong KS, Shin GJ, Chung WS (2006).** The methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene mutation is associated with hyperhomocysteinemia, cardiovascular disease and plasma B-type natriuretic peptide levels in Korea. *Clin Chem Lab Med*;44(9):1070-5.

**Chua S, Wu CJ, Chang HW et al., (2005).** Impact of elevated plasma total homocysteine concentration on coronary atherosclerosis in Chinese patients with acute myocardial infarction undergoing primary coronary intervention. *Int Heart J*; 46: 181-193.

**Clarke R, Bennett DA, Parish S, Verhoef P, Dötsch-Klerk M, Lathrop M, et al. (2012).** MTHFR Studies Collaborative Group. Homocysteine and coronary heart disease: metaanalysis of MTHFR case-control studies, avoiding publication bias. *PLoS Med*;9:e1001177.

**Clarke R, Halsey J, Lewington S et al., (2010).** B-Vitamin Treatment Trialists' Collaboration. Effects of lowering homocysteine levels with B vitamins on cardiovascular disease, cancer, and cause-specific mortality: Meta-analysis of 8 randomized trials involving 37485 individuals. *Arch Intern Med*;170:1622-1631.

**Constans J et al., (2012).** Société Française de Médecine Vasculaire, Collège des enseignants de médecine vasc, Collège Français de Pathologie Vasculaire. Traité de médecine vasculaire. Tome 1: Principes de base, maladies artérielles. *Elsevier Masson*, 30 janv. 2012. N° 720. P 14.

**Coppola A, Davi G, De Stefano V, Mancini FP, Cerbone AM, Di Minno G, (2000).** Homocysteine, coagulation, platelet function, and thrombosis. *Semin Thromb Hemost.*;26(3):243-54.

**Cordain L et Hickey MS, (2006).** Ultraviolet radiation represents an evolution selective pressure for the south- to-north gradient of the MTHFR 677TT Genotype. *AM J Clin Nutr* ;84:1243-1243.

**Cosar A, Osman MI, Ozcan O, Mustafa GL, (2014).** Folate and homocysteine metabolisms and their roles in the biochemical basis of neuropsychiatry. *Turk J Med Sci*;44: 1-9.

**Coujard R and Poirier J, (1980).** Précis d'histologie humaine. *Presses Université Laval*. N°752 p : 369, 370, 373.

**Courand PY, Delahaye F, Harbaoui B, (2012).** Cardiologie. Concours ECN. *Pradel*, N°224.

**Cox ID, Botker BE, Bagger JP, Sonne HS, Kristensen BO, Kaski JC. (1999).** Elevated endothelin concentrations are associated with reduced coronary vasomotor responses in patients with chest pain and normal coronary arteriograms. *J Am Coll Cardiol*;34:455-460.

**Cuvelier C, Cabaraux JF, Dufrasne I, Hornick JL, Istasse L, (2004).** Acides gras : nomenclature et sources alimentaires Manuscrit déposé le 26/09/2004 *Ann. Méd. Vét.*, 2004, 148, 133-140.

**Dali-Youcef N and Andrès E, (2009).** An update on cobalamin deficiency in adults. *Q J Med*; 102: 17-28.

**Dallongeville J, (2006).** Le métabolisme des lipoprotéines. *Cah. Nutr. Diét*, 41, 1, 2006- p55.

**Daubner SC and Matthews RG, (1982).** Purification and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from pig liver. *J Biol Chem* 257(1):140-145.

**Dayal S and Lentz SR. (2005).** ADMA and hyperhomocysteinemia. *Vasc Med*;10(suppl 1):S27-S33.

**De Bree A, Verschuren WM, Bjørke-Monsen AL, Van der Put NM, Heil SG, Trijbels FJM and al., (2003).** Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase 677T mutation on the relations among folate intake and plasma folate and homocysteine concentrations in a general population sample. *Am J Clin Nutr*;77:687e93.

**De Marco P, Calevo MG, Moroni A et al. (2002).** Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as risk factors for NTDs. *Eur J Pediatr Surg* 2001; 11(Suppl 1):S14-17.

**De Re V, Cannizzaro R, Canzonieri V, Cecchin E, Caggiari L, De Mattia E, Pratesi C, De Paoli P, Toffoli G, (2010).** MTHFR polymorphisms in gastric cancer and in first degree relatives of patients with gastric cancer. *Tomor Biol* ;31: 23-32.

**Dedoussis GV, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Skoumas J, Choumerianou D, Stefanadis C; ATTICA Study Group ,(2005).** An association between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation and inflammation markers related to cardiovascular disease. *Send to Int J Cardiol*;100(3):409-14.

**Demet IF, Atay A, Koseoglu MH, Ellidag HY, Yesil M, Deveci E, (2016).** The severity of Coronary Artery Disease and Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Enzyme Gene Polymorphism. *Int Cardiovasc Res J*;10(4):172-178. icrj.35166.

**Demuth K, Atger V, Borderie D, et al. (1999).** Homocysteine decreases endothelin-1 production by cultured human endothelial cells. *Eur J Biochem*; 263 : 367-76.

- Demuth K, Drunat S, Paul JL, Moatti N, (2000).** Hyperhomocystéinémie et athérosclérose ;*médecine/sciences*.16 : 1081-90.
- Demuth K, Myara I, Chappey B, et al. (1996).** A cytotoxic electronegative LDL subfraction is present in human plasma. *ArteriosclerThrombVascBiol*; 16: 773-83.
- Devlin AM, Clarke R, Birks J, Evans JG, Halsted CH,(2006).** Interactions among polymorphisms in folate-metabolizing genes and serum total homocysteine concentrations in a healthy elderly population?*Am J Clin Nutr*;83:708–13.
- Dhar S, Chatterjee S, Ray S, Dutta A, EnguptaBS , Chakrabarti S (2010).** Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase gene as the genetic predispositions of coronary artery diseases in eastern India. *Journal of Cardiovascular Disease Research*; Vol. 1 / No 3. Down syndrome in Italy. *Eur J Hum Genet*; 10:388-390.
- Ducimetière P, (1989).** Epidémiologie de l'athérosclérose. *médecine/sciences* ; 5 : 371-77.
- Dupin H, (1992).** Alimentation et nutrition humaines. *EsfEditeur*, N°1533p : 641,646.
- Dupuy AM, Terrier N, Sénécal L, Morena M, Leray H, Canaud B and Cristol JP, (2003).** La CRP est-elle plus qu'un marqueur de l'inflammation?*Néphrologie Vol ; 24 n° 7, pp. 337-341.*
- Durand P, Lussier-Cacan S and Blache D, (1997).** Acute methionine load-induced hyperhomocysteinemia enhances platelet aggregation, thromboxane biosynthesis, and macrophage-derived tissue factor activity in rats. *FASEB J* ;11: 1157– 68.
- Durand P, Prost M, Loreau N, Lussier-Cacan S, Blache D.(2001).** Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Lab Investig*;81(5):645-672.
- Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG, (2002).** Vascular proliferation and atherosclerosis : new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med* ; 8 : 1249-56.
- Eftychiou C, Antoniadis L, Makri L, Koumas L, Costeas PA, Kyriakou E, Nicolaidis E , Papadogiannis D, (2012).** Homocysteine Levels and MTHFR Polymorphisms in Young Patients with Acute Myocardial Infarction: A Case Control Study. *Hellenic J Cardiol*; 53: 189-194.
- Eid SS et Rihani G, (2004).** Prevalence of factor V Leiden, prothrombin G20210A, and MTHFR C677T mutations in 200 healthy Jordanians. *Clin Lab Sci* ;17: 200-202.
- Eisenstein EL, Shaw LK, Anstrom KJ, Nelson CL, Hakim Z, Hasselblad V, et al.(2001).** Assessing the clinical and economic burden of coronary artery disease: 1986–1998. *Med Care*; 39:824–35.
- Ekwere EO, Andy J, Ansa V, Asuquo OA , Udoh A, (2014).** Coronary Artery Disease and the Profile of Cardiovascular Risk Factors in South South Nigeria: A Clinical and Autopsy Study. *Hindawi Publishing Corporation Cardiology Research and Practice*; Volume 2014, Article ID 804751, 7 pages.
- EL Gezery D, Risk M, Sharaki O, Abou-Zeid A, Abdel Raheem A and Samy M, (2003).** Methylene Tetrahydrofolate Reductase Gene (C677T) Polymorphism, Folic Acid, Vitamin B12 and Homocysteine in Coronary Heart Disease. *Molecular Diagnosis and Vaccines*; 1 (1), 39-47.
- Elbaz M and Arnal JF, (2006).** Dysfonction endothéliale et athérosclérose. *Réalités Cardiologiques* N° 215 – Cahier 1 Mars 2006.
- Emmerich J, (1998).** Artériopathie des membres : monographies de médecine vasculaire. *Edition Masson*. Vol : 40.P : 9-10.
- Ergul E, Sazci A, Utkan N, Canturk Z, (2003).** Polymorphisms in the MTHFR gene are associated with breast cancer. *Tumor Biol* ;24: 286-290.
- Esfahani ST, Cogger EA, Caudill MA, (2003).** Heterogeneity in the prevalence of methylene-tetrahydro-folate reductase gene polymorphisms in women of different ethnic groups. *J Am Diet Assoc* ;103: 200-207.
- Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, Striegl G, Jurgens G,(1990).** Biochemical, structural and functional properties of oxidized LDL. *Chem Res Toxicol* ; 3 ; 77-92.
- Fakhrzadeh H, Ghotbi S, Pourebrahim R, Nouri M, Heshmat R, Bandarian F, Shafae A andLarijani B,(2006).**Total plasma homocysteine, folate, and vitamin b12 status in healthy Iranian adults: the Tehran homocysteine survey (2003–2004)/a cross – sectional population based study.*BMC Public Health*; 6:29.

