

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

ANNEE : 2000

THESE N° : 162

INFLUENCE DE L'HYPERHOMOCYSTEINEMIE SUR LA
FECONDATION IN VITRO :
A PROPOS DE 96 CYCLES.



THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

présentée et soutenue publiquement le 25 octobre 2000

PAR

Hugues CALY
né le 16 mars 1968 à DAX (40)

EXAMINATEURS DE LA THESE

- M. le Professeur Henri-Jean PHILIPPEPrésident
M. le Professeur Jean-Claude ALDIGIER.....Juge
M. le Professeur Denis VALLEIX.....Juge
M. le Maître de Conférence Universitaire Paul Michel LAPLAUD.....Juge
M. le Docteur Pascal PIVER.....Directeur de Thèse
M. le Docteur Yves AUBARDMembre invité
Mme le Docteur Sophie DELCLEVE-PAULHAC..... Membre invité

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

DOYEN DE LA FACULTE: Monsieur le Professeur PIVA Claude

ASSESEURS: Monsieur le Professeur VANDROUX Jean-Claude
Monsieur le Professeur DENIS François
Monsieur le Professeur GASTINNE Hervé

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS:

ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
ADENIS Jean-Paul * (C.S)	OPHTALMOLOGIE
ALAIN Luc (C.S)	CHIRURGIE INFANTILE
ALDIGIER Jean-Claude	NEPHROLOGIE
ARCHAMBEAUD-MOUVEROUX Françoise (C.S)	MEDECINE INTERNE
ARNAUD Jean-Paul (C.S)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
BARTHE Dominique (C.S)	HISTOLOGIE EMBRYOLOGIE CYTOGENETIQUE
BEDANE Christophe	CLINIQUE OBSTETRICALE ET GYNECOLOGIE
BENSAID Julien	DERMATOLOGIE
BERTIN Philippe	CLINIQUE MEDICALE CARDIOLOGIQUE
BESSEDE Jean-Pierre	THERAPEUTIQUE
BONNAUD François (C.S)	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
BONNETBLANC Jean-Marie (C.S)	PNEUMOLOGIE
BORDESSOULE Dominique (C.S)	DERMATOLOGIE
BOULESTEIX Jean (C.S)	HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION
BOUTROS-TONI Fernand	PEDIATRIE
CATANZANO Gilbert	BIostatistique ET Informatique MEDICALE
CHARISSOUX Jean-Louis	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE
CLAVERE Pierre	ORTHOPEDIE
COGNE Michel	RADIOTHERAPIE
COLOMBEAU Pierre (C.S)	IMMUNOLOGIE
CORNU Elisabeth	UROLOGIE
CUBERTAFOND Pierre (C.S)	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
DARDE Marie-Laure (C.S)	CLINIQUE DE CHIRURGIE DIGESTIVE
DE LUMLEY WOODYEAR Lionel (C.S)	PARASITOLOGIE
DENIS François (C.S)	PEDIATRIE
DESCOTTES Bernard (C.S)	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DUDOGNON Pierre (C.S)	ANATOMIE
DUMAS Jean-Philippe	REEDUCATION FONCTIONNELLE
DUMAS Michel (C.S)	UROLOGIE
DUMONT Daniel	NEUROLOGIE
DUPUY Jean-Paul (C.S)	MEDECINE DU TRAVAIL
FEISS Pierre (C.S)	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
GAINANT Alain	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
GAROUX Roger (C.S)	CHIRURGIE DIGESTIVE
GASTINNE Hervé (C.S)	PEDOPSYCHIATRIE
	REANIMATION MEDICALE

LABROUSSE Claude
LABROUSSE François (C.S)
LASKAR Marc (C.S)
LEGER Jean-Marie (C.S)
LEROUX-ROBERT Claude (C.S)
MABIT Christian
MAUBON Antoine
MELLONI Boris
MENIER Robert (C.S)
MERLE Louis
MOREAU Jean-Jacques (C.S)
MOULIES Dominique
NATHAN-DENIZOT Nathalie
PERDRISOT Rémy
PILLEGAND Bernard (C.S)
PIVA Claude (C.S)
PRALORAN Vincent (C.S)
RIGAUD Michel (C.S)
ROUSSEAU Jacques
SALLE Jean-Yves
SAUTEREAU Denis
SAUVAGE Jean-Pierre (C.S)
TREVES Richard (C.S)
TUBIANA-MATHIEU Nicole (C.S)
VALLAT Jean-Michel
VALLEIX Denis
VANDROUX Jean-Claude (C.S)
VERGNENEGRE Alain
VIDAL Elisabeth (C.S)
VIGNON Philippe
VIROT Patrice (C.S)
WEINBRECK Pierre (C.S)

REEDUCATION FONCTIONNELLE
ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
PSYCHIATRIE D'ADULTES
NEPHROLOGIE
ANATOMIE-CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
RADIOLOGIE
PNEUMOLOGIE
PHYSIOLOGIE
PHARMACOLOGIE
NEUROCHIRURGIE
CHIRURGIE INFANTILE
ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE
MEDECINE LEGALE
HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION
BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
MEDECINE PHYSIQUE ET READAPTATION
HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE
OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
RHUMATOLOGIE
CANCEROLOGIE
NEUROLOGIE
ANATOMIE
BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
EPIDEMIOLOGIE- ECONOMIE DE LA SANTE PREVENTION
MEDECINE INTERNE
REANIMATION MEDICALE
CARDIOLOGIE
MALADIES INFECTIEUSES

MAITRE DE CONFERENCE ASSOCIE A MI-TEMPS

BUCHON Daniel

MEDECINE GENERALE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

* C.S = Chef de Service

A notre Maître et Président de thèse

**Monsieur le Professeur Henri-Jean PHILIPPE
Professeur de Gynécologie et d'Obstétrique
Chirurgien des Hôpitaux
Chef de Service**

**Nous vous remercions de l'honneur que
vous nous faites en présidant le jury de cette thèse.**

**Vous venez de prendre vos fonctions dans le
service. Aussi, nous espérons que ce travail sera le
témoignage de notre profond respect et de notre
admiration.**

A notre Maître et Juge

Monsieur le Professeur Jean-Claude ALDIGIER
Professeur de Néphrologie
Médecin des Hôpitaux

Nous vous remercions de l'honneur que
vous nous faites en jugeant cette thèse.

Nous avons apprécié vos connaissances et
votre enthousiasme.

Nous espérons que ce travail n'aura pas trahi
la confiance que vous nous avez accordée.

Soyez assuré de notre profonde
considération.

A notre Maître et Juge

Monsieur le Professeur Denis VALLEIX
Professeur D'Anatomie
Chirurgien des Hôpitaux

Nous vous remercions de l'honneur que
vous nous faites en jugeant cette thèse.

Nous vous remercions d'avoir partagé votre
érudition tant médicale que littéraire.

Nous espérons que ce travail aura été digne
du profond respect que je vous porte.

Soyez assuré de notre admiration.

A notre Maître et Juge

Monsieur le Maître de Conférence Universitaire Paul Michel
LAPLAUD
Biologiste des Hôpitaux
Unité 321 de l'INSERM, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière

Nous vous remercions de l'honneur que
vous nous faites en jugeant cette thèse.

Nous avons apprécié vos connaissances et
vos conseils.

Nous espérons que ce travail n'aura pas trahi
la confiance que vous nous avez accordée.

Soyez assuré de notre profonde
considération.

A notre Maître et Directeur de Thèse

Monsieur le Docteur Pascal PIVER
Chirurgien des Hôpitaux
Praticien Hospitalier

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites en dirigeant cette thèse.

Nous vous remercions de nous avoir guidé tout au long de ce travail en nous faisant profiter de vos connaissances et de vos compétences.

Nous vous savons gré de nous avoir appris notre métier par votre rigueur et votre droiture.

Nous espérons que ce travail aura été digne de la confiance que vous nous avez accordée.

Soyez assuré de notre profonde admiration.

A notre Maître

Monsieur le Docteur Yves AUBARD
Chirurgien des Hôpitaux
Praticien Hospitalier

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites en participant à ce jury de thèse.

Nous vous remercions pour ces années durant lesquelles vous nous avez inculqué notre métier grâce à votre savoir et votre probité.

Pour tout cela, soyez assuré de notre complet dévouement et de notre admiration sans faille.

A notre Maître

Madame le Docteur Sophie DELCLEVE-PAULHAC
Biologiste des Hôpitaux
Praticien Hospitalier

Nous vous remercions de l'honneur que
vous nous faites en participant à ce jury de thèse.

Nous vous remercions de nous avoir guidé
dans notre travail en nous évitant maints errements
et en nous faisant profiter de vos compétences.

Pour votre gentillesse et votre dévouement,
soyez assuré de notre profonde considération.

A nos maîtres d'Internat

Monsieur le Professeur Jean-Henri BAUDET.

Nous avons eu le privilège d'être votre interne. Par votre rigueur et vos compétences, vous nous avez enseigné les exigences de notre métier. Soyez assuré de notre dévouement et de notre profonde estime.

Monsieur le Professeur Bernard DESCOTTES

Nous avons eu le privilège d'être votre interne. Durant cette année, vous nous avez montré les arcanes de la chirurgie. Grâce à votre probité, vous nous avez enseigné ce que doit être notre profession. Soyez assuré de notre profonde considération.

Monsieur le Professeur Jean-Louis TABASTE

Monsieur le Docteur Ferdinand RAFFI

Vous avez été mon premier maître. Que de souvenirs durant cette année !
Soyez remercié pour vos encouragements et votre pédagogie.

A mes Amis

Madame le Docteur Christine MANCIET

Madame le Docteur Sandrine BERNARD

Madame le Docteur Muriel CANTALOUBE

Madame le Docteur Sylvaine DURAND-FONTANIER

Madame le Docteur Maryse FIORENZA-GASQ

Madame le Docteur Danièle COLLET

Madame le Docteur Anne VINCELOT

Monsieur le Docteur Jean-Luc EYRAUD

Monsieur le Docteur Jean-Christophe PECH

Monsieur le Docteur Bertrand PECH DE LA CLAUSE

Monsieur le Docteur Maxime SODJI

Monsieur le Docteur Patrice GRANDCHAMP

Monsieur le Docteur Jean-Marie PREUX qui m'a beaucoup aidé pour les statistiques

Laurence TRESOR

Philippe DESSEIGNET

Benoît GALLIER

Jérôme GANA

A Sylvie Gauriat pour l'aide apportée et surtout pour son amitié.

A Anne-Marie Coignoux et Marie-Claire.

A toutes les Sage-Femmes du service qui m'ont appris au jour le jour mon métier.

A toutes les Secrétaires, les Infirmières et les Aide-Soignantes du Service de Gynécologie et celles de Chirurgie Viscérale et Transplantations.

A mes parents

Merci pour tout.

Merci de m'avoir permis d'être là ce soir.

Merci de m'avoir aidé depuis, maintenant 32 ans par votre Amour et votre Dévouement.

Merci de m'avoir soutenu dans les moments difficiles de la Vie et de m'avoir conforté dans mes choix.

Merci de m'avoir supporté et de m'avoir guidé.

Pour tout cela et bien plus encore, soyez assuré de mon Amour et de ma reconnaissance éternels.

A ma grand mère

J'espère qu'un de tes rêves est en train de se réaliser, ce soir.

A Dominique et à mes grand parents Angèle, Jean et Pierrot

Vous qui n'êtes plus là pour partager avec moi ce moment de bonheur, j'espère que vous êtes fiers de moi comme je le suis de vous.

A Catherine

A Pascaline et Julien

Merci pour être entré dans ma vie en m'apportant tant de Bonheur et de Joie.
J'espère pouvoir vous le rendre au centuple.

Que cette thèse soit le prétexte au commencement d'une vie d'Amour et de Félicité.

Merci, Catherine d'avoir supporté mon caractère plus "affirmé" que d'habitude
durant ces derniers mois qui n'ont pas du être des plus faciles pour toi pour maintes
raisons.

**INFLUENCE DE
L'HYPERHOMOCYSTEINEMIE SUR
LA FECONDATION IN VITRO : A
PROPOS DE 96 CYCLES.**

SOMMAIRE :

I- INTRODUCTION

A- L'hyperhomocystéinémie en Assistance Médicale à la Procréation

B- Découverte de l'hyperhomocystéinémie et de son rôle

II- L'HOMOCYSTEINE :

A- Le métabolisme de l'homocystéine :

1- La voie de la méthylation

2- La voie de la transsulfuration

B- Les voies de passage et de régulation

C- Les enzymes :

1- La méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) et la méthionine synthétase (MS) :

a- La MTHFR :

b- La MS :

2- La cystathionine- β -synthétase :

D- Les facteurs influençant l'homocystéinémie :

1- Les facteurs physiologiques :

a- L'âge et le genre

b- Les covariantes chimiques

c- La grossesse

d- Les oestrogènes

e- L'homocystéine dans le liquide folliculaire ovarien

f- La nourriture, les vitamines et le style de vie

2- Les facteurs pathologiques :

a- Les déficits en vitamines

b- L'insuffisance rénale

c- Le diabète

d- Les transplantations

- e- L'arthrite rhumatoïde
- f- La maladie thyroïdienne
- g- Les autres maladies

3- Les médicaments

III- LA PATHOGENIE :

A- L'hyperhomocystéinémie sévère et modérée

B- Tests de dépistage de l'hyperhomocystéinémie :

1- Les tests utilisés :

- a- Le test rapide
- b- Le test de charge à la méthionine ou MLT

2- Etude comparant les deux tests sur deux prélèvements :

a- Résultats :

- Pour les sujets présentant un taux normal après un MLT
- Pour les sujets présentant un taux élevé après un MLT

b- Commentaires

c- Conclusion

C- Les enzymes en cause :

1- La méthylène tétrahydrofolate réductase :

- a- Homocystéinurie due à la MHTFR,ARG184TER
- b- Homocystéinurie due à MTHFR,ARG158GLN
- c- Polymorphisme de la MTHFR thermolabile, MTHFR,677C-T ou tMTHFR
- d- Polymorphisme de la MTHFR thermolabile, MTHFR,1298A-C
- e- Homocystéinurie due à MTHFR,983A-G
- f- Homocystéinurie due à MTHFR,1027T-G
- g- Homocystéinurie due à MTHFR,1084C-T
- h- Homocystéinurie due à MTHFR,1711C-T
- i- Homocystéinurie due à MTHFR,1081C-T

2- La cystathionine- β -synthétase :

- a- Homocystéinurie due à CBS,GLY307SER
- b- Homocystéinurie due à CBS,PRO145LEU
- c- Homocystéinurie due à CBS,ALA114VAL
- d- Homocystéinurie pyridoxine-répondeuse due à CBS,ILE278THR
- e- Homocystéinurie pyridoxine-répondeuse due à CBS,LYS384GLU
- f- Homocystéinurie pyridoxine-répondeuse due à CBS,LEU539SER
- g- Homocystéinurie pyridoxine-répondeuse due à CBS,ARG266LYS

D- Les effets cellulaires

1- Les effets cellulaires de l'hyperhomocystéinémie :

a- L'hypométhylation :

- **Au niveau de l'ADN et de l'ARN**
- **Au niveau des phospholipides**

b- Le stress oxydatif

2- Les effets cellulaires en fonction des enzymes impliquées :

E- Les effets sur les systèmes et organes :

1- Sur le système cardiovasculaire :

a- Histo et physiopathologie:

- **Au niveau endothélial**
- **Au niveau de cellules musculaires lisses artérielles**
- **Au niveau des lipides de membranes**
- **Au niveau hémostatique**
- **Autres effets**

b- Atteinte du système cardio-vasculaire :

- **La maladie coronarienne**
- **La maladie ischémique cérébrovasculaire**
- **La maladie vasculaire périphérique**
- **La thrombose veineuse profonde**

c- les malformations cardiaques

2- Sur le système nerveux central :

a- Action de l'homocystéine sur le tissu nerveux

b- Les défauts de fermeture du tube neural

c- Les désordres neuro-psychiatriques

3- Sur l'unité fœto-maternelle du placenta :

a- Le placenta de la patiente hyperhomocystéinémique

b- La pré-éclampsie :

- **La dysfonction endothéliale**
- **Hypothèse sur les causes de ce dysfonctionnement :**
 - ❖ **1^{ère} hypothèse** : l'ischémie placentaire selon Oxford
 - ❖ **2^{ème} hypothèse** : les VLDL
 - ❖ **3^{ème} hypothèse** : la théorie de la toxine déciduale
 - ❖ **4^{ème} hypothèse** : la maladie génétique
- **Confrontations entre ces mécanismes et l'implication de l'hyperhomocystéinémie**
 - ❖ **Corrélations avec l'hypothèse de l'ischémie placentaire selon Oxford**
 - ❖ **Corrélations avec l'hypothèse des VLDL modifiant la TxPA**
 - ❖ **Corrélations avec l'hypothèse de la maladaptation immune**

❖ Corrélations avec l'hypothèse de la maladie génétique

- c- Fausses couches à répétition et avortements précoces
- d- Le retard de croissance intra-utérin
- e- L'infarctus placentaire et l'hématome rétroplacentaire
- f- Les morts fœtales in utero

4- Sur le système oculaire :

- a- La dégénérescence fibreuse de la zonula
- b- La luxation du cristallin
- c- La réfraction
- d- Le glaucome

5- Cancers et homocystéine :

- a- Le cancer colo-rectal
- b- La néoplasie cervicale utérine
- c- Le cancer du sein

F- Le traitement de l'hyperhomocystéinémie :

- 1- Effet de la supplémentation vitaminique in vitro et in vivo
- 2- Acide folique, vitamines B6 et B12 et risque cardiovasculaire
 - a- Essais de différents traitements
 - b- Acide folique seul ou avec vitamines B6 et B12
 - c- Résultats
- 3- Les vitamines B6 et folates dans la vasculopathie placentaire
- 4- Les folates et les anomalies de fermeture du tube neural
- 5- Au total

IV- INFLUENCE DE L'HYPERHOMOCYSTEINEMIE SUR LA FECONDATION IN VITRO :

A- Matériel et méthodes

B- Les résultats :

- 1- Sur la totalité des patientes :
 - a- L'âge
 - b- Les types d'infertilité
 - c- Le dosage sanguin de l'homocystéine
 - d- L'homocystéinémie en fonction de l'âge
 - e- Grossesse biochimique
- 2- Sur la totalité des embryons issus des FIV :
 - a- L'aspect de l'ovocyte à J1
 - b- Evolutivité de l'embryon à J2
 - c- Nombre de cellules embryonnaires à J2
 - d- Type de fragmentation à J2
 - e- Type d'embryon à J2
- 3- Sur les embryons issus d'ovocytes 2 PN à J1 :
 - a- L'évolutivité à J2 :
 - b- Type de fragmentation à J2
 - c- Type d'embryon à J2

- d- Nombre de cellules à J2
- 4- Les embryons issus de 2 PN suivant les classes $\pm 10 \mu\text{mol/l}$ d'homocystéinémie :
 - a- La grossesse
 - b- L'aspect à J1
 - c- L'évolutivité à J2
 - d- Le nombres de cellules embryonnaires
 - e- La fragmentation à J2
 - f- Le type d'embryon à J2

C- Discussion :

- 1- Généralités
- 2- Aspect de l'embryon à J1
- 3- Evolutivité de l'embryon à J2
- 4- Le nombre de cellules embryonnaires à J2
- 5- La fragmentation à J2
- 6- Le type d'embryon à J2
- 7- L'obtention d'une grossesse
- 8- Comparaison entre les deux normes d'hyperhomocystéinémie

V- CONCLUSION



I- INTRODUCTION :

A- L'hyperhomocystéinémie en Assistance Médicale à la Procréation :

L'homocystéine est un composé essentiel dans le mécanisme biochimique de fonctionnement de la cellule. Son rôle principal est de donner un groupement méthyl à différents composés surtout protéiques. De plus, elle intervient dans des phénomènes de détoxification impliquant des agents oxydatifs nocifs pour la cellule.

Mais comme souvent, un excès peut avoir des effets inverses. Ainsi, l'hyperhomocystéinémie est préjudiciable et cause de nombreux effets pervers tant au niveau cellulaire qu'au niveau macroscopique et entre autres sur les systèmes vasculaires.

Son rôle nocif en obstétrique a été démontré assez récemment : il serait impliqué dans les fausses couches à répétition, les problèmes toxémiques, le retard de croissance.

Le but de cette thèse est de rechercher ses effets délétères sur la fécondation in vitro (FIV). Jusqu'à présent, aucune étude n'a prise en compte l'implication de l'hyperhomocystéinémie en matière de réussite de traitement de la stérilité. Or, de part ses mécanismes au niveau cellulaire et au niveau systémique, on peut penser que cette pathologie a un effet sur les embryons voire même en amont sur la qualité des ovocytes recueillis. Si ces assertions se confirment, il existe un triple intérêt à se préoccuper du taux d'homocystéine des patientes entrant dans un protocole de FIV :

- ✓ Du fait de sa relative fréquence dans la population générale (15% de mutation du gène de la MTHFR impliquée dans le métabolisme de l'homocystéine), nombre de patientes ayant des échecs de FIV pourraient être hyperhomocystéinémiques et donc traitées comme telles.
- ✓ Un des intérêts du dépistage de ces patientes serait de mettre en place un traitement très simple basé sur une vitaminothérapie. Peu onéreux, il a fait ses preuves dans les pathologies vasculaires, par exemple. Ce traitement n'a pas encore été étudié dans cette indication.

- ✓ Ces patientes pourraient être averties du risque accru de pathologies vasculaires précoces et pourraient donc bénéficier d'un traitement précoce et d'un suivi plus régulier.

Pour étudier l'effet de l'hyperhomocystéinémie, nous avons dosé l'homocystéine chez toute patiente entrant dans un protocole de FIV. Pour chacune d'elles, tous les embryons ont été répertoriés et analysés en fonction de leur qualité. A partir de ces résultats et des grossesses ayant été obtenues, nous avons étudié les effets possibles de l'homocystéine.

B) Découverte de l'homocystéine et de son rôle :

Carson *et al.* (1) ont mis en évidence en 1962 en Irlande une nouvelle pathologie lors d'une campagne de surveillance de jeunes attardés mentaux. Cette pathologie entraînait une anomalie biochimique importante sous la forme d'une excrétion urinaire importante d'un acide aminé, l'homocystéine, qui n'est normalement pas présent dans les urines. En étudiant ces patients, Carson s'est aperçu qu'il existait une forte incidence des pathologies vasculaires allant jusqu'à la mort prématurée. Ce n'est qu'en 1969 que Mc Cully *et al.*(2) ont découvert que ces pathologies vasculaires étaient essentiellement dues à des concentrations sériques d'homocystéine élevées dans le sang et non dues à un autre dérèglement métabolique dont pouvaient être atteints ces jeunes patients.

Des lors, l'homocystéine a suscité un intérêt croissant. En 1976, Wilcken *et al.* (3) ont publié la première étude montrant que l'homocystéine était significativement plus élevée chez les patients présentant une pathologie coronarienne. Depuis, de nombreuses méta analyses n'ont fait que confirmer ce rôle.

La pathogénicité de l'hyperhomocystéinémie ne s'est pas seulement révélée dans la pathologie coronarienne mais a été mise en évidence en rhéologie dans la thrombose veineuse profonde, dans les accidents vasculaires ischémiques cérébraux, en psychiatrie dans divers syndromes.

II) L'HOMOCYSTEINE :

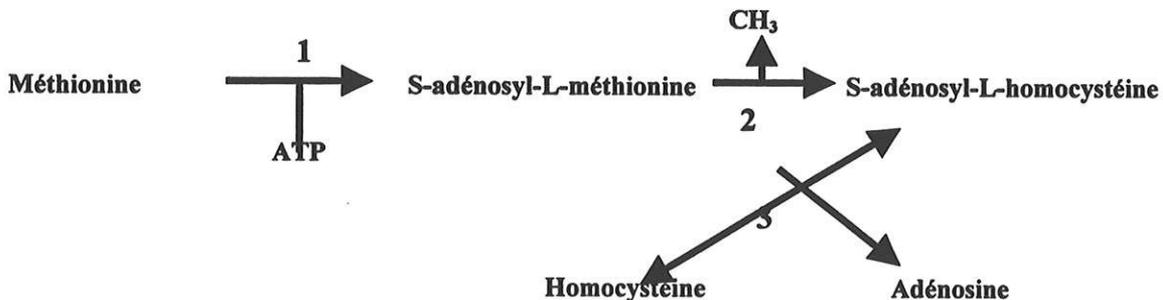
A- Le métabolisme de l'homocystéine :

Il est important de passer en revue le métabolisme de l'homocystéine (4 et 5) car il permet de comprendre les mécanismes en jeu et l'implication des différentes enzymes dont le rôle est primordial dans la pathogénicité de l'hyperhomocystéinémie.

Ce métabolisme comporte deux voies principales : la voie de la méthylation et celle de la transulfuration.

1- La voie de la méthylation :

L'homocystéine est générée par le catabolisme de la méthionine. Ceci se fait par la condensation enzymatique de l'ATP pour former le S-adenosyl-L-méthionine (SAM). Celui-ci subit une déméthylation produisant le S-adenosyl-L-homocystéine (SAH) qui, par hydrolyse conduit à la formation de l'homocystéine et de l'adénosine.

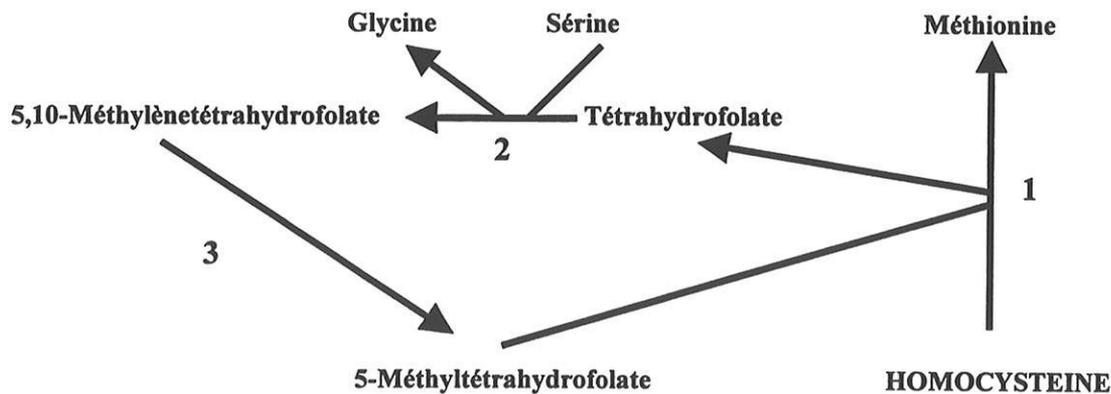


1 : Méthionine adénosyl transférase

2 : Transméthylations dépendantes de l'adénosyl méthionine

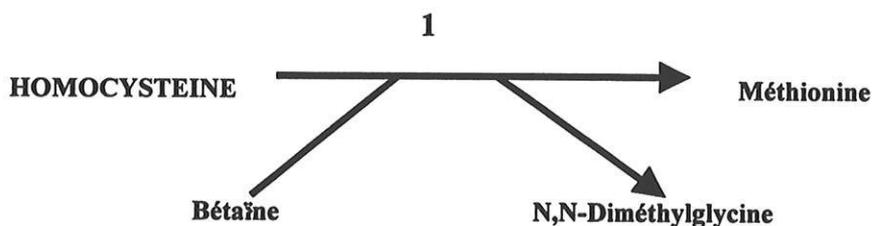
3 : Adénosylhomocystéinase

Une quantité importante d'homocystéine est régénérée par une voie annexe de reméthylation qui est catalysée par la méthyltétrahydrofolate homocystéine méthyltransférase ou méthionine synthétase (MS). Cette réaction enzymatique requiert le 5,10-méthyltétrahydrofolate qui est produit par une enzyme, la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) et qui est aussi dépendant de la présence d'une coenzyme, la méthylcobalamine, un dérivé de la vitamine B 12.



- 1 : Méthyltétrahydrofolate homocystéine méthyltransférase ou méthionine synthétase
- 2 : Sérine hydroxyméthylase
- 3 : Méthylène tétrahydrofolate réductase

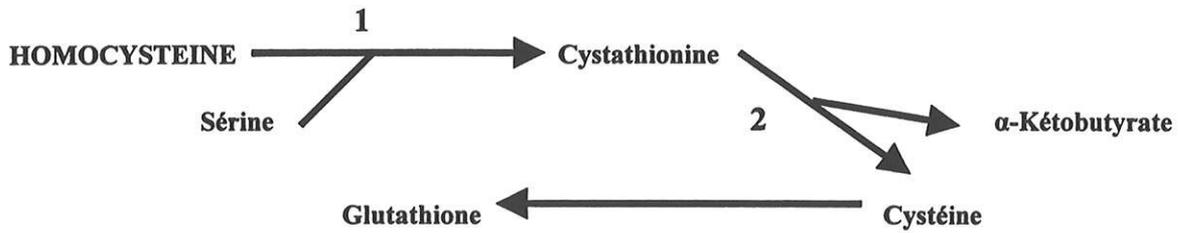
De plus, un mécanisme mineur de reméthylation est catalysé par la bétaine-homocystéine méthyltransférase qui utilise la bétaine en tant que donneur méthyl formant la N,N-Diméthylglycine et la méthionine.



- 1 : Bétaïne-homocystéine méthyltransférase

2- La voie de la transulfuration :

Une majorité de l'homocystéine est catabolisée avec la sérine en cystathionine grâce à une enzyme la cystathionine β -synthétase et un co-enzyme, le pyridoxal-5'-phosphate ou vitamine B 6. Ainsi, le catabolisme de l'homocystéine est sensible aux concentrations de sérine et de vitamine B 6. La cystathionine est, à son tour, hydrolysée en cystéine et α -kétobutyrate par la γ -cystathionase qui est, elle aussi, vitamine B 6 dépendante.