- Favier A, (1997).** Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problème posés par le choix d'un marqueur. *Annales de Biologie Clinique*. 1; 9-16.
- Ferland G, (2012).** Alimentation et vieillissement. Troisième édition. Presses de l'Université de Montréal. N° 348p : 52.
- Foody JM, Milberg JA, Robinson K, Pearce GL, Jacobsen DW and Sprecher DL ,(2000).** Homocysteine and Lipoprotein (a) Interact to Increase CAD Risk in Young Men and Women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;20:493-499.
- Fournier JA, Cabezon S, Cayuela A, Ballesteros SM, Cortacero JA , Diaz De La Llera LS, (2004).** Long-term prognosis of patients having acute myocardial infarction when  $\leq 40$  years of age. *Am J Cardiol*; 94: 989-92.
- Freitas AI, Mendonça I, Guerra G, Brión M, Reis RP, Carracedo A, Brehm A, (2008).** Methylene tetrahydrofolate reductase gene, homocysteine and coronary artery disease: The A1298C polymorphism does matter. Inferences from a case study (Madeira, Portugal). *Thromb Res -03375*; No of Pages 9.
- Frelut ML, Emery-Fillon N, Guiland JC, Dao JH and De Courcy GP, (2006).** Alanine amino transferase concentrations are linked to folate intakes and methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism in obese adolescent girls. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 43:234–9.
- Friedman G, Goldschmidt N, Friedlander Y, Ben-Yehuda A, Selhub J, Bahaey S, and al., (1999).** A common mutation A1298C in human methylene tetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations. *J Nutr*;129(9):1656-61.
- Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, Olivieri O, Jacques PF, Rosenberg IH, Corrocher R , Selhub J, (2002).** A common mutation in the 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci USA*;99:5606–11.
- Friso S, Girelli D, Trabetti E, Stranieri C, Olivieri O, Tinazzi E, Martinelli N, Faccini G, Pignatti PF, Corrocher R et al., (2002).** A1298C methylene tetrahydrofolate reductase mutation and coronary artery disease: relationships with C677T polymorphism and homocysteine/folate metabolism. *Clin Exp Med* 2: 7-12.
- Froese DS, Huemer M, Suormala T, Burda P, Coelho D, Guéant JL, Landolt MA., Kozich V, Fowler B, Baumgartner MR,(2016).** Mutation Update and Review of Severe Methylene tetrahydrofolate Reductase Deficiency. *HUMAN MUTATION*, Vol.00, No. 0, 1–12.
- Froese SD, Kopeck J, Rembeza E, Bezerra GA, Oberholzer AE, Suormala T, Lutz S, Chalk R, Borkowska O, Baumgartner Matthias R, Yue Wyatt W,(2018).** Structural basis for the regulation of human 5,10- methylene tetrahydrofolate reductase by phosphorylation and S-adenosylmethionine inhibition. *NATURE COMMUNICATIONS*. 9:2261.
- Frost P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG et al., (1995).** A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylene tetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*; 10(1):111-3.
- Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, Fitzgerald LA and Rodgers GM, (1993).** “Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells, *ArteriosclerThromb* ; 13: 1327–1333.
- Fu Yi, Wang X, Kong W.(2017).** Hyperhomocysteinaemia and vascular injury: advances in mechanisms and drug targets. *British Journal of Pharmacology*.
- Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH, (1992).** The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* ; 326:242-250,310-318.
- Galluzzi L, Vacchelli E, Michels J, Garcia P, Kepp O, Senovilla I ,Vitale L, Kroemer G.(2013).** Effects of vitamin B6 metabolism on oncogenesis, tumor progression and therapeutic responses. *Oncogene*;1–10.
- Gardemann A, Weidemann H, Philipp M, Katz N, Tillmanns H, Wilhelm Hehrlein F , Haberbusch W, (1999).** The TT genotype of the methylene tetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism is associated with the extent of coronary atherosclerosis in patients at high risk for coronary artery disease. *European Heart Journal*; 20, 584 592.

**Gaughan DJ, Barbaux S, Kluijtmans LA, Whitehead AS. (2000).**The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: *genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene*. *Gene*. Oct 31;257(2):279-89.

**Gautier, Masson TD, Lagrost L, (2011).** Métabolisme des lipoprotéines de haute densité (HDL) HDL metabolism. *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements. Elsevier Masson SAS.* 3, 267-272.

Ghaedi M, Aleyasin A, Boroumand MA, Abbasi SH, Davoodi S, Mirakhori M. (2007). *J Teh Univ Heart Ctr* 3 161-166.

**Gizard F and Staels B, (2006).**Rôle protecteur de la voie fibrates/p16INK4A dans les lésions vasculaires occlusives. *M/Sn° 4*, vol. 22, avril 2006.

**Goldstein JL and Brown M, (2009).** The LDL Receptor. *ArteriosclerThrombVascBiol* ; 29 : 431-8.

**Goudet P ,Yindoula PJ , (2008).**Matière et énergie dans les systèmes : manuel de chimie-biochimie alimentaire. *EducagriEditions.* N°255.

**Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M, Rozen R, (1998).** Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome* 9:652–656.

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

**Graeber JE, Slott JH, Ulane RE, et al. (1982).** Effect of homocysteine and homocystine on platelet and vascular arachidonic acid metabolism. *PediatrRes*, 16:490–493.

**Greer IA, Ginsberg J, Forbes C, (2006).** Women's Vascular Health. *CRC Press*, N° 496. P 22.

**Gueant JL, Candito M, Andres E, VanObberghen E, Nicolas JP, (2004).** Familial pernicious anaemia with hyperhomocysteinaemia in recurrent early pregnancy loss. *Thromb Haemost* ;92:1147–9.

**Guéant JL, Coelho D, Nicolas JP, (2014).** La vitamine B12 et les maladies génétiques associées. *Bull. Acad. Natle Méd.*198, no 6, 1141-1156.

**Guéant JL, Guéant-Rodriguez RM, Anello G, Bosco P, Brunaud L, Romano C, Ferri R, Romano A, Candito M, Namour B, (2003).** Genetic determinants of folate and vitamin B12 metabolism: a common pathway in neural tube defect and Down syndrome? . *Clin Chem Lab Med* ;41:1473–7.

**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, Mutchinick OM, (2006).** Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr* ;83 (3): 701-707.

**Guéant-Rodriguez RM, Juillièrè Y, Candito M, Adjalla CE, Gibelin P, Herbeth B, Van Obberghen E , Guéant JL, (2005).** Association of *MTRR A66G* polymorphism (but not of *MTHFR C677T* and *A1298C*, *MTR A2756G*, *TCN C776G*) with homocysteine and coronary artery disease in the French population. *Thromb Haemost*; 94: 510–5.

**Guenther BD, Sheppard CA, Tran P, Rozen R, Matthews RG, Ludwig ML, 1999.** The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nature* 6, 359–365.

**Guillard JC, Favier A, Potier de Courcy G, Galan P , Hercberg S.(2002)** L'hyperhomocystéinémie : facteur de risque cardiovasculaire ou simple marqueur ? Données fondamentales. Elsevier masson ;(03)00104-4.

**Guillard JC. (2011).** Cancer et vitamine B9, trop ou trop peu ? Folate and Cancer. The right dose. *Métabolismes Hormones Diabètes et Nutrition - Vol. XV - n° 6.*

**Guillard JC, Favier A, Potier de Courcy G, Galan P, Hercberg S. (2003).** L'hyperhomocystéinémie : facteur de risque cardiovasculaire ou simple marqueur ? : 1. Données fondamentales. *Elsevier masson* ; (03)00104-4.

**Guthikonda S, Haynes W, (2006).** Homocysteine: Role and Implications in Atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports*, 8:100–106.

- Hajjar KA.(1993).**Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. *The Journal of clinical investigation*; 91(6):2873–2879.
- Haleng J, Pincemail J, Defraigne J.O. , Charlier C. , Chapelle J.P.(2007).** Le stress oxydant. *Rev Med Liege*; 62 : 10 : 628-638.
- Hall C (2005)**NT-ProBNP: the mechanism behind the marker. *J Card Fail* ;11, 81-83.
- Hambaba L, Abdessemed S, Yahia M, Laroui S, Rouabahal F,( 2008).** Relation entre hyperhomocystéinémie et polymorphisme C677T du gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase dans la population algérienne saine. *Ann Biol Clin* ;66: 637-41.
- Handy DE, Zhang Y, Loscalzo J.(2005).**Homocysteine down-regulates cellular glutathione peroxidase (GPx1) by decreasing translation. *J BiolChem*;280(16):15518-15525.
- Hanson NQ, Aras O, Yang F and Tsai MY , (2001).**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*; 47(4):661-6.
- Hansson GK, (2005).** Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*; 352: 1685-95.
- Hao H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML, (2003).** Arterial smooth muscle cell heterogeneity : implications for atherosclerosis and restenosis development. *ArteriosclerThrombVascBiol*; 23: 1510-20.
- Hao L, Ma J, Stampfer MJ, Ren A, Tian Y, Tang Y, Willett WC, Li Z,(2003).** Geographical, seasonal and gender differences in folate status among Chinese adults. *J Nutr* ;133 (11): 3630-3635.
- Heidari MM, Khatami M, Hadadzadeh M, Kazemi M, Mahamed S, Malekzadeh P , al., (2016).**Polymorphisms in NOS3, MTHFR, APOB and TNF-alpha Genes and Risk of Coronary Atherosclerotic Lesions in Iranian Patients. *Res Cardiovasc Med*;5(1):e29134.
- Heijmans BT, Boer JM, Suchiman HE, Cornelisse CJ, Westendorp RG, Kromhout D, Feskens EJ , Slagboom PE, (2003).** A common variant of the methylenetetrahydrofolate reductase gene (1p36) is associated with an increased risk of cancer. *Cancer Res*;63:1249–53.
- Hellmann H et Mooney S.** Vitamin B6: A Molecule for Human Health?.*Molecules* 2010, 15, 442-459.
- Hendy OM, Abd Al Moneam E, Allam M et al., (2011).** Frequency of thrombotic gene mutations in diabetic patients with and without coronary artery disease. *Med J Cairo Univ*;79(2):197–204.
- Hennen G , (2001).**Endocrinologie. *De Boecksuperieur*. N°518.
- Hernandez-Diaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA, (2000).** Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N. Engl. J. Med.* 343, 1608–1614.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. (1992).** Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* # 10: 413-417.
- Hiraoka M, Kagawa Y, (2017).** Genetic polymorphisms and folate status. *Congenital Anomalies* ;57, 142–149.
- Hiraoka M, Kato K, Saito Y, Yasuda K, Kagawa Y,(2004).** Gene-nutrient and gene-gene interactions of controlled folate intake by Japanese women. *Biochem Biophys Res Commun* ;316: 1210-1216.
- Hobbs CA, James SJ, Parsian A, Krakowiak PA, Jernigan S, Greenhaw JJ, Lu Y , Cleves MA, (2006).** Congenital heart defects and genetic variants in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *J Med Genet*;43:162- 166.
- Hobbs CA, Sherman SL, Yi P et al.(2000).**Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Hum Genet*; 67:623-630.
- Hofmann MA, Lalla E, Lu Y, Gleason MR, Wolf BM, Tanji N et al., (2001).** Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerate atherosclerosis in a murine model. *J Clin Invest*;107(6):675–83.
- Homberger A, Linnebank M, Winter C, Willenbring H, Marquardt T, Harms E, Koch HG.(2000).** Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene.*European Journal of Human Genetics*; 8, 725–729.

- Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. (2005).** Dose-dependent effects of folic acid on blood concentrations of homocysteine: a metaanalysis of the randomized trials. *Am J Clin Nutr*;82:806–12.
- Houcher Z, (2012).** Facteurs nutritionnels, homocystéine et polymorphisme C677T du gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase dans la population algérienne.
- Hubert W, Maria K, Aleksandra E M, Magdalena B, Grażyna K. (2015).** Coexistence of the 677C>T and A1298C MTHFR polymorphisms and its significance in the population of Polish women. *Ginekol Pol* ;86: 742-747.
- Huemer M, VonblonK, FodingerM, KrumpholzR, HubmannM, UlmerH , Simma B,(2006).** Total Homocysteine, Folate, and Cobalamin, and Their Relation to Genetic Polymorphisms, Lifestyle and Body Mass Index in Healthy Children and Adolescents.*Pediatr Res*;60: 764–769.
- Humphrey LL, Fu R, Rogers K, Freeman M , Helfand M, (2008).** Homocysteine level and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin Proc*;83:1203-12(PMID: 18990318).
- Hustad S, Middtun O, Schneede J, Vollset SE, Grotmol T, Ueland PM,(2007).**The Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism as a Modulator of a B Vitamin Network with Major Effects on Homocysteine Metabolism. *Am. J. Hum. Genet*;80:846–855.
- Hylemon PB, Pandak WM, Vlahcevic ZR, (2001).** Regulation of hepatic cholesterol homeostasis. In: Arias IM (ed), *The Liver Biology and Pathobiology*.
- Igari S, Ohtaki A, Yamanaka Y, Sato Y, Yohda M, Odaka M, Noguchi K, Yamada K,(2011).** Properties and Crystal Structure of Methylenetetrahydrofolate Reductase from *Thermus thermophilus* HB8.*PLoS ONE* 6(8): e23716.
- Ince Fatma D, Atay A, Koseoglu MH, Ellidag HY, Yesil M , Deveci E,(2016).** The severity of Coronary Artery Disease and Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Enzyme Gene Polymorphism. *Int Cardiovasc Res J*;10(4):172-178.icrj.35166.  
*Int J Clin Exp Med*;8(3):4399-4404.
- Isotalo PA, Wells GA, Donnelly JG, (2000).** Neonatal and fetal methylene-tetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: An Examination of C677T and A1298C Mutations. *Am J Hum Genet* ;67-986-990.
- Jablonski NG et Chaplin G, (2010).** Human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation. *Proc Natl Acad Sci* 107: 8963–8969.
- Jacob MP, (2006).** Matrice extracellulaire et vieillissement vasculaire. *Medecine/Sciences*; 22 : 273-8.
- Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH and al., (1996).** Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation*; 93(1):7–9.
- Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rich S, Rosenberg IH and Selhub J, (2001).**Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr*; 73:613–621.
- Jacques PF, Choumenkovitch FS.(2005)** .Chapitre 5 ;Mild MTHFR Deficiency and Folate Status. *MTHFR Polymorphisms and Disease*, edited by Per Magne Ueland and Rima Rozen.
- Jacques PF, Rosenberg IH, Rogers G, et al.(1999).** Serum total homocysteine concentrations in adolescent and adult Americans: Results from the third national health and nutrition examination survey. *Am J ClinNutr*, 69:482–489.
- James SJ, Pogribna M, Pogribny IP et al. (1999).**Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr*; 70:495-501.
- Jaunin-Stalder N, Pasche O and Cornuz J .(2009).**Patient avec des tests hépatiques perturbés : que faire ?*Rev Med Suisse*; 5 : 2410-4.
- Jawien A, Bowen-Pope DF, Lindner V et al., (1992).**Platelet-derived growth promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat balloon angioplasty model. *J Clin Invest*;89 507-11.
- Jeffrey L, Anderson MD, Gretchen JK, Matthew J, ThomsonBS, MichaeltoddBS, Tami L, Bair BS, Joseph B, Muhlestein MD, John F , Carlquist A, (1997).**Mutation in the

Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Is Not Associated With Increased Risk for Coronary Artery Disease or Myocardial Infarction. *Salt Lake City, Utah*; 1206–11.

**Jerbi Z, Abdennebi M, Douik H, Ben Romdhane H, Harzallah L, Guemira F, Ghanem A, (2005).** Étude du polymorphisme C677T du gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase dans la population tunisienne. *Ann Biol Clin* ; 63: 487-491.

**Jiang S, Zhao R, Pan M, Venners SA, Zhong G and Hsu YH, (2014).** Associations of MTHFR and MTRR polymorphisms with serum lipid levels in Chinese hypertensive patients. *Clin Appl Thromb Hemost*;20:400–10.

**Joosten E, Van Den Berg A, Riezler R, Naurath HJ, Undenbaum J, et al.(1993).** Metabolic evidence that deficiencies of vitamin B12 (cobalamin) folate and vitamin B6 occur commonly in elderly people. *AmJClinNutr*, 58: 468-476.

**Joubran R, Asmi M, Busjahn A, Vergopoulos A, Luft F , Jouma M, (1998).** Homocysteine levels and coronary artery disease in Syria. *J Cardiovasc Risk*;5: 257–261.

**Kaluźna CJ, Żurawicz E, Michalska M, Rynkowski J, (2013).** A focus on homocysteine in autism. *Acta Biochim Pol*, Vol. 60, No 2/ 137–142.

**Kang SS, Passen EL, Ruggie N, et al.(1993).** Thermolabile defect of methylenetetrahydrofolatereductase in coronary artery disease. *Circulation*, 88:1463–1469.

**Kang SS, Zhou J, Wong PW, et al (1988)** Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 43: 414–421.

**KartalOzer N, Taha S, Azzi A, (2005).** Homocysteine induces DNA synthesis and proliferation of vascular smooth muscle cells by interfering with MAPK kinase pathway. *Biofactors*;24:193–199.

**Kauwell GP, Wilsky CE, Cerda JJ, Herrlinger-Garcia K, Hutson AD, Theriaque DW, Boddie, A, Rampersaud GC and Bailey LB, (2000).** Methylenetetrahydrofolate reductase mutation (677C3T) negatively influences plasma homocysteine response to marginal folate intake in elderly women. *Metabolism*; 49: 1440–1443.

**Kerkeni M, Addad F, Chauffert M, Myara A, Gerhardt M, Chevenne D, Trivin F, Ben Farhat M, Miled A , Maaroufi K ,(2006).** Hyperhomocysteinaemia, methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and risk of coronary artery disease. *Ann Clin Biochem*; 43: 200–206.

**Khaleghparast Amin, Khaleghparast Sharif , Khaleghparast Hossein.(2014).** Association between the A1298C Polymorphism of the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and Recurrent Spontaneous Abortion. *Iranian Journal of Neonatology*; 5(2).

**Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ and Schouten EG ,(2002).** MTHFR677C3T polymorphism and risk of coronary heart disease: a metaanalysis. *JAMA*; 288:2023–31.

**Kluijtmans LA, Kastelein JJ, Lindemans J, et al.(1997).** Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation*;96:2573–7.

**Kluijtmans LA, Young IS, Boreham CA, Murray L, McMaster D, McNulty H, Strain JJ, McPartlin J, Scott JM , Whitehead AS, (2003).** Genetic and nutritional factors contributing to hyperhomocysteinemia in young adults. *Blood*;101:2483-2488.

**Koch HG, Goebeler M, Marquardt T, Roth J, Harms E. (1998).** The redox status of aminothiols as a clue to homocysteine-induced vascular damage ?*Eur J Pediatr*; 157, Suppl 2 : S102-6.

**Kou M, Wang L, Liang KJ et Wu MJ, (2001).** Genotyping 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase for Patients with Coronary Artery Disease in Southern Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis*; Vol. 9, No. 3, Pages 173-177.

**Krijnen PA, Meischl C, Nijmeijer R, Visser CA, Hack CE , Niessen HW, (2006).** Inhibition of sPLA2-IIA, C-reactive protein or complement: new therapy for patients with acute myocardial infarction? *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets*; 6, 113–123.

**Kumudini N, Uma A, Naushad SM, Mridula R, Borgohain R and Kutala VK, (2014).** Association of seven functional polymorphisms of one-carbon metabolic pathway with total plasma homocysteine levels and susceptibility to Parkinson's disease among South Indians. *Neurosci Lett*;568:1e5.

**Kunugi H, Fukuda R, Hattori M et al. (1998).** C677T polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase gene and psychoses. *Mol Psychiatry*; 3:435-7.

**Kutzbach C and Stokstad E L R. (1971).** *Biochim. Biophys. Acta* 250, 459–477.

**Lacoley P, Babuty D, Boulanger C, Ghaleh B, Loirand G, Pinet F, Samuel JL, (2007).** Biologie et *John Libbey Eurotext*, N° 677. P 302, 303.

- Lakatta EG and Levy D, (2003).** Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a « set up » for vascular disease. *Circulation*; 107 : 139-46.
- Laperche T, Mestari F, Sabouret P. (1995).** Les marqueurs biochimiques de la nécrose myocardique. *Sang Thrombose Vaisseaux*. 2, 91-9.
- Laraqui A, Allami A, Carrié A, Raisonnier A, Coiffard AS, Benkouka F, et al.(2007).**Relation between plasma homocysteine, gene polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes, and angiographically proven coronary artery disease. *Eur J Intern Med* ;18:474–83.
- Laraqui A, Bennouar N, Meggouh F, Allami A, El Kadiri N, Benkouka F, Azeddoug H, El Haitem N, Benomar A, Fellat S, Benomar M, (2002).** Homocystéine, lipoprotéine (a) : facteurs de ° 5.
- Larifla L, (2002).** Athérosclérose Hypertension Thrombose. *Elsevier Masson*. N° 232 p : 7, 9,10.
- Leclerc D et Rozen R. (2008).** Endoplasmic Reticulum Stress Increases the Expression of Methylenetetrahydrofolate Reductase through the IRE1 Transducer. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* ;6, pp. 3151–3160.
- Leclerc D et Rozen R.(2007).**Génétique moléculaire de *MTHFR* Les polymorphismes ne sont pas tous bénins.. *MEDECINE/SCIENCES* ; 23 : 297-302.
- Leclerc D, Sibani S, Rima R, (2005).** Chapitre 1; Molecular Biology of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and Overview of Mutations/Polymorphisms. *MTHFR Polymorphisms and Disease*, edited by Per Magne Ueland and Rima Rozen.
- Lee MN, Takawira D, Nikolova AP, Ballou DP, Furtado VC, et al. (2009)** Functional role for the conformationally mobile phenylalanine 223 in the reaction of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*48: 7673–7685.
- Leklem JE. (1990).**Vitamin B6: a status report. *J Nutr*;120:1503-1507.
- Lentz SR and Sadler JE, (1991).** Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest* ; 88:1906–1914.
- Leonard EJ and Yoshimura T, (1990).** Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today* ; 11: 97 101.
- Li H, Lewis A, Brodsky S, Rieger R, Iden C , Goligorsky MS, (2002).** Homocysteine induces 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase in Vascular Endothelial Cells A Mechanism for Development of Atherosclerosis? *Circulation*; 105: 1037–43.
- Li L, Yang Y, Wu S, Deng X, Li J, Ning N , Hou X, (2016).**Meta-analysis of association between MTHFR C677T polymorphism and risk of myocardial infarction: evidence from forty-four case-control studies. *Int J Clin Exp Med*;9(3):5630-5642.
- Li MN, Wang HJ, Zhang NR, MS, XL, Shi XJ, Zhou T, Chen B, Zhang J ,Li H ,(2017).**MTHFR C677T gene polymorphism and the severity of coronary lesions in acute coronary syndrome. *Medicine*; 96:49.
- Li WX, Cheng F, Zhang AJ, Dai SX, Li GH, Lv WW, Zhou T, Zhang Q, Zhang H, Zhang T, Liu F, Liu D and Huang J,(2017).**Folate Deficiency and Gene Polymorphisms of MTHFR, MTR and MTRR Elevate the Hyperhomocysteinemia Risk. *Clin Lab* ;63:523-533.
- Li WX, Lv WW, Dai SX, Pan ML, Jing-Fei H, (2015).** Joint associations of folate, homocysteine and MTHFR, MTR and MTRR gene polymorphisms with dyslipidemia in a Chinese hypertensive population: a cross-sectional study. *Lipids in Health and Disease*; 14:101.
- Li WX, Li W, Cao JQ, Yan H, Sun Y, Zhang H, Zhang Q, Tang L, Wang M, Huang JF and Liu D, (2016).**Folate Deficiency Was Associated with Increased Alanine Aminotransferase and Glutamyl Transpeptidase Concentrations in a Chinese Hypertensive Population: A Cross-Sectional Study.*J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*;62(4):265-271.
- Liakos M, Parikh PB. (2018).** Gender disparities in presentation, management, and outcomes of acute myocardial infarction. *Curr Cardiol Rep.*;20(8):64.
- Liang R, Zhou Y, Xie J, Lv W, Kang B, Liang Y, and al., (2014).**Association of C677T gene polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and plasma homocysteine level with hyperlipidemia. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*;34:1195–8.
- Libby P, (1995).** Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* ;91: 2844-50.
- Lievers KJ, Boers GH, Verhoef P, den Heijer M, Kluijtmans LA, van der Put NM, Trijbels FJ, Blom HJ, (2001).** A second common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)