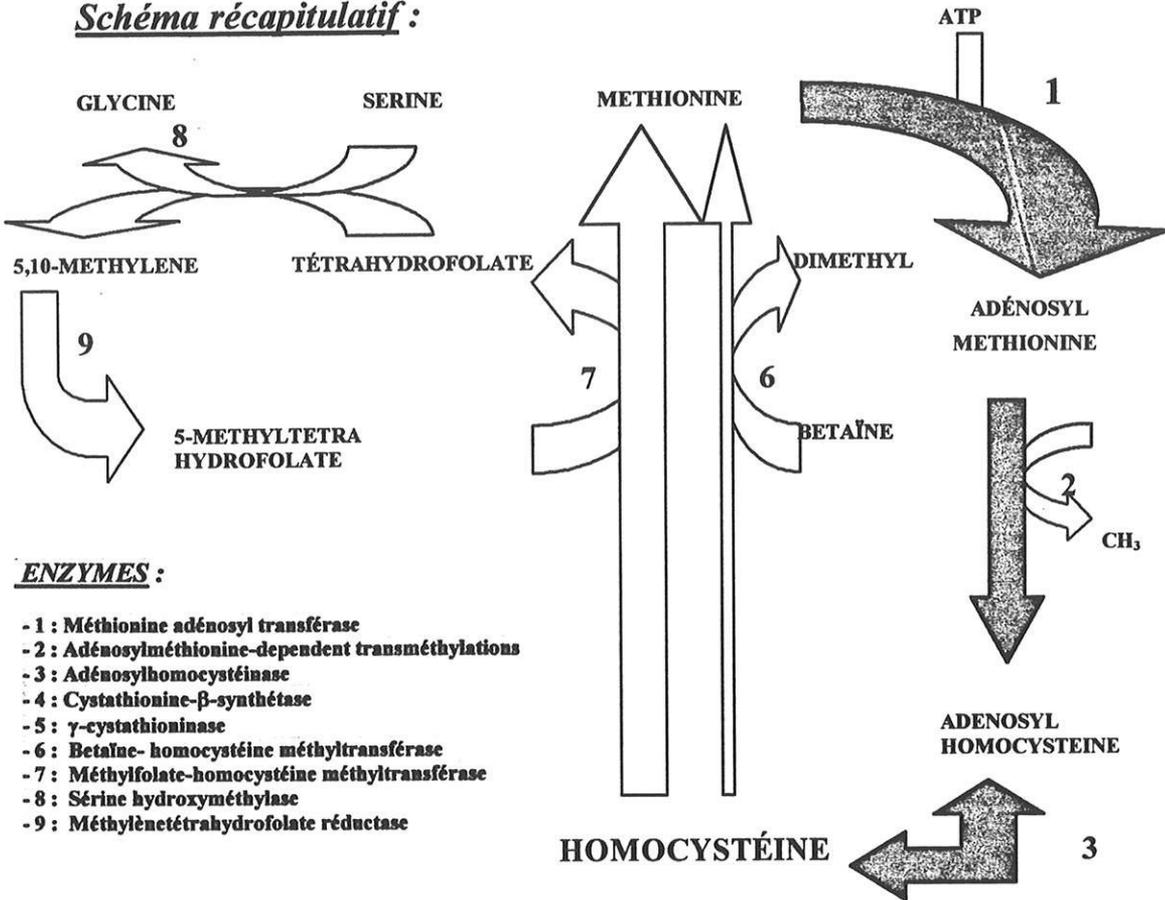
1 : Cystathionine-β-synthétase

2 : γ-Cystathioninase

Par ce mécanisme, on voit qu'une proportion importante de méthionine est activée avec l'ATP pour former le SAM. Le rôle principal du SAM et la finalité principale de ce cycle est le don d'un radical méthyl à une infinité de receveurs. Aussi, le SAH issu de la déméthylation du SAM n'est qu'un produit conduisant à la formation de l'homocystéine qui recommencera un nouveau cycle de transfert d'un radical méthyl.

Il est important de noter que l'hydrolyse est une réaction réversible qui tend à favoriser la formation de SAH. Par contre, le processus de transsulfuration qui conduit la condensation de l'homocystéine avec la sérine pour former la cystathionine est un phénomène irréversible. L'excès de cystéine est oxydé en taurine ou en sulfates inorganiques et excrété dans les urines. On peut dire que le processus de transsulfuration permet de cataboliser l'excès d'homocystéine qui n'est pas requis pour le transfert de groupement méthyl.

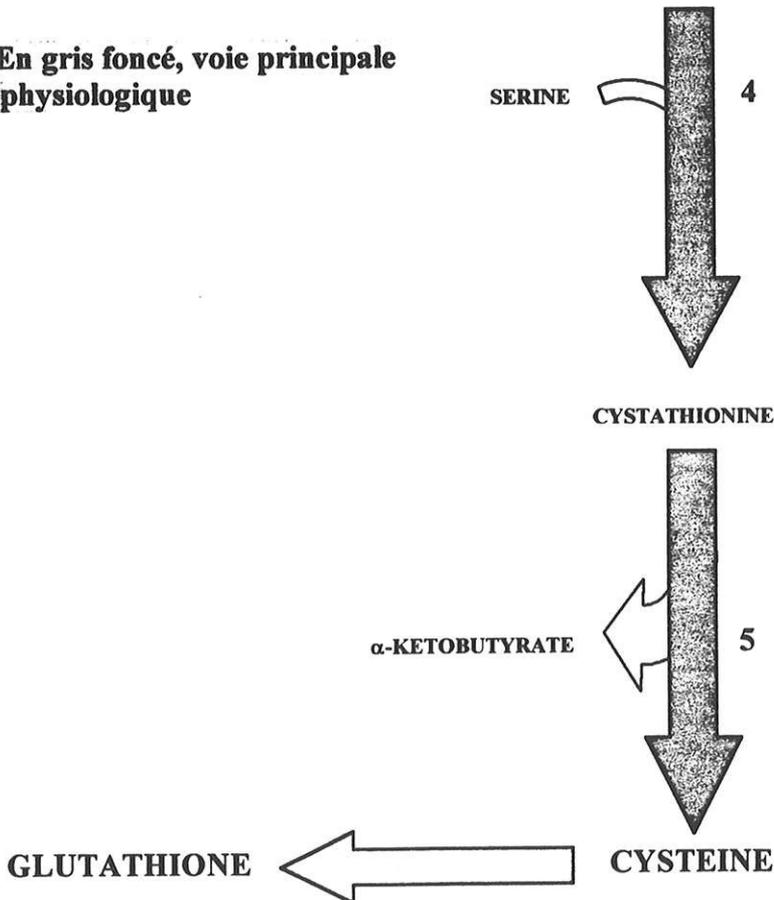
Schéma récapitulatif :



ENZYMES :

- 1 : Méthionine adénosyl transférase
- 2 : Adénosylméthionine-dépendent transméthylations
- 3 : Adénosylhomocystéinase
- 4 : Cystathionine- β -synthétase
- 5 : γ -cystathioninase
- 6 : Bétaïne- homocystéine méthyltransférase
- 7 : Méthylfolate-homocystéine méthyltransférase
- 8 : Sérine hydroxyméthylase
- 9 : Méthylène-tétrahydrofolate réductase

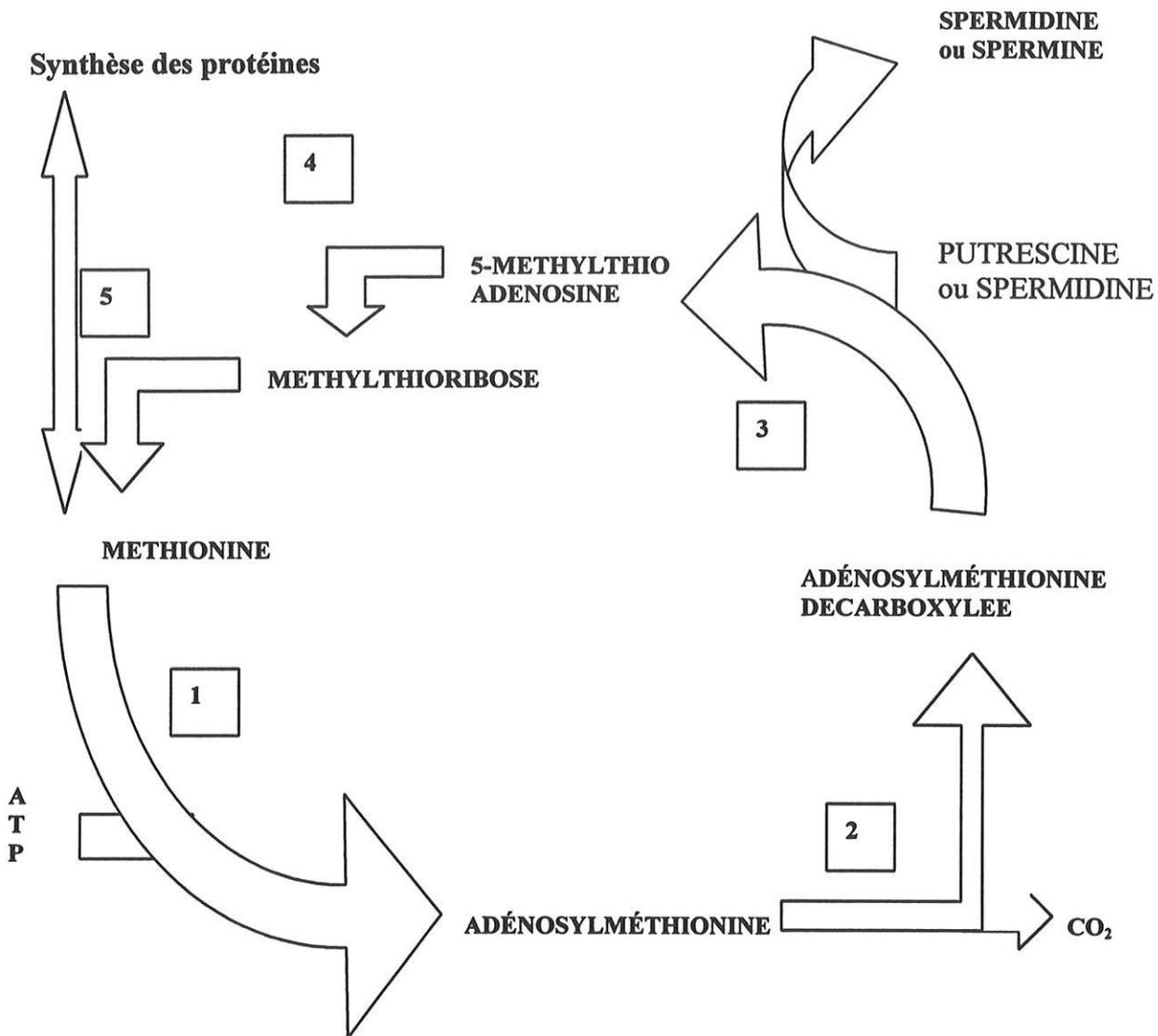
En gris foncé, voie principale physiologique



B- Les voies de passage et de régulation (5 et 6):

Dans toute cellule de mammifère, deux réactions, la synthèse de protéine et la formation de l'adénylméthionine via l'adénylméthionine transférase (MAT) intéressent la méthionine disponible. La MAT existe sous la forme de 3 iso enzymes. Une des deux iso enzymes produites par le foie a une forte affinité pour la méthionine et est affecté positivement par le produit de la réaction, à savoir le SAM. Pour cette raison, seul le foie peut synthétiser plus d'enzymes en réponse à une concentration élevée de méthionine. Dans les tissus extra hépatiques, les concentrations en SAM sont relativement constantes. Ainsi, virtuellement, tout le SAM est retenu dans la cellule d'origine.

Le SAM peut donner son groupe méthyl à une des multiples réactions de méthylations ou, suivant le cycle de décarboxylation, peut transférer son radical propylamine pour la synthèse de spermine ou spermidine. Cette voie permet la resynthèse de la méthionine par le biais de la 5-méthylthioadénosine.



ENZYMES :

- | | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 1- Méthionine adénosyl transférase | 3- Spermidine ou spermine synthétase |
| 2- Adénosylméthionine décarboxylase | 4- Méthylthioadénosine phosphorylase |

Dans les tissus normaux, cette dérivation vers la spermine ne représente que 10 % de la distribution du catabolisme du SAM.

Que ce soit envers les receveurs méthyl ou par rapport au diverses enzymes, le SAH est un inhibiteur. Par conséquent, le métabolisme de l'homocystéine est essentiel et est régulé par trois mécanismes.

Le premier fait intervenir l'adénosylhomocystéinase qui est présente dans toutes les cellules. Comme l'équilibre de cette réaction favorise la synthèse du SAH, le remplacement de ce produit est essentiel pour maintenir le flux du cycle de la méthionine. Pour cela, il existe des sites

protéiniques intracellulaires qui assure la mouvance de la production. Lorsque leur capacité est dépassée puisqu'ils sont saturables, le SAH est évacuée hors de la cellule. L'expérience montre que seuls les reins sont capables d'extraire celle-ci du secteur extracellulaire.

De même, l'homocystéine est transportée par des protéines et exportée hors de la cellule. Mais, contrairement au SAH, l'homocystéine peut être prise en charge par le foie et d'autres tissus. En effet, l'homocystéine représente le seul métabolite physiologiquement présent dans le plasma en transit entre le site de production et celui du métabolisme comme le foie.

A partir de l'homocystéine, trois voies métaboliques peuvent être prises. Les deux premières assurent la resynthèse de la méthionine et permettent de restaurer le pool de celle-ci.

- La première utilise la bétaine comme donneur méthyl. Cette réaction essentielle au catabolisme oxydatif de la choline est présente dans le foie de tous les Mammifères et dans les reins des primates et des porcs.
- La seconde qui intervient dans tous les tissus des Mammifères, est essentielle à la formation du méthyltétrahydrofolate. La méthylcobalamine y intervient comme cofacteur et cette réaction représente l'intersection entre le métabolisme de la vitamine B 12 et celui des folates.
- La troisième réaction qui est assurée par une enzyme vitamine B 6 dépendante, entre en compétition avec les deux autres pour extraire l'homocystéine du cycle de la méthionine. L'irréversibilité de cette séquence explique le flux unidirectionnel de la transulfuration de la méthionine en cystéine.

Au total, bien que le cycle de la méthionine soit ubiquitaire, du moins chez les Mammifères, il existe de nombreuses différences dans la distribution des différentes enzymes intervenant dans ce cycle. Nous avons déjà noté la distribution limitée de la bétaine-homocystéine méthyltransférase dans le foie et de la restriction au foie de l'unique iso enzyme de la MAT à avoir une forte affinité pour la méthionine. De plus, la cystathionine- β -synthétase est absente du cœur, des poumons, des testicules, des surrénales et de la rate. Le cerveau et les tissus adipeux possèdent la cystathionine- β -synthétase mais sont déficitaires en γ -cystathioninase et sont donc dépendant d'un apport externe en cystéine.

Ainsi, le cycle complet de transulfuration est seulement présent dans quatre tissus (le foie, les reins, l'intestin grêle et le pancréas). Ces tissus ayant le plus rapide turn-over de glutathione, il est vraisemblable que le cycle complet de transulfuration permette la régénération de ce métabolite très important.

Connaître cette disparité de répartition des enzymes est essentiel pour comprendre, d'une part les bases biochimiques de l'hyperhomocystéinémie et d'autre part pour comprendre l'histopathologie des séquelles vasculaires et neurologiques, par exemple.

C- Les enzymes :

1- La méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) et la méthionine synthétase (MS) (7) :

Avec la découverte croissante de séquelles induites par l'hyperhomocystéinémie, l'attention a été portée vers les enzymes responsables de la synthèse et du catabolisme de l'homocystéine. MTHFR et MS sont deux de ces enzymes fondamentales pour le cycle de l'homocystéine.

La MTHFR catalyse la réaction de réduction du méthylène tétrahydrofolate en méthyltétrahydrofolate. Ceci constitue la seule réaction de génération du méthyltétrahydrofolate dans la cellule.

La MS catalyse le transfert méthyl du méthyltétrahydrofolate à l'homocystéine, générant la méthionine et le tétrahydrofolate. Chez l'homme, la méthionine est un acide aminé essentiel et cette réaction sert à régénérer le groupe méthyl de la méthionine.

L'homocystéine est un métabolite sur une branche critique du métabolisme 1-carbone.

Si la cellule a son stock d'adénylméthionine, et si le ratio S-adényl-méthionine (AdoMet) / S-adényl-homocystéine (AdoHcy) est élevé, la MTHFR est inhibée. Sous ces conditions, le niveau de méthylène tétrahydrofolate est bas et l'homocystéine est dégradée en cystathionine, α -kétobutyrate, ammonium et cystéine. Si le ratio AdoMet/AdoHcy est bas, le signal est donné d'une nouvelle synthèse d'AdoMet, le signal d'inhibition de la MTHFR est levé

et le méthylène tétrahydrofolate est synthétisé pour supporter la réaction de la MS. L'activité de la MTHFR est régulée par le ratio AdoMet/AdoHcy avec l'AdoMet comme inhibiteur. Mais l'AdoHcy ne sert pas d'activateur mais entre en compétition avec l'AdoMet pour être porté par la réductase.

a- La MTHFR :

La plupart de nos connaissances sur la structure et la fonction de la MTHFR nous viennent de l'étude de son homologue porcine qui est très proche.

Cet enzyme contient un équivalent non covalent de brin de flavine adénine nucléotide (FAD) pour chaque sous-unité d'enzyme. C'est un dimère de deux sous-unités égales de 37 kDa chacune. La dénaturation de chaque sous-unité montre qu'elles se clivent en deux portions : un fragment N-terminal de 40 kDa et un autre C-terminal de 37 kDa. Le clivage protéolytique entraîne la perte de la régulation allostérique de l'activité de l'enzyme avec l'AdoMet mais pas la perte de sa capacité catalytique, ce qui suggère que les deux zones de régulation et de catalyse soient distinctes. Puisque l'AdoMet est très affine pour la région C-terminale de 37 kDa, on peut considérer que celle-ci est donc la région régulatrice.

La zone N-terminale de la protéine humaine montre une similitude avec de plus petites protéines venant de bactéries de l'intestin qui catalysent la même réaction et qui se nomme NADPH-dépendant réduction du méthylène tétrahydrofolate. Bien que l'activité de cet enzyme ne soit pas régulée par l'AdoMet, il existe une grande présomption pour que la région N-terminale de l'enzyme humaine soit la région catalytique et pour quelle contienne des déterminants pour supporter le FAD, le NADPH et le méthylène tétrahydrofolate.

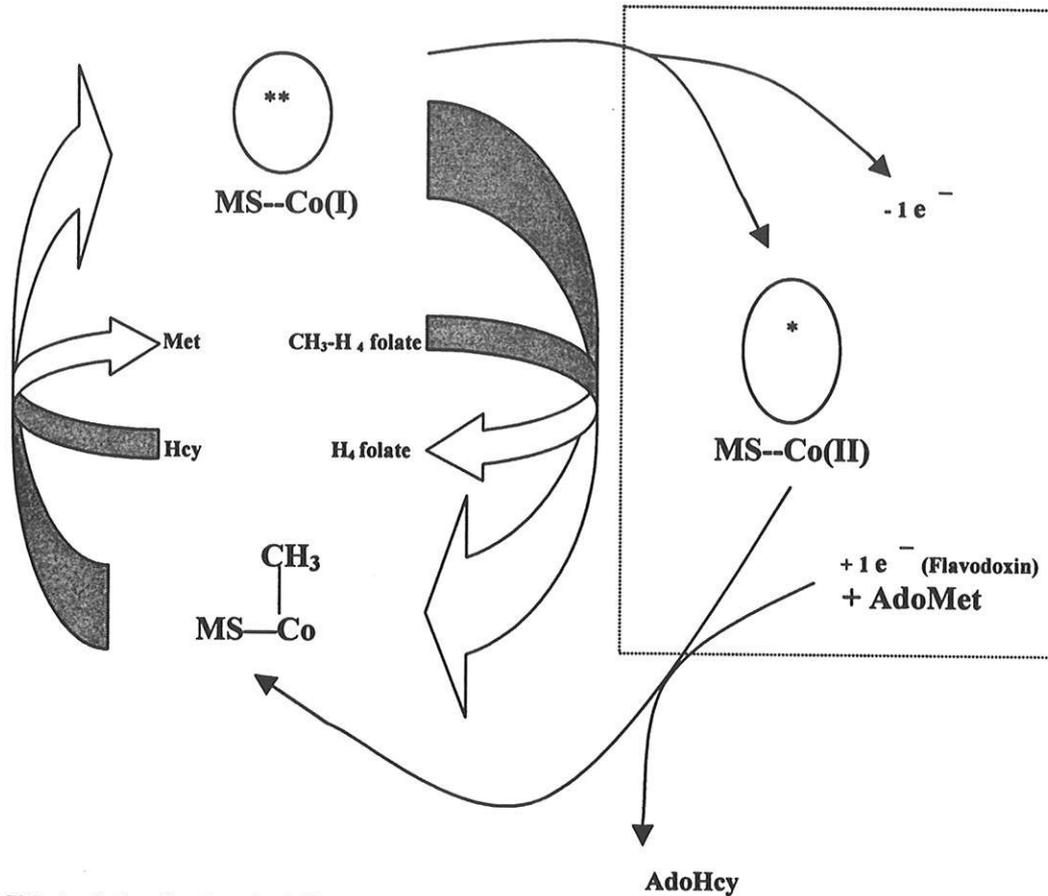
L'enzyme humaine contient une région extrêmement hydrophile, Lys-Arg-Arg-Glu-Glu-Asp, qui pontent la région catalytique et la région régulatrice. Le clivage protéolytique en deux fragments de 40 et 37 kDa, comme décrit ci-dessus, semble se situer entre Lys et Arg.

b- La MS :

La MS cobalamine dépendante a été initialement caractérisée par les laboratoires Wood, Weissbach et Huennekens. Leurs études ont établi la participation de la cobalamine (Vitamine B12) comme cofacteur dans le transfert du méthyle du méthylène tétrahydrofolate vers l'homocystéine et ont défini les modalités du turn-over catalytique.

Cycle primaire du turn-over

Réactivation catalytique



Chimie de la réaction du MS :

Dans la réaction normale, le groupe B12-MS passe de la cob(I)almine vers la méthylcobalamine Co-CH₃. L'homocystéine déméthyle la méthylcobalamine pour générer la méthionine et la cob(I)almine qui, en retour est méthylée par le méthylène tétrahydrofolate pour former la méthylcobalamine et le tétrahydrofolate. Occasionnellement, la cob(I)almine est oxydée en cob(II)almine qui est inactive. Le retour à sa forme active nécessite une méthylation réductrice. Chez la bactérie *E. coli*, l'électron est fourni par la flavodoxin associée à l'AdoMet qui fournit le substrat de la réaction réductrice. Chez les Mammifères, le donneur d'électron n'a pas été identifié. Autorisation de R.G. Matthews.

Ce turn-over catalytique nécessite la présence d'oxygène, d'homocystéine, de méthylène tétrahydrofolate, d'AdoMet et d'un système réducteur.

2- La cystathionine β-synthétase(8) :

Chez les eucaryotes, l'atome soufre de la cystéine est apporté par la méthionine alors que la chaîne carbonée et le groupe aminé viennent de la sérine. Un métabolite intermédiaire de cette synthèse est l'homocystéine qui occupe un poste clé dans le métabolisme de la méthionine, de

l'AdoMet et de la cystéine. Environ 50% de l'homocystéine formée est recyclée via la voie de la reméthylation en méthionine alors que les autres 50% sont engagés dans une voie irréversible de transulfuration pour produire de la cystéine ; cette voie est, entre autre, catalysée par la cystathionine β -synthétase (CBS) [L-sérine hydrolyase (avec l'homocystéine), EC 4.2.1.22]. Aussi, le CBS est directement impliqué dans la synthèse de la cystéine, le principal précurseur du glutathion et le principal système redox de la cellule.

L'AdoMet fait office d'aiguillage entre les voies de reméthylation et de transulfuration. A de bas niveaux d'AdoMet, sa resynthèse n'est pas modifiée. Par contre, à de hautes concentrations d'AdoMet, la reméthylation de l'homocystéine est freinée par l'inhibition de la MTHFR et de la bétaine méthyltransférase. L'autre voie, la transulfuration, subit l'effet stimulateur de l'AdoMet sur l'activité du CBS.

Le gène du CBS chez l'humain et le rat est un $M_r = 63\ 000$ polypeptides qui requiert la présence de pyridoxal-5'-phosphate (PLP) comme cofacteur et qui est régulé par l'AdoMet. Le gène humain codant pour le CBS a été localisé sur le chromosome 21. Il est à noter que son locus, la région 21q22.3 est associé au Syndrome de Down. Une expression accrue du gène du CBS semble être liée à ce syndrome.

Il a été récemment montré que l'oligomérisation des sous unités de CBS, l'activité de l'enzyme et l'activation par l'AdoMet dépendent du potentiel redox de l'environnement. La forme tétramérique est la structure minimale de l'enzyme actif. Des oligomères supérieurs avec une activité supérieure de moitié au tétramère sont retrouvés quand l'enzyme est exposé à des conditions oxydatives. Les transformations de taille et les changements de performance de l'enzyme sont réversibles et dépendent du potentiel réducteur du tampon et de la présence de l'AdoMet. Une molécule d'AdoMet porte une molécule de sous unité réduite. Deux résidus de cystéine sur un total de onze sont exposés à la surface de la protéine réduite et ce pour chaque sous unité de CBS. L'AdoMet interagit sur un ou sur les deux groupes sulfhydryl, les protégeant contre l'oxydation et maintenant l'enzyme dans un état réduit, la forme tétramérique la plus active.

La CBS humaine appartient à un groupe croissant de protéines dont la structure native et l'activité dépendent du statut redox des groupes cystéine présents à la surface de la protéine.

D- Les facteurs influençant l'homocystéinémie (4):

1- Physiologiques :

a- L'âge et le genre :

Il existe de nombreuses variables physiologiques qui peuvent agir sur le taux d'homocystéine.

Les concentrations circulantes d'homocystéine sont 25% plus importantes chez l'homme que chez la femme non ménopausée, et les taux augmentent dans les deux genres avec l'âge, cela étant probablement dû à une décroissance de la fonction rénale, à un déficit vitaminique ou à tout autre facteur métabolique indépendant. L'âge croissant, en particulier, peut entraîner une baisse de l'activité de la CBS.

b- Les covariantes biochimiques :

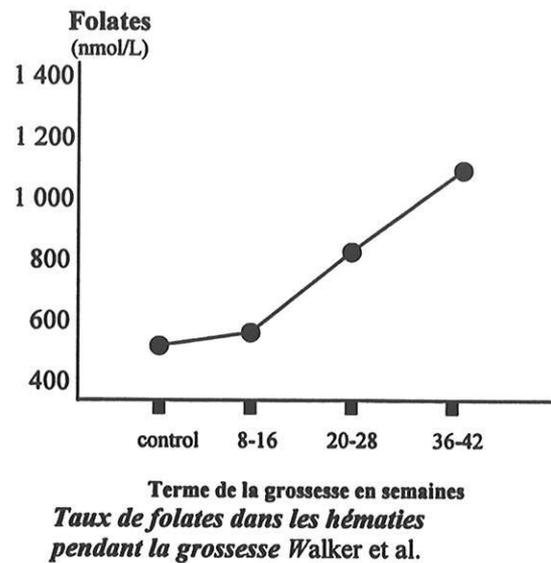
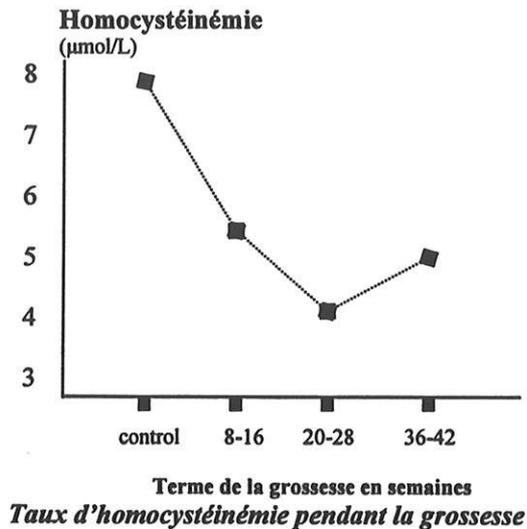
La créatine est synthétisée à partir de l'acétate guanidinique et du SAM (avec la cosynthèse du SAH). Un excédent net de SAM est utilisé dans cette réaction par rapport aux autres réactions combinées utilisant elles aussi le SAM. Le SAH est hydrolysé en adénosine et homocystéine ; parce que l'acide urique est un produit du catabolisme de la purine, à la fois la créatinine et l'acide urique sont métaboliquement liés à l'homocystéine.

L'augmentation dans l'âge de l'homocystéine et de la cystéine peut être en rapport avec un dysfonctionnement de la fonction rénale dû à l'âge.

La différence dans les deux genres du taux d'homocystéine peut être en relation avec la synthèse de la créatine-créatinine chez l'homme. Etant donné que la création de la créatine (et de la créatinine) à partir du guanidinoacétate est dépendante du SAM, pour chaque molécule de créatine synthétisée, une molécule d'homocystéine est formée.

c- La grossesse:

Le peu de publications existantes sur les taux plasmatiques d'homocystéine font preuve de contradictions dans les données. Seule l'étude de Walker *et al.* (9) apporte quelques lumières sur les taux d'homocystéinémie durant la grossesse.



Les taux d'homocystéinémie décroissent régulièrement durant la grossesse pour atteindre le nadir lors du second trimestre. La chute de ce taux est à corrélérer avec la chute du taux d'albumine puisque celle-ci est la principale protéine transporteuse. Une autre explication de la chute de ce taux est sa possible utilisation par le fœtus. En effet, il existe un gradient de concentration décroissant entre le système veineux maternel et le système veineux fœtal d'une part et entre ce dernier et le système artériel fœtal d'autre part ; ce qui suggère une intégration de l'homocystéine dans le processus métabolique de l'enfant.