gene and its relationship to MTHFR enzyme activity, homocysteine, and cardiovascular disease risk. *J Mol Med* ;79: 522-528.

**Liew SC, (2016).** Folic acid and diseases – supplement it or not?. *RevAssoc Med Bras*; 62 (1) : 90-100.

**Liew SC, Gupta ED, (2015).** Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: Epidemiology, metabolism and the associated diseases. *European Journal of Medical Genetics* 58 1-10.

**Liu C, Yang Y, Peng D and al., (2015).**Hyperhomocysteinemia as a metabolic disorder parameter is independently associated with the severity of coronary heart disease. *Saudi Med J*;36:839–46.

**Liu Y, Li K, Venners SA, Hsu YH, Jiang S, Weinstock J, and al., (2015).** Individual and joint associations of methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype and plasma homocysteine with dyslipidemia in a Chinese population with hypertension. *Clin Appl Thromb Hemost*.

**Logeart D, (2007).**Insuffi sance cardiaque et dosage du BNP en pratique clinique. *Technologie appliquée ; spectra biologie* n° 157.

**Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, McQueen MJ, Probstfi eld J, Fodor G, Held C and Genest J Jr, (2006).**Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med*; 354 (15): 1567–1577.

**Loup-Leuciuc A, Loup PJ, Lombardi T, Samson J,(2011) .**Carence en vitamine B12 (1re partie) : mise au point. *Med BuccaleChirBuccale* ;17:211-224.

**Lüllmann-Rauch R , (2008).**Histologie. *De Boeck Supérieur*. N° 704 p : 255.

**Lusis Aldons J, (2000).** Atherosclerosis. Macmillan Magazines Ltd, *NATURE*, VOL : 407, P : 233.

**MacLachlan TK, Sang N, Giordano A, (1995).**Cyclins, cyclindependent kinases and cdk inhibitors: implications in cell cycle control and cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*; 5: 127-56.

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

**Markan S, Sachdeva M, Sehrawat BS, Kumari S, Jain S, Khullar M, (2007).** MTHFR 677 CT/MTHFR 1298 CC genotypes are associated with increased risk of hypertension in Indians. *Mol Cell Biochem* ;302: 125-131.

**Martin C, Vallet B, ArnetteBR, (2017).** Physiologie humaine appliquée (2e édition). *John LibbeyEurotext*, N°914. P 516.

**Martin YN, Salavaggione OE, Eckloff BW, et al. (2006).** Human methylenetetrahydrofolate reductase pharmacogenomics: gene resequencing and functional genomics. *Pharmacogenet Genomics*; 16 : 265-77.

**Masson D, YvanC - Laurent, (2008).** L’augmentation du HDL-cholestérol Un traitement d’avenir dans le domaine de l’athérosclérose. *médecine/science*; 24 : 341-74.

**Matsuura F, Wang N, Chen W, et al., (2006).** HDL from CETP deficient subjects shows enhanced ability to promote cholesterol efflux from macrophages in an apoE- and ABCG1-dependent pathway. *J Clin Invest*; 116 : 1435-42.

**Matthews RG. (1990)** in *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, ed. Muller, F. (CRC, Boca Raton, FL), Vol. I, pp. 371–387.

**Matthews RG. (2002).** Methylenetetrahydrofolate reductase: A common human polymorphism and its biochemical implications. *Chem Rec*; 2(1):4-12.

**McGarel C, Pentieva K, Strain JJ, McNulty H, (2015).** Emerging roles for folate and related B-vitamins in brain health across the lifecycle. *Proc. Nutr. Soc* ; 74, 46–55.

**McKinnon PJ, Caldecott KW. (2007).** DNA strand break repair and human genetic disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*;8:37e55. *Med.* 320 : 915-924.

**Mehlig K, Leander K, De Faire U, Nyberg F, Berg C, Rosengren A, Björck L, Zetterberg H, Blennow K, Tognon G, TorénK, Strandhagen E, Lissner L , Thelle D, (2013).** The association between plasma homocysteine and coronary heart disease is modified by the MTHFR677C>T polymorphism. *Heart*;99:1761–1765.

**Meisel C, Cascorbi I, Gerloff T, Stangl V, Laule M, Muller JM, Wernecke KD, Baumann G, Roots I et Stangl K,(2001).** Identification of six methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*)

genotypes resulting from common polymorphisms: impact on plasma homocysteine levels and development of coronary artery disease. *Atherosclerosis*;154: 651–658.

**Mello AL, Freire DC, Da Cunha S, Foss-Freitas MC and Vannucchi H, (2012).** Evaluation of plasma homocysteine level according to the C677T and A1298C polymorphism of the enzyme MTHFR in type 2 diabetic adults. *Arq Bras Endocrinol Metab*; 56(7):429-34.

**Menard C, (2018).** Recettes et menus pour l'excès de cholestérol. BoD. *Books on Demand*. N° 144p 9, 10.

**Milani RV and Lavie CJ, (2008).** Homocysteine: The Rubik's Cube of Cardiovascular Risk Factors. *Mayo Clin Proc*; 83 (11): 1200–1202.

**Misra A, Vikram NK, Pandey RM, Dwivedi M, Ahmad FU, Luthra K, Jain K, Khanna N, Devi JR, Sharma R, Guleria R, (2002).** Hyperhomocysteinemia, and low intakes of folic acid and vitamin B12 in urban North India. *Eur J Nutr*; 41:68-77.

**Molloy AM, (2004).** Folate and homocysteine interrelationships including genetics of the relevant enzymes. *Curr Opin Lipidol*; 15:49–57.

**Monsen ALB, Refsum H, Markestad T, Ueland PM, (2003).** Cobalamin status and its biochemical markers methylmalonic acid and homocysteine in different age groups from 4 days to 19 years. *Clin Chem*; 49:2067–2075.

**Morita H, Taguchi J, Kurihara H, Kitaoka M, Kaneda H, Kurihara Y, et al., (1997).** Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease. *Circulation*;95(8):2032-6.

**Morozova S, Suc-Royer I, Auwerx J, (2004).** Modulateurs du métabolisme du cholestérol et avenir du traitement de l'athérosclérose. *M/SN° 6-7*, vol. 20.

**Mouchabac S. (2008).** Homocystéine, hyperhomocystéinémie et dépression. *Neuropsychiatrie : Tendances et Débats* ; 32 : 9 – 18.

**Moussard C, (2006).** Biochimie structurale et métabolique. *De Boeck Supérieur*. N° 368p 151, 183, 184, 201.

**Mudd SH, Levy HL, Skovby F. (1995).** Disorders of transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease; 7th ed. Vol. 1. *New York : McGraw-Hill Book Co*, 1270-327.

**Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, et al., (1997).** Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precedes monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions, *J Clin Invest*. 100 : 2680-90.

**Naruszewicz M, Mirkiewicz E, Olszewski AJ, Mc Cully KS. (1994).** Thiolation of low-density lipoprotein by homocysteinethiolactone causes increased aggregation and altered interaction with cultured macrophages. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*; 4: 70-7.

**Naseem KM. (2005).** The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med*; 26(1-2):33-65.

**Nasiri M, Roostaei A et Ehsanian Z, (2014).** Association of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene C677T and A1298C Polymorphisms with Myocardial Infarction from North of Fars Province. *Res Mol Med*; 2 (3): 36-40.

**Ni J, Zhang L, Zhou T, Xu WJ, Xue JL, Cao N, Wang X, (2017).** Association between the MTHFR C677T polymorphism, blood folate and vitamin B12 deficiency, and elevated serum total homocysteine in healthy individuals in Yunnan Province, China. *Journal of the Chinese Medical Association*; 80; 147e153.

**Nicolas JP and Chango A, (1997).** Dérégulation du métabolisme de l'homocystéine et conséquences pour le système vasculaire. *Bull Acad Natle Méd*, 181, 313-331.

**Niessen HWM, Krijnen PAJ, Visser CA, Meijer CJLM, Hack CE, (2003).** Type II secretory phospholipase A2 in cardiovascular disease: a mediator in atherosclerosis and ischemic damage to cardiomyocytes? *Cardiovascular*; 60, 68–77.

**Nishio H, Lee MJ, Fujii M, Kario K, Kayaba K, Shimada K, Matsuo M, Sumino K, (1996).** A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene among the Japanese population. *JPN Am J Hematol* ;41, (2): 247-251.

- Nojima M, Iwasaki M, Kasuga Y, Yokoyama S, Onuma H, Nishimura H, Kusama R, Yoshida T, Tsugane S, (2018).** Correlation between global methylation level of peripheral blood leukocytes and serum C reactive protein level modified by MTHFR polymorphism: a cross-sectional study. *BMC Cancer*;18:184.
- Oka T.(1990).** Vitamin B6. *Nippon Rinsho*;57 : 2199-2204.
- Olivier, B.-B.** (2011). Myocardial cell death and regeneration. In: *Acute Coronary Syndromes: A companion to Braunwald's heart disease*. Saunders, pp 66-80.
- Oram JF, Lawn RM, Garvin MR, Wade DP, (2000).** ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J BiolChem*2000;275:34508-11.
- Outinen P, Sood S, Liaw P, Sarge K, Maeda N and Hirsh J, (1998).** Characterization of the stress-inducing effects of homocysteine. *Biochem J*;332(1):213–21.
- Owens GK, (1995).** Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *PhysiolRev*, 75: 487 517.
- Ozarda Y, Sucu DK, Hizli B and Aslan D, (2009).** Rate of T alleles and TT genotype at MTHFR 677C/T locus or C alleles and CC genotype at MTHFR1298A/C locus among healthy individuals in Turkey: impact on homocysteine and folic acid status and reference intervals. *Cell Biochem Funct*;27:568e77.
- Paluku They-They T, Hamzi K, Mazabraud A, Nadifi S, (2009).** Fréquence du polymorphisme C677T du gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) dans les populations arabe et berbère du Maroc. *Antropo*; 20: 11-17.
- Papatheodorou L and Weiss N, (2007).** Vascular oxidant stress and inflammation in hyperhomocysteinemia. *Antioxidants& redox signaling* ; 9 (11):1941–1958.
- Patrice J, Emma B, Zoe Y, Martin V, Mark L. (2016).**Converging Evolutionary, Environmental and Clinical Ideas on Folate Metabolism. *ERHM* .vol. 1: 42-46.
- Pejchal R, Campbell E, Guenther BD, Lennon BW, Matthews RG and Ludwig ML, (2006).** Structural perturbations in the Ala—>Val polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase: how binding of folates may protect against inactivation. *Biochemistry*; 45(15):4808–18.
- Peng F, Labelle LA, Rainey BJ, Tsongalis GJ, (2001).** Single nucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are common in US Caucasian and Hispanic American populations. *Int J Mol Med* ;8: 509-511.
- Pereira AC, Schettert IT, Morandini Filho AA, Guerra-Shinohara EM, Krieger JE ,(2004).**Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) c677t gene variant modulates the homocysteine folate correlation in a mild folate-deficient population.*Clin Chim Acta* ; Feb;340(1-2):99-105.
- Perera R, Chandrasena LG, Indrakumar J, Peiris H, (2017).**MTHFR C677T and A1298C Gene Polymorphisms and Ischemic Heart Disease (IHD) in a Sri Lankan Population - A Preliminary Study. *Indian Journal of Mednodent and Allied Sciences*;Vol. 5, No. 1, pp- 1-8.
- Perlemuter K, MontalescotG, Bassand JP, (2005).** Infarctus du myocarde. (*OMS*).
- Pickell L, Tran P, Leclerc D, et al.(2005).** Regulatory studies of murine methylenetetrahydrofolate reductase reveal two major promoters and NF-kappaB sensitivity. *Biochim Biophys Acta* ; 1731 : 104-14.
- Pinto X, Vilaseca MA, Garcia-Giralt N, Ferrer I, Pala M, Meco JF, Mainou C, Ordovas JM, Grinberg D and Balcells S, Baix Llobregat Homocysteine Study Group ,(2001).** Homocysteine and the MTHFR 677C →T allele in premature coronary artery disease. Case control and family studies. *Eur J Clin Invest*; 31:24-30.
- Piskac-Collier AL, Monroy C, Lopez MS, Cortes A, Etzel CJ, Greisinger AJ, et al.(2011).**Variants in folate pathway genes as modulators of genetic instability and lung cancer risk. *GenesChromosomes Cancer*; 50: 1–12.
- Poitras E, Houde A (2002).** La PCR en temps réel: principes et applications. *Rev. Biol. Biotech* ; pp.2-11.
- Porter K, Hoey L, Hughes CF, Ward M, McNulty H,(2016).**Causes, Consequences and Public Health Implications of Low B-Vitamin Status in Ageing. *Nutrients*; 8, 725.

- Pratt DS et Kaplan MM, (2000).** Evaluation of abnormal liver enzyme results in asymptomatic patients. *N Engl J Med*;342:1266-71.  
present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9, 849–853.
- Quinn MT, Parthasarathy S, LG Fong, Steinberg D, (1987).** Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte / macrophages during atherogenesis. *Proc Nat AcadSciUSA*: 84: 2995-8.
- Qureshi N, Dugan RE, Cleland WW, Porter JW.** Kinetic analysis of the individual reductive steps catalyzed by beta-hydroxy-beta-methylglutaryl-coenzyme A reductase obtained from yeast. *Biochemistry* 15: 4191–4207, 1976.
- Rady PL, Szucs S, Grady J, et al.(2002).** Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel *MTHFR* polymorphic site, *G1793A*. *Am J Med Genet*; 107: 162–8.
- Rai AK, Sigh S, Mehta S, Kumar A, Pandey LK, Raman R, (2006).** MTHFR C677T and A1298C polymorphisms are risk factors for Down's syndrome in Indian mothers. *J Hum Genet* ;51: 278-283.
- Rami A, Mahfouz NK, Cortas Khalil M, Charafeddine RN, AbdulKhalik DS, Sarieddine RH, Kadi Rose T and Daher, (2012).** Correlation of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms with homocysteine metabolism in healthy Lebanese adults. *Gene* ;10;504(2):175-80.
- Ranjith N, Pegoraro RJ et Rom L, (2003).** Risk factors and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in a young South African Indian-based population with acute myocardial infarction. *Cardiovasc J South Afr*; 14: 127–132.
- Rebstein M et Soerensen C, (2011).** Chimie avancée. PPUR Presses polytechniques. N° 426p : 89.
- Refsum H, Smith D, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J and al., (2004).** Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem*;50:3-32.
- Refsum H, Ueland PM, Nygård O , Vollset SE, (1998).** Homocysteine and cardiovascular disease, *Annu Rev Med*; vol. 49(pg. 31-62).
- Reitsma PH, (2007).** Rosendaal FR. Past and future of genetic research in thrombosis. *J Thromb Haemost* ;Suppl1;264-9.
- Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, et al., (2000).** Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science*; 289 : 1524-9.
- Richter B, Stegmann K, Roper B et al.(2001).** Interaction of folate and homocysteine pathway genotypes evaluated in susceptibility to neural tube defects (NTD) in a German population. *J Hum Genet*; 46:105-109.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. (1997).** Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 245: 154-160.
- Rita K et Thomas R, (2004).** Increased Frequency of the MTHFR A1298C Mutation in an Irish Population. *Clinchem.* 50, No. 12.
- Roblin X, Pofelski J, Zarski JP, (2007).** Rôle de l'homocystéine au cours de la stéatose hépatique et de l'hépatite chronique. *Gastroenterol Clin Biol*;31 ;415-420.
- Romero-Sánchez C, Gómez-Gutierrez A, Gómez PE, Casas-Gomez MC, Briceño I, (2015).** C677T (rs1801133) MTHFR gene polymorphism frequency in a Colombian population. *Colomb Med* 46: 75-79.
- Rosenberg N, Murata M, Ikeda Y and al., (2002).** The frequent 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with a common haplotype in whites, Japanese, and Africans. *Am J Hum Genet*;70:758–62.
- Rosenblatt DS and Whitehead VM, (1999).** Cobalamin and folate deficiency: acquired and hereditary disorders in children. *Semin Hematol*;36: 19–34.
- Ross R. (1993).** The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature (Lond.)* 362:801–809.
- Russell DW, (1992).** Cholesterol biosynthesis and metabolism. *Cardiovasc Drugs Ther* 1992; 6: 103-10.

- Sadeghian S, Fallahi F, Salarifar M, Davoodi G, Mahmoodian M, Fallah N, Darvish S, Karimi A, Tehran HC, (2006).** Homocysteine, vitamin B12 and folate levels in premature coronary artery disease. *BMC Cardiovascular Disorders*;6:38.
- Saïle R and Taki H, (2007).** Cholestérol, lipoprotéines et athérosclérose : de la biochimie à la physiopathologie. *les technologies de laboratoire*. N° Janvier-Février 2007.
- Sanada S, Komuro I, Kitakaze M, (2011).** Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *AJP Heart Circ. Physiol.*, 301(5), H1723-H1741.
- Saraswathy KN, Asghar M, Samtani R, Murry B, Mondal PR, Ghosh PK, Sachdeva MP, (2012).** Spectrum of MTHFR gene SNPs C677T and A1298C: a study among 23 population groups of India. *Mol Biol Rep* ;39 (4): 5025-5031.
- Sazci A, Ergul E, Kaya G, Karat I, (2005).** Genotype of allele frequencies of the polymorphic methylenetetrahydrofolate reductase gene in Turkey. *Cell Biochem Funct*; 23: 51-54.
- Schrier LS. (2011).** Physiology of vitamin B12 and folic acid deficiency. *UpToDate*.
- Schwedler SB, Hansen-Hagge T, Reichert Mand al., (2009).** "Monomeric C-reactive protein decreases acetylated LDL uptake in human endothelial cells," *Clinical Chemistry*; vol. 55, no. 9, pp. 1728–1731.
- Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH., Rogers G, Bowman BA, Gunter EW, Wright JD, Johnson CL, (1999).** Serum Total Homocysteine Concentrations in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (1991–1994): Population Reference Ranges and Contribution of Vitamin Status to High Serum Concentrations. *Ann Intern Med*; 131 (5)321-330.
- Sen U, Mishra PK, Tyagi N, Tyagi SC.(2010).** Homocysteine to hydrogen sulfide or hypertension. *Cell biochemistry and biophysics*; 57(2-3):49–58.
- Serraj K, Mecili M, Andrès E.(2010).** Signes et symptômes de la carence en vitamine B12 : *revue critique de la littérature*. mt, vol. 16, n° 1.
- Shahzad Khuram, Hai Abdul, Ahmed Asifa, Kizilbash Nadeem, Alruwaili Jamal.(2013).** A Structured-based Model for the Decreased Activity of Ala222Val and Glu429Ala Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Mutants. *Bioinformation* 9(18): 929-936.
- Shanahan CM and Weissberg PL, (1998).** Smooth muscle cell heterogeneity: patterns of gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *ArteriosclerThrombVascBiol*, 18: 333-8.
- Shannon B, Gnanasampanthan S, Beilby J, Iacopetta B, (2002).** A polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene predisposes to colorectal cancers with microsatellite instability. *Gut*;50: 520–524.
- Shelnutt K P, Kauwell G P, Chapman CM, Gregory JF, Maneval DR., Browdy AA, Theriaque DW and Bailey LB, (2003).** Folate status response to controlled folate intake is affected by the methylenetetrahydrofolate reductase 677C3T polymorphism in young women. *J. Nutr*; 133: 4107–4111.
- Shen J, Zhang J, Wen J, Ming Q, Zhang J, Xu Y, (2015).** Correlation of serum alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase with coronary heart disease.
- Shrubsole MJ, Gao YT, Cai Q, Shu XO, Dai Q, Hebert JR, Jin F, Zheng W, (2004).** MTHFR polymorphisms, dietary folate intake, and breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* ;13: 190-196.
- Silaste ML, Rantala M, Alftan G, Aro A and Kesäniemi YA, (2003).** Plasma homocysteine concentration is decreased by dietary intervention. *Br J Nutr*;89:295-301.
- Škovierová H, Vidomanová E, Mahmood S, Sopková J, Drgová A, Cervenová T, Halašová E, Lehotský J, (2016).** The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health. *J. Mol. Sci*17, 1733.
- Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, Fowler B, Geisel J, Dierkes Jand al., (2004).** Clinical use and rational management of homocysteine, folic acid, and B vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases. *Z Kardiol*; 93: 439-53.