Ainsi, l'étude de Malinow *et al.* (10) permet de corroborer cette assertion. Ils ont déterminé la concentration plasmatique de l'homocystéine dans le sang veineux maternel et dans les vaisseaux ombilicaux après la délivrance. Leur étude a permis de démontrer nombre de faits nouveaux :

- L'homocystéinémie des veines ombilicales est, environ 1 µmol/L plus basse que dans le sang maternel ; étant donné que la plupart des autres acides aminés présentent un gradient opposé, on peut penser qu'il existe un transport actif à travers le placenta. On constate que ce taux ombilical est proportionnel au taux maternel d'homocystéine et de folates. De plus, l'homocystéinémie dans l'artère ombilicale est plus

faible de 1 $\mu\text{mol/L}$ par rapport au taux veineux. Ce taux, quant à lui est proportionnel au taux retrouvé dans la veine ombilicale. Ce résultat suggère la possibilité d'un détournement de l'homocystéine maternelle vers le fœtus à travers le placenta dans la veine ombilicale d'où elle est extraite, réalisant une balance positive pour le fœtus au dépend de sa mère.

- Le gradient d'homocystéinémie entre la veine et l'artère est relié au taux observé dans la veine ombilicale et inversement corrélé au poids néonatal mais indépendant des facteurs maternels. Aussi, comme le taux d'homocystéinémie dans la veine ombilicale est dépendant du taux observé dans le sang maternel et inversement dépendant des taux de folates et de vitamines B12 de la mère, le pourcentage d'homocystéine prélevé par le fœtus, reflété par le gradient entre le niveau artériel et celui retrouvé dans la veine, est donc dépendant du métabolisme propre à l'enfant et n'interfère pas avec celui de la mère.

- Sur la base de la mesure de la différence de taux entre la veine et l'artère qui est de 1 $\mu\text{mol/L}$, l'estimation des besoins quotidiens du fœtus en homocystéine est de 369 $\mu\text{mol/j}$. Ce résultat suggère que le fœtus doit avoir des besoins croissants durant la grossesse mais cela n'a pas été démontré de façon formelle.

- Les niveaux maternels d'homocystéine sont corrélés négativement à l'âge gestationnel et au poids néonatal. Ce résultat laisse à penser que la baisse progressive du taux d'homocystéine est, en partie, due au prélèvement que fait le fœtus proportionnellement à son poids et à son âge. Suivant le même raisonnement, on constate que le taux de folates maternels sont positivement dépendant du poids néonatal. Cette association

positive entre le poids et le taux de folates est surprenante mais peut être reliée avec une interdépendance entre la folatémie, le taux de vitamine B12 et l'homocystéinémie.

Cette baisse du taux d'homocystéine a des implications cliniques importantes. Les recherches d'hyperhomocystéinémie chez des patientes présentant une coagulopathie ou des thromboses inexplicables pourraient être faussement négatives du fait de cette "hypohomocystéinémie" physiologique. De plus, étant donné que la plupart des autres tests utilisés pour le bilan des thrombophilies sont eux aussi affectés par l'état gravide, il peut être licite de reporter ces tests à la période du post-partum. Néanmoins, la recherche de mutations de la CBS et de la MTHFR peut être effectuée.

d- Les oestrogènes :

Les différences entre hommes et femmes diminuent après la ménopause mais il persiste quand même une différence entre les deux sexes.

Le traitement hormonal substitutif de la ménopause fait baisser le taux d'homocystéine et il existe une forte corrélation négative entre le taux d'estradiol et l'homocystéinémie chez la femme ménopausée.

e- L'homocystéine dans le liquide folliculaire ovarien (11):

Le liquide folliculaire fournit les nutriments à l'ovocyte en facilitant leur transport depuis le plasma. L'état nutritionnel de cet ovocyte est important pour sa maturation et par voie de conséquence la fertilisation et l'embryogenèse.

On peut supposer que les taux d'homocystéine, de méthionine de vitamines B6, B9 et B12 ont une influence sur cette embryogenèse.

Parce que le liquide folliculaire est composé en grande partie d'un exsudat plasmatique, on peut s'attendre à retrouver toutes les substances présentes dans celui-ci. Pour vérifier cela, Steegers-Theunissen *et al.* ont entrepris de déterminer les concentrations en homocystéine, méthionine, folates, B6 et B12 dans ce liquide folliculaire et dans le sang avant l'ovulation.

Les résultats de cette étude sont :

- les concentrations en méthionine sont plus faibles que celles observées dans le sang.
- les concentrations en folates ne sont pas différentes.
- celles des vitamines B6 et B12 sont plus faibles dans le liquide folliculaire.
- les concentrations sériques en homocystéine, folates et B12 sont corrélées significativement à celles observées dans le liquide folliculaire.
- le contraire est observé pour les concentrations en méthionine et B6.

Le liquide folliculaire est composé à partir d'un flux graduel de fluide dérivé du sang et par des composés synthétisés et sécrétés par la thèque interne et les cellules de la granulosa. La corrélation établie entre les concentrations en homocystéine dans le liquide folliculaire et dans le sang suggère que la diffusion de cette substance de la circulation ovarienne vers le follicule soit le principal déterminant de ces concentrations folliculaires.

Les concentrations en méthionine dans le follicule pré-ovulatoire sont faiblement mais significativement plus faibles que dans le sérum. Il n'existe aucune différence significative entre la concentration en méthionine du follicule et celle du sérum. La méthionine est convertie en S- adénosyl-méthionine qui est un donneur de groupement méthyl primordial pour la division et la

croissance cellulaire. Aussi, on peut penser que la méthionine folliculaire est un nutriment très important pour la croissance de la cellule de la granulosa et pour les ovocytes.

Comme la composition du liquide folliculaire est un miroir de celle du sérum, d'importants taux d'homocystéine ou de faibles taux de méthionine devraient être retrouvés chez des patientes présentant un désordre dans le métabolisme de l'homocystéine. De plus, en théorie, une composition altérée du liquide folliculaire concernant les concentrations en homocystéine et en méthionine peut conduire à une maturation ovocytaire anormale, une fertilisation déficiente et conduire à une perturbation précoce du développement de l'embryon.

f- La nourriture, les vitamines et le style de vie :

Il est important de tenir compte de l'alimentation du sujet chez qui on doit doser l'homocystéinémie. En effet, les taux diminuent de façon modeste dans les quelques heures qui suivent la prise d'un repas mais ils dépendent surtout de la méthionine que contient le repas. Ces taux sont directement dépendants de la quantité de vitamines surtout B6, folates et B12 contenues dans le repas. Ainsi, des aliments riches en protéines animales contiennent 2 à 3 fois plus de méthionine que des aliments issus de végétaux. Par contre, ces derniers de part l'importante quantité de vitamines qu'ils contiennent peuvent faire baisser les taux d'homocystéine.

De même que le statut vitaminique est un déterminant important de l'homocystéinémie, le style de vie est aussi prépondérant. The Hordaland Homocysteine Study (12,13) a été une des premières études à montrer que la cigarette, le café à hautes doses et l'absence d'exercice physique sont associés à une élévation du taux sanguin d'homocystéine mais l'influence de l'alcool n'est pas encore très claire. Quoique le café soit souvent associé, dans les habitudes de vie à la cigarette et à une faible consommation de vitamines sous forme de fruits et de légumes, l'association café à hautes doses/homocystéinémie n'est que peu influencée par l'ajustement de

ces variables. Par contre l'association cigarette/café est bien corrélée avec un taux particulièrement élevé d'homocystéine. Il est intéressant de noter que c'est l'effet inverse qui se produit pour le thé.

2- Pathologiques :

a- Les déficits en vitamines :

Parmi la population en bonne santé, les taux d'homocystéine sont nettement plus hauts chez les sujets ne prenant aucun supplément vitaminique. Particulièrement chez le sujet âgé, le taux d'homocystéine est fortement corrélé négativement au taux de vitamine B12. Parmi les causes acquises d'hyperhomocystéinémie, les déficits en folates et vitamines B12 sont les plus communs. Quelques études confirment la forte incidence de déficits occultes en B12 chez les personnes âgées quel que soit le genre.

A partir d'un seuil de 0.35 mg/j de folates, on assiste chez la population jeune à une augmentation des taux d'homocystéine inversement proportionnelle à la prise faible de vitamines.

b- L'insuffisance rénale :

L'hyperhomocystéinémie est suspectée d'être un facteur de risque indépendant de développement d'une mortalité et d'une morbidité dans la phase terminale de la maladie rénale, et d'être un facteur de risque de maladie vasculaire chez le dialysé. Le mécanisme exact de cette influence néfaste est peu connu. Parmi ces mécanismes, citons :

- ✓ L'accumulation de toxines inhibant le métabolisme de l'homocystéine.
- ✓ Le déficit ou l'altération du métabolisme des vitamines B6, B12 et folates.
- ✓ La vitamino résistance.
- ✓ La réduction de la clearance rénale de l'homocystéine.
- ✓ La diminution de la dégradation rénale de l'homocystéine.

La supplémentation en folates chez les patients urémiques ne présentant pas, a priori de déficit en folates, réduit le degré d'hyperhomocystéinémie mais il n'existe que ponctuellement un

retour à la normale et de fortes doses sont nécessaires. Ceci suggère qu'une alimentation pauvre en folates ne soit pas la seule raison invoquée dans le mécanisme de l'hyperhomocystéinémie.

Un effet semblable a été retrouvé avec la supplémentation en pyridoxine.

La défaillance de la supplémentation forcée à réduire les taux d'homocystéine à des normes acceptables peut être en relation avec des inhibiteurs indifférenciés de la folate conjugase identifiés récemment dans le plasma de patients hémodialysés. L'activation de l'acide folique pour former des composés qui soient biologiquement actifs requiert l'addition séquentielle de résidus glutamyl pour former des folylpolyglutamates. Le devenir de ces composés est régi par la balance de l'activité entre la folate conjugase qui clive le glutamyl des polyglutamyl folates et la folyl-poly- γ -glutamate synthétase qui le réinsère. Les folylpolyglutamates à courtes chaînes ont la plus grande activité biologique et à l'inverse ceux à longues chaînes ont une activité inhibitrice. Ceci a été démontré pour l'activité d'enzymes folates dépendant comme la méthionine synthétase mais aussi pour des enzymes ne dépendant pas des folates comme la cystathionine- γ lyase.

L'accumulation de ces longues chaînes chez le dialysé a été évoquée pour expliquer, entre autres choses, l'hyperhomocystéinémie.

L'hyperhomocystéinémie est corrélée aux niveaux importants de créatinine associés à la perte de la fonction glomérulaire rénale. Néanmoins, le taux plasmatique d'homocystéine peut être normal chez des patients présentant une fonction glomérulaire modérément réduite et une créatininémie normale. De plus, l'hyperhomocystéinémie due à un dysfonctionnement rénal n'est qu'incomplètement réduite par l'hémodialyse ou la dialyse péritonéale. L'inaptitude du rein à corriger les taux d'homocystéinémie, malgré la réduction effective de la clearance à la créatinine, semble refléter la perte de la capacité du rein à cataboliser l'homocystéine.

Nombre de facteurs conduisent à l'hyperhomocystéinémie mais la cause ultime de l'élévation plasmatique du taux d'homocystéine dans la maladie rénale semble liée au défaut de balance entre l'apparition et la disparition de ce composé dans le courant plasmatique. En effet, la fonction rénale occupe une place importante dans l'élimination du plasma de l'homocystéine. Avec une fonction rénale normale, virtuellement toute l'homocystéine liée à une protéine porteuse se situe dans le compartiment plasmatique et l'homocystéine libre qui est filtrée est recaptée par le tube proximal assurant, ainsi une filtration urinaire nette minime. Comme cela a été vu précédemment, le rein possède les enzymes nécessaires pour assurer la métabolisation complète de l'homocystéine, à savoir, à la fois la voie de la méthylation mais aussi celle de la transulfuration. Cette donnée peut expliquer que la perte de la dualité des voies dans le traitement métabolique de l'homocystéine dans un rein déficient peut être un important déterminant dans l'apparition d'une hyperhomocystéinémie observée dans la phase terminale de l'insuffisance rénale.

c- Le diabète :

Les études portant sur des patients diabétiques sont assez rares. Ceux-ci qu'ils soient insulino ou non dépendants possèdent une forte propension à développer une hyperhomocystéinémie par rapport aux individus sains. Les taux élevés d'homocystéine ne sont pas simplement dus à une anomalie du fonctionnement rénal. Les patients diabétiques souffrant d'hyperhomocystéinémie ont significativement plus de lésions micro et macroangiopathiques.

De plus, étant donné que l'apolipoprotéine a est augmentée chez les patients diabétiques insulino dépendants avec une néphropathie diabétique, et que, de plus, l'hyperhomocystéinémie peut entraîner un dérèglement de la fibrinolyse contrôlée par l'apolipoprotéine a, il peut expliquer un lien étroit entre le taux d'homocystéine et l'athéromatose chez ces patients.

d- Les transplantations :

Arnadottir *et al.* (14) ont, les premiers documenté l'association entre le traitement par cyclosporine et l'hyperhomocystéinémie chez des patients ayant subi une transplantation rénale. Les données des études faites sur l'hyperhomocystéinémie ont démontré le risque qu'elle fait encourir aux transplantés rénaux en contribuant à augmenter le risque de maladie cardiovasculaire précoce qui est une cause fréquente de morbidité et de mortalité chez ces patients.

Par contre, il reste un doute sur le fait que l'hyperhomocystéinémie observée chez le transplanté rénal est uniquement due à la faible diminution de la fonction rénale que la transplantation engendre ou s'il existe des mécanismes additionnels relatifs au traitement anti-rejet mis en œuvre.

Les études effectuées chez des transplantés cardiaques indiquent qu'eux aussi ont des taux élevés d'homocystéine mais les facteurs cliniques et biochimiques contribuant à cet état n'ont pas encore été assez étudiés. On soupçonne la diminution de la fonction glomérulaire et le faible taux sérique de folates et de vitamine B6 mais ces seuls facteurs ne peuvent pas tout expliquer.

e- L'arthrite rhumatoïde :

Il semble que le taux d'homocystéine plasmatique soit plus élevé chez les patients atteints de cette maladie. Pettersson *et al.* (15) ont prouvé que ces patients avaient un déficit en vitamine B12 et une fonction gastrique perturbée. L'hyperhomocystéinémie, dans ces cas, peut être associée à un déficit fonctionnel en B12 et à une diminution de la fonction rénale, les deux contribuant à faire que ces patients ont plus de risque de développer une maladie cardiovasculaire.

f- La maladie thyroïdienne :

La concentration moyenne de l'homocystéine observée chez des patients hypothyroïdiens est plus élevée que dans la population euthyroïdienne alors qu'elle n'est pas significativement différente chez les patients hyperthyroïdiens. La créatininémie est plus élevée chez les patients hypothyroïdiens alors qu'elle est plus faible chez les hyperthyroïdiens alors que l'inverse se passe pour la folatémie. Mais ces différences ne semblent pas expliquer de façon convaincante les taux d'homocystéine observés aux dires des études multivariées effectuées.

g- Autres maladies :

L'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque cardiovasculaire indépendant pour les patients souffrant de lupus érythémateux disséminé. Il en est de même chez les enfants leucémiques et chez les patients présentant un psoriasis.

3- Les médicaments :

Les effets des médicaments sur les taux d'homocystéine sont très variables.

Ceux connus pour l'augmenter sont :

- ✓ La cyclosporine
- ✓ Le méthotrexate
- ✓ L'aminoglutéthimide (ORIMETENE®)
- ✓ L'azaribine
- ✓ Le NO
- ✓ Les diurétiques
- ✓ Les corticostéroïdes
- ✓ Les anticonvulsivants comme la carbamazépine et la phénytoïne

- ✓ La théophylline

Ceux connus pour le diminuer sont :

- ✓ Le tamoxifène
- ✓ La contraception orale
- ✓ Le traitement hormonal substitutif de la ménopause
- ✓ La pénicillamine
- ✓ La N-acétylcystéine

III- LA PATHOGENIE DE L'HYPERHOMOCYSTEINEMIE :

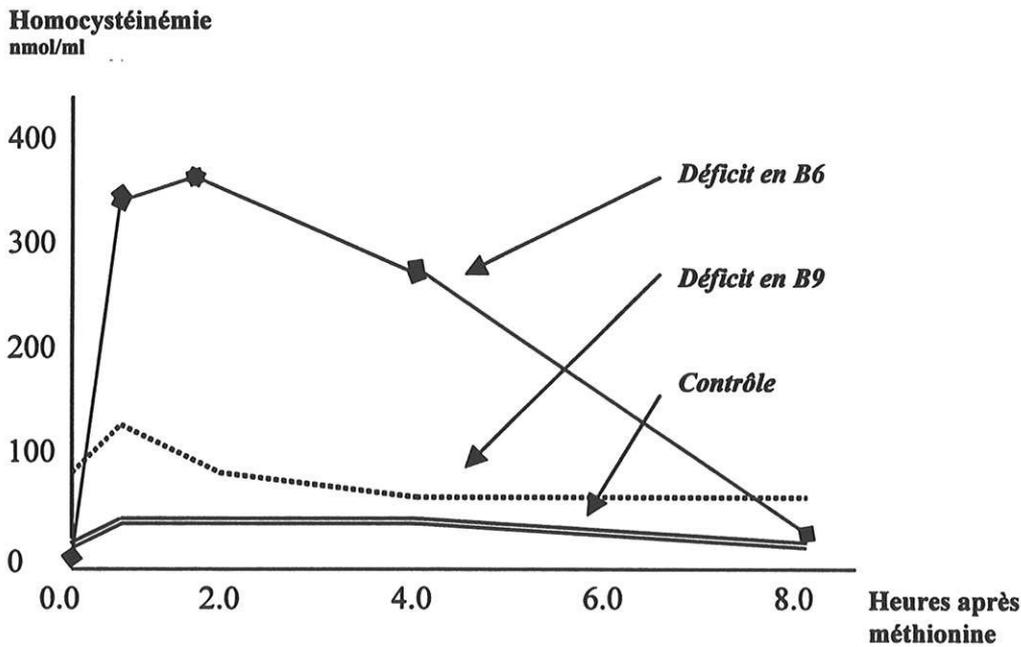
A- L'hyperhomocystéinémie sévère et modérée (16):

L'hyperhomocystéinémie chez l'homme peut être divisée en catégories incluant les causes, la prévalence et la sévérité.

La plus sévère est due à un défaut des gènes codant pour les enzymes du métabolisme de l'homocystéine. Dans ce cas, le défaut d'enzyme impliqué soit dans la voie de reméthylation soit dans celle de la transulfuration conduit à une importante élévation du taux d'homocystéine dans le sang ou les urines. La forme la plus classique de ce type de désordre, à savoir l'hyperhomocystéinurie congénitale, est causée par le défaut homozygote d'un gène codant pour une enzyme catalysant la transformation de l'homocystéine en cystathionine, bloquant ainsi la voie de la transulfuration ; cet enzyme est la Cystathionine- β -synthétase. Chez ces individus, les taux plasmatiques d'homocystéine peuvent atteindre 400 $\mu\text{mol/L}$ pour une normale à 15 $\mu\text{mol/L}$.

Les défauts homozygotes d'autres gènes qui conduisent à des taux aussi élevés incluent ceux qui codent pour un autre enzyme, le méthylène tétrahydrofolate réductase (qui intervient dans la voie de reméthylation) ou pour d'autres enzymes qui participe à la synthèse de la cobalamine méthylée.

Les plus courantes causes d'hyperhomocystéinémie sont aussi plus modérées dans leur intensité et sont dues à des déficits moins sévères en gènes codant pour les enzymes ou dues à une carence en vitamines intervenant dans le métabolisme de l'homocystéine.



Concentrations plasmatiques en homocystéine après Méthionine loading test chez le rat déficient en folates ou en B6 ou chez le contrôle. Avec l'accord de Selhub J.

Dans ces pathologies, les taux plasmatiques d'homocystéine peuvent différer suivant la voie métabolique affectée par le déficit en enzyme ou la carence en vitamines.

Ainsi, une anomalie au niveau de la voie de reméthylation, même si elle est modérée, conduira à une augmentation substantielle des concentrations plasmatiques de l'homocystéine. Une telle anomalie peut être due à un apport inadéquat en B12 ou folates ou à un déficit en MTHFR.

A contrario, une anomalie de la voie de la transulfuration conduit, au pire, à une augmentation modérée de l'homocystéinémie si cette anomalie n'est pas due à un déficit complet en CBS. Ce phénomène est dû à un déficit hétérozygote en CBS ou à une carence en B6 et est facilement identifiable par une augmentation du taux d'homocystéine après un test de charge à la méthionine ou après un repas.

L'évidence de deux formes distinctes d'hyperhomocystéinémie a été relevée pour la première fois par une étude, la Family Heart Study (17) en 1995. On a mesuré l'homocystéinémie chez chaque participant à HO et H4 d'un test de charge à la méthionine. Il a été retrouvé :

- 44 individus hyperhomocystéinémiques
- 20 (46%) avaient un HO positif seul
- 17 (34.5%) avaient un H4 positif seul
- 7 (14%) avaient les deux valeurs pathologiques

D'après ces différenciations, on peut établir un tableau prenant en compte à la fois le type d'anomalie en cause et son impact sur le taux d'homocystéinémie :

	CAUSES	CONSEQUENCE	EFFETS SUR RHCS
HYPERHOMOCYSTEINEMIE SEVERE	Déficit complet en enzymes CBS ou MTHFR ou en enzymes du métabolisme de la vitamine B12	Blocage des 2 voies sans possibilité d'échappement par une voie annexe	Accumulation de l'homocystéine qui ne peut ni être reméthylée ou dégradée en cystéine d'où apparition d'hyperhomocystéinurie
HYPERHOMOCYSTEINEMIE MODEREE	Mauvaise reméthylation de l'homocystéine par carences en folates ou en B12 ou déficit partiel en enzyme type MTHFR thermolabile	Blocage de la voie de reméthylation mais évacuation par l'autre voie qui est irréversible	Augmentation partielle de l'homocystéinémie dans les conditions physiologiques
HYPERHOMOCYSTEINEMIE PROVOQUEE PAR LE MLD	Démasquage d'une anomalie au niveau de la transulfuration (défaut de la CBS ou carence en B6	Blocage de la voie de la transulfuration mais shunt possible par la voie de la reméthylation ou par les voies annexes	Augmentation transitoire de l'homocystéine qui revient à la normale dans les conditions physiologiques

B- Tests de dépistage de l'hyperhomocystéinémie :

Pour déterminer si un sujet est ou non hyperhomocystéinémique, nous avons à notre disposition deux types de tests :

- **Le premier** est dit rapide et consiste à doser le taux sérique d'homocystéine à un temps t. L'avantage de ce test est sa rapidité de mise en œuvre, son faible coût et surtout sa faisabilité puisqu'il n'existe aucune contrainte.

- **Le deuxième** est dit de charge et consiste à doser l'homocystéine après une ingestion de méthionine. Son intérêt réside essentiellement dans sa fiabilité à dépister les faux négatifs que peut engendrer le premier mais il implique une structure plus lourde et des contraintes de temps puisqu'il doit y avoir un laps de temps entre la prise de la méthionine et le dosage.

Il existe de nombreux facteurs influents le taux d'homocystéine comme l'âge, le sexe, la créatininémie, la carence vitaminique et les taux d'œstrogènes circulants.

Parallèlement à ces facteurs, d'autres considérations sont à prendre en compte comme la survenue récente de problèmes cardiovasculaires et les prédispositions génétiques comme par exemple l'homozygotie pour la mutation de la MTHFR.

Peu de choses sont connues sur les variations des taux d'homocystéine durant le temps. Ainsi, seules quelques études ont montré qu'il n'existait pas de variations significatives du taux d'homocystéine chez des sujets ayant eu un dosage à un an d'intervalle. Au jour le jour, la variation intra individuelle du dosage rapide de l'homocystéine est d'environ 25% chez des sujets en bonne santé. Par contre, il n'existe aucune donnée sur les variations après un test de charge. Les variations chez un même individu du taux plasmatique d'homocystéine ont deux implications importantes :

- ✓ La validation du diagnostic avec établissement de valeurs seuils pour les formes élevées.
- ✓ L'estimation du risque inhérent à l'hyperhomocystéinémie chez cet individu.

1- Les tests utilisés :

a- Le test rapide :

Il est fait un prélèvement de sang sur un tube EDTA à 9 heures du matin. Ce sang est transporté sur de la glace et centrifugé à 1700 tours/min pendant 10 min et ce dans les 30 minutes qui suivent le prélèvement. Le plasma recueilli est ensuite conservé à -30°C en attendant l'analyse.

La valeur pathologique se situe au delà de 12.5 $\mu\text{mol/l}$.

b- Le test de charge à la méthionine ou MLT :

On administre dans du jus d'orange de la L-Méthionine à raison de 0.1 g/kg de poids. Pendant ce test, le patient ingère un petit déjeuner et un déjeuner standards pauvres en méthionine (contenant 14 mg de méthionine par gramme de protéine).

Six heures après l'ingestion de méthionine, il est effectué un prélèvement suivant la même procédure que celle utilisée plus haut. Les produits sanguins recueillis doivent être analysés dans la semaine qui suit.

L'homocystéinémie totale, à savoir celle libre et celle liée à la protéine porteuse, est mesurée. Pour cela, on utilise le tri-*n*-butyl-phosphine comme agent réducteur et l'ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonate en tant que fluorochromophore, suivi par une chromatographie à hautes performances en phase liquide associée à une détection de fluorescence. A Limoges, est utilisée une méthode de dosage immuno-enzymatique (Cf. infra)

L'hyperhomocystéinémie post-méthionine est définie comme une concentration en homocystéine après un MLT excédant le 97.5^{ème} percentile des sujets contrôles.

Les valeurs seuils sont de 54 $\mu\text{mol/l}$ pour les hommes, 51 $\mu\text{mol/l}$ pour les femmes non ménopausées et de 69 $\mu\text{mol/l}$ pour les femmes ménopausées.

2- Etude comparant les deux tests sur deux prélèvements :

La validité des tests a été étudiée pour savoir quel test est le plus fiable pour dépister une hyperhomocystéinémie chez le sujet a priori sain et chez celui présentant des facteurs de risques.

Cette étude, initiée par van den Berg *et al.* (18), a pour but d'étudier les variations des résultats chez un groupe de sujets normo et hyperhomocystéinémiques ayant subi les deux tests à deux reprises après un laps de temps de 27 à 122 jours.

a- Résultats :

Le premier résultat indique que la différence entre les deux prélèvements n'est pas associée à la durée de la période entre ceux-ci.

Il existe une relation entre le taux moyen d'homocystéine post méthionine entre les deux prélèvements et concernant la différence entre les deux mesures, la variabilité augmente avec le taux d'homocystéine. Par contre, pour le test rapide, cette relation n'est pas significative.

- **Pour les sujets présentant un taux normal après MLT :**

Les deux mesures montrent une corrélation pour le MLT et pour le test rapide.

Les coefficients individuels de variation sont de 17.1% pour le premier et de 23% pour le deuxième.

L'âge ne semble pas relié aux taux de bases d'homocystéine.

Le taux de base dans le test rapide est corrélé négativement aux taux de folates mais pas dans le MLT ni dans la différence entre rapide et MLT. La différence du taux d'homocystéine du rapide est corrélé négativement à la variation des folates. Un taux plus faible de folates dans le MLT est associé à une homocystéine plus élevée dans le MLT également et vice et versa. La variation du taux d'homocystéine dans le MLT est, aussi, corrélé négativement à la variation des folates mais la différence entre les deux tests ne l'est pas.

Le delta des taux de vitamines B6 et B12 n'est relié à aucun delta de taux d'homocystéine.

- **Pour les sujets présentant un taux élevé après MLT :**

Les deux mesures montrent une corrélation pour le test rapide et pour le MLT.

Les coefficients individuels de variation sont de 15% pour le premier et de 18.8% pour le second.

L'âge n'est pas relié aux taux d'homocystéine.

Le taux de base post-MLT et la différence entre les deux tests sont corrélés négativement aux folates et aux vitamines B6 et B12. Le delta des folates n'est pas relié au delta du rapide, ni à celui du MLT et ni à la différence entre les deux tests.

Le delta des vitamines B6 et B12 n'est pas relié au delta de quelque taux d'homocystéine que ce soit.

b- Commentaires :

Il existe une variabilité intra individuelle des taux d'homocystéine dans le temps.

Cette variabilité mise en évidence dans les deux tests est reliée à la variabilité retrouvée dans le taux de folates chez les sujets présentant un taux normal après MLT mais n'est pas retrouvée chez les sujets présentant un test positif.

Il n'existe aucune relation en rapport avec les autres cofacteurs de la synthèse de l'homocystéine à savoir les vitamines B6 et B12.

Les différences de taux retrouvés dans les deux mesures peuvent s'expliquer par le fait que l'alimentation ingérée dans les jours précédant le prélèvement peut influencer le taux de folates et d'homocystéine.

Une relation significative existe entre la variation des deux mesures par test rapide et la variation des folates chez les sujets présentant un taux normal après MLT. Il semble, donc, que de faibles changements de folates dans l'alimentation peuvent affecter le taux d'homocystéine dans le test rapide. Ce taux dans le test rapide est déterminé de façon primaire par l'activité de la voie de reméthylation dont la MTHFR est un enzyme prépondérant. Aussi, il semble que cette activité de la MTHFR soit très sensible à de faibles variations des folates. Cette étude a montré, de plus, que la sensibilité normale de l'activité de la voie de reméthylation à des fluctuations du taux de folates est diminuée chez des sujets présentant une hyperhomocystéinémie après un MLT.

En étudiant le génotype de la MTHFR, van den Berg a démontré que les individus mutants homozygotes pour la MTHFR thermolabile ont de plus grandes variations des taux d'homocystéine avec un test rapide que ceux homozygotes pour le gène normal.

Dans cette étude, une attention particulière a été portée aux “performances” du MLT. Celui-ci avait été proposé au départ comme test diagnostique pour la détection de la déficience hétérozygote de la cystathionine- β -synthétase. Il avait été démontré que la plupart des sujets présentant une hyperhomocystéinémie après un MLT n'étaient pas hétérozygotes pour la déficience en CBS mais que ce taux élevé d'homocystéine après ce test était un facteur de risque indépendant de maladies cardiovasculaires et était présent chez un tiers des patients affectés par la maladie athéromateuse avant 55 ans. Des études avaient montré que des taux élevés dans les deux tests n'intervenaient pas nécessairement chez les mêmes sujets. Par exemple, 30 à 50% des sujets présentant une hyperhomocystéinémie après un MLT ont des taux normaux après un test rapide. Aussi, la positivité des deux tests chez un même sujet reflète des désordres différents dans le métabolisme de la méthionine-homocystéine, désordres qui peuvent être associés à des mécanismes différents d'atteintes artérielles.

En pratique clinique, on considère le MLT comme un test binaire positif ou négatif. Or, l'hyperhomocystéinémie entraîne un risque préjudiciable qui est graduel. De plus, l'étude a montré qu'il existait une variabilité substantielle dans le temps des taux d'homocystéine. Aussi, le résultat du test quand il est noté normal ou pas est sujet à caution surtout quand les valeurs retrouvées sont aux frontières des seuils considérés comme normaux.

La variabilité des taux observés dans le MLT est reliée aux changements des taux de folates et celle-ci est significative uniquement chez les sujets présentant des taux normaux.

La relation entre le delta des folates et la différence entre les deux tests n'est pas évidente probablement parce que, pour chaque changement dans le taux de folates, la variation

retrouvée dans le test rapide est plus prononcée que dans le MLT. Le changement d'activité de la voie de la reméthylation peut affecter les taux d'homocystéine après un MLT, au moins chez les sujets présentant des taux normaux après ce test. Cette assertion est confirmée par le fait que les taux observés après MLT sont corrélés négativement aux taux de folates et qu'une supplémentation en ceux-ci diminuent les taux mesurés.

c- Conclusion :

Il existe une substantielle variabilité dans le temps des taux d'homocystéine à la fois pour le test rapide et aussi pour le MLT. Ceci est le fait, tout au moins pour partie, des variations des taux de folates, au moins chez les sujets "normaux" pour le MLT.

Finalement, l'homocystéine est un facteur de risque de maladies importantes dont l'implication est graduelle ce qui implique de revoir le concept de normalité ou d'anormalité des tests utilisés.

C- Les enzymes en cause :

1- La méthylènetétrahydrofolate réductase :

Notant que le déficit sévère en MTHFR est la plus commune des causes héréditaires de mauvais métabolisme de l'homocystéine, Sibani *et al.* (19) a catalogué vingt quatre mutations ; la plus courante étant la forme thermolabile de la MTHFR, nous nous contenterons de passer en revue les neuf plus communes.

a- Homocystéinurie due à la MTHFR, ARG184TER :

Chez deux patients présentant un déficit en MTHFR, Goyette *et al.* (20) identifia une transition du nucléotide 559 de C vers T , convertissant un codon arginine en codon terminaison. Cette mutation du nucléotide 559 est en relation avec le codon 184 du ADNc.

L'analyse de ces deux patients a conclu à l'homozygotie pour la mutation ou tout au moins à la production d'un non-sens ou d'un allèle nul. Ces deux patients ont une forme sévère de déficience en MTHFR qui est apparue très tôt. Un des deux présente une consanguinité chez ses parents. De plus, ils sont tous deux Indiens d'Amérique venant du Sud des Etats-Unis.

b- Homocystéinurie due à la MTHFR, ARG158GLN :

Chez un patient présentant une hyperhomocystéinurie, Goyette *et al.* (20) ont montré une transition de G vers A du nucléotide 482 qui convertit le codon 158 de l'arginine vers la glutamine. L'analyse a révélé une hétérozygotie qui conduit à la formation d'un ARNm codant pour une protéine enzymatique dont les taux, certes faibles, montrent une activité de 10% par rapport à la normale et induisant une révélation plus tardive de la maladie.

c- Polymorphisme de la MTHFR thermolabile, MTHFR, 677C-T ou tMTHFR :

Frost *et al.* (21) a identifié une substitution C-T du nucléotide 677 qui convertit une alanine en valine. La mutation dans un état homo ou hétérozygote est corrélée avec une réduction de l'activité enzymatique et une augmentation de la thermolabilité des lymphocytes extraits ; in vitro, l'expression de l'ADNc contenant la mutation confirme son effet sur la thermolabilité de la MTHFR. Les individus homozygotes sont une augmentation significative de l'homocystéinémie. Approximativement, 10% des canadiens habitant en ville sont homozygotes pour ce variant alors que, presque la moitié porte une copie de cette mutation. Dans la population caucasienne et asiatique, l'homozygotie pour la MTHFR thermolabile concerne de 5 à 30% des personnes. Les taux plasmatiques d'homocystéine sont corrélés au variant suivant un mode dominant-codominant.

Les effets hyperhomocystéinémiques de la tMTHFR sont variables et semblent être dépendants du taux de folates. Cette mutation cause une redistribution des folates et par

conséquent, les 677T homozygotes requièrent un stock plus important de folates pour maintenir le taux d'homocystéinémie à une valeur acceptable. En présence d'un taux faible de folates dans le plasma, les individus homozygotes pour MTHFR C677T montrent une prédisposition pour une hyperhomocystéinémie sévère. Une corrélation significative existe entre le génotype tMTHFR et la diminution du taux de folates et il semblerait que les taux élevés d'homocystéine soient plus fréquents dans le groupe des individus homozygotes. On peut donc supposer que la tMTHFR soit un facteur de risque uniquement chez les individus ayant un pool de folates diminués, assertion confirmée par différentes études comme celle de Jacques *et al.* (22) Dans cette étude, il a été démontré que, quand les concentrations de folates sont supérieures à 15.4 nmol/l, l'homocystéinémie est normale et n'est pas perturbée par le statut génomique de l'individu. A l'inverse, lorsque les concentrations en folates sont inférieures à la normale, il existe une hyperhomocystéinémie chez les patients homozygotes pour la mutation 677CT. Ces données impliquent donc que l'expression phénotypique de la mutation dépend à la fois du statut homo ou hétérozygote mais aussi d'un facteur extrinsèque représenté par la folatémie.

d- Polymorphisme de la MTHFR thermolabile, MTHFR. 1298A-C :

Van der Put *et al.* (23) ont identifié un autre polymorphisme du gène de la MTHFR : une mutation 1298A-C qui change un glutamate en résidu alanine. Ni le statut homozygote ni le statut hétérozygote ne sont associés à un taux élevé d'homocystéinémie. De plus, il n'existe pas de phénomène de dépendance d'expression phénotypique de la mutation en rapport avec la folatémie comme il peut exister avec la mutation 677C-T.

Par contre, l'association des deux hétérozygoties pour les deux polymorphismes de la MTHFR entraîne une baisse de l'activité spécifique de la MTHFR, une hyperhomocystéinémie sévère et une diminution du taux de folates circulants. Ainsi, on observe que la combinaison des deux mutations à l'état hétérozygote pour la MTHFR conduit, en définitive, aux même

perturbations que l'homozygotie pour la mutation 677C-T. Cette combinaison est observée dans 28% des patients présentant un défaut du tube neural comparé aux 20% des contrôles. Cette conclusion suggère que les mutations combinées rendent compte d'une proportion d'anomalies du tube neural en relation avec le taux de folates et qui ne sont pas expliquées par le statut homozygote pour 677C-T.

e- Homocystéinurie due à MTHFR, 983A-G :

Kluijtmans *et al.* (24) ont décrit une base moléculaire pour un déficit sévère en MTHFR chez quatre familles non liées originaires de la Turquie et de la Grèce. Grâce à un séquençage direct RT/PCR, ils ont identifié quatre nouvelles mutations : deux "missense" (983A-G ; 1027T-G) et deux non-sens (1084C-T ; 1711C-T). Un morceau du variant contient un codon de terminaison prématuré chez un patient et semble être un effet secondaire du 1027T-G "missense". Toutes les mutations sont présentes sous la forme homozygote. Le patient présentant la mutation 983A-G était originaire de Macédoine, son affection avait été rapportée par Wendel et Bremer (25) en 1984 puis par Hyland *et al.* (26) en 1988. Le diagnostic de déficience de la MTHFR avait été fait à l'âge de deux ans. Sa condition clinique s'était améliorée sous traitement par bêtaïne et acide folique. Malgré cela, elle présentait à dix sept ans un retard mental important. Dans la protéine, il existait une substitution de la sérine par l'asparagine. Elle était, de plus, homozygote pour le polymorphisme 677C-T.

f- Homocystéinurie due à MTHFR, 1027T-G :

Kluijtmans *et al.* (24) ont observé une mutation non-sens 1027T-G chez un enfant dont les ancêtres étaient turcs. Cette mutation convertissait un tryptophane en glycine. Cet intron contenait une translation prématurée vers un codon terminal.

g- Homocystéinurie due à MTHFR,1084C-T :

Kluijtmans *et al.* (24) ont observé cette anomalie à l'état homozygote chez le fils d'un couple consanguin de turcs, eux-mêmes en bonne santé. Elle consistait en une transition C-T en position 1084 du MTHFR cDNA ; il en résultait un changement du codon CGA (arg) en TGA (stop) et provoquait la synthèse d'une protéine tronquée. Ce patient était aussi hétérozygote pour le polymorphisme 677C-T.

h- Homocystéinurie due à MTHFR,1711C-T :

Kluijtmans *et al.* (24) ont détecté une homozygotie pour une mutation 1711C-T entraînant une modification de codon de CGA (arg) pour TGA (stop). Cette patiente était une enfant d'un couple turc consanguin. Elle présenta à l'âge de 10 mois un sévère retard du développement psychomoteur, une importante microcéphalie et une homocystéinurie. Cliniquement, elle évolua de façon positive mais continua à présenter un important retard mental. Elle n'était pas atteinte par la mutation 677C-T.

i- Homocystéinurie due à MTHFR,1081C-T :

Tonetti *et al.* (27) ont décrit une famille avec des parents consanguins remontant à plusieurs générations. Cette famille avait 4 enfants qui présentaient une hyperhomocystéinémie avec une hypométhioninémie associées à un taux faible de folates dans le sérum et les hématies et spécialement une MTHFR indétectable dans les globules rouges.

Tous les quatre étaient homozygotes pour la mutation 1081C-T sur l'exon 6, changeant une arginine en cystéine ; leurs parents étaient tous deux homozygotes pour la mutation.

Les quatre enfants ainsi que leur père étaient homozygotes pour la mutation 677C-T alors que la mère était hétérozygote pour cette même mutation.

2- La cystathionine- β -synthétase :

Nugent *et al.* (28) ont donné une information complète sur le premier cas décrit d'homocystéinurie. Il s'agissait d'un patient identifié pour la première fois par Carson et Neill (29) en 1962 pendant un programme de surveillance d'individus retardés mentaux en Irlande du Nord. Depuis de nombreux cas ont été étudiés permettant de mettre en évidence 10 types de mutation de la CBS.

a- Homocystéinurie due à CBS, GLY307SER :

Chez deux patients sans lien de parenté présentant une homocystéinurie, Gu *et al.* (30) ont retrouvé une transition G-T sur le gène de la CBS, entraînant une substitution de la sérine en glycine sur le résidu 307 de la protéine. Cette protéine mutante est apparemment stable mais ne présente aucune activité enzymatique. Cette mutation a surtout été détectée chez les populations celtiques.

b- Homocystéinurie due à CBS, PRO145LEU :

Kozich *et al.* (31) a trouvé chez une patiente dont les parents étaient d'origines irlandaise et allemande une transition C-T sur le nucléotide 434 entraînant une substitution de la proline 145 en leucine.

c- Homocystéinurie due à CBS, ALA114VAL :

Une autre mutation avait été découverte par le même auteur que précédemment sur la même patiente : il s'agissait d'une transition C-T sur le nucléotide 341 codant pour une valine en position 114 au lieu d'une alanine.

d- Homocystéinurie pyridoxine répondeuse due à CBS, ILE278THR :

Hu *et al.* (32) ont retrouvé dans un allèle d'un patient répondant peu à la pyridoxine et dans les deux allèles d'un patient répondeur, une mutation non-sens de l'exon 8 du gène de la CBS, entraînant une translation de la thréonine vers l'isoleucine 278. Bien que cette mutation 833T-C soit retrouvée chez 50% des patients allemands homozygotes pour le gène déficient de la CBS, Kluijtmans *et al.* (33) ne l'ont retrouvé chez aucun patient présentant des affections cardiovasculaires prématurées. Ils ont pu donc en conclure que cette affection n'était pas en cause dans ce type de maladie. Cette mutation I278T est la plus fréquente mutation de l'homocystéinurie en Italie où presque tous les cas sont B6-répondeurs et où la fréquence est d'environ 1/55 000 contre 1/58 000 pour les USA et 1/889 000 pour le Japon.

Chez un groupe de patients présentant des affections coronariennes prématurées, Tsai *et al.* (34) ont mis en évidence une augmentation non prévisible d'une mutation impliquant une insertion 68-bp dans la région codante de l'exon 8. Paradoxalement, cette mutation n'affecte pas l'activité enzymatique de la CBS. De plus, dans leur étude, il avait été retrouvé cette mutation chez 11.7% des contrôles. Contrairement à ce qu'avaient affirmé Sebastio *et al.* (35) en disant que cette insertion introduisait un codon prématuré de terminaison entraînant une CBS non fonctionnelle, Tsai *et al.* (34) ont rapporté que cette insertion créait une épissure alternante de site qui éliminait non seulement les séquences introniques insérées mais aussi la mutation T-C du nucléotide 833 (ile278thr) associée à cette insertion. Le résultat net de cet épissage était la génération à la fois quantitative et qualitative d'un ARNm et d'une CBS normaux.

e- Homocystéinurie pyridoxine répondeuse due à CBS, LYS384GLU :

Chez deux Français homocystéinuriques répondeurs à la B6 et n'ayant aucun lien de parenté et n'étant pas d'origine celtique, Aral *et al.* (36) ont trouvé de nouvelles mutations de la

CBS. Chez l'un d'eux, il a mis en évidence une transition A-G du nucléotide 1150 entraînant une substitution de la lysine 384 en acide glutamique de la protéine de la CBS.

f- Homocystéinurie pyridoxine répondeuse due à CBS.LEU539SER :

Chez le deuxième patient, Aral *et al.* (36) ont trouvé une homozygotie pour la mutation leu539ser.

g- Homocystéinurie pyridoxine répondeuse due à CBS.ARG266LYS :

Kim *et al.*(37) ont trouvé chez 7 patients classés comme pyridoxine-répondeurs, une nouvelle mutation arg266lys (797G-A). Ce point de mutation est très proche de la duplication 68-bp vue précédemment au niveau de la jonction intron 7-exon 8. Ils ont testé d'un point de vue fonctionnel cette mutation sur un système utilisant des levures. La mutation 797G-A n'exprime aucun phénotype particulier lorsque les levures sont élevées dans un milieu riche en pyridoxine mais il en est tout autre dans un milieu pauvre en B6 augurant de ce qui se passe chez les humains. Ce test a même été proposé comme test diagnostique.

h- Homocystéinurie pyridoxine répondeuse due à CBS.ASP444ASN :

Kluijtmans *et al.* (38) ont étudié une jeune femme de 20 ans admise à l'hôpital à l'âge de 9 ans pour retard psychomoteur et syndrome marfanoïde. Le traitement mis en place comprenait Vitamine B6, acide folique et bétaïne. 11 ans plus tard, elle était en excellente santé avec un quotient intellectuel proche de la moyenne. Elle était homozygote pour une mutation non-sens 1330G-A du gène de la CBS. Cette mutation engendrait une substitution asp444asn induisant le remplacement d'un acide aminé neutre pour un chargé négativement.

Ses deux parents et une sœur indemnes étaient hétérozygotes pour cette mutation.

Malgré cette mutation homozygote, l'activité de la CBS, chez un extrait de culture de fibroblastes de cette patiente, était identique à celle que pourrait avoir un hétérozygote et non pas un homozygote. Kluijtmans *et al.* (38) n'ont pas observé d'augmentation de l'activité de l'enzyme de cette patiente en présence de S-adénosylméthionine contrairement à une activité multipliée par 3 pour les contrôles. Cette mutation introduite dans un système d'expression de *E. coli*, l'activité de l'enzyme a été mesurée à différentes concentrations de S-adénosylméthionine. Encore, cette construction n'a pas montré de signe de stimulation par le substrat à n'importe quelle concentration alors que la construction normale était fortement stimulée. Cette donnée suggère que la mutation asp444asn interfère avec la régulation de la CBS par la S-adénosylméthionine. De plus, cela met en exergue l'importance de la régulation par ce composé de la voie de la transulfuration dans l'homéostasie de l'homocystéine chez l'humain.

D- Les effets cellulaires :

1- Les effets cellulaires de l'hyperhomocystéinémie :

Deux grands effets sont constatés sur la cellule dans les cas d'hyperhomocystéinémie :

- ✓ L'hypométhylation des phospholipides, des protéines et de l'ADN.
- ✓ Le stress oxydatif dû à une modification du potentiel redox de la cellule.

a- L'hypométhylation :

Comme l'on démontré Yi *et al.*(39) , la S-adénosyl-méthionine et la S-adénosyl-homocystéine sont d'importants indicateurs métaboliques de l'activité de méthylation de la cellule, le premier en temps que substrat et le deuxième en temps que produit des principales réactions de méthylations de la cellule.

Toutes les méthyltransférases présentes dans la cellule sont régulés in vivo par le ratio SAH/SAM. Le SAH régule aussi la synthèse de méthyltétrahydrofolate indirectement par la levée de l'inhibition de la MTHFR par le SAM.

Une élévation chronique de la SAH réduit la méthylation de l'ADN, de l'ARN, des protéines et des phospholipides. Il existe une grande affinité de la SAH pour le site actif des méthyltransférases cellulaires ; cette affinité induit une inhibition de l'enzyme.

- **Au niveau de l'ADN et de l'ARN :**

Une étude sur des cellules hépatiques de rat effectuée par Wainfan *et al.* (40), a montré qu'un régime pauvre en méthyl induisait une augmentation du renouvellement des cellules hépatiques et augmentait l'incidence des cancers. Les mécanismes responsables de cette augmentation des cancers induits ne sont pas complètement élucidés. L'hypothèse de cette étude était que le régime pauvre en méthyl, en induisant une baisse du pool de S-adenosyl-méthionine, entraînait une baisse de la méthylation de l'ADN avec pour conséquence une modification de l'expression des gènes qui jouent un rôle dans la régulation de la croissance cellulaire.

Ce phénomène se retrouve aussi au niveau de l'ARN dans une étude de Sitz *et al.* (41) Le 5.8S ARN ribosomal (ARNr) est présent dans les tissus normaux sous la forme d'un résidu 2'-O-méthylé de l'acide uridilique qui est méthylé dans le cytoplasme. Il constitue une des sous-unités de formation du ribosome qui est la centrale de production cytoplasmique des protéines. Des changements du ratio SAM/SAH induits par une inactivation de la vitamine B12 qui est un coenzyme de la MTHFR, entraînent d'autres changements dans le taux de méthylation de cet ARNr. Le ratio de méthylation trouvé sur du tissu neurologique humain inactivé pour la vitamine

B12 montre qu'il existe une inhibition des méthyltransférases responsables de l'activation de cet ARNr.

Fell *et al.* (42) ont montré que la synthèse de novo folate dépendante de l'acide thymidilique précurseur de la thymidine formant une des bases de l'ADN est inhibée par de fortes concentrations de L-homocystéine. De plus, la capacité des cellules à incorporer des serines à 2 carbones et des glycines à 3 carbones à l'ADN est diminuée par la présence de L-homocystéine.

- **Au niveau des phospholipides :**

Hoffman *et al.* (43) ont étudiés le rôle de la méthylation des phospholipides et de la phospholipase A2 sur la fonction "Natural Killer" (NK) des cellules mononucléaires humaines.

Un pré-traitement des cellules effectrices par un inhibiteur de la méthyltransférase, la 3-déazaadénosine, en présence d'homocystéine thiolactone, réduit de façon dose-dépendante la cytotoxicité. Cet effet est dû essentiellement à une inhibition de la méthylation des phospholipides et non à un effet sur les acides nucléiques ou sur les protéines. Ce rôle de la méthylation des phospholipides est prouvé par l'observation de l'interaction entre les tumeurs cibles sensibles aux NK et les cellules mononucléaires qui entraîne une augmentation de la méthylation des phospholipides uniquement en présence des cellules cibles. Ainsi, une diminution de la méthylation des phospholipides entraîne une incompétence des cellules mononucléaires.

b- Le stress oxydatif :

Le glutathion est issu du métabolisme de l'homocystéine via la voie de la transulfuration. Il protège la cellule des dommages causés par l'oxydation en maintenant le stock de protéines du groupe sulfhydryl ainsi que d'autres composants dans leur forme réduite. C'est le principal système

tampon de la cellule. Une baisse de la production de glutathion entraîne une variation importante et très toxique du pH intracellulaire.

Un mécanisme cellulaire important affecté par une variation du status redox de la cellule est la synthèse des glycoprotéines dans le reticulum endoplasmique (5) qui dépend de la formation de ponts disulfides à l'intérieur des chaînes protéiques pour en assurer la cohérence.

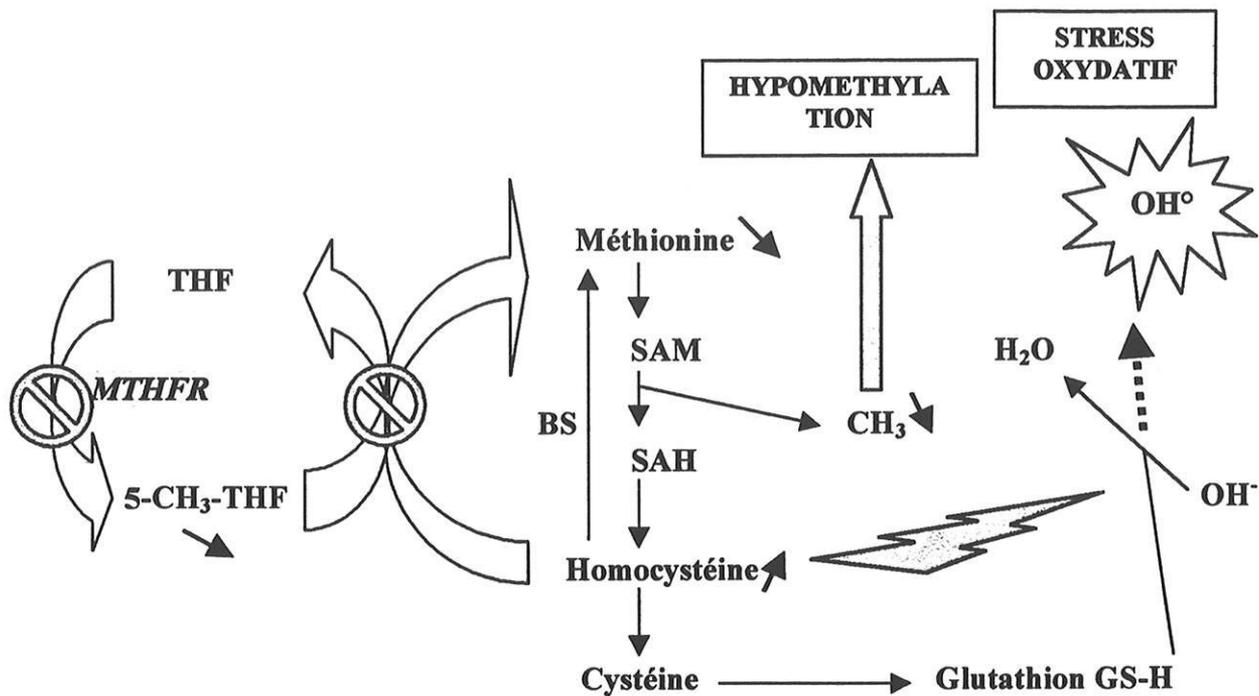
2- Les effets cellulaires en fonction des enzymes impliquées :

a- Atteinte de la voie de la reméthylation :

Dans cette voie, sont impliqués des déficits partiels en folates ou B12, en MTHFR, ou en méthionine synthétase. Il résulte de ce dysfonctionnement une diminution du pool de méthionine car, la voie de la reméthylation étant shuntée, il n'y a plus de conversion de l'homocystéine en méthionine par la méthionine synthétase. La seule voie de régénération de la méthionine reste la voie annexe de la bétaine synthétase(BS) qui n'assure, en temps normal que 10% de la conversion de l'homocystéine.

Ce mécanisme implique que la cytotoxicité de l'hyperhomocystéinémie soit dûe essentiellement à l'hypométhylation.

Néanmoins, le stress oxydatif peut être impliqué. En effet, bien que la synthèse de glutathione soit conservée, l'homocystéine en excès du fait de l'absence de conversion en méthionine est à des concentrations élevées. Comme nous le verrons plus tard, l'hyperhomocystéinémie entraîne un largage massif d'ions peroxydes et d'autres radicaux libres. Ceux-ci peuvent rapidement lors d'une intoxication chronique par l'hyperhomocystéinémie déborder les capacités de tampon du glutathion ou des autres thiols présents dans la cellule.



b- Atteinte de la voie de la transulfuration :

Dans ce cas, il existe un déficit partiel en CBS ou en vitamine B6. La voie de la transulfuration est atteinte et compromet le potentiel réducteur de la cellule mais, dans ce cas, l'homocystéinémie est moindre et le pouvoir générateur de radicaux libres de l'homocystéine est atténuée. Il n'existe pas de défaut de méthylation.

E- Les effets sur les organes et systèmes :

1- Sur le système cardio-vasculaire :

a- Histo et physiopathologie :

- au niveau endothélial :

L'homocystéine peut affecter toute cellule composant le mur vasculaire mais l'endothélium semble particulièrement vulnérable. Wall *et al.* (44,45) ont montré que les dommages occasionnés par l'homocystéine sont dose-dépendants. Harker *et al.* (46) ont démontré

que, après cinq jours de perfusion d'homocystéine thiolactone, il existait une desquamation endothéliale. De même, ils ont perfusé pendant trois mois des babouins à de hautes doses d'homocystéine et ont retrouvé des lésions athérosclérotiques identiques à celles retrouvées chez les humains. Il existe les mêmes lésions en perfusant de la cystéine. Il semblerait que ce soit une perturbation du mécanisme oxydatif de l'homocystéine qui soit en jeu.

L'auto oxydation de l'homocystéine (47) commande non seulement la formation de l'homocystéine mais aussi celle des disulfites mixtes et celle de l'homocystéine thiolactone. Elle stimule aussi la production de molécules d'oxygène actif comme l'anion super oxyde, le peroxyde d'hydrogène ou le radical hydroxyl qui exercent une importante action oxydative néfaste. In vitro, les études indiquent que des taux élevés d'homocystéine exercent un effet toxique sur les cellules endothéliales en augmentant la production d'hydrogène peroxyde. Les thiols sont connus pour protéger contre les dommages des xéno biotiques en régulant l'équilibre redox intracellulaire et en servant de substrat aux enzymes chélateurs des molécules d'oxygène actif. Ces réactions commandent à la formation de radicaux libres thiyl qui sont des molécules potentiellement réactives dans les conditions physiologiques. Ces radicaux libres induisent l'élévation des taux d'homocystéine qui initient la peroxydation des lipides avec leurs conséquences fâcheuses sur les cellules composant le mur vasculaire.

A des concentrations normales, l'homocystéine interagit avec le NO pour produire le S-nitrosohomocystéine qui amplifie l'effet vasoprotecteur du NO. Les cellules endothéliales détoxiquent l'homocystéine en libérant le NO ou un complexe S-nitrosothiol qui conduira à la formation de S-nitrosohomocystéine. Cette chaîne de réaction fait diminuer la production de peroxyde d'hydrogène suivant l'oxydation des groupes sulphydryl.

En comparant avec l'homocystéine, le S-nitrosohomocystéine possède des propriétés NO-like comprenant le potentiel vasodilatateur et la faculté de diminuer l'agrégabilité des plaquettes mais ce complexe ne peut être converti en homocystéine thiolactone. Ce mécanisme de protection peut être dépassé par une exposition chronique des cellules endothéliales à l'hyperhomocystéinémie.

La bio disponibilité diminuée de NO peut aussi être due à une production inadaptée. Les thiols comme l'homocystéine peuvent atténuer la production endothéliale de NO actif par le biais des radicaux anions super oxyde qui favorisent la peroxydation des lipides.

Les dommages au niveau de l'endothélium peuvent avoir un effet néfaste sur la vasodilatation artérielle flux-dépendant qui est un marqueur précoce de l'athéromatose.

Celermajer *et al.* (48) ont confirmé la dysfonction endothéliale en réponse à une hyperémie chez les artères brachiales et fémorales de patients hyperhomocystéinuriques. Joannides *et al.* ont démontré le rôle essentiel, *in vivo*, du NO dans la dilatation artérielle radiale chez l'humain dépendant du flux sanguin.

- **au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires :**

Lentz *et al.*(49) ont démontré la dysfonction vasculaire d'animaux chez qui une hyperhomocystéinémie avait été induite par la nourriture. La réponse vasomotrice, mise en évidence par la résistance des vaisseaux quantifiée par une angiographie *in vivo*, révèle la mauvaise adaptation des vasodilatateurs dépendant de l'endothélium comme dans la réponse au nitroprusside qui est indépendante de l'endothélium. Cette assertion suggère que l'endothélium intervient sûrement dans le processus pathologique de l'hyperhomocystéinémie mais qu'il existe

aussi vraisemblablement une participation de la cellule musculaire lisse du mur vasculaire. Harker *et al.* (46) ont montré que la perfusion d'homocystéine à des babouins induisait la formation de plaques d'athérome.

Dans une étude *in vitro*, Tsai *et al.* (50,51) démontraient que l'homocystéine à des taux relativement bas (0.1 mmol/l) augmentait la synthèse de l'ADN dans les cellules musculaires lisses aortiques du rat et de l'homme et stimulait leur prolifération excessive. Ce phénomène peut être expliqué par une production accrue d'ARN messenger de cyclin A et D1 qui reflète le retour dans un cycle mitotique des cellules quiescentes. Pour corroborer cela, Lubec *et al.* (52) reportaient que l'administration orale d'homocystéine est étroitement liée à la stimulation de la cyclin-dépendant kinase qui initie la mitose.

In vivo, l'excès d'homocystéine augmente la prolifération et la synthèse de l'ADN des cellules musculaires lisses en activant le couple récepteur/transporteur de la diacylglycérol-dépendant protéine kinase C (PKC) qui, en retour induit l'expression des protooncogènes *c-fos* et *c-myb*.