- Stanslawska-Sachadyn A, Woodside JV, Brown KS, Youg IS, Murray L, McNulty H**, (2008). Evidence for sex differences in the determinants of homocysteine concentration. *Mol Genet Metabol*;93:355-62.
- Stegmann K, Ziegler A, Ngo ET, Kohlschmidt N, Schröter B, Ermert A, Koch MC**, (1999). Linkage disequilibrium of MTHFR genotypes 677C/T-1298A/C in the German population and association studies in probands with neural tube defects (NTD). *Am J Med Gene* 87:23-9.
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL**, (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J*
- Stern LL et al.** (2000) Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is
- Stevens A and Lowe J**, (1997). *Histologie humaine*. 2<sup>ème</sup> édition de boeck. Vol : 342, P : 138.
- Stipanuk MH**, (2004). Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu Rev Nutr*; 24: 539-77.
- Stocker R**, (1994). Lipoprotein oxidation: mechanistic aspects, methodological approaches and clinical relevance. *Curr Opin Lipidol*; 5 : 422-33.
- Stuppia L, Gatta V, Gaspari AR et al.**(2002) C677T mutation in the 5,10-MTHFR gene and risk of Down syndrome in Italy. *Eur J Hum Genet* ; 10:388-390.
- Sultan IE, Abbas H, El-Reweny AA, Khalafala OA, El-Abd D, Mosaad N**, (2006). *J T U Med Sc*; 1(1):20-29.
- Sumner J, Jencks DA, Khani S, Matthews RG.** (1986). Photoaffinity labeling of methylenetetrahydrofolate reductase with 8-azido-S-adenosylmethionine. *J Biol Chem* 261(17):7697-7700.
- Sun J, Xu Y, Xue J, Zhu Y, Lu H**, (2005). Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism associated with susceptibility to coronary heart disease in Chinese type 2 diabetic patients. *Mol and Cell Endoc* 229: 95-101.
- Taguchi T, Mori H, Hamada A, Yamori Y, Mori M**,(2012). Serum folate, total homocysteine levels, and methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T polymorphism in young healthy female Japanese. *Asia Pac J Clin Nutr*; 21: 291-295.
- Taiz L, Zeiger E**, (2010). *Plant Physiology* (5 e), 5th Edition, Sinauer Associates Inc., Sunderland, 782 p.
- Tanis BC, Blom HJ, Bloemenkamp DG, Van Den Bosch MAAJ, Algra A, Van Der GY, Rosendaal FR**, (2004). Folate, homocysteine levels methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T variant, and the risk of myocardial infarction in young women: effect of female hormones of homocysteine levels. *Journal of the thrombosis and haemostasis*2; 35- 40.
- Tedgui A and Mallat Z**, (2001). Athérosclérose et inflammation. *Med Sci*2001 ; 17 : 162-9.
- Therrien JM**, (2014). Une histoire inventée : essai sur le cholestérol. *iBookthèque*, N° 516 pages.
- Thogersen AM, Nilsson TK, Dahlen G, Jansson JH, Boman K, Huhtasaari F and Hallmans J.** (2001). Homozygosity for the 677C T mutation of 5,10: methylenetetrahydrofolate reductase and total plasma homocysteine are not associated with greater than normal risk of a first myocardial infarction in northern Sweden *Coron Artery Dis*; 12(2):85-90.
- Thorin-Trescases N, Voghe-Guillaume I, Farhat N, Drouin A, Gendron ME, Thorin E**, (2010). Âge et stress oxydant Vers un déséquilibre irréversible de l'homéostasie endothéliale. *MEDECINE/SCIENCES*; 26 : 875-80.
- Tice JA, Ross E, Coxson PG, et al.**, (2001). Costeffectiveness of vitamin therapy to lower plasma homocysteine levels for the prevention of coronary heart disease: effect of grain fortification and beyond. *JAMA*;286:936-943.
- Title LM, Cummings PM, Giddens K, Genest JJ Jr et Nassar BA**, (2000). Effect of folic acid and antioxidant vitamins on endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*; 36: 758 - 65.
- Tong Zou, Weihong Yang, Zongliu Hou, Jiefu Yang**, (2010). Homocysteine enhances cell proliferation in vascular smooth muscle cells: role of p38 MAPK and p47phox. *Acta Biochim Biophys Sin*, 42: 908-915.

- Tran P, Leclerc D, Chan M, et al. (2002).** Multiple transcription start sites and alternative splicing in the methylenetetrahydrofolate reductase gene result in two enzyme isoforms. *Mamm Genome* ; 13 : 483-92.
- Trembath D, Sherbondy AL, Vandyke DC, et al. (1999).** Analysis of select folate pathway genes, *PAX3*, and human *T* in a Midwestern neural tube defect population. *Teratology*; 59: 331–41.
- Trimmer EE, Ballou DP, Ludwig ML, Matthews RG, (2001).** Folate activation and catalysis in methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli*: roles for aspartate 120 and glutamate 28. *Biochemistry* 40: 6216–6226.
- Ubbink JB, HaywardVermaak WJ, Van Der Merwe A, Becker PJ; (1993).** Vitamin B-12, vitamin B-6, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. *AmJClinNutr*; 57: 47-53.
- Ueland PM and Rozen R, (2005).** (eds). *MTHFR polymorphisms and disease*. Georgetown: Landes Bioscience/Eurekah.com : 210 p.
- Ueland PM, Hustad S, Schneede J et al. (2001).** Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci*; 22(4):195-201.
- Van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ. (1998).** A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects?. *Am J Hum Genet* ;62: 1044-1051.
- Van der Put NM, Steegers-Theunissen RPM, Frosst P et al. (1995).** Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet*; 346:1070-1.
- Van Der VC, Kerneis M, Abtan J, O'Connor S, Silvain J, Montalescot G and Collet JP ,(2012).** Maladie coronaire prématurée. *Sang Thrombose Vaisseaux*; 4: 173-82.
- Varthaman A, Khallou-Laschet J, Thauinat O, Caligiuri G, Nicoletti A, (2008).** L'athérogenèse Une maladie dysimmunitaire. *MEDECINE/ SCIENCES* ; 24 : 169-7.
- Verma S, Li SH, Badiwala MV, Weisel RD, Fedak PW, Li RK, Dhillon B, Mickle DA. (2002).** Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation*; Apr23;105(16):1890-6.
- Vesin C, Horellou MH, Mairesse S, Conard J, Safar M, Blacher J, (2007).** Homocystéine et risque cardiovasculaire. *Sang Thrombose Vaisseaux* ; 19, N° 3 : 143-9.
- Veyrat DC, Blasco H, Crinier J, Vayne C, Emond P, Labarthe F, Andres CR, Maillot F,(2013).** Exploration d'un hyperhomocystéinémie. *Ann BiolClin*; 71(5) : 517-25.
- Vilkaitis G, Merkiene E, Serva S, et al. (2001).** The mechanism of DNA cytosine-5 methylation. Kinetic and mutational dissection of Hhai methyltransferase. *J Biol Chem* 276: 20924–20934.
- Virgos C, Martorell L, Simo JM et al.(1999).** Plasma homocysteine and the methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene variant: Lack of association with schizophrenia. *Neuroreport*; 10:2035-8.
- Voet D et Voet JG, (2016).** Biochimie. *De Boeck Supérieur*, N° 1784. P 251,494, 450, 454.
- Vossen R, Aten E, Roos A, Dunnen JT. (2009).** High-Resolution Melting Analysis (HRMA) –More than just a sequence variant screening. *Human Mutation*. 30 : 860-866.
- Wang D, He Y, Li Y, Luan D, Yang X, Zhai F and Ma G,(2011).** Dietary patterns and hypertension among Chinese adults: a nationally representative cross-sectional study. *BMC Public Health* ;11: 925.
- Wang G, Siow YL, O K. (2000).** 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*; 352:817–826.
- Wang J, Ouyang N, Qu L, Lin T, Zhang X, Yu Y, Jiang C, Xie L, Wang L, Wang Z, Ren S, Chen S, Huang J, Liu F, Huang W, Qin X. (2017).** Effect of MTHFR A1298C and MTRR A66G genetic mutations on homocysteine levels in the Chinese population: a systematic review and meta-analysis. *J Transl Intern Med* 29;5(4):220-229.
- Wang N, Lan D, Chen W, et al., (2004).** ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *ProcNatAcadSci USA*; 101 : 9774-9.
- Wang X, Fu J, Li Q, Zeng D , (2016).** Geographical and Ethnic Distributions of the MTHFR C677T, A1298C and MTRR A66G Gene Polymorphisms in Chinese Populations: A Meta Analysis ; *PLoS One*11: e0152414.

**Wang Y, Pei L, Wang J, Zheng X. (2012).** Is the prevalence of MTHFR C677T polymorphism associated with ultraviolet radiation in Eurasia?. *J Hum Genet*; 57: 780–786.

**Wassim YA, Ramzi RF, Hala T, Jocelyn LD, Noha IH, (2004).** Differences in the Frequency of the C677T Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene among the Lebanese Population. *Am J Hematol* 76: 85-87.

**Weill JH, Boulanger Y, Chambon P, Gautheron D, Lazdunski M, Montreuil J, Patte LC, Rebel G, Wright M, (1975).** Biochimie générale. *Masson Paris*. N° 427p : 201, 211, 212.

**Weinman S et Méhul P, (2004).** Toute la biochimie. *DUNOD Paris*. N° 451p : 322,331.

**Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R, (1998).** A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab*; 64: 169-172.

**Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, (2002).** The 1298A→C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis*; 156(2):409–415.

**Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Chen Z, Curtis Ellison R, Eckfeldt JH, Rozen R, (2001).** The A1298C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis* 156: 409-415.

**Welzel TM, Katki HA, Sakoda LC, Evans AA, London WT, Chen G, O'Broin S, Shen FM, Lin WY, McGlynn KA, (2007).** Blood folate levels and risk of liver damage and hepatocellular carcinoma in a prospective high-risk cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. Jun; 16(6):1279-82.