La cycline(Cyc)-dépendante kinase (CDK) est nécessaire à la fois dans la phase S et la phase G2/M du cycle cellulaire et par conséquent elle est présente dans les phases de réplication de l'ADN et dans la mitose. L'homocystéine a prouvé son rôle dans l'induction de la synthèse de *Cyc-A*, *Cyc-D1* et *Cyc-A1* au niveau des cellules musculaires lisses. A des concentrations de 1mM, l'homocystéine augmente les taux d'ARN de *Cyc-D1* et *Cyc-A* chez la cellule lisse musculaire aortique des rats de facteurs 3 et 15 respectivement confirmant le rôle important de l'homocystéine dans l'induction de la synthèse de gènes permettant à la cellule de réintégrer un cycle cellulaire de réplication.

Ainsi, l'expression de *Cyc-A* induite par l'homocystéine permet d'accélérer la production de lésions d'athéromatose en promouvant la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires.

- **au niveau des lipides de membranes :**

On peut penser que la modification par oxydation des "low-density lipoprotein" (LDL) n'est pas seulement due aux dommages endothéliaux mais aussi à la formation des cellules spumeuses dérivées des macrophages (47). Les LDL modifiés par l'oxydation sont présents dans la plaque d'athérome chez l'homme. L'homocystéine comme d'autres thiols font preuve de certaines propriétés délétères à partir du moment où les groupes sulphydryl apparaissent pour catalyser, grâce aux ions ferriques et cupriques au sein d'un système d'oxydation, la formation de super oxyde, de peroxyde d'hydrogène, de radicaux hydroxyl et de radicaux homocystéinyl. Hirano *et al.* (53) ont montré la diminution des taux d'acides gras poly insaturés lors de l'oxydation des LDL induite par un mélange Fer/homocystéine.

L'effet toxique direct de l'homocystéine sur les cellules vasculaires pourrait être influencé par l'homocystéine thiolactone qui est un lactone à cycle interne de haute réactivité qui est produit pendant l'oxydation de l'homocystéine. Ce composé thiolate se fixe aux groupes aminés libres des HDL induisant la formation d'agrégats qui sont incorporés par les macrophages et les cellules spumeuses aux premiers stades de l'athérosclérose.

Au total, l'homocystéine thiolactone possède de graves effets athérogènes comprenant une destruction intimale, l'oxydation lipidique, l'hyperplasie myointimale, le dépôt de glycoaminoglycans, la fibrose et aussi la diminution de l'activité plaquettaire. Voir Annexe 1.

- **au niveau hémostatique :**

Les effets pro thrombotiques de l'homocystéine (47) peuvent être une conséquence, d'une part de la réduction des ponts disulphides de la thrombomoduline ou de la protéine C ou d'autre part de l'altération du potentiel redox intracellulaire précipité par l'oxydation des thiols réduits.

Les effets de l'homocystéine sur l'hémostase peuvent être le résultat de :

- L'accroissement de l'activité du facteur V associé à la cellule endothéliale
- La diminution de l'activité de la protéine C
- L'inhibition de l'expression en surface de la thrombomoduline ou l'inhibition de son cofacteur
- L'augmentation de l'expression du "tissue factor"
- La diminution de l'activité de l'antithrombine III
- La diminution de l'activité du facteur VII parallèlement à l'augmentation de celle du facteur XII
- La diminution de l'activité du "tissue plasminogen activator" due à une inhibition directe de son transporteur vers la cellule endothéliale via la protéine porteuse de phospholipide annexin II
- La diminution de la formation et de la sécrétion du facteur Von Willebrand
- La liaison excessive de la lipoprotéine à la fibrine
- La suppression de l'expression de l'héparine sulfate dans l'endothélium

- L'augmentation du turn-over plaquettaire et diminution de la durée de vie des plaquettes
- L'augmentation de la formation du Thrombine A 2 dans les plaquettes initiant leur activation

Il faut savoir que tous ces effets délétères ne sont pas propres à l'homocystéine mais peuvent se retrouver avec tous les acides aminés contenant un thiol libre.

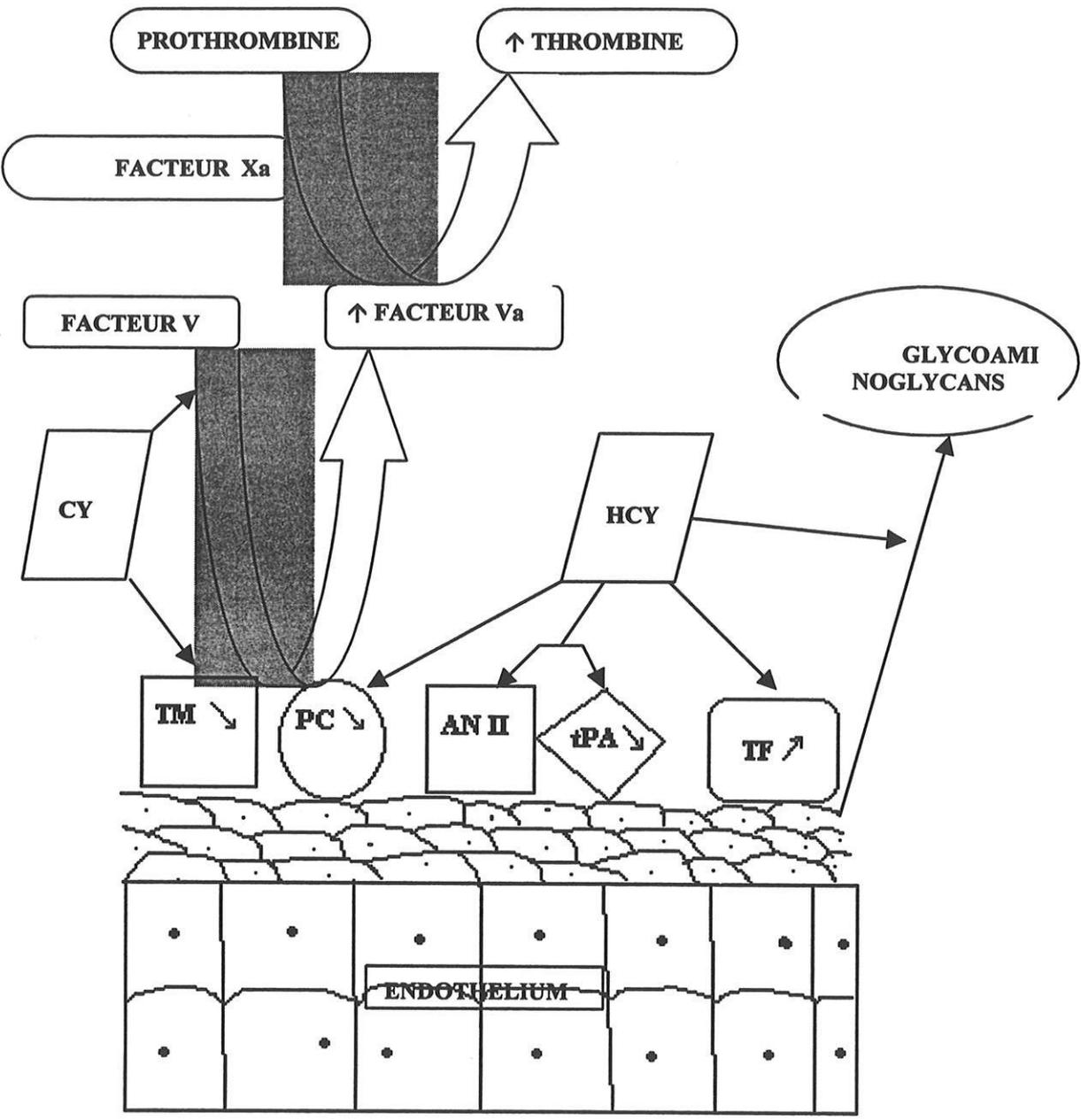
L'effet de l'homocystéine sur le système de la protéine C qui est la principale voie de régulation de la coagulation, est probablement de première importance. L'homocystéine stimule l'activation du facteur V. De hautes concentrations en homocystéine diminue l'activation de la protéine C et, en retour, conduit à rendre inefficace l'inactivation du facteur Va et donc augmente la formation de thrombine.

Cependant, la signification de l'altération de la fonction plaquettaire dans l'hyperhomocystéinémie modérée est soumise à doute. L'augmentation de la synthèse du Thromboxane A2 ou la réduction de l'activité de l'antithrombine III ont été décrites seulement dans l'hyperhomocystéinémie homozygote et ces faits n'ont pas été confirmés par d'autres études. De plus, des études, examinant les effets de l'homocystéine sur les dysfonctions endothéliales, ont eu des résultats négatifs. De Jong *et al.* (54) n'ont pas retrouvé d'association significative entre l'hyperhomocystéinémie et les marqueurs protéiques de la cellule endothéliale (von Willebrand facteur ((vWF)), tissue-type plasminogen activator, thrombomodulin, plasminogen activator inhibitor-1 et cellular fibronectin) chez des sujets en bonne santé de plus de 56 ans.

A contrario, Freyburger *et al.* (55) reportent que l'hyperhomocystéinémie modérée chez des patients présentant une pathologie artérielle est associée à une élévation significative des facteurs VIII c, vWF et du complexe thrombine-antithrombine dans le plasma. Domagala *et al.* (56) ont montré que la formation de thrombine est favorisée seulement chez les patients dont les taux augmentés d'homocystéine sont supérieurs à 60 $\mu\text{mol/l}$. Cette observation semble suggérer qu'il existe un seuil au-delà duquel l'hyperhomocystéinémie possède un effet sur le mécanisme thrombogénique.

Il est, de plus, incertain que la supplémentation en acide folique, vitamine B 6 et vitamine B 12 altère l'effet thrombogénique de l'hyperhomocystéinémie par diminution des taux d'homocystéine. Freyburger *et al.* (55) ont montré qu'un apport quotidien de 10 mg d'acide folique et de 500 mg de vitamine B 6 chez 20 patients présentant des atteintes précoces d'athérosclérose ne modifie pas les paramètres hémostatiques mis à part la protéine C dont le taux diminue après le traitement.

Par contre, un travail plus récent consistant en une injection intramusculaire de 5 mg d'acide folique et de 1 000 μg de vitamine B 12 par semaine, diminue la formation de thrombine dans le sang périphérique et au niveau des dommages sur la micro vascularisation, indépendamment du degré d'atteinte d'athérosclérose. De plus, Domagala *et al.* (56) ont découvert que les patients dont le taux d'homocystéinémie est supérieur à 60 $\mu\text{mol/l}$ présentent la plus importante baisse de la production de thrombine sous traitement vitaminique.



HCY : homocystéine TM : thrombomoduline PC : protéine C
 TF : tissue factor AN II : annexine II tPA : tissue-type plasminogen activator

Cibles possibles de l'homocystéine dans les mécanismes hémostatique en association avec les cellules endothéliales.

- autres effets :

Il a été montré que des taux d'homocystéine compris entre 10 et 50 $\mu\text{mol/l}$ affecte la méthylation de l'ADN et celle des protéines associées aux protéines des membranes entraînant une altération de l'expression génique et de la fonction protéique (57, 58, 59).

En présence d'adénosine, l'homocystéine mais pas la cystéine, augmente le niveau de la S-adenosylhomocystéine qui est un puissant inhibiteur de la réaction de transfert du groupement méthyl. La réduction de la méthylation cellulaire qui en découle, a été retrouvée dans les cellules endothéliales vasculaires mais pas dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux, corrélation faite avec le fait que l'homocystéine possède un pouvoir inhibiteur de la phase G1 du cycle cellulaire. L'hypométhylation de la protéine 21 ^{ras} (un régulateur de la phase G1 associé à la membrane cellulaire des cellules endothéliales) induite par l'homocystéine résulte de la diminution d'activité des protéines kinases stimulées par le mitogène (60). D'autre part, l'inhibition de la croissance de la cellule endothéliale par l'homocystéine peut aussi être associée à l'hypométhylation de protéines comme la lamine B et la phosphatase 2A (61). L'acylation des résidus de lysine dans les protéines par l'homocystéine thiolactone peut contribuer à la toxicité cellulaire si celle-ci est concomitante d'une hyperhomocystéinémie (62, 63).

L'homocystéine a démontré son rôle dans l'hyper stimulation du récepteur glutamate type N-méthyl-D-aspartate. A des concentrations de 10 à 100 $\mu\text{mol/l}$, l'homocystéine se comporte comme un agoniste direct du récepteur glutamate, conduisant à un flux excessif d'ions calcium et à une production excessive de molécules d'oxygène réactif (64, 65).

Dalton *et al.* (66) ont montré que, dans les muscles lisses dérivés de la crête neurale, l'homocystéine pouvait stimuler un N-méthyl-D-aspartate récepteur spécifique qui est

couplé à la production de diacylglycérol et à l'activation de la protéine C kinase. Ce mécanisme pourrait expliquer la stimulation de la production cellulaire retrouvée dans l'hyperhomocystéinémie.

Majors *et al.* (67) montrent que l'homocystéine augmente l'accumulation de collagène de types I, III et V chez des cultures de cellules musculaires lisses artérielles de lapin ; l'héparine et le polysulfate pentosan sont actifs pour bloquer ce processus. Cette observation suggère que l'hyperhomocystéinémie conduit à une diminution de la composante élastique du mur vasculaire par la lyse de l'élastine provoquée, en partie, par l'activation directe des métalloprotéases.

L'homocystéine influe aussi sur la fonction leucocytaire. Dans des cultures de cellules endothéliales provenant de veines ombilicales, l'augmentation de l'adhésion des monocytes et leur migration ont été associées à des taux d'homocystéine relativement élevés (< 50 $\mu\text{mol/l}$). Ce phénomène a pu être initié par l'activation des protéines de surface des monocytes de types CD11b/CD18 et CD14 à des taux relativement bas d'homocystéine et paraît être dose-dépendant et significativement plus sélectif pour l'homocystéine que pour la cystéine (68, 69).

Jacobsen *et al.* (70) ont observé l'amélioration du chimiotactisme des monocytes pour les protéines 1 et l'interleukine 8 mais pas pour l'interleukine 1 β et le tumor necrosis factor pour des concentrations identiques d'homocystéine. Ces résultats impliquent que l'hyperhomocystéinémie promouvoit l'athérogenèse précoce grâce à un recrutement accru des monocytes. L'homocystéine augmente l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales et par-là même contribue à la libération de celles-ci.

b- Atteinte du système cardio-vasculaire :

• La maladie coronarienne :

Jusqu'à il y a 5 ans environ, toutes les études impliquant l'hyperhomocystéinémie comme facteur de risque dans la pathologie coronarienne étaient rétrospectives. Une étude de Clarke *et al.*(71) suggéra que les taux élevés d'homocystéine soit un facteur de risque indépendant avec un odds ratio de 3.2. Plus récemment, Boushey *et al.* (72) ont réalisé une méta-analyse sur 27 études relevant de l'hyperhomocystéinémie et son rôle dans la maladie athéromateuse et sur le rôle des taux de folates sur ceux de l'homocystéine. L'odds ratio pour cette maladie à des taux d'homocystéine de 5 $\mu\text{mol/l}$ était de 1.6 pour les hommes et de 1.8 pour les femmes. De plus, cette augmentation des risques est linéaire en fonction des taux d'homocystéine et ne présente aucun palier ou effet seuil. Il a été démontré que le bénéfice de la diminution des taux d'homocystéine est applicable à une grande majorité de la population adulte.

Une étape importante dans les investigations prospectives a été la détermination des taux d'homocystéine dans la "U.S. Physicians Health Study"(73). Cinq ans après leur incorporation dans l'étude, 271 hommes ayant présenté un infarctus du myocarde ont été comparés à 271 contrôles. Dans les premiers, le taux plasmatiques d'homocystéine était significativement plus élevé : 11.1 ± 4 vs. 10.5 ± 2.8 $\mu\text{mol/l}$, $p = 0.03$. Dans un sous-groupe, le risque relatif pour les plus hauts taux définis par le 5^{ème} percentile vs. ceux plus bas définis par le 9^{ème} percentile était de 3.1 (95% d'intervalle de confiance, 1.4 à 6.9, avec un $p = 0.005$). Ce risque passait à 3.4 (95% d'IC, 1.3 à 8.8 avec un $p = 0.01$) si on intégrait en plus des facteurs de risque comme le diabète, l'hypertension, l'hyperlipidémie ou la prise d'un traitement à base d'aspirine.

Dans une étude prospective initiée par Nygård *et al.* (74) sur 587 patients présentant un insuffisance coronarienne objectivée par une angiographie, l'hyperhomocystéinémie s'est révélée

être un facteur prédictif très puissant de mortalité. Quand les patients avaient un taux inférieur à 9 $\mu\text{mol/l}$, la mortalité était comparable au groupe témoin ; lorsque le taux était compris entre 9.0 et 14.9, l'OR pour la mortalité était de 1.9 ; il était de 2.8 pour des taux entre 15.0 et 19.9 et de 4.5 pour des taux supérieurs à 20.0. Cette étude a été validée par une autre étude, l'étude COMAC (75), portant sur des patients de 19 centres dans 9 pays européens.

- **La maladie ischémique cérébrovasculaire :**

Une association positive entre l'homocystéine et la maladie cérébrovasculaire a été reportée dans différentes études. Mais les résultats sont parfois paradoxaux. Ainsi, dans une méta-analyse de onze études effectuée par Boushey *et al.* (72) sur l'hyperhomocystéinémie en tant que facteur de risque de l'attaque cérébrale, 9 études cas-témoins ont montré que l'hyperhomocystéinémie était un facteur de risque indépendant alors que deux études prospectives montraient le contraire.

Cette méta-analyse incluait l'étude COMAC (75) qui objectivait un risque deux fois supérieur d'attaque chez des patients ayant un taux d'homocystéine après test rapide et MLT situé dans le cinquième supérieur comparativement aux autres patients dont le taux se situait dans les 4/5^{ème} inférieurs.

On peut, néanmoins, penser que l'hyperhomocystéinémie confère un risque de maladie vasculaire cérébrale identique aux autres risques habituellement en cause tout en étant indépendant de ceux-ci et elle a, de plus, un effet multiplicatif en étant associée à d'autres risques comme le tabac, l'hypertension ou l'hypercholestérolémie.

Dans l'étude prospective "British Regional Heart Study"(76), un gradient linéaire d'association de l'hyperhomocystéinémie et de l'attaque cérébrale a été observée et de même dans une autre étude réalisée aux Pays-Bas.

- **La maladie vasculaire périphérique :**

Des observations initiales sur l'association positive entre l'hyperhomocystéinémie et l'incidence de la maladie vasculaire périphérique ont été faites par Boers *et al.*(77, 78) et Brattstrom *et al.* (79)

Malinow *et al.* (80) ont détecté de hauts niveaux d'homocystéine chez des patients présentant cette maladie vasculaire en comparaison de contrôles indemnes. Dans l'étude de Clarke *et al.* (71), les patients présentant une hyperhomocystéinémie ont un odds ratio plus important de développer tous types de pathologies vasculaires incluant la pathologie périphérique.

Dans l'étude COMAC (75), des taux importants d'homocystéine sont associés de façon indépendante avec des morts découlant de maladies cardiovasculaires et des progressions non fatales de maladies cardiovasculaires chez des patients présentant une pathologie vasculaire périphérique symptomatique.

- **La thrombose veineuse profonde :**

Les études initiales sur le risque de thrombose veineuse profonde dans l'hyperhomocystéinémie ont été faites par Brattstrom *et al.*(79) et Bienvenu *et al.* (81).Den Heijer *et al.* (82) ont étudiés 185 patients qui présentent des thromboses profondes récurrentes et qui avaient, pour 64 d'entre eux, un taux d'homocystéine élevé mesuré par test rapide. Dans ce groupe de patients, l'hyperhomocystéinémie était associée à un risque accru de développer une thrombose

veineuse profonde. Cette assertion a été corroborée par une méta-analyse regroupant neuf cas-témoins.

Une étude prospective (83) a montré que le facteur V Leiden, une mutation du gène codant pour le facteur V, associé à une hyperhomocystéinémie modérée augmente le risque de thromboembolisme idiopathique.

- **Malformations cardiaques :**

Les anomalies congénitales du cœur sont souvent le résultat d'un développement incomplet du muscle cardiaque durant les 6 premières semaines de gestation. En embryologie, on apprend que la crête neurale, un dérivé du système nerveux est responsable de la formation du septum conotruncal. Il est donc compréhensible que l'hyperhomocystéinémie, influant sur la formation de cette crête (Cf. infra) soit aussi responsable d'anomalie dans la morphogenèse du cœur.

Une étude initiée par Kapusta *et al.* (84) a porté sur 27 mères dont les enfants étaient porteurs de malformations sans anomalie chromosomique.

Les résultats ont montré que les taux d'homocystéine mesurés par un test rapide étaient significativement plus élevés chez ces mères dont les enfants étaient atteints comparativement aux mères dont les enfants étaient sains. Par contre, il est intéressant de noter que le test de charge n'était pas significatif ; de même que les dosages en folates intra-érythrocytaire, le dosage de B12 et le dosage de la B6. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que cette anomalie impliquerait plus la voie de la reméthylation plutôt que la voie de la transsulfuration.

A cause du rôle de la crête neurale dans la septation du cœur, on conçoit donc que le métabolisme de l'homocystéine s'il est perturbé peut interférer sur ce processus comme sur le processus de fermeture de la crête neurale comme nous le verrons dans le chapitre suivant. Il n'a jamais été reporté de cas d'embryon présentant les deux anomalies cardiaque et neurologique en même temps probablement parce que ces deux anomalies conjointes conduisent à un avortement précoce.

Dans cette étude, toutes les anomalies cardiaques quelles qu'elles soient étaient prises en compte. Néanmoins, il serait incorrect de penser que toute anomalie cardiaque peut être due à une hyperhomocystéinémie. Le fait est que les femmes présentant une hyperhomocystéinémie ont un risque accru d'avoir des enfants porteurs de malformations cardiaques de toutes formes mais ceci laisse à penser que les mécanismes de ces malformations ne sont pas encore totalement connus et surtout l'implication de l'hyperhomocystéinémie dans celles-ci.

2- Sur le système nerveux :

a- Action de l'homocystéine sur le tissu nerveux :

L'homocystéine peut entraîner des scissures dont le mécanisme n'est pas complètement élucidé. Par contre, on sait que l'homocystéine peut provoquer une neurotoxicité directe en activant le sous-type NMDA du récepteur glutamate(66). La stimulation excessive de ces récepteurs est connue pour entraîner des dommages cérébraux dans les ischémies locales. Aussi, l'homocystéine n'est pas seulement en cause dans le dommage vasculaire entraînant l'attaque mais elle participe aussi à la réponse néfaste du tissu neural dépendant des vaisseaux lésés.

De plus, l'homocystéine et l'acide cystéine sulfinique jouent de concert avec le glutamate comme une sorte d'excitateur des éléments GABAergiques neuronaux ou gliaux. Ce rôle peut être contrôlé par la réaction inverse sur le glutamate ou sur le transporteur du GABA et de même sur

l'activation du récepteur NMDA. Or, l'homocystéine est un antagoniste pour le site porteur du glutamate du récepteur NMDA et, de plus, elle semble être un antagoniste partiel de la glycine qui est présente sur ce site comme coagoniste. Ainsi, lorsqu'il existe des conditions particulières induisant une augmentation du taux de glycine comme dans une attaque cérébrale ou dans un traumatisme crânien, l'homocystéine est neurotoxique sous son rôle agoniste à des concentrations de 10 à 100 $\mu\text{mol/l}$ dépassant son activité neuroprotectrice antagoniste. Dans ces conditions, le dommage cérébral est dû à un afflux excessif d'ion Ca^{2+} et à la production d'oxygène actif. De plus, la super stimulation dans ce cas des récepteurs NMDA contribue à la neurotoxicité de l'homocystéine.

b- Les défauts de fermeture du tube neural :

Un cycle de la méthionine perturbé peut altérer le développement de l'embryon. Chez le rat, un manque de méthionine et de S-adenosyl-méthionine conduit à perturber la morphogenèse, spécialement la fermeture du tube neural.

Il a été établi que les anomalies du tube neural avaient une origine multifactorielle, incluant les aberrations chromosomiques comme la trisomie 18, les mutations géniques et les médicaments tératogènes. Néanmoins, il existe de fortes présomptions sur le fait qu'un cycle de la méthionine perturbé peut, à lui seul, conduire à la formation de défauts du tube neural.

En 1997, Bjorke-Monsen *et al.* (85) ont rapporté l'étude de 28 enfants souffrant de spina bifida et ayant des taux élevés d'homocystéine en comparaison de 76 contrôles. Seize sur les 28 enfants atteints avaient une voire deux mutations 677C-T de la MTHFR. Steegers-Theunissen *et al.* (86) ont démontré qu'il existait une hausse significative de l'homocystéine amniotique chez les patientes porteuses d'un fœtus atteint d'anomalies du tube neural comparativement à d'autres

patientes indemnes. Chez les patientes ayant avorté d'un fœtus atteint, ils ont pratiqué un MLT qui a confirmé que ces patientes présentaient un taux sensiblement plus élevé d'homocystéine par rapport à un groupe témoin.

De même, Mills *et al.* (87), dans une étude comparable a démontré ces résultats.

Il existe différents mécanismes évoqués pouvant conduire devant un cycle de la méthionine perturbé à une anomalie de fermeture du tube neural. Ceux-ci ne sont que partiellement confirmés.

Van der Put *et al.* (88) ont rapporté une prévalence pour l'homozygotie à MTHFR,677C-T de 2.9 à 3.7 fois supérieure chez les parents d'enfants présentant une anomalie du tube neural versus les parents de groupe contrôle. La MTHFR thermolabile peut ainsi expliquer les taux d'homocystéine observés.

Posey *et al.* (89) ont suspecté qu'environ 20% des défauts du tube neural sont causés par une mutation du gène de la MTHFR.

Par contre, il ne semble pas qu'une mutation de la CBS soit en jeu, écartant ainsi l'implication de la voie de la transulfuration ; de même, une mutation de la méthionine synthétase ne semble pas être, elle aussi, en cause.

La pierre d'angle du développement des anomalies du tube neural n'est pas uniquement la baisse de la biodisponibilité des folates dans leur forme active (5 méthylène tétrahydrofolate) mais plus une carence en acide folique. Quand des patientes ayant présenté lors d'une grossesse antérieure un problème de fermeture du tube neural, prennent 4 mg d'acide folique de 4 semaines

avant la conception jusqu'à 12 semaines de grossesse, elles diminuent de 72% le risque de récurrence d'un nouveau problème comparativement à un groupe témoin (MRC, Vitamin Study Research Group : 90, 91). Comme le développement et la fermeture du tube neural interviennent de façon précoce dans la grossesse (entre le 30^{ème} et le 43^{ème} jour de gestation), il n'est pas surprenant que la prise d'acide folique doit être entreprise très tôt voire même avant la conception pour prévenir de façon efficace les anomalies du tube neural.

Il est à noter que non seulement la récurrence mais aussi l'apparition de novo d'anomalie peuvent être prévenues par l'administration d'acide folique (Czeizel et Dudas, 92).

En plus de l'acide folique, il semble que la vitamine B12 joue aussi un rôle dans cette pathologie. Il existe différents rapports (Haddow *et al.*,93) de patientes ayant subi une dérivation gastrique, situation connue pour entraîner une malabsorption de la B12 et qui, étant enceintes, ont eu des enfants atteints d'anomalies du tube neural.

c- Les désordres neuro-psychiatriques (94, 95):

Une diminution de l'activité de la méthionine synthétase a été suspectée comme cause probable des anomalies neuro-psychiatriques vues dans les déficits de la cobalamine de part l'importance de la méthionine et du S- adénosyl-méthionine dans les multiples réactions de méthylation incluant celle de la myéline qui est dépendante de ce dernier composé.

L'homocystéinémie est élevée chez les patients ayant un déficit en folates ou en cobalamine sans préjuger de l'existence ou non de troubles neurologiques. Le taux de méthionine est, lui, maintenu dans la grande majorité des sujets. Ceci suggère que les taux de méthionine et le degré de méthylation sont maintenus quelle que soit la sévérité des déficits en folates et/ou en cobalamine. Une telle préservation peut être due à la réaction enzymatique où la bétaine et

l'homocystéine sont converties en N,N-diméthylglycine et méthionine, respectivement et où ni la cobalamine ni les folates ne sont impliqués.

Une diminution de l'activité du L-méthylmalonyl-CoA mutase a aussi été pressentie comme étant la cause des troubles neurologiques en substituant le substrat de l'enzyme aux dépends de l'acétyl-CoA et conduisant ainsi à l'accumulation d'acide gras de plus grand nombre de carbone ainsi qu'à la formation d'acide gras polymères, tous deux responsables de changement dans l'intégrité de la chaîne de myéline et donc une démyélinisation du tissu nerveux (96).

Les résultats de ces études ne peuvent supporter les hypothèses que seuls la MS et le L-méthylmalonyl-CoA sont responsables de ces anomalies.

Des études plus récentes ont montré la présence d'une mutation 677C-T de la MTHFR, enzyme qui conduit normalement à la formation de 5-CH₃-tétrahydrofolate qui est un des substrat de la MS. Mais une étude cas-témoins effectuée sur 9 patients présentant un déficit en cobalamine versus un groupe contrôle infirme le rôle majeur que pourrait avoir cette mutation dans les troubles neurologiques(30).

En résumé, il semble que les mécanismes impliquant le métabolisme de l'homocystéine dans les troubles neuro-psychiatriques ne soient pas encore totalement élucidés bien qu'il existe une quasi-certitude de cette participation.

3- Sur l'unité fœto-maternelle du placenta :

a- Le placenta de la patiente hyperhomocystéinémique :

La plupart des pathologies retrouvées sur le placenta montrent des anomalies de la placentation, mais elles ne sont ni spécifiques de l'hyperhomocystéinémie maternelle ni retrouvées sur tous les placentas.

Une réponse inadéquate de la part de la vascularisation maternelle à la placentation a été décrite dans la pré-éclampsie et dans le retard de croissance intra-utérin.

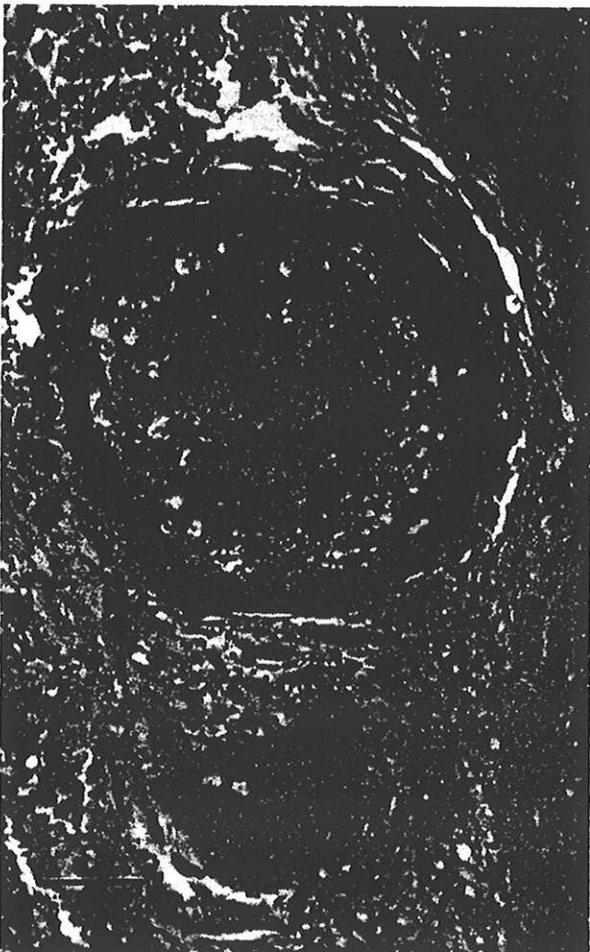
De façon typique, il existe une absence de changement de type de vascularisation des artères spiralées dans le lit placentaire, mécanisme normalement induit par le trophoblaste. Il en résulterait une athéromatose aiguë et une thrombose artérielle entraînant une diminution de l'apport sanguin se manifestant au niveau placentaire par une maturation accélérée des villosités et leur infarctissement. L'affaiblissement du mur vasculaire placentaire conduit au décollement.

Aucun placenta ne présente à lui seul toutes les anomalies décrites et il faut savoir que les artères spiralées maternelles ne sont pas toujours examinées sur les coupes placentaires. De plus, examiner ces artères sur la plaque basale du placenta ne détecte pas forcément la présence ou l'extension d'une lésion située à proximité dans le lit placentaire, dans la déciduale profonde ou dans le myomètre adjacent. Ainsi, on peut suspecter que les lésions retrouvées ne soient, en fait que la face émergée de l'iceberg.

Nous avons déjà vu que l'hyperhomocystéinémie produit des dommages endothéliaux, une prolifération des cellules musculaires lisses artérielles, un mauvais fonctionnement de la vasodilatation dépendant de l'oxyde nitrique et une thrombogénèse. Les mécanismes

pathogéniques de la thrombose dans cette maladie incluent une interaction entre l'inhibition de l'activateur du "Tissue Plasminogen" et l'homocystéine.

Il n'existe aucune certitude sur le possible effet de l'homocystéine sur l'activateur du plasminogène type urokinase et ses inhibiteurs, mais elle semble bien être en cause ne serait-ce que par le rôle du plasminogène protéolytique péricellulaire activateur dépendant dans la migration trophoblastique et dans le remodelage de la vascularisation maternelle. Toute rupture dans les interactions normales entre le trophoblaste et les tissus maternels par l'homocystéine peut entraîner un défaut de migration du trophoblaste et peut expliquer la placentation inadéquate retrouvée au niveau du placenta.



Artère spiralée maternelle dans la plaque basale montrant une importante athéromatose avec une thrombose endoluminale (hématoxyline et éosine, la barre représente 100 μ m). Autorisation de T. Y. Khong.

b- La pré-éclampsie :

La vasodilatation artérielle systémique représente le premier changement observé lors de la grossesse sur le système hémodynamique. Ce changement initie une série de cascades de compensation dans la circulation et le volume homéostatique qui inclue, entre autres, une augmentation du rendement cardiaque, une hémodilution et une activation du système rénine-angiotensine-aldostérone. Souvent, la pré-éclampsie est précédée d'anomalies de ces systèmes de compensation gestationnels précoces.

La plupart des symptômes observés lors d'une pré-éclampsie sont dus à une dysfonction de l'endothélium.

• La dysfonction endothéliale :

Les cellules endothéliales sont disposées stratégiquement pour servir de cellules sensibles aux signaux humoraux et hémodynamiques mais aussi pour servir de cellules effectrices susceptibles de relayer une réponse biologique affectant l'intégrité du mur vasculaire.

Pour maintenir l'homéostasie et la fluidité sanguine, ces cellules synthétisent différentes molécules dont les plus grandes sont la fibronectine, l'héparan sulfate, l'interleukine 1, le "Tissue Plasminogen Activator" (tPA) et différents facteurs de croissance, et pour les plus petites, la prostacycline (PGI₂), le "Endothelium-Derived Relaxing Factor" (EDRF), le facteur activant les plaquettes (PAF) et l'endothéline. La production de ces facteurs est modulée par des changements de concentrations de messagers secondaires intra-cellulaires comme l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), le guanosine monophosphate cyclique (GMPc) ou le calcium et les interactions entre les cellules endothéliales et les plaquettes, les globules blancs ou les constituants du plasma.

Le PGI2 et l'EDRF sont considérés comme les médiateurs les plus importants de la vasodilatation. PGI2, un eicosanoïde, est le vasodilatateur le plus puissant et un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire. L'EDRF connu actuellement sous le nom de Nitric Oxyde ou NO est un puissant vasodilatateur et un inhibiteur de l'adhésion et de l'agrégabilité plaquettaire. Des interactions synergiques existent entre ces deux éléments pour réguler l'homéostasie des interactions plaquettes/mur vasculaire.

Les dysfonctionnements endothéliaux jouent un rôle important dans la pathogenèse de la pré-éclampsie : augmentation des niveaux de facteur VIII : RAG, des niveaux de fibronectine et de fibronectine ED 1+, des taux d'endothéline, anomalie de la balance entre le tPA et le "Plasminogen activator inhibitor" ainsi que pour celle de PGI2/Thromboxane A2 (TXA2) (99, 100, 101).

La preuve morphologique de ce dysfonctionnement se retrouve dans la nature histologique des lésions : endothélite glomérulaire et changements ultrastructuraux du lit placentaire et des vaisseaux qui y sont insérés.

- **Hypothèses sur les causes de ce dysfonctionnement :**

- ❖ **1^{ère} Hypothèse** : l'hypothèse de l'ischémie placentaire d'Oxford (Redman, Sargent et Smarason):

Selon le groupe d'Oxford, la pré-éclampsie est un processus en deux temps.

Le premier temps comprend un processus qui affecte les artères spiralées maternelles entraînant une insuffisance maternelle d'apport sanguin au placenta.

Le deuxième temps prend en compte les effets de l'ischémie sur le versant maternel et sur le versant foetal (102).

Les membranes des microvillosités du syncytiotrophoblaste (STBMM) qui recouvrent les villosités chorioniques assurent la plus grande partie de la surface en contact entre le placenta et le sang maternel. Les STBMM des patientes pathologiques et celles ne présentant pas d'anomalie suppriment la prolifération des cellules endothéliales des artères spiralées dans les même proportions. Il semblerait donc que puisqu'il n'existe aucune différence quantitative, ce soit au niveau qualitatif que se situe la différence entre les deux groupes de patientes (104).

La pré-éclampsie est associée avec une augmentation du contenu en glycogène du trophoblaste et de l'activité de la glycogène synthétase, similaire à ce qui se passe dans la môle hydatiforme. L'accumulation de glycogène dans ces villosités syncytiotrophoblastiques est un marqueur métabolique de l'immaturité de ces cellules qui sont incapables de se diviser.

L'augmentation du glycogène apparaît être une autre expression du taux de turn-over de trophoblaste vilieux causé par l'augmentation de la prolifération cytotrophoblastique et par celle de la déportation trophoblastique. Les villosités cytotrophoblastiques du placenta produisent du TXA2 dont la quantité chute lorsque les villosités atteignent leur maturité en se différenciant en syncytiotrophoblaste. L'explication la plus logique de l'augmentation de la déportation du trophoblaste est la faculté qu'a le syncytiotrophoblaste à émettre des bourgeons qui peuvent s'allonger en longs pédicules durant le processus de la pré-éclampsie (102).

- ❖ 2^{ème} hypothèse : celle “Very Low Density Lipoproteins” (VLDL) contre l’activité prévenant la toxicité (TxPA) (104):

Le sérum des patientes pré-éclamptiques est plus toxique que celui des patientes saines pour les cultures de cellules endothéliales *in vitro* et, de plus, il entraîne une plus grande accumulation de triglycérides dans ces cellules.

Les concentrations de triglycérides sont plus importantes chez la patiente toxémique mais le rapport molaire des acides gras non estérifiés (AGNE) est un meilleur indice prédictif de l’accumulation des triglycérides dans les cellules endothéliales que leurs concentrations totales. L’albumine plasmatique existe sous différentes formes dont le point isoélectrique varie de 4.8 à 5.6. Le rôle de ces AGNE est de porter le pI de l’albumine à un niveau plus bas. La proportion des formes isoélectriques de l’albumine change rapidement en réponse aux besoins de l’organisme à mobiliser les acides gras des tissus adipeux et à les transporter vers le foie pour leur intégration dans les VLDL.

L’albumine plasmatique exprime une activité TxPA si son pI est à 5.6. Ainsi, si le ratio des AGNE fait que le pI glisse de 5.6 vers 4.8, les patientes pré-éclamptiques ont leur TxPA diminuée par rapport aux autres patientes enceintes non atteintes.

Cette diminution de la TxPA des VLDL entraînerait une accumulation *in vitro* des triglycérides dans la cellule endothéliale comme l’a démontré Endresen *et al.* et serait la cause de la cytotoxicité.

Sous des conditions non stressantes, le sérum des personnes saines présente un pic important de la TxPA. Après un stress, les catécholamines favorisent le relargage des AGNE du tissu adipeux entraînant une diminution de la TxPA par l'intermédiaire d'une augmentation de la prédominance de la forme pI 4.8 de l'albumine sérique. L'étendue et la durée de la diminution de la TxPA est très variable d'un individu à l'autre ; le même type de stress n'entraînera pas la même chute de la TxPA et chez certains sujets, la chute de cette TxPA est tellement importante que le sérum perd toute capacité à protéger la cellule endothéliale de la cytotoxicité des VLDL in vitro.

Arbogast *et al.* partent de cette hypothèse expliquant que c'est l'augmentation du taux de VLDL et donc de leur cytotoxicité qui entraînerait la dysfonction de la cellule endothéliale dans la pré-éclampsie. Allant de pair avec cette hypothèse, il est établi que la grossesse augmente la demande en énergie. A côté de cette augmentation d'énergie maternelle, il existe une demande accrue de la part du fœtus et du placenta pour leur croissance. Cette demande se traduit par une augmentation des taux de VLDL durant la grossesse. En réponse à cet état, les hormones placentaires mobilisent les AGNE du tissu adipeux. Chez les patientes présentant de faibles concentrations sériques d'albumine, le fait d'exporter les AGNE des tissus adipeux vers le foie entraîne une chute de la TxPA à tel point que la cytotoxicité des VLDL est exprimée. Mais comme dans l'hypothèse d'Oxford, la chronologie des événements chez la mère ne peut s'expliquer à elle seule par l'hypothèse VLDL/TxPA.

❖ 3^{ème} hypothèse : celle de la maladaptation immune envers l'artère spiralée : la théorie de la toxine déciduale (105):

On peut considérer que l'unité foetoplacentaire soit une allogreffe puisqu'elle contient du tissu antigénique paternel qui est étranger pour l'hôte maternel. Pour cette raison, la grossesse est un unique état d'adaptation immunitaire.

Actuellement, il existe nombre de présomptions sur le fait que la pré-éclampsie trouve son origine dans ces mécanismes immunitaires. La maladaptation immunitaire apparaît être une explication logique pour le défaut d'invasion trophoblastique endovasculaire observée pendant la pré-éclampsie et dans certains cas de retard de croissance intra-utérin.

Fisher *et al.* ont démontré que le cytotrophoblaste des patientes pré-éclamptiques ont un phénotype d'adhésion altéré qui réduit les capacités d'invasion. De plus, l'expression du HLA-G est déficiente sur le trophoblaste extravillositaire. L'expression de cette protéine non polymorphique qu'est le HLA-G doit avoir une grande importance dans l'acceptation par la mère du tissu placentaire et doit avoir une fonction de gène auto-remplaçant. Pour accréditer cette thèse, il a été découvert un allèle variant du HLA-G chez des patientes pré-éclamptiques. Christiani *et al.* ont trouvé un résidu Gal (galactose) α 1-3 Gal réduit durant l'invasion trophoblastique de patientes atteintes et, de plus, l'anticorps anti-Gal est augmenté chez ces patientes. Le résidu Gal α 1-3 Gal pourrait être un marqueur de la capacité invasive du trophoblaste et le portage d'anticorps anti-Gal maternel sur le trophoblaste pourrait contribuer à limiter l'invasion trophoblastique et, par la même, participer au contrôle immunologique de l'implantation.

Quel peut être le lien entre cette inadaptation immune et la dysfonction endothéliale ?

La déciduale est surtout un tissu lymphoïde. Dans le premier trimestre de la grossesse, les cellules "Natural Killers" (NK) et les lymphocytes possédant de gros granules cytoplasmiques qui attaquent les cellules cibles sans préimmunisation, constituent 45% de toutes les cellules stromales de cette déciduale. L'activation des neutrophiles, localisée dans le lit placentaire, a été démontrée comme étant en cause dans la pré-éclampsie. Il a été, de plus, démontré que ces mêmes

neutrophiles étaient impliqués dans la pathogenèse des dommages vasculaires en dehors de la grossesse.

✓ L'élastase :

L'activation des neutrophiles entraîne un largage du contenu des granules des neutrophiles comme, par exemple l'élastase et d'autres protéases qui détruisent l'intégrité de la cellule endothéliale, la membrane basale et la matrice subendothéliale. L'élastase plasmatique est un marqueur de l'activation des neutrophiles et est découverte en de plus grandes quantités chez les patientes pré-éclampsiques. Le nombre de neutrophiles contenant de l'élastase dans le tissu fibrineux de la déciduale est significativement plus important dans l'hypertension induite par la grossesse et est corrélé au taux d'acide urique.

Par contre, le taux d'élastase contenu dans le plasma de la veine ombilical est identique que la mère soit hyper ou normotensive. Ce qui implique que ce phénomène d'augmentation de l'élastase soit uniquement un processus propre à la circulation maternelle.

Greer *et al.* (106) ont trouvé une corrélation directe entre le taux plasmatique d'élastase et les taux importants de facteur von Willebrand, assurant l'importance de l'élastase dans le processus pathologique de la cellule endothéliale dans la pré-éclampsie.

✓ Les radicaux oxygènes libres : ROL :

La pré-éclampsie est associée à un stress oxydatif. Les concentrations plasmatiques en ROL sont augmentées pendant cette maladie. Le rôle de ces ROL dans la physiopathologie de la pré-éclampsie est démontré par la découverte de lipofuschine dans le foie et le placenta de patientes atteintes de ce désordre. Les peroxydes lipidiques (LPO) placentaires entraînent une sécrétion locale de TXA2 et, par voie de conséquence, augmente la vasoconstriction progressive

dans la vascularisation placentaire. Les effets des LPO sur les vaisseaux sanguins de la circulation systémique et utéroplacentaire chez le rat ressemblent aux changements observés dans la physiopathologie de la pré-éclampsie chez l'homme. Bien qu'originaires de la membrane cellulaires endothéliales, les LPO circulent dans la circulation générale et causent une peroxydation lipidique des lipides circulants et des lipoprotéines causant des dommages disséminés de l'endothélium. Le titre des IgG auto-anticorps des lipoprotéines de faible densité oxydées est augmenté lors de la pré-éclampsie (107).

La mauvaise adaptation et l'activation subséquente des cellules de la déciduale lymphoïde peuvent être la cause de l'augmentation des ROL et des LPO (108). De plus, les neutrophiles sont également activés lors de réponses immunes et lors de période d'ischémie. En réponse à l'activation des neutrophiles, il apparaît un phénomène appelé explosion respiratoire associée à une augmentation de 2 à 20 fois de la consommation d'oxygène, responsable de la production d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène. Les cellules lymphoïdes produisent des ROL et, conjointement, les neutrophiles activés convertissent la xanthine deshydrogénase endothéliale en xanthine oxydase tout en favorisant le largage des ROL par la cellule endothéliale. Cette conversion de la xanthine deshydrogénase en xanthine oxydase est une réaction irréversible. Ainsi, dans l'interaction entre les neutrophiles et les cellules endothéliales, ces dernières ne sont pas des acteurs passifs dans les événements conduisant à la cytotoxicité. La génération endothéliale d'anions superoxydes est un événement-clé résultant de la cytotoxicité endothéliale liée à l'exposition aux neutrophiles activés. Les ROL et les protéases comme l'élastase travaillent de façon synergique dans l'élaboration des dommages endothéliaux. Tsukimori *et al.* (109) conclurent que la pré-éclampsie est caractérisée par la présence d'un activateur des neutrophiles dans le sérum qui favorise la production d'anions superoxydes. Alternativement à cette théorie, Walsh *et al.* (110, 111, 112) ont émis l'hypothèse que les neutrophiles pouvaient être activés

lorsqu'ils circulent dans la chambre intervillaire par des LPO sécrétés par les cellules trophoblastiques. Le placenta est un autre générateur important de LPO et de ROL dans la pré-éclampsie. Le rapport de production placentaire de LPO et celui de TXA2 est couplé par la PGH synthétase qui lorsqu'il est activé génère non seulement des TXA2 mais aussi des radicaux qui conduisent à la conversion des lipides placentaires en LPO.

✓ Le stress oxydatif et le dysfonctionnement endothélial :

Les radicaux libres sont les espèces chimiques les plus "explosives" qui soient (110, 111, 112). Parmi ceux-ci, ceux issus de l'oxygène ont des origines multiples parmi lesquelles citons celles qui sont les plus répandues dans la cellule aérobie : la mitochondrie à travers la chaîne transporteuse d'électrons et le cytochrome P450. Les autres sources notables sont les dérivés enzymatiques de la xanthine oxydase, l'activation des neutrophiles et l'oxydation des catécholamines. Le métabolisme de l'acide arachidonique génère des radicaux oxygènes grâce à la lipoxigénase et à la cycloxygénase à la fois. Mais la voie de cette dernière génère 1 000 fois plus de radicaux que la voie de la lipoxigénase. Les ROL conduisent à la formation des LPO. Les deux extrémités des acides gras insaturés sont très sensibles à l'oxydation par les ROL. Une fois que l'oxydation lipide est initiée, celle-ci s'auto entretient..

Les ROL inhibent la relaxation endothélium dépendante in vivo et in vitro par deux mécanismes : l'inactivation chimique du NO et l'inhibition de la production et du largage du NO par les cellules endothéliales endommagées par l'oxydation.

Les LPO stimulent la production de PGH synthétase mais inhibent la production de PGI2 aussi l'augmentation des taux de LPO dans la pré-éclampsie favorise la production de TXA2 dérivé des plaquettes au dépend de la production vasculaire de PGI2. Les ROL et les LPO augmentent la production endothéliale d'endothéline et provoquent un phénomène de tolérance de

régulation de la part des récepteurs à l'endothéline avec comme conséquence une activité accrue de celle-ci. Les LPO, de plus, altèrent la perméabilité membranaire à l'hydrogène, à d'autres ions et la perméabilité capillaire aux protéines. Les dommages occasionnés aux cellules endothéliales des glomérules rénaux par les LPO et l'augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales pour les protéines peuvent expliquer les oedèmes et la protéinurie observés dans la pré-éclampsie. Le déclenchement de la formation des thrombi dû aux LPO s'explique par l'augmentation de la synthèse de thrombine et la chute du taux d'anti-thrombine III (ATIII). Les LPO empêchent la fibrinolyse en activant le PAI-1 endothélial et en inhibant dans le même temps la formation de tPA. Un autre effet des LPO est de diminuer la fluidité des membranes endothéliales. Celle-ci est influencée par la quantité de cholestérol et d'acides gras insaturés présents dans la membrane cellulaire : une augmentation de la quantité de cholestérol diminue la fluidité de la membrane. Le LPO augmente la quantité de cholestérol inclus dans la membrane. Dans la pré-éclampsie, une augmentation du taux de cholestérol dans les membranes et une fluidité diminuée ont été décrites pour les plaquettes et les cellules trophoblastiques. De plus, les LPO altèrent la membrane en augmentant le taux de lipoprotéines de faible densité admises dans la cellule.

Ceci peut expliquer le fait que l'incubation de cellules endothéliales avec du sérum de femmes pré-éclamptiques augmente le taux de triglycérides contenus dans les cellules qui résulte, entre autre, d'une diminution de la synthèse endothéliale en PGI₂.

✓ Les chélateurs de radicaux libres (110, 111, 112):

Les radicaux oxygènes réactifs sont connus pour être des espèces chimiques très nocives. Ceci est faux puisqu'ils jouent un rôle-clé dans nombre de réactions physiologiques comme les oxydations dues au cytochrome P450, la régulation du tonus des muscles lisses et l'élimination de micro-organismes.

Il est habituel dans ces cas de définir une balance entre d'une part les radicaux libres et d'autre part les antioxydants. Chez une patiente présentant une grossesse sans signe d'hypertension, le rapport des concentrations maternelles entre l'antioxydant qu'est la vitamine E et les LPO et aussi entre le PGI2 et le TXA2 favorise l'action antioxydante de la vitamine E et l'action vasodilatatrice de la PGI2 pour favoriser la continuité de la gestation.

Wang *et al.* (113) a rapporté une mauvaise balance due à une augmentation des LPO et une diminution de la vitamine E dans la pré-éclampsie mise en corrélation avec une diminution de la PGI2 et une augmentation de la TXA2.

L'activité de l'érythrocyte glutathione peroxydase (GSHPx) et les taux de glutathione érythrocytaire (GSH) sont augmentés lors d'une pré-éclampsie ; ce qui n'est pas étonnant étant donné que ces deux composés sont un système chélateur majeur des LPO. L'augmentation compensatrice des taux de GSH érythrocytaire intervient dans les dommages dus à l'oxydation, dans l'exposition à une endotoxine, à un "Tumor Necrosis Factor" (TNF) et à une Interleukine-1. En accord avec l'étude de Walsh *et al.* (110, 111, 112), la diminution du GSHPx dans la pré-éclampsie peut être reliée à une augmentation de la synthèse de radical superoxyde par la PGH synthétase ou à une diminution de l'inactivation de superoxyde par la baisse de l'activité placentaire de la superoxyde dismutase.

Uotila *et al.* (114) ont retrouvé une corrélation significative dans la pré-éclampsie entre le taux de GSHPx et le taux d'acide urique plasmatique.

❖ La 4^{ème} hypothèse : la pré-éclampsie : une maladie génétique :

La pré-éclampsie sévère a une tendance familiale. Le développement de cette maladie peut être due à un gène récessif ou un gène dominant à pénétrance variable. Cette pénétrance peut influencer par le génotype fœtal. Un concept multifactoriel peut aussi être envisagé(115).

- Corrélations entre ces hypothèses physiopathologiques et l'hyperhomocystéinémie :

Dans une étude, Powers *et al.* (116) ont recherché une hyperhomocystéinémie chez des patientes pré-éclamptiques. Ils ont constaté que 30% des patientes présentant cette pathologie vasculaire avaient une homocystéine plasmatique totale correspondant au 97.5^{ème} percentile.

Cette augmentation de concentration pouvait s'expliquer par une dysfonction rénale d'abord glomérulaire puis tubulaire sans augmentation de production ou de dégradation d'homocystéine. Mais leurs données ne montraient pas de corrélation entre la créatininémie et l'homocystéinémie : nous avons vu précédemment que l'excrétion urinaire de l'homocystéine est très faible. De plus, l'association entre l'augmentation de l'homocystéinémie et la dysfonction rénale est en relation avec une perte de la masse fonctionnelle rénale qui intervient pour plus de 20% dans le métabolisme de l'homocystéine.

Une autre explication à l'augmentation de cette homocystéinémie chez ces patientes aurait pu être la diminution du volume plasmatique que l'on rencontre de façon physiologique pendant la grossesse. Mais cette augmentation devrait induire une augmentation du catabolisme surtout dans les reins et le foie, chose qui n'a pas été retrouvée.

Powers a retrouvé une corrélation, chez les patientes hyperhomocystéinémiques et pré-éclamptiques, entre la concentration en homocystéine et un marqueur de l'atteinte endothéliale, la

fibronectine cellulaire. De façon intéressante, il a retrouvé le même type de relation chez la patiente enceinte et ne présentant pas de pathologie. Ce résultat suggère, comme dans les atteintes coronariennes précoces, que l'homocystéine a un effet graduel sur la cellule endothéliale et sur le largage de la fibronectine cellulaire. L'augmentation de la fibronectine n'est que la conséquence de l'atteinte endothéliale.

Mais comment expliquer cette atteinte endothéliale ?

❖ Corrélations avec l'hypothèse de l'ischémie placentaire d'Oxford :

Nous avons vu que l'accumulation de glycogène dans les villosités syncytiotrophoblastiques était due à une immaturité de ces cellules en raison de l'augmentation de la déportation trophoblastique et donc de la migration cytotrophoblastique. Ce phénomène crée un lit vasculaire placentaire de mauvaise qualité qui peut conduire à la pré-éclampsie.

Or, l'hyperhomocystéinémie augmente l'accumulation de glycogène de type I, II et IV dans les cultures de cellules artérielles chez le lapin en entraînant une diminution de la composante élastique. Mais qu'en est-il chez l'homme et est-ce que cette augmentation est une cause ou une conséquence de la pré-éclampsie ? Aucune étude n'a été publiée pour valider ces hypothèses.

❖ Corrélations avec l'hypothèse des VLDL modifiant la TxPA :

L'homocystéine interagit avec les LDL par peroxydation entraînant des dommages endothéliaux. Aucun travail n'a été retrouvé sur l'action de l'homocystéine sur les VLDL.

❖ Corrélations avec l'hypothèse de la maladaptation immunitaire :

Nous avons vu que l'hyperhomocystéinémie commande la formation de radicaux libres en excès qui sont cytotoxiques surtout au niveau des cellules endothéliales. Ces ROL entraînent aussi une activation des neutrophiles qui sont en quantité importante dans la membrane déciduale du placenta. Cette activation va entraîner une surproduction d'oxygène et crée de nouveaux ROL. Il semble donc qu'il se constitue un cercle vicieux entre l'activation de ces neutrophiles et la production de ROL. Les conséquences au niveau vasculaires vont être énormes :

- ✓ Diminution de la fluidité des plaquettes et des cellules trophoblastiques par altération des membranes due à la peroxydation des lipides.
- ✓ Augmentation de la synthèse de thrombine, diminution de l'anti-thrombine III, inhibition de la synthèse du tPA entraînant la formation de thrombi.
- ✓ Vasoconstriction et diminution de l'agrégabilité des plaquettes

Tous ces mécanismes sont le lit de la pré-éclampsie.

❖ Corrélation avec la maladie génétique :

Elle est évidente si l'on considère les multiples mutations génétiques à l'origine de l'hyperhomocystéinémie.

c- Fausses couches à répétition et avortements précoces :

Les fausses couches à répétition affectent 2 à 5 % des couples. Leurs étiologies ne sont pas retrouvées dans 24 à 60% des cas. Bien que certains désordres comme les anomalies

chromosomiques, les insuffisances du corps jaune, les malformations congénitales de l'utérus, l'hypertension systémique, le diabète et l'hyper ou l'hypothyroïdie soient impliqués, ces étiologies sont relativement rares.

Récemment, des relations de cause à effets ont été mises en cause entre les anomalies de coagulation et des désordres métaboliques. Cela peut conduire à un état prothrombotique et à un risque accru d'avortement après 16 semaines de grossesse.

Dans une étude, Nelen *et al.* (117, 118) ont cherché à établir une relation entre la mutation 677C-T de la MTHFR et les avortements précoces à répétition. Ceci est relaté dans le tableau ci-après.

Génotypes de la MTHFR	Groupe des avortements à répétition (n = 187)	Groupe contrôles (n = 1160)
C/C type natif	77 (42%)	48 (42%)
T/C hétérozygotes	79 (43%)	59 (52%)
T/T homozygotes	29 (16%)	6 (5%)
OR 95% intervalle de confiance	3.3 (1.3-10.1)	
OR (95% de l'IC) = odds ratio et 95% de l'IC calculés à partir du groupe T/T versus T/C et T/T versus groupe contrôles.		

Tableau de distribution de la mutation MTHFR 677C-T dans les avortements précoces à répétition et dans les contrôles.

Dans un premier temps, il existe une preuve évidente de la relation entre les avortements et la mutation 677C-T de la MTHFR. De plus, les patientes T/T ont des taux plus importants d'homocystéinémie après test rapide et MLT. Mais cela ne concerne pas toutes les patientes homozygotes ; en particulier, celles présentant un taux élevé de folates (> à 7 nmol/l) ont une homocystéinémie normale. Ceci apporte du poids à l'assertion disant qu'il existe des interactions gène-environnement dans la régulation des concentrations d'homocystéine.

d- Le retard de croissance intra-utérin :

Burke *et al.* (119) ont cherché à mettre en évidence une association entre l'hyperhomocystéinémie et le retard de croissance intra-utérin. Partant de l'hypothèse que cette pathologie entraînait des troubles vasculaires chez la mère du type pré-éclampsie, il semblait logique de pouvoir incriminer l'hyperhomocystéinémie comme facteur de risque. Son étude n'a porté que sur 30 enfants dont les mères étaient hyperhomocystéinémiques. Il n'a pas retrouvé de différence significative (120).

Par contre, De vries *et al.* (121) et Leeda *et al.* (122) ont retrouvé des résultats contraires.