**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, (2003).** Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas worldwide. *J Med Genet* ; 40: (8) 619-625.

**Williams JD, Jacobson EL, Kim H, Kim M, Jacobson MK, (2012).** Folate in skin cancer prevention. *SubcellBiochem*; 56:181–197.

**Williams KT and Schalinske KL, (2007).** New insights into the regulation of methyl group and homocysteine metabolism. *J. Nutr*; 137, 311–314.

**Wilson RD, Johnson JA, Wyatt P et al. (2007).** Preconceptional vitamin/folic acid supplementation 2007: the use of folic acid in combination with a multivitamin supplement for the prevention of neural tube defects and other congenital anomalies. *J ObstetGynaecolCan* ; 29: 1003-26.

**Woo CW, Siow YL, Pierce GN, Choy PC, Minuk GY, Mymin D, O K, (2005).** Hyperhomocysteinemia induces hepatic cholesterol biosynthesis and lipid accumulation via activation of transcription factors. *Am J PhysiolEndocrinol Metab* 288: E1002–E1010.

**Woo KS, Chook P, Chan LL et al., (2002).** Long-term improvement in homocysteine levels and arterial endothelial function after 1-year folic acid supplementation. *Am J Med*; 112: 535-9.

**Yakub M, Moti N, Parveen S, Chaudhry B, Azam I, Mohammad PI, (2012).** Polymorphisms in MTHFR, MS and CBS Genes and Homocysteine Levels in a Pakistani Population. *PLoS ONE*; 7(3): e33222.

**Yamada K, Chen Z, Rozen R, Matthews RG. (2001).** Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(26):14853–14858.

**Yamada, K, Strahler JR, Andrews PC, Matthews, RG, (2005).** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 10454–10459.

**Yang B, Fan S, Zhi X, Wang Y, Wang Y, Zheng Q and Sun G, (2015).** Prevalence of Hyperhomocysteinemia in China: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*; 7, 74-90.

**Yang B, Liu Y, Li Y, Fan S, Zhi X, et al., (2013).** Geographical Distribution of MTHFR C677T, A1298C and MTRR A66G Gene Polymorphisms in China: Findings from 15357 Adults of Han Nationality. *PLoS ONE* ; 8(3): e57917.

**Yang QH, Botto LD, Gallagher M, Friedman JM, Sanders CL, Koontz D, Nikolova S, Erickson JD and Steinberg K, (2008).** Prevalence and effects of gene-gene and gene-nutrient interactions on

serum folate and serum total homocysteine concentrations in the United States: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey DNA Bank. *Am J Clin Nutr*;88:232– 46.

**Yenilmez ED, Tuli A , Bozkurt A, (2012).** The effects of factor V leiden, prothrombin G20210A, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, factor XIII A Val34Leu, factor XIII B His95Arg and apolipoprotein E genotypes on coronary artery disease.

**Yetley EA, Pfeiffer CM, Phinney KW, Yetley EA, Pfeiffer CM, Phinney KW, et al.(2011).** Biomarkers of folate status in NHANES: a roundtable summary. *Am J Clin Nutr*; 94(1):303S-12S.

**Yi X, Yanli Z, Dingsheng J, Xiaoyan L, Yi G et Xuejun J, (2014).**Efficacy of folic acid supplementation on endothelial function and plasma homocysteine concentration in coronary artery disease: A meta-analysis of randomized controlled trials.*Experimental and Therapeutic Medicine* 7; 1100-1110.

**Yvan-Charvet L, Ranalletta M, Wang N, et al., (2007).**Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J Clin Invest*; 117 : 3900-8.

**Zappacosta B, Graziano M, Persichilli S, Di Castelnuovo A, Mastroiacovo P , Iacoviello L ,(2014).** 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms: genotype frequency and association with homocysteine and folate levels in middle-southern Italian adults. *Cell Biochem Funct*; 32: 1-4.

**Zhang L, Jin M, Hu XS, Zhu JH. (2006).**Homocysteine stimulates nuclear factor kappaB activity and interleukin-6 expression in rat vascular smooth muscle cells. *Cell BiolInt*;30:592–597.

**Zhang Q, Zeng X, Guo J, Wang X (2002).** Oxidant stress mechanism of homocysteine potentiating Con A-induced proliferation in murine splenic T lymphocytes. *Cardiovasc Res* 53: 1035–1042.

**Zhang Q, Zeng X, GuoJ,Wang X (2001).**Effects of homocysteine on murine splenic B lymphocyte proliferation and its signal transduction mechanism. *Cardiovasc Res* 52: 328–336.

**Zhang R, Huo C, Wang X, Dang B, Wang Y , Mu Y, (2018).** Two Common MTHFR Gene Polymorphisms (C677T and A1298C) and Fetal Congenital Heart Disease Risk: An Updated Meta-Analysis with Trial Sequential Analysis. *Cell Physiol Biochem*;45:2483-2496.

**Zhi X, Yang B, Fan S, Wang Y, Wei J, Zheng Q and Sun G,(2016).**Gender-specific interactions of MTHFR C677T and MTRR A66G polymorphisms with overweight/obesity on serum lipid levels in a Chinese Han population. *Lipids in Health and Disease*; 15:185.

**Zhou J and Austin RC. (2009).** Contributions of hyperhomocysteinemia to atherosclerosis: causal relationship and potential mechanisms.*Biofactors*;35(2):120-129.

**Zou CG and Banerjee R. (2005).** Homocysteine and redox signaling. *Antioxid Redox Signal*, 7: 547–559.

## Abstract

In this work, we investigated the association between homocysteinemia and different genotypes of the C677T and 1298 C polymorphisms of the methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, their frequencies, and correlations with certain clinical, biochemical and certain risk factors, and this in a population of the *Aurès* region, northeast Algeria. Our study focused on 94 healthy voluntary subjects and 14 patients with chronic myocardial infarction (IDM). Our work, is the first in the region of *Aurès* which analyzed the influence of these two polymorphisms in young coronary subjects in this population.

Our results show that allelic and genotypic frequencies in the healthy population are (11.70% TT and 32.45% T) for C677T polymorphism, and (7.44% CC and 21.81% C) for A1298C polymorphism. The co-existence frequency C677T/A1298C is 11.70% for double heterozygote CT/AC. While the TT/AC, CT/CC and the double mutant homozygote TT/CC genotypes were not found. However, in pathological population, frequencies are 35.71%, 57.14% and 7.14% for CC, CT and TT genotypes of C677T polymorphism, respectively. Concerning A1298C polymorphism, the frequencies are 78.75% AA and 21.42% AC, while the homozygous CC mutant has not been found.

This study shows a very significant association of hyperhomocysteinemia (Hhcy) and C677T polymorphism of the MTHFR gene in the healthy, predominantly male, population. The distribution of total homocysteine (thcy) and folate according to different genotypes of C677T polymorphism was not significant, moderate hyperhomocysteinemia was recorded for the genotype (CT) and intermediate for the mutated genotype (TT), with a low folate level, showing the deleterious effect of the muted variant (T), and supporting the hypothesis of gene-nutrient interaction between MTHFR and folate. In addition, correlations between thcy, folate, vitamin B12 and age based on genotypes of C677T polymorphism showed that they rates were inversely proportional to folate concentration, B12 and age. In contrast, our results showed no significant correlation of the parameters studied with genotypes of A1298C polymorphism. These observations may be due to the low effect of this polymorphism on the activity of the MTHFR enzyme.

In the pathological population, our results show no significant association of Hhcy with different genotypes of C677T polymorphism. However, a decrease in folate and B12 was recorded with moderate Hhcy for TT genotype but remains non significant. This could indicate the deleterious effect of the muted genotype on the concentrations of thcy, B12, and B9 in patients. Similarly, the distribution of homocysteinemia in A1298C polymorphism group showed no significant correlation of moderate Hhcy with AC and AA genotypes. Equally, no significant differences were observed in the distribution of B9 and B12.

In conclusion, our study supports the hypothesis that polymorphisms C677T and A1298C MTHFR can be a significant risk factor for IDM in the presence of moderate Hhcy. We therefore suggest a strategy for the biological exploration of Hhcy to allow the assessment of a moderate or intermediate Hhcy as quickly as possible, in order to inform the general public in our region (*Aurès*) and countrie about the risks of the disease. Furthermore, genetic investigation of various IDM markers would be helpful to treat and predict the risks of this pathology.

**Key words:** Coronary atherosclerosis, myocardial infarction, genetic polymorphisms, MTHFR C 677 T, MTHFR A 1298 C, Hyperhomocysteinemia, RT-PCR, *Aurès*, Algeria.

## الملخص

قمنا في هذا العمل بدراسة التكرارات الأليلية و الجينية وكذلك تواجد الطفرتين C677T , A1298C لبوليمورفيزم (عديد الأنماط) الجين ميثلان رباعي الهيدروفولات ريديكتاز (MTHFR) بالإضافة إلى البحث عن وجود علاقة محتملة بين مستويات الهوموسيستين (tHcy) و الأنماط الجينية المختلفة لبوليمورفيزم السابقين إستنادا للبيانات الإكلينيكية و البيوكيميائية لمجموعتين من المشاركين في البحث (الأصحاء و المرضى) المقيمين جميعا في منطقة الأوراس شمال شرق الجزائر. شملت هذه الدراسة 94 متطوعا سليما (مجموعة الأصحاء) و 14 مريضا مصابا بمرض إحتشاء عضلة القلب (IDM) (مجموعة المرضى) وذلك في المرحلة المزمدة من المرض. دراستنا هذه، هي الأولى في منطقة الأوراس التي حلت فئة الشباب مرضى الشرايين التاجية في هذه المجموعة من السكان.

تظهر نتائجنا أن التكرارات الأليلية والوراثية في الأصحاء هي (TT %11.70 و T %32.45) لعدد الأنماط C677T ، و (CC %7.44 و C %21.81) لل A1298C عديد الأنماط. تردد التعايش / C677T A1298C هو 11.70 % لل CT/AC. في حين ، لم يتم العثور على الثنائيات الوراثية TT/AC ، CT و TT/CC. في مجموعة المرضى ، تكون التكرارات 35.71 % و 57.14 % و 7.14 % للنمط الجيني CC و CT و TT من عديد الأنماط C677T ، على التوالي. أما فيما يتعلق بعديد الأنماط A1298C ، فإن الترددات هي AA % 78.75 و AC % 21.42 ، في حين لم يتم العثور على متحور مماثل CC.