Il nous semble plus intéressant, pour avoir une idée juste de se référer à l'étude qu'ont faite les Norvégiens (Vollset *et al.*, 123) et qui a déjà été citée plus haut : la Hordaland Homocysteine Study. Elle portait sur le devenir et les complications de 14 492 grossesses. Dans cette étude, l'homocystéinémie était de 101 % supérieure aux concentrations normales observées d'habitude chez les patientes dont l'enfant présentait un retard de croissance intra-utérin.

Il y a donc fort à penser que, bien que les études soient discordantes, l'hyperhomocystéinémie joue un rôle important dans le retard de croissance intra-utérin.

e- L'infarctus placentaire et l'hématome rétro-placentaire :

Pour étudier l'incidence de l'hyperhomocystéinémie sur l'hématome rétroplacentaire (HRP) et les phénomènes d'infarctissement placentaire, Goddijn-Wessel *et al.* (124) ont confronté 84 femmes ayant des antécédents d'HRP ou d'infarctus placentaire face à 46 femmes ayant eu une grossesse normale.

L'HRP, complication vitale pour la mère et surtout pour l'enfant, semble résulter de la rupture soudaine de l'artère spiralée. Alors que l'infarctus du placenta est dû à une occlusion de cette même artère au niveau du myomètre ou de la déciduale. L'examen histologique des artères spiralées dans l'infarctus révèle un ou plusieurs signes de vasculopathie, comme par exemple, une athéromatose, une sténose luminale, une nécrose ou une thrombose.

Les causes des lésions retrouvées dans ces artères semblent être identiques au mécanisme de pathogenèse suggéré pour les lésions artérielles systémiques observées dans la pathologie cardiovasculaire à savoir une atteinte, à la fois endothéliale, du muscle lisse vasculaire et une atteinte de la fibrinolyse.

Cette étude révéla que les taux de folates, vitamine B6 et B12 étaient plus bas dans le groupe étudié que dans les contrôles. De plus, le taux de folates sanguin et le taux intra-érythrocytaire étaient significativement et négativement corrélés à l'homocystéinémie. Il n'a pas été fait dans cette une recherche de la cause de l'hyperhomocystéinémie. Les auteurs n'ont pas pu déterminer si elle était la conséquence d'un déficit vitaminique ou d'une déficience enzymatique car toutes les mutations en cause n'avaient pas été mise en évidence.

Par contre, cette analyse montra que la concentration moyenne d'homocystéine était plus importante chez les patientes ayant présenté un HRP ou un infarctus placentaire lors de leur première grossesse comparativement à celles ayant présenté ce même type de pathologies après avoir eu des grossesses normales. Ceci suggère que l'hyperhomocystéinémie entraîne des anomalies placentaires de façon plus précoce qu'une autre cause. Il est intéressant de noter que ce résultat retrouvé à partir de test rapide n'a pu être validé avec le MLT.

f- Les morts fœtales in utero :

Quere *et al.* (125) ont rapporté le cas d'une patiente présentant une hyperhomocystéinémie à 46 $\mu\text{mol/l}$ et qui avait eu 5 décès fœtaux consécutifs. Ils ont aussi réalisé une étude rétrospective sur 100 patientes ayant eu ce genre de pathologie. Leurs résultats montrent que cette patiente présentait une mutation homozygote C677T pour la MTHFR comme 20 % des patientes hyperhomocystéinémiques de cette étude (12% des patientes présentaient des concentrations d'homocystéine élevées).

Des résultats similaires ont été retrouvés par de Vries *et al.* (121): 11 % de leurs patientes présentaient une hyperhomocystéinémie parmi toutes celles ayant eu une mort fœtale in utero sans signe d'hypertension gravidique.

4- Sur le système oculaire (126):

Une grande variété de désordres oculaires apparemment non liés entre eux a été décrite à propos de patients atteints d'homocystéinurie due à une déficience de la CBS. Ces symptômes oculaires peuvent être regroupés en 3 classes principales de pathologies :

- ✓ Un petit nombre de symptômes plus ou moins pathognomoniques comme, par exemple la dégénérescence fibreuse de la zonula.

- ✓ Une variété de symptômes secondaires résultant des premiers : luxation du cristallin, sphérophakie, myopie cristallinienne et glaucome aigu.

- ✓ Quelques signes cliniques non liés entre eux, non spécifiques et, en fait, fortuits : vitrée primaire hyperplasique, hyperopie.

a- **La dégénérescence fibreuse de la zonula :**

La dégénérescence des fibres de la zonula est le plus important facteur étiologique de l'hyperhomocystéinémie sévère. En clinique, les fibres rémanantes de la zonula s'observent généralement à l'opposé de la direction prise par la luxation du cristallin comme une frange blanchâtre en position équatoriale et sur la face antérieure. Cette image clinique de la dégénérescence associée à la rupture des fibres est pathognomonique des patients atteints de déficience de la CBS.

Le phénomène biochimique de destruction zonulaire n'est pas complètement expliqué. En accord avec les hypothèses émises par Irreverre *et al.* (127) et Johnson et Waldman (128), il pourrait résulter de la déconnexion des ponts disulfures des protéines causée par une réaction de substitution de l'homocystéine. La fibrilline, un composé majeur des fibres zonulaires riche en ponts disulfures est une cible préférentielle de la destruction induite par l'homocystéine.

b- **La luxation du cristallin :**

L'ectopie lenticulaire est le plus fréquent symptôme résultant de la dysfonction zonulaire dans la déficience de la CBS et, en même temps, la principale cause des complications secondaires ultérieures dont est atteinte la fonction oculaire de des patients.

Cette pathologie n'est pas congénitale et n'est observée avant l'âge de 2 ans que dans de très rares cas. Sans traitement, cette affection touche 2/3 des patients avant la 1^{ère} décennie et 90% à

l'âge de 25 ans. L'incidence de la dislocation totale intervenant dans cette pathologie sur la chambre antérieure et sur le vitrée est le plus souvent majeure et semble souligner le caractère temps dépendant du mécanisme chimique destructif des zonules.

c- La réfraction :

La myopie dans la déficience de la CBS est due à la fois à une augmentation du pouvoir optique du cristallin mais aussi à l'élongation axiale de l'œil. La myopie lentale résulte de la tension créée par la dégénérescence zonulaire induisant une déformation sphérique passive en augmentant, par conséquent, le pouvoir optique.

d- Le glaucome :

Le glaucome apparaît dans la plupart des cas de façon aiguë et douloureuse après une luxation antérieure du cristallin.

5- Cancers et homocystéine :

Les toutes dernières études faites sur l'homocystéine révèlent une implication de l'hyperhomocystéinémie dans la pathologie cancéreuse. Ceci n'est pas surprenant si l'on tient compte du rôle de celle-ci dans les mécanismes de réplication de l'ADN qui sont cancérigènes lorsqu'ils sont pris en défaut.

Deux types de cancers ont été spécialement étudiés : le cancer colo-rectal et la néoplasie cervicale de l'utérus. Il existe, de plus une étude sur le cancer du sein et le métabolisme de l'homocystéine.

a- Le cancer colo-rectal :

Kato *et al.* (129) sont partis de l'hypothèse qu'un facteur de protection du cancer colo-rectal est la consommation de fruits riches en folates et donc que ces vitamines et l'homocystéine pouvaient avoir un rôle dans ce type de cancer. De même, certaines habitudes de vie comme la consommation d'alcool pouvaient être un facteur de risque.

En fait, les patients atteints de ce cancer présentaient une concentration plus basse de folates et une homocystéinémie plus élevée. Leur conclusion est que les sujets présentant une concentration en folates basse et une consommation alcoolique élevée sont deux fois plus atteints que ceux présentant des folatémies hautes et une consommation modérée d'alcool sans toutefois confirmer le caractère protecteur des folates.

b- La néoplasie cervicale utérine :

Une étude de Goodman *et al.* (130) a cherché à montrer la possible implication de l'hyperhomocystéinémie dans la pathologie cervicale utérine. Leurs résultats sont assez discordants puisque le risque est augmenté pour les néoplasies in situ de bas grade mais pas pour les hauts grades. Les ASCUS qui sont des pathologies inclassables et très variables dans leur évolutivité sont corrélées avec une concentration élevée de cystéine.

Thomson *et al.* (131) ont retrouvé des résultats opposés concernant la concentration en homocystéine plasmatique et le grade de la néoplasie.

c- Le cancer du sein :

Wu *et al.* (132) n'ont retrouvé aucune relation entre la folatémie, la concentration en B5, en homocystéine et la survenue d'un cancer du sein.

F- Le traitement de l'hyperhomocystéinémie :

Le plus grand recul que nous ayons concernant le traitement des anomalies du métabolisme de l'hyperhomocystéinémie est celui de la Willink Biochemical Genetics Unit (133). Depuis 1962, Walter *et al.* ont suivi 31 patients présentant un déficit en cystathionine- β -synthetase.

Le traitement de la déficience en CBS illustre les différentes stratégies qui peuvent être employées pour la prise en charge de ce type d'anomalies métaboliques :

- ✓ Augmenter l'activité résiduelle de l'enzyme en cause
- ✓ Diminuer l'activité de la voie métabolique concernée
- ✓ Supplémenter les produits déficients en deçà du bloc métabolique
- ✓ Utiliser des voies alternatives pour cataboliser les substances toxiques en amont du bloc métabolique.

1- Effet de la supplémentation vitaminique in vitro et in vivo :

Une étude de Woo *et al.* (134) ont étudié la réponse endothéliale à un traitement de 8 semaines de 10 mg/j d'acide folique versus un placebo. La supplémentation en acide folique diminue la fonction endothéliale artérielle dépendant de l'oxyde nitrique. La dilatation dépendante de l'endothélium a varié de 6 à 8.2 %. Le mécanisme de cette augmentation de la dilatation est mal connu mais pourrait être en rapport avec une diminution de la formation d'homocystéine thiolactone et une augmentation de la formation de S-nitroso-homocystéine.

Une autre étude effectuée par Carmody *et al.* (135) a retrouvé une baisse significative de la prolifération des cellules musculaires lisses artérielles chez les groupes de cellules traitées avec 20 nmol/l d'acide folique.

2- Acide Folique, vitamines B6, B12 et risque cardiovasculaire (132) :

a- Essais de différents traitements :

Différentes études (136, 137, 138, 139) ont été faites pour trouver le dosage optimal de vitamines. Une méta-analyse effectuée par Clarke *et al.* (136), a montré qu'en moyenne un traitement par de l'acide folique réduisait les concentrations en homocystéine de 25% avec un dosage d'acide folique compris entre 0.5 et 5 mg/j. Un apport quotidien d'en moyenne 0.5 mg/j de vitamine B12 augmentait la réduction de l'homocystéinémie de 7%. Par contre, un apport additionnel de vitamine B6 (16.5 mg/j en moyenne) n'avait aucun effet additionnel.

Le traitement optimal est donc 0.5-5 mg/j de folates avec 0.5 mg/j de vitamine B12.

b- Acide folique seul ou avec vitamine B12 et B6 :

Sur ces trois vitamines, c'est l'acide folique qui a le plus important rôle ; les vitamines B6 et B12 n'ont qu'un rôle accessoire. De plus, la vitamine B12 a surtout été introduite pour limiter le risque théorique de neuropathies chez les patients déficients en vitamines B12 et chez lesquels seule la vitamine B6 était proposée. En fait, la vitamine B6, en dehors du contexte d'anomalie de métabolisme de l'homocystéine, est une vitamine qui possède un effet cardioprotecteur. Il y a donc un intérêt à associer la vitamine B6 et les folates.

c- Résultats :

De la méta-analyse de Clarke, il ressort qu'une diminution prolongée de la concentration en homocystéine dans le sang de 3 à 5 $\mu\text{mol/l}$ diminue de 30% l'incidence de la maladie coronarienne.

3- Les vitamines B6 et folates dans la vasculopathie placentaire :

Leeda *et al.* (122) ont recherché l'influence d'une supplémentation en acide folique (5 mg/J) et vitamine B6 (100mg/j) chez des patientes ayant un antécédent de pré-éclampsie et/ou de retard de croissance intra utérin. (17.9% des 207 femmes incluses dans cette étude étaient hyperhomocystéinémiques). Les patientes initialement hyperhomocystéinémiques ont toutes eu un contrôle par MLT qui s'est révélé normal après 10 semaines de traitement. Leeda conclue aussi que ce résultat est essentiellement du à la vitamine B9. Il est aussi observé chez les patientes hyperhomocystéinémiques traitées une augmentation sensible du poids de naissance.

4- Les folates et les anomalies de fermeture du tube neural :

Dans son article, Eskes *et al.* (140) relate l'historique de la recherche sur l'homocystéine et mentionne l'étude du MRC Vitamine Study Research Group (141) sur la prévention des défauts de fermeture du tube neural par une supplémentation en acide folique. Le risque récurrent de défaut de fermeture du tube neural était diminué de 72% avec une supplémentation périconceptionnelle de 4 mg/j d'acide folique. (4semaines avant et 8 semaines après la conception)

5- Au total :

Il semble que la supplémentation vitaminique des patientes hyperhomocystéinémiques soit consensuelle pour la vitamine B12 et les folates aux doses respectives de 0.5mg/j et 5 mg/j. Le bénéfice de la supplémentation en B6 est à apprécier en fonction de la pathologie en cause.

IV- INFLUENCE DE L'HYPERHOMOCYSTEINEMIE SUR LA FECONDATION IN VITRO : A PROPOS DE 96 CYCLES :

Connaissant tous les effets que peut engendrer l'hyperhomocystéinémie, nous avons voulu savoir si cette pathologie interférait d'une manière particulière sur les résultats des fécondations in vitro. En effet, de par son mode d'action à la fois cytologique et systémique, l'hyperhomocystéinémie pourrait avoir une influence sur le développement de l'ovocyte, la qualité embryonnaire et sur l'obtention d'une grossesse.

A- Matériel et méthodes :

Durant la période s'échelonnant entre juillet 1999 et juillet 2000, nous avons inclus 90 patientes débutant un cycle de stimulation ovarienne en vue d'une FIV dans le Centre d'Assistance Médicale à la Procréation du CHRU Dupuytren de Limoges. Toutes les patientes ont eu le dosage de l'homocystéinémie dans le Centre lors du bilan pré opératoire au début du traitement de stimulation. Ce dosage se faisant sur un tube EDTA (Cf. infra) déjà utilisé pour le bilan, il a été considéré comme un déchet et n'a pas nécessité d'accord du CPPRB.

Nous avons exclu de cette étude :

- ✓ Toutes les patientes n'ayant pas eu de réponse folliculaire à la stimulation.
- ✓ Celles n'ayant pas eu de freination.
- ✓ Celles ayant eu une hyperstimulation.

Au total, 96 cycles de stimulation ont été étudiés.

Deux types de protocoles ont été utilisés en fonction de la réserve ovarienne :

- ✓ Protocole long : injection d'analogues de la GnRH (Décapeptyl® 3 mg ou Enanthone® 3.75 mg) à J1 du cycle puis injection de gonadotrophines FSH recombinantes (Gonal F® ou Puregon®) jusqu'au jour du déclenchement par gonadotrophine chorionique.

- ✓ Protocole court : injection d'analogues de la GnRH (Décapeptyl® 0.1 mg) et de gonadotrophines FSH recombinantes (Puregon® ou Gonal F®) de J1 du cycle jusqu'au jour du déclenchement par gonadotrophine chorionique. Ce type de protocole est utilisé chez les patientes présentant une réserve ovarienne faible.

Les 90 patientes ont un dosage par test rapide de l'homocystéinémie. Il est fait un prélèvement de sang sur un tube EDTA à 9 heures du matin à jeun. Ce sang est transporté sur de la glace et centrifugé à 1700 tours/min pendant 10 min et ce dans les 30 minutes qui suivent le prélèvement. Le plasma recueilli est ensuite conservé à -30°C en attendant l'analyse.

L'homocystéinémie totale, à savoir celle libre et celle liée à la protéine porteuse, est mesurée par le test IMX®System des Laboratoires ABBOTT (Laboratoires ABBOTT, Division diagnostic, 12, Rue de la Couture SILIC 203, F-94518 RUNGIS Cedex) .

La valeur pathologique se situe au-delà de $12.5\ \mu\text{mol/l}$. Cette valeur a été établie par un calibrage du kit de dosage à partir d'un panel de 300 personnes représentatives de la population générale et ne présentant aucune pathologie vasculaire. Lors des premiers tests de dépistage de l'hyperhomocystéinémie, cette valeur seuil de $12.5\ \mu\text{mol/l}$ avait été déterminée par dosage de l'homocystéinémie chez des patients présentant une pathologie vasculaire précoce.

Aucune de ces patientes ne prenait de traitement susceptible de modifier le taux sanguin d'homocystéine ou de régime particulier.

De J13 au jour du déclenchement pour les protocoles longs et de J1 au jour du déclenchement pour les protocoles courts, un monitoring de la stimulation a été effectué. Celui-ci comprend un dosage sanguin de 17 β -estradiol et de LH ainsi qu'une surveillance échographique. Celle-ci permettait de mesurer le diamètre de chaque follicule sur les deux ovaires. Cette mesure permet d'apprécier la qualité de réponse ovarienne à la stimulation ; elle permet aussi de juger le moment le plus propice du déclenchement : celui-ci est effectué s'il existe au moins deux follicules de 15 à 18 mm de diamètre et si le taux d'estradiol est d'environ 150 à 250 pg/ml par follicule de plus de 15 mm.

Les ponctions ovocytaires ont été réalisées sous anesthésie générale (sans N₂O susceptible d'entraîner une hyperhomocystéinémie ponctuelle).

Les complexes cumulo-ovocytaires prélevés ont été lavés puis incubés dans un milieu de culture approprié (Ferticult® Ferti Pro N.V., Beermen, Belgique) à 37°C sous 5% de CO₂. Un examen de chaque complexe permet de déterminer si l'ovocyte prélevé est mature et fécondable (émission d'un premier globule polaire).

Parallèlement, a été réalisé un recueil de sperme qui est traité par migration sur gradient (90/70/40 %) puis lavage par une solution de Ferticult®. Une spermoculture a été systématiquement faite pour dépister tout risque d'infection.

L'insémination est faite deux heures après la ponction.

A J1, le zygote a été examiné afin de voir l'apparition de pronuclei signant une bonne fécondation.

A J2, l'embryon obtenu est typé suivant la classification :

✓ Régularité des blastomères :

- Type I : blastomères réguliers sans fragment cytoplasmique
- Type II : blastomères réguliers avec fragments
- Type III : blastomères irréguliers sans fragment
- Type IV : blastomères irréguliers avec fragment
- Type V : blastomères complètement fragmentés
- Type VI : absence d'embryon obtenu (rajouté pour des raisons de calculs statistiques)

✓ Fragmentation :

- + : moins de 20% du volume de l'embryon est constitué de fragments
- ++ : de 20 à 50%
- +++ : plus de 50%

✓ Nombre de blastomères (cellules embryonnaires)

Ainsi, l'embryon idéal est de type I4 à J2 (nous n'avons retenu que cette valeur à J2 car tous les embryons n'étaient pas étudiés à J3 : cela dépendait de leur degré de développement).

Le transfert embryonnaire a été fait 48 ou 72 heures après la ponction. Ce transfert s'est effectué avec un cathéter de Frydman dont la taille dépendait de l'hystérométrie effectuée lors du bilan pré-FIV en première partie de cycle.

Quatorze jours après le transfert, un dosage sanguin de 2-HCG a été fait et s'il se révélait positif un autre dosage était fait à 48 heures pour contrôler l'évolutivité de la grossesse.

La grossesse biochimique correspond à un taux de 2-HCG supérieur à 13 UI et la grossesse clinique à la présence d'un sac ovulaire à l'échographie ou à un dosage de 2-HCG > 1 000 UI.

Pour chaque patiente, nous avons consigné :

- ✓ le nombre de follicules matures (supérieurs à 15 mm de diamètre) mesurés par l'échographie le jour du déclenchement.
- ✓ l'examen de l'ovocyte ou du zygote à J1 : 0 globule polaire (0gp), 1 globule polaire (1gp), 2 globules polaires (2gp), 1 pronucleus (1pn), 2 pronuclei (2pn), plus de deux pronuclei correspondant à une polyspermie.
- ✓ l'évolutivité à J2
- ✓ le nombre de blastomères à J2 (un résultat de 1 cellule correspondant à une absence d'évolutivité ou à un embryon de classe V)
- ✓ la fragmentation à J2
- ✓ le type embryonnaire
- ✓ s'il y a eu congélation
- ✓ s'il y a eu transfert et quels types d'embryons
- ✓ l'aspect du cytoplasme des blastomères
- ✓ l'obtention d'une grossesse biochimique
- ✓ l'obtention d'une grossesse clinique
- ✓ l'âge de la patiente

- ✓ la tranche d'âge suivant les classes suivantes : 26-30, 31-35, 36-40, 41-42.
- ✓ le dosage de l'homocystéinémie en :mol/l
- ✓ la classe d'homocystéinémie plus ou moins 12.5 :mol/l.
- ✓ le type de protocole utilisé pour la stimulation ovarienne
- ✓ le type d'infertilité du couple

Dans cette étude, 90 couples ont été inclus, 96 cycles ayant donné 1080 ovocytes prélevés ont été étudiés (6 patientes ont eu deux cycles durant la période d'étude).

Les calculs statistiques ont été réalisés grâce au logiciel StatView® comprenant le test du χ^2 , le test exact de Fischer, le test-t séries avec pour tous ces tests un intervalle de confiance de 95%.

B- Résultats :

1- Sur la totalité des patientes :

a- L'âge :

L'âge des patientes est compris entre 26 et 42 ans pour une moyenne de 34.07 ans. La répartition des patientes suivant leur âge est représentée sur le tableau 1. La distribution de l'âge des patientes est uniforme dans les groupes d'homocystéinémie plus ou moins 12.5 :mol/l.

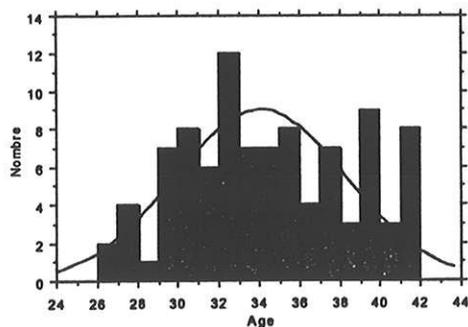


Tableau 1 : distribution de l'âge des patientes et comparaison avec une distribution normale.

b- Les types d'infertilités :

Parmi les 90 couples, 44 présentaient une pathologie strictement féminine, 16 une pathologie strictement masculine, 28 une pathologie mixte et 2 FIV ont été faites avec un sperme de donneur. Il n'existe pas de différence significative de l'homocystéinémie en fonction du type d'infertilité (*test du Chi^2 : $p = 0.3$*) et la population étudiée était homogène pour ce critère. Nous avons étudié surtout l'endométriose qui est le plus important facteur de risque d'échec de FIV en raison de son action cellulaire qui provoque une dégradation de la qualité des ovocytes. Il n'existe pas de différence de l'homocystéinémie en fonction de l'endométriose (*test du Chi^2 : $p = 0.4$*) et la population étudiée était homogène pour ce critère.

c- Les protocoles de stimulation :

72 patientes ont bénéficié d'un protocole long et 18 d'un protocole court. Il n'existe pas de différence significative de l'homocystéinémie en fonction du protocole utilisé (*test exact de Fisher : $p > 0.9999$*) et la population étudiée était homogène pour ce critère.

d- Le dosage sanguin de l'homocystéine :

L'homocystéinémie dosée chez ces 90 patientes a été comprise entre 4.3 et 16.2 :mol/l soit une moyenne de 8.54 ± 2.56 :mol/l. La répartition de ces homocystéinémies suit une loi normal et est représentée dans le tableau 2.

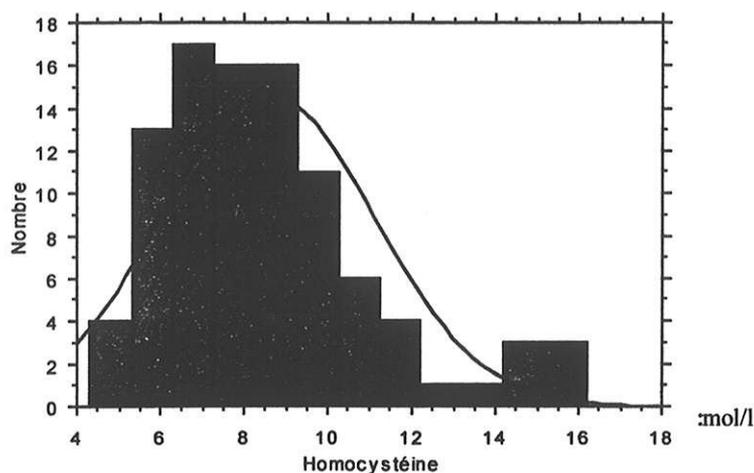


Tableau 2 : Répartition des patientes en fonction de l'homocystéinémie et comparaison avec une distribution normale.

e- L'homocystéinémie en fonction de l'âge :

Comme cela avait été retrouvé par toutes les autres études effectuées, l'homocystéinémie augmente de façon significative avec l'âge. Dans le tableau 3, on s'aperçoit que cette différence est valable entre les 3 premiers groupes (26-30, 31-35, 36-40) et le dernier (41-42). Par contre, il n'existe pas de différence entre les 3 premiers.

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
26-30, 31-35	,173	,389	,3829	
26-30, 36-40	,337	,432	,1265	
26-30, 41-42	-1,616	,564	<,0001	S
31-35, 36-40	,164	,405	,4280	
31-35, 41-42	-1,788	,544	<,0001	S
36-40, 41-42	-1,952	,575	<,0001	S

Tableau 3 : Comparaison de l'homocystéinémie pour les différentes tranches d'âge : Test PLSD de Fisher.

Ceci est confirmé par la moyenne de l'homocystéinémie en fonction des tranches d'âge.

(Tableau 4).

Moyenne
homocystéinémie
($\mu\text{mol/l}$)

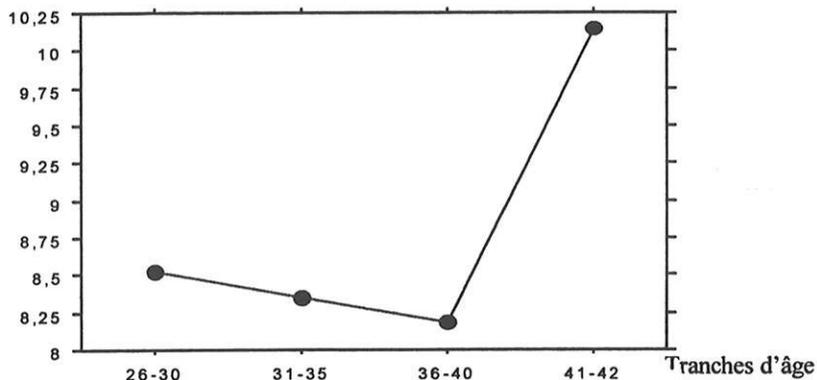


Tableau 4 : comparaison de l'homocystéinémie en fonction des tranches d'âge.

f- Grossesse biochimique :

Les résultats de l'étude ne sont pas différents de ceux observés habituellement dans le Centre de Procréation Médicalement Assistée ou niveau national (année de référence :1998).

Le nombre moyen d'embryons transférés a été de 2.12 par patiente.

Le taux de grossesse biochimique a été de 27% par patiente et de 22 % pour le taux de grossesse clinique.

Le taux de grossesse biochimique par transfert a été de 30% et 27% pour le taux de grossesse clinique.

Il existe une tendance à une corrélation négative entre la classe de l'homocystéinémie et l'obtention ou non d'une grossesse biochimique ($p = 0.09$ pour le test exact de Fischer). A fortiori, cette tendance est moindre concernant les grossesses cliniques.

	Normale	Pathologique	
OUI	30 (33.7%)	0 (0%)	30 (31.25%)
NON	59 (66.3%)	7 (100%)	66 (68.75%)
	89 (100%)	7 (100%)	96

Tableau 5 :
Tableau de
distribution entre
classes
d'homocystéinémie
et grossesse
biochimique.

Pour étudier les effets de l'hyperhomocystéinémie, il est nécessaire de continuer l'étude au niveau embryonnaire et non plus au niveau de chaque patiente.

2- Sur la totalité des embryons issus des FIV :

a- L'aspect de l'ovocyte à J1 :

Les résultats obtenus montrent que l'aspect de l'ovocyte à J1 est peu dépendant de l'homocystéinémie retrouvée (*test du χ^2 : $p = 0.88$*).

b- Evolutivité de l'embryon à J2 :

Il est retrouvé une tendance à la différence de l'évolutivité de l'embryon à J2 suivant que la patiente présente une hyperhomocystéinémie ou pas (*$p = 0.0691$ au test exact de Fisher*).

c- Nombre de cellules embryonnaires à J2 :

Le nombre de cellules à J2 est corrélé significativement à l'homocystéinémie mesurée (*$p = 0.0005$ pour le test-t séries*). Le tableau 7 montre que plus l'embryon possède de cellules à J2 plus la différence s'accroît entre les deux groupes d'homocystéinémie : elle passe d'un facteur 0.8 à une cellule à un facteur 1.9 pour 4 cellules (qui est le nombre de cellules idéal à J2) et à un facteur 4.4 à 6 cellules en faveur du groupe normal pour l'homocystéinémie.

La différence la plus mince se situe à 3 cellules (facteur 1.5).

Il est à noter que les deux derniers groupes de 9 et 10 cellules ne sont pas exploitables en raison de l'absence d'effectif dans le groupe pathologique.

	Normale	Pathologique	
1	492 (50%)	58 (60%)	550 (50.9%)
2	91 (9.2%)	19 (19%)	110 (10.1%)
3	46 (4.6%)	3 (3%)	49 (4.5%)
4	206 (20.9%)	11 (11%)	217 (20%)
5	58 (5.9%)	2 (2%)	60 (5.5%)
6	44 (4.4%)	1 (1%)	45 (4.1%)
7	19 (1.9%)	1 (1%)	20 (1.8%)
8	22 (2.2%)	1 (5%)	23 (2.1%)
9	3 (0.3%)	0 (0%)	3 (0.2%)
10	3 (0.3%)	0 (0%)	3 (0.2%)
	984 (100%)	96 (100%)	1080

Tableau 6 : Tableau de distribution du nombre de cellules à J2 en fonction de la classe d'homocystéinémie.

Si on élimine les embryons ne possédant qu'une cellule à J2, c'est à dire ceux qui n'ont pas évolués, la différence entre les groupes d'homocystéinémie s'intensifie ($p = 0.0004$ pour le *test-t séries*).

Le tableau 8 réalisé avec ces données montre que le nombre de cellules à J2 va croissant dans le groupe normal et c'est l'inverse qui apparaît pour l'autre groupe.

A 2 cellules, le facteur est 2.7 en faveur du groupe pathologique et il passe à 1.5 puis 3.5 pour les groupes 4 et 6 cellules en faveur des valeurs normales d'homocystéinémie.

	Normale	Pathologique	
2	91 (18.4%)	19 (50%)	110 (20.7%)
3	46 (9.3%)	3 (7.8%)	49 (9%)
4	206 (41.8%)	11 (28%)	217 (40.9%)
5	58 (11.7%)	2 (5.2%)	60 (11.3%)
6	44 (8.9%)	1 (2.6%)	45 (8.4%)
7	19 (3.8%)	1 (2.6%)	20 (3.7%)
8	22 (4.4%)	1 (2.6%)	23 (4.3%)
9	3 (0.6%)	0	3 (0.5%)
10	3 (0.6%)	0	3 (0.5%)
	492 (100%)	38 (100%)	530

Tableau 7 : tableau de distribution du nombre de cellules à J2 en fonction des classes d'homocystéinémie pour tous les embryons ayant évolués.

d- Type de fragmentation à J2 :

Les résultats montrent que le type de fragmentation des embryons à J2 est dépendant de l'homocystéinémie ($p=0.05$ pour le test du χ^2). On note, dans le tableau 8, que la différence entre les classes d'homocystéinémie va en augmentant : facteur 0.5 pour "0", 1 pour "+", 1.5 pour "++", 1.5 pour "+++" en faveur du groupe normal.

	0	+	++	+++	
Normale	82 (16.5%)	167 (33.6%)	172 (34.6%)	75 (15,1%)	496 (100%)
Pathologique	13 (33.3%)	13 (33.3%)	9 (23%)	4 (10.2%)	39 (100%)
	95 (17.7%)	180 (33.6%)	181 (33.8%)	79 (14.7%)	535

Tableau 8 : tableau de distribution des classes de fragmentation en fonction des classes d'homocystéinémie. Les embryons "n" ont été éliminés car ils correspondent à des embryons n'ayant pas évolués.

e- Type d'embryon à J2 :

Les résultats sont significatifs concernant le type d'embryon à J2 en fonction des classes d'homocystéinémie ($p=0.05$ pour le test du χ^2). Il existe, respectivement, 0.5, autant, 1.1, 1.7 et

0.5 fois plus d'embryons de classe normohomocystéinémique dans les groupes I, II, III, IV et V. (Cf. tableau 9). Ce sont les classes extrêmes I et V qui sont les plus représentées chez le groupe hyperhomocystéinémique.

	Normale	Pathologique	
I	71 (14.3%)	12 (30.7%)	83 (15.5%)
II	207 (41.7%)	16 (41%)	223 (41.6%)
III	14 (2.8%)	1 (2.5%)	15 (2.8%)
IV	198 (39.9%)	9 (23%)	207 (38.6%)
V	6 (1.2%)	1 (2.5%)	7 (1.3%)
	496 (100%)	39 (100%)	535

Tableau 9 : Tableau de distribution du type de l'embryon à J2 en fonction de la classe d'homocystéinémie. Les embryons de type VI ont été exclus car n'ayant pas évolués.

Dans cette étude, il existe un biais important : tous les ovocytes prélevés ont été inclus dans les calculs. Or, on sait que de nombreux ovocytes ne sont pas aptes à être fécondés pour des raisons diverses comme l'immaturation induite par le syndrome des ovaires polykystiques, les ovocytes atrésiques : toutes anomalies indépendantes de l'homocystéinémie mais qui ont pu fausser les résultats observés ci-dessus.

Aussi, afin d'éliminer ce biais, seuls les ovocytes de type 2PN à J1 c'est à dire tous les ovocytes fécondés ont été retenus par la suite pour l'étude de l'influence de l'homocystéinémie sur l'embryon.

3- Les embryons issus d'ovocytes 2 PN à J1 :

a- L'évolutivité des embryons à J2, issus d'ovocytes à 2PN :

Les embryons à J2, issus d'ovocytes à 2 PN ont une évolutivité significativement moindre dans le groupe hyperhomocystéinémique ($p = 0.0306$ pour le test exact de Fisher). La répartition se fait suivant le tableau 11. Pour le calcul, nous n'avons pas éliminé les embryons à 1 cellule.

Il existe 1.1 fois plus d'embryons évolutifs dans la classe normale et 3.2 fois plus d'embryons non évolutifs dans la classe pathologique.

	Normale	Pathologique	
Oui	403 (95.9%)	34 (87.1%)	437 (95.2%)
Non	17 (4%)	5 (12.8%)	22 (4.7%)
	420 (100%)	39 (100%)	459

Tableau 10 : tableau de distribution de l'évolutivité des embryons issus d'ovocytes à 2 PN.

b- Type de fragmentation des embryons à J2, issus d'ovocytes à 2PN :

Si on considère les embryons à J2, issus d'ovocytes à 2 PN, la différence de fragmentation est statistiquement significative en fonction des classes d'homocystéinémie ($p=0.05$ pour le test du χ^2). les embryons de patientes hyperhomocystéinémiques sont moins fragmentés que les autres : 2 fois à "0", 0.6 fois pour "++". Par contre, on note une différence moindre pour le groupe "+++".(Cf. tableau 11)

	0	+	++	+++	
Normale	68 (16.8%)	138 (34.2%)	138 (34.2%)	57 (14.6%)	401 (100%)
Pathologique	12 (35.2%)	11 (32.3%)	7 (20.5%)	3 (11.7%)	33 (100%)
	80 (18.3%)	149 (34%)	145 (33%)	60 (14.4%)	434 (100%)

Tableau 11 : Tableau de distribution de la fragmentation des embryons issus d'ovocytes 2 PN, à J2 en fonction des classes d'homocystéinémie. Les embryons présentant une fragmentation "n" ont été exclus car ils n'avaient pas évolué.

c- Type d'embryon à J2, issus d'ovocytes 2 PN :

Il existe une différence presque significative entre les types d'embryon à J2, issus d'ovocytes à 2 PN ($p = 0.055$). Cette différence est surtout présente dans les groupes I, III, IV et V dans lesquels les embryons issus de classe normale sont, respectivement 0.5, 0.6, 1.8 et 0.3 fois plus représentés. (Cf. tableau 12).

	Normale	Pathologique	
I	62 (15.3%)	11 (32.3%)	73 (16.7%)
II	176 (43.6%)	14 (41.1%)	190 (43.4%)
III	8 (1.9%)	1 (2.9%)	9 (2%)
IV	153 (37.9%)	7 (20.5%)	160 (36.6%)
V	4 (0.9%)	1 (2.9%)	5 (1.1%)
	403 (100%)	34 (100%)	437

Tableau 12 :
Tableau de distribution du type d'embryon à J2 issus d'ovocytes à 2 PN en fonction des classes d'homocystéinémie. Les embryons de classe VI ont été exclus car n'ayant pas évolué.

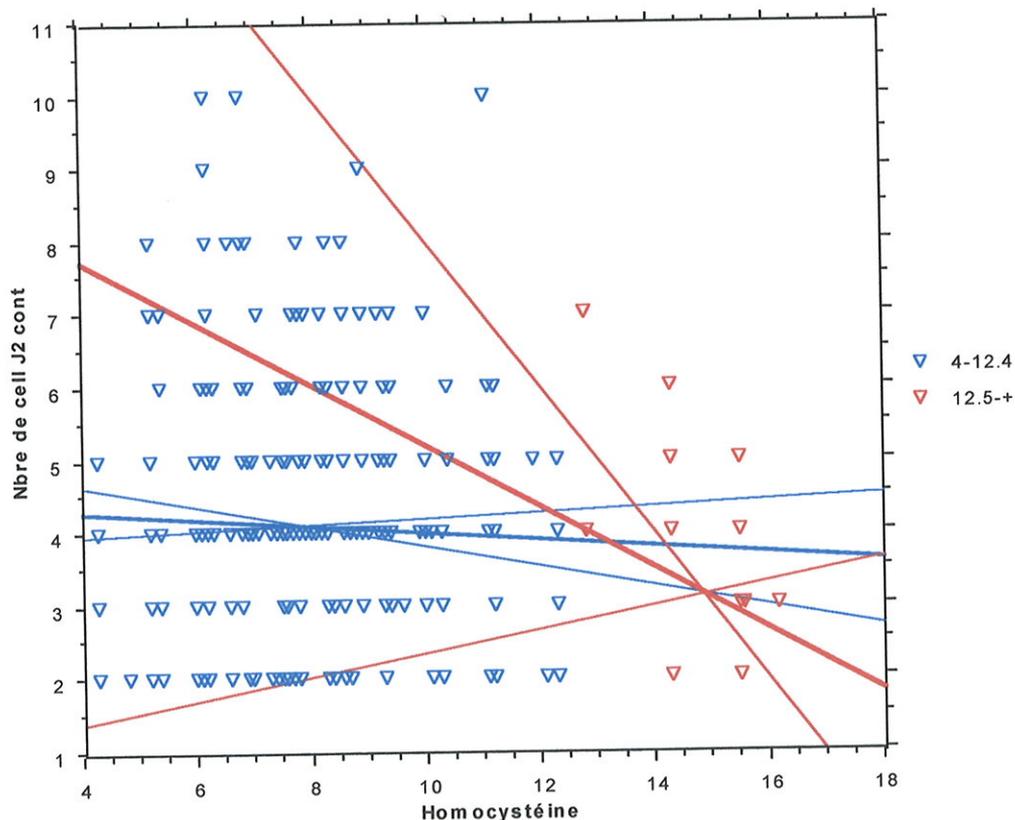
d- Nombre de cellules embryonnaires à J2 :

Il existe une différence significative entre le nombre de cellules à J2 chez les embryons issus d'ovocytes à 2 PN et les classes d'homocystéinémie ($p = 0.008$ pour le test-t séries). Cette différence est croissante en fonction du nombre de cellules : les patientes hyperhomocystéinémiques ont des embryons 2.5 fois plus nombreux dans la classe 2 cellules, 0.7 fois plus dans la classe 4 cellules et 0.3 fois plus dans la classe 6 cellules. (Cf. tableau 14). Ces résultats se retrouvent sur une courbe de régression dont les pentes sont exprimées suivant la classe d'homocystéinémie. (Cf. tableau 14)

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Nbre de cell
Normale	79 (19.7%)	36 (8.9%)	170 (42.3%)	48 (11.9%)	35 (8.7%)	16 (3.9%)	11 (2.7%)	3 (0.7%)	3 (0.7%)	401 (100%)
Pathologique	16 (48.4%)	3 (9%)	10 (30.3%)	2 (6%)	1 (3%)	1 (3%)	0 (0%)	0	0	33 (100%)
Homocyst	95 (21.8%)	39 (8.9%)	180 (41.4%)	50 (11.5%)	36 (8.2%)	17 (3.9%)	11 (2.5%)	3 (0.6%)	3 (0.5%)	434

Tableau 14 : Distribution du nombre de cellules des embryons issus d'ovocytes 2 PN, à J2 en fonction des classes d'homocystéinémie. Les embryons 1 cellule ont été exclus car ils n'avaient pas évolués.

Ces résultats sont résumés dans la courbe de régression bivariée du tableau 15.



Nbre de cell J2 cont = 9,448 - ,424 * Homocystéine; R² = ,066 (12.5-+)
 Nbre de cell J2 cont = 4,513 - ,05 * Homocystéine; R² = ,003 (4-12.4)

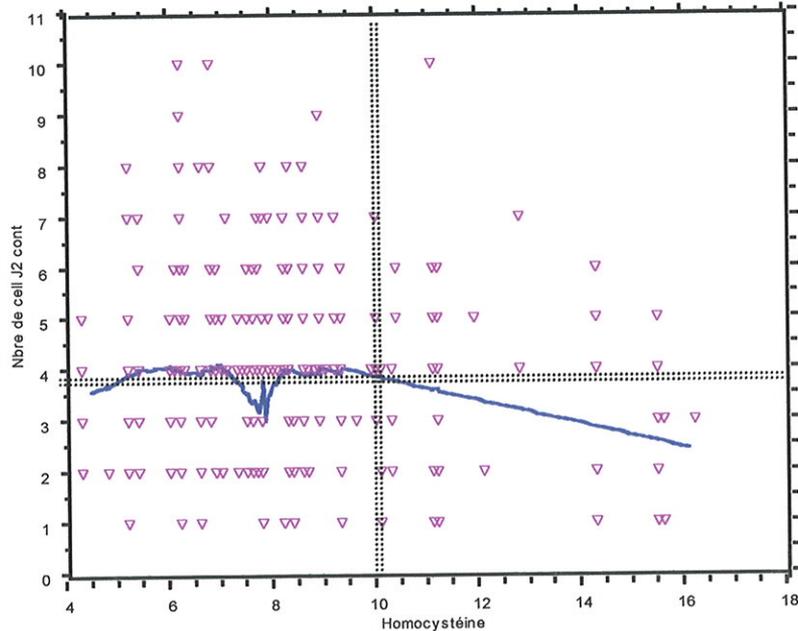
Tableau 15 : courbe de régression bivariée du nombre de cellules à J2 chez les embryons issus d'ovocytes à 2 PN et dont le nombre de cellules est supérieur à 1 cellule. Les droites en plein représentent les droites de régression et celles en pointillés les intervalles de confiance de 95%.

Comme cela était précisé, la valeur pathologique de l'homocystéinémie fixée à 12.5 :mol/l a été choisie en fonction des résultats observés dans une population générale d'hommes et de femmes de tout âge. Or, l'homocystéinémie est physiologiquement plus élevée chez les hommes et chez les femmes ménopausées (4).

Dans cette étude, toutes les patientes étaient jeunes. Il nous a semblé licite de voir si la concentration d'homocystéinémie de 12.5 :mol/l n'était pas une valeur au dessus du vrai seuil de pathogénicité.

Deux courbes de lissage ont été faites (Cf. tableaux 16 et 17). Sur ces courbes, la décroissance du nombre de cellules commence à partir de 10 :mol/l d'homocystéinémie.

Tableau 16 :
Nombre de cellules par embryon issu d'ovocytes à 2 PN en fonction de l'homocystéinémie. Courbe de lissage de Supersmoother. La barre verticale représente le point d'inflexion de



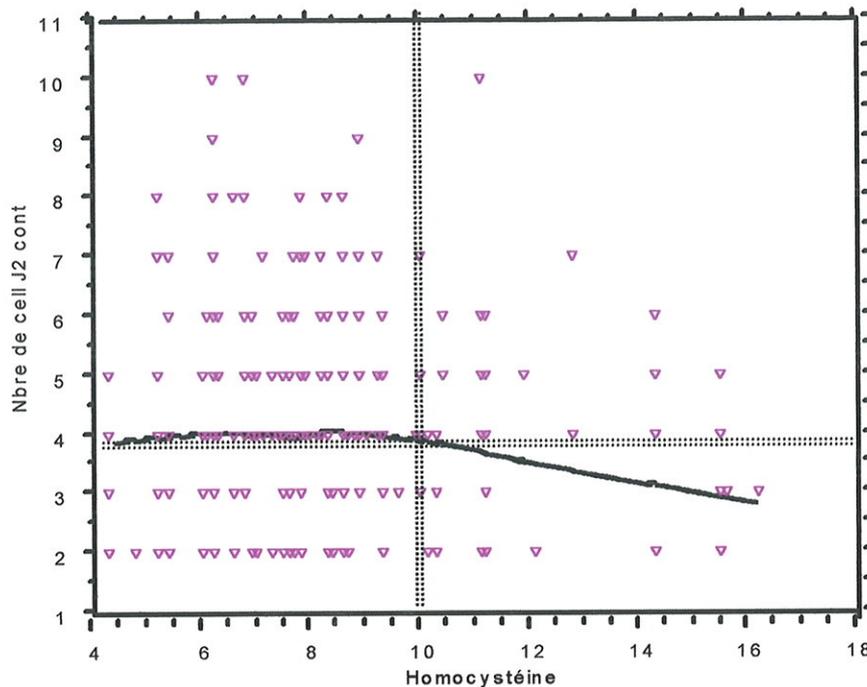


Tableau 17 : Nombre de cellules à J2 pour les embryons issus d'ovocytes à 2 PN. Le croisement des deux barres représente le point d'inflexion de la courbe. Courbe de Lowess.

En fonction de ces résultats, les effets de l'homocystéinémie ont été recalculés en fonction de ces deux nouvelles classes ± 10 :mol/l.

4- Les embryons issus de 2 PN suivant les classes ± 10 :mol/l d'homocystéinémie :

a- La grossesse :

Si on étudie le rapport qui existe entre cette nouvelle classe d'homocystéinémie et l'obtention ou non d'une grossesse biochimique, le résultat est statistiquement significatif (*Test exact de Fischer : $p = 0.0389$*).

Il existe 2.8 fois moins de grossesses biochimiques dans la classe > 10 :mol/l et 1.4 fois moins d'échec de grossesse dans la classe normale.

Si on raisonne par embryons transférés, cette différence est encore significative. (*Test exact de Fisher : $p = 0.0022$*).

Par contre, bien que le p diminue (de 0.1844 pour les classes ± 12.5 :mol/l à 0.1714 pour les classes ± 10 :mol/l), ce résultat n'est pas encore significatif pour les grossesses cliniques. Ceci vient probablement de l'effectif réduit de patientes dans la classe pathologique.

	Normale	Pathologique	
Oui	27 (36.9%)	3 (13%)	30 (31.25%)
Non	46 (63%)	20 (86.9%)	66 (68.75%)
	73 (100%)	23 (100%)	96

Tableau 18 : tableau de distribution des grossesses biochimiques en fonction des classes d'homocystéinémies ± 10 :mol/l.

b- Aspect à J1 :

Bien que l'aspect à J1 ne soit pas essentiellement dû à la concentration d'homocystéine sérique, il nous a semblé intéressant de voir l'effet de la nouvelle classe.

L'aspect de l'ovocyte ou du zygote à J1 est corrélé négativement à la concentration en homocystéinémie suivant les deux classes ± 10 :mol/l. ($p = 0.0017$ pour le test du χ^2).

	Normale	Pathologique	
0 GP	87 (10.9%)	42 (14.6%)	129 (11.9%)
1 GP	295 (37.1%)	105 (36.7%)	400 (37%)
2 GP	31 (3.9%)	8 (2.7%)	39 (3.6%)
1 PN	14 (1.7%)	4 (1.3%)	18 (1.6%)
2 PN	351 (44.2%)	108 (37.7%)	459 (42.5%)
Polyspermie	16 (2%)	19 (6.6%)	35 (3.2%)
	794 (100%)	286 (100%)	1080

Tableau 19 : distribution de l'aspect à J1 en fonction des classes d'homocystéinémie ± 10 :mol/l.

Il existe 1.1 fois moins de 2 PN, 1.3 fois moins de 1 PN et 3 fois plus de polyspermie dans la classe > 10 :mol/l.

c- Evolutivité à J2 :

L'évolutivité à J2 des ovocytes 2 PN est significativement corrélée à la classe d'homocystéinémie (*Test exact de Fischer : p = 0.0194*). Il existe 3 fois moins d'ovocytes évolués dans la nouvelle classe hyperhomocystéinémique.

d- Le nombre de cellules :

Il existe une forte différence entre le nombre de cellules à J2 suivant les deux classes d'homocystéinémie ± 10 :mol/l (*p = 0.0003 test t-séries*).

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Normale	61 (18%)	28 (8.2%)	148 (43.7%)	39 (11.5%)	31 (9.1%)	15 (4.4%)	11 (3.2%)	3 (0.8%)	2 (0.5%)	338 (100%)
Patho	34 (35%)	11 (11.4%)	32 (33.3%)	11 (11.4%)	5 (5.2%)	2 (2%)	0	0	1 (1%)	96 (100%)
T	95 (21.8%)	39 (8.9%)	180 (41.4%)	50 (11.5%)	36 (8.2%)	17 (3.9%)	11 (2.5%)	3 (0.6%)	3 (0.6%)	434

Tableau 20 : Tableau de distribution du nombre de cellules des embryons à J2, issus d'ovocytes à 2 PN pour les classes d'homocystéinémie plus ou moins 10 :mol/l. Restriction faite des embryons n'ayant pas évolués.

Les résultats sont comparables à ceux obtenus avec les classes d'homocystéinémie ± 12.5 :mol/l. Il y a 1.75 fois plus de classe "6 cellules", 1.3 fois plus de "4 cellules" et 2.2 fois plus de "7 cellules" dans le groupe < 10 :mol/l. Par contre, il existe 2 fois de classes "2 et 10" cellules et 1.4 fois plus de "3 cellules" dans le groupe > 10 :mol/l.

e- Fragmentation :

La fragmentation de l'embryon varie de façon significative en fonction des classes d'homocystéinémie ± 10 :mol/l ($p = 0.0005$ pour le test du χ^2). Les résultats sont juxtaposables avec ceux obtenus pour les classes d'homocystéinémie ± 12.5 :mol/l.

	0	+	++	+++	
Normale	51 (15%)	111 (32.8%)	125 (36.9%)	51 (15%)	338 (100%)
Patho	29 (30.2%)	38 (39.5%)	20 (20.8%)	9 (9.3%)	96 (100%)
	80 (18.4%)	149 (34.3%)	145 (33.4%)	60 (13.8%)	434

Tableau 21 : Tableau de distribution de la fragmentation de l'embryon à J2, issus d'ovocytes à 2 PN pour les classes d'homocystéinémie plus ou moins 10 :mol/l. Restriction faite des embryons n'ayant pas évolués.

f- Type d'embryon :

Il existe une différence significative entre le type d'embryon suivant les classes d'homocystéinémie ± 10 :mol/l ($p = 0.001$ pour le test du χ^2). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec les classes d'homocystéinémie ± 12.5 :mol/l avec une forte différence pour le groupe III.

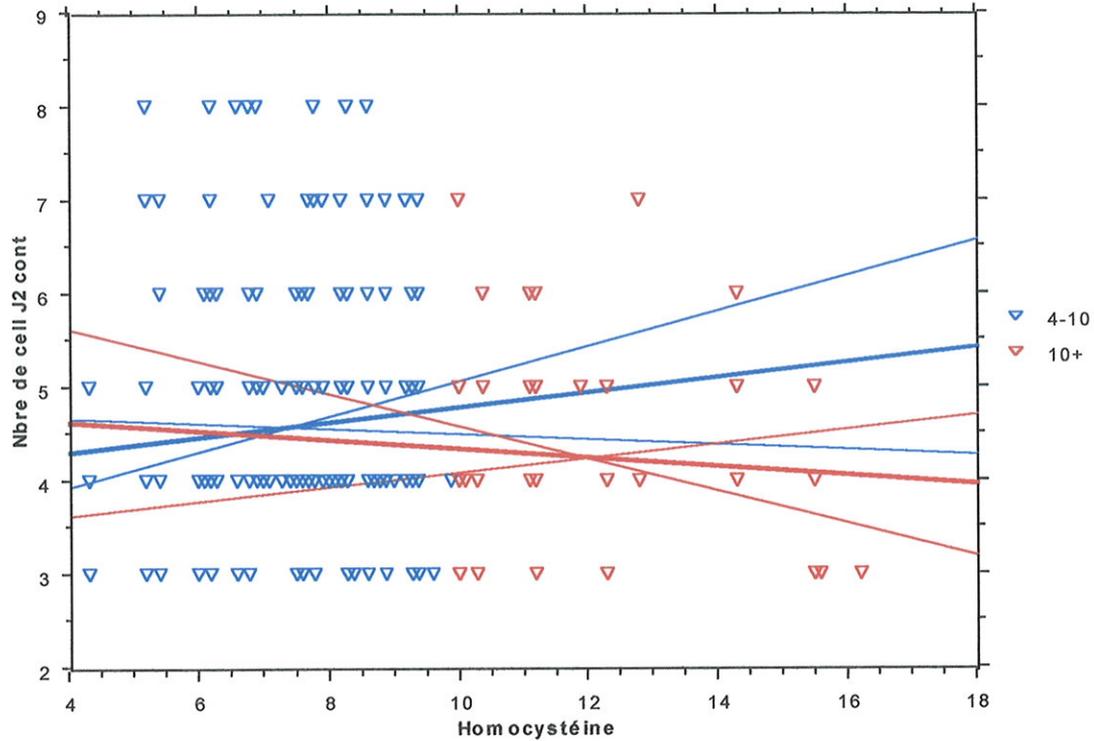
	Normale	Pathologique	
I	48 (14.2%)	25 (26%)	73 (16.8%)
II	154 (45.5%)	36 (37.5%)	190 (43.7%)
III	5 (1.4%)	4 (4.1%)	9 (2%)
IV	131 (38.7%)	29 (30.2%)	160 (36.8%)
V	0	2 (2%)	2 (0.4%)
	338 (100%)	96 (100%)	434

Tableau 22 : Tableau de distribution du type de l'embryon à J2 issu d'ovocyte 2PN pour les classes d'homocystéinémie plus ou moins 10 :mol/l. Restriction fa des embryons n'ayant pas évolués.

Pour vérifier si l'effet de l'homocystéinémie persistait quand elle était considérée comme pathologique au delà de 10 :mol/l, nous avons sélectionné les meilleurs embryons : 2 PN à J1 et le nombre de cellules de l'embryon à J2 compris entre 3 et 8. Le résultat est significatif ($p = 0.04$ pour le test-t séries). Ce qui se traduit par le tableau de distribution 23 et la courbe de régression bivariée du tableau 24.

	3	4	5	6	7	8	
Normale	28 (10.2%)	148 (54.4%)	39 (14.3%)	31 (11.5%)	15 (5.5%)	11 (4%)	272 (100%)
Pathologique	11 (18%)	32 (52%)	11 (18%)	5 (8.1%)	2 (3.2%)	0	61 (100%)
	39 (11.7%)	180 (54%)	50 (15%)	36 (10.8%)	17 (5.1%)	11 (3.3%)	333

Tableau 23 : distribution du nombre de cellules à J2 des embryons issus d'ovocytes à 2 PN dont le nombre de cellules est compris entre 3 et 8 en fonction des classes d'homocystéinémie ± 10 :mol/l.



Nbre de cell J2 cont = $4,833 - ,048 * \text{Homocystéine}$; $R^2 = ,01$ (10+)
 Nbre de cell J2 cont = $4,006 + ,08 * \text{Homocystéine}$; $R^2 = ,008$ (4-10)

Tableau 24 : courbe de régression du nombre de cellules des embryons comprenant de 3 à 8 cellules, issus d'ovocytes à 2 PN pour les deux classes d'homocystéinémie ± 10 :mol/l. Les droites pleines représentent les droites de régression et les droites en pointillés sont les intervalles de confiance de 95%.

		± 12.5 :mol/l		± 10 :mol/l
	Significativité	Remarques	Significativité	Remarques
Grossesse biochimique	non	p = 0.0944	Oui	2.8 x moins dans classe pathologique
Grossesse clinique	non	p = 0.1844	non	p = 0.1714
Aspect J1	non	p = 0.8891	Oui	1.1 x moins de 2 PN, 3x plus de polyspermie, 1.3 x moins de 1 PN dans classe pathologique
Evolutivité J2	Oui	3.2 x moins d'embryons évolués dans classe pathologique	Oui	3 x moins d'ovocytes évolués dans la classe pathologique
Cellules J2	Oui	1.25 x plus de 1 cell, 2.5 x plus de 2 cell, 1.5 x moins de 4 cell et 3 x moins de 6 cell pour classe pathologique	Oui	2 x plus de 2 et 10 cell, 1.4 x plus de 3 cell, 1.75 x moins de 6 cell, 1.3 x moins de 4 cell et 2.2 x moins de 7 cell dans classe pathologique
Fragmentation J2	Oui	2 x plus de 0, 1.6 x moins de ++ pour la classe pathologique	Oui	Idem classe 12.5
Type J2	Oui	2 x plus de I et 3 x plus de V pour la classe pathologique	Oui	Idem classe 12.5
Embryons transférés	Oui	Aucune grossesse biochimique avec > 12.5	Oui	
Embryon de 3 à 8 cellules	non	p = 0.88	Oui	

Tableau 25 : Récapitulatif

C- Discussion :

1- Généralités :

L'homocystéine et surtout son précurseur la méthionine occupent une place centrale dans tout le processus de la fécondation.

- ✓ La fonction donneur de méthyl est essentielle pour toutes les opérations de duplication de l'ADN, de synthèse des différents ARN, des phospholipides et des protéines.
- ✓ Le glutathion, la taurine et l'hypotaurine qui sont tous des métabolites de l'homocystéine sont les principaux systèmes tampons du potentiel redox de la cellule.
- ✓ La taurine mais aussi la méthionine sont des protecteurs de la membrane cellulaire et des osmorégulateurs. La taurine inhibe la synthèse de la phosphatidylcholine qui est le substrat de la phospholipase C, une puissante enzyme de la famille des hydrolases.

Pour chacun de ces effets, les conséquences d'un excès d'homocystéine entraînent des dégats très importants.

Chez l'embryon humain, aucune étude complète n'a été faite sur l'effet de l'hyperhomocystéinémie.

Un des intérêts essentiels de notre étude a été de démontrer le rôle néfaste de l'hyperhomocystéinémie en deçà de la norme communément admise de 12.5 :mol/l. Comme nous

l'avons démontré dans les calculs statistiques, il semble que l'effet délétère de l'homocystéine commencerait à des concentrations de 10 :mol/l.

Ce résultat est fondamental d'une part par les implications cliniques qu'il suggère, à savoir la nécessité de traiter ces patientes comme les autres patientes hyperhomocystéinémiques à 12.5 mais d'autre part il modifie le raisonnement sur les mécanismes en cause dans les anomalies observées