أظهرت دراستنا أيضا وجود ارتباط وثيق للغاية بين فرط الهوموسستين في الدم (Hhcy) وعديد الأنماط الجيني MTHFR C677T عند الأصحاء، تتعلق في معظمها بجنس الذكور. أما توزيع الهوموسستين الكلي (tHcy) وحمض الفوليك حسب المورثات من عديد الأنماط C677T لم يكن كبيرا، كما تم تسجيل فرط الهوموسستين المعتدلة في الدم للنمط الوراثي (CT) و المتوسطة للنمط الوراثي المتحور (TT) ، مع انخفاض معدل حمض الفوليك ، خاصة بالنسبة للأليل TT، مما يعكس التأثير الضار للطفرة (T)، ويدعم فرضية تفاعل الجينات والتغذية بين MTHFR و الفولات. وبالإضافة إلى ذلك، أظهرت الارتباطات بين tHcy، حامض الفوليك، وفيتامين B12 والعمر وفقا لعديد الأنماط C677T ، أن tHcy يتناسب عكسيا مع تركيز حمض الفوليك و B12 و العمر. من ناحية أخرى ، أظهرت نتائجنا عدم وجود علاقة ملحوظة بين الخصائص المدروسة والأنماط الوراثية لعديد الأنماط A1298C. هذه الملاحظة ويرجع ذلك إلى تأثير ضعف هذا العديد في نشاط الإنزيم MTHFR.

في المجموعة المرضية ، لا تظهر نتائجنا ارتباطاً مهماً بين Hhcy والأنماط الجينية المختلفة لعديد الأنماط C677T. ومع ذلك ، تم تسجيل انخفاض في مستويات الفولات و B12 مع Hhcy معتدلة للنمط الوراثي TT ، ولكن بشكل غير معتبر. يمكن أن يشير هذا إلى التأثير الضار للنمط الجيني المتحور على تركيزات tHcy ، B12 و B9 في المرضى. وكذلك، فإن توزيع هوموسيستين الدم مع عديد الأنماط A1298C ، لم يظهر ارتباطا معتبرا بين Hhcy معتدلة مع الأنماط الوراثية AC و AA. وأيضا، لوحظ عدم وجود اختلاف كبير لتوزيع B9 و B12.

كخاتمة نقترح من خلال هذه الدراسة المهمة ضرورة القيام باستكشاف بيولوجي لفرط الهوموسيستين في الدم للكشف المبكر عن تواجد فرط معتدل أو متوسط للهوموسيستين وذلك لإعلام عامة الناس في منطقتنا الواسعة (الأوراس) و بلدنا على خطورة هذا العرض و تطوراتها. أيضا ضرورة الإستكشاف الجيني عن مختلف واسمات مرض إحتشاء عضلة القلب للتمكن من العلاج و الوقاية من هذا المرض المزمن.

**الكلمات المفتاحية :** إحتشاء عضلة القلب ، عديد الأنماط الوراثية (بوليمورفيزم) MTHFR ، A1298C، MTHFR C677T، RT-PCR، في الوقت الحقيقي، فرط الهوموسيستين في الدم، الأوراس ، الجزائر.

## Résumé

Nous avons étudié, dans ce travail, l'éventuelle association entre l'homocystéinémie et les différents génotypes des polymorphismes C677T et A1298C du gène de la méthylène tetrahydrofolate réductase (MTHFR), leurs fréquences, leurs corrélations avec certains paramètres cliniques, biochimiques ainsi que certains facteurs de risques, et cela chez une population de la région *Aurès*, au Nord-est de l'Algérie. Notre étude a porté sur 94 sujets volontaires sains et 14 patients en phase chronique de l'infarctus du myocarde (IDM). Notre travail, est le premier dans la région des *Aurès* qui a analysé l'influence de ces deux polymorphismes chez les sujets jeunes coronariens dans cette la population.

Nos résultats montrent que les fréquences alléliques et génotypiques dans la population saine sont de (11,70% TT et 32,45% T) pour le polymorphisme C677T, et de (7,44% CC et 21,81% C) pour le polymorphisme A1298C. La fréquence de coexistence C677T/A1298C est de 11,70% pour le double hétérozygote CT/AC. Alors que, les génotypes TT/AC, CT/CC et le double mutant homozygote TT/CC n'ont pas été retrouvés. Cependant, dans la population pathologique, les fréquences sont de 35,71%, 57,14% et 7,14% pour les génotypes CC, CT et TT du polymorphisme C677T, respectivement. Concernant le polymorphisme A1298C, les fréquences sont de 78,75% AA et 21,42% AC, alors que le mutant homozygote CC n'a pas été retrouvé.

Notre étude montre également une association très significative de l'hyperhomocystéinémie (Hhcy) et le polymorphisme C677T du gène MTHFR dans la population saine, liée majoritairement au sexe masculin. La distribution de l'homocystéine total (tHcy) et de folate selon les différents génotypes du polymorphisme C677T, était non significative, une hyperhomocystéinémie modérée a été enregistrée pour le génotype (CT) et intermédiaire pour le génotype muté (TT), avec un faible taux de folate, témoignant l'effet délétère du variant muté (T), et soutenant l'hypothèse de l'interaction de gène -nutriment entre MTHFR et le statut folate. En outre, les corrélations entre l'tHcy, folate, vitamine B<sub>12</sub> et l'âge en fonction des génotypes du polymorphisme C677T ont montré que les taux de tHcy étaient au total, inversement proportionnels à la concentration du folate, à la B<sub>12</sub> et à l'âge. En revanche, nos résultats n'ont montré aucune corrélation significative des paramètres étudiés et les génotypes du polymorphisme A1298C. Cette observation est due au faible effet de ce polymorphisme sur l'activité de l'enzyme MTHFR.

Dans la population pathologique, nos résultats ne montrent pas d'association significative de l'Hhcy et les différents génotypes du polymorphisme C677T. Cependant une diminution du taux de folate et de la B<sub>12</sub> a été enregistrée avec l'Hhcy modérée pour le génotype TT, mais qui reste non significative. Cela pourrait témoigner de l'effet délétère du génotype muté sur les concentrations de tHcy, B<sub>12</sub> et B<sub>9</sub> chez les patients. Similairement, la distribution de l'homocystéinémie en fonction du polymorphisme A1298C, montre une association non significative de l'Hhcy modérée avec les génotypes AC et AA. Ainsi, aucune différence significative n'a été observée pour la distribution de B<sub>9</sub> et B<sub>12</sub>.

En conclusion, notre étude soutient l'hypothèse que le polymorphisme C677T et A1298C MTHFR peuvent être un facteur de risque important pour l'IDM, en présence d'une Hhcy modérée. Nous suggérons ainsi une stratégie d'exploration biologique de l'Hhcy pour permettre l'évaluation d'une Hhcy modérée ou intermédiaire le plus rapidement possible, afin d'informer le grand public dans notre région (*Aurès*) et pays, sur les risque de l'évolution de cette maladie. Ainsi que l'investigation génétique des divers marqueurs de traiter et prédire les risques de cette maladie.

**Mots clés :** Athérosclérose coronarienne, Infarctus du myocarde, polymorphismes génétiques, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, Hyperhomocystéinémie, RT-PCR, Aurès, Algérie.

## Résumé

Nous avons étudié, dans ce travail, l'éventuelle association entre l'homocystéinémie et les différents génotypes des polymorphismes C677T et A1298C du gène de la méthylène tetrahydrofolate réductase (MTHFR), leurs fréquences, leurs corrélations avec certains paramètres cliniques, biochimiques ainsi que certains facteurs de risques, et cela chez une population de la région *Aurès*, au Nord-est de l'Algérie. Notre étude a porté sur 94 sujets volontaires sains et 14 patients en phase chronique de l'infarctus du myocarde (IDM). Notre travail, est le premier dans la région des *Aurès* qui a analysé l'influence de ces deux polymorphismes chez les sujets jeunes coronariens dans cette la population.

Nos résultats montrent que les fréquences alléliques et génotypiques dans la population saine sont de (11,70% TT et 32,45% T) pour le polymorphisme C677T, et de (7,44% CC et 21,81% C) pour le polymorphisme A1298C. La fréquence de coexistence C677T/A1298C est de 11,70% pour le double hétérozygote CT/AC. Alors que, les génotypes TT/AC, CT/CC et le double mutant homozygote TT/CC n'ont pas été retrouvés. Cependant, dans la population pathologique, les fréquences sont de 35,71%, 57,14% et 7,14% pour les génotypes CC, CT et TT du polymorphisme C677T, respectivement. Concernant le polymorphisme A1298C, les fréquences sont de 78,75% AA et 21,42% AC, alors que le mutant homozygote CC n'a pas été retrouvé.

Notre étude montre également une association très significative de l'hyperhomocystéinémie (Hhcy) et le polymorphisme C677T du gène MTHFR dans la population saine, liée majoritairement au sexe masculin. La distribution de l'homocystéine total (tHcy) et de folate selon les différents génotypes du polymorphisme C677T, était non significative, une hyperhomocystéinémie modérée a été enregistrée pour le génotype (CT) et intermédiaire pour le génotype muté (TT), avec un faible taux de folate, témoignant l'effet délétère du variant muté (T), et soutenant l'hypothèse de l'interaction de gène -nutriment entre MTHFR et le statut folate. En outre, les corrélations entre l'tHcy, folate, vitamine B<sub>12</sub> et l'âge en fonction des génotypes du polymorphisme C677T ont montré que les taux de tHcy étaient au total, inversement proportionnels à la concentration du folate, à la B<sub>12</sub> et à l'âge. En revanche, nos résultats n'ont montré aucune corrélation significative des paramètres étudiés et les génotypes du polymorphisme A1298C. Cette observation est due au faible effet de ce polymorphisme sur l'activité de l'enzyme MTHFR.

Dans la population pathologique, nos résultats ne montrent pas d'association significative de l'Hhcy et les différents génotypes du polymorphisme C677T. Cependant une diminution du taux de folate et de la B<sub>12</sub> a été enregistrée avec l'Hhcy modérée pour le génotype TT, mais qui reste non significative. Cela pourrait témoigner de l'effet délétère du génotype muté sur les concentrations de tHcy, B<sub>12</sub> et B<sub>9</sub> chez les patients. Similairement, la distribution de l'homocystéinémie en fonction du polymorphisme A1298C, montre une association non significative de l'Hhcy modérée avec les génotypes AC et AA. Ainsi, aucune différence significative n'a été observée pour la distribution de B<sub>9</sub> et B<sub>12</sub>.

En conclusion, notre étude soutient l'hypothèse que le polymorphisme C677T et A1298C MTHFR peuvent être un facteur de risque important pour l'IDM, en présence d'une Hhcy modérée. Nous suggérons ainsi une stratégie d'exploration biologique de l'Hhcy pour permettre l'évaluation d'une Hhcy modérée ou intermédiaire le plus rapidement possible, afin d'informer le grand public dans notre région (*Aurès*) et pays, sur les risque de l'évolution de cette maladie. Ainsi que l'investigation génétique des divers marqueurs de traiter et prédire les risques de cette maladie.

**Mots clés :** Athérosclérose coronarienne, Infarctus du myocarde, polymorphismes génétiques, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, Hyperhomocystéinémie, RT-PCR, Aurès, Algérie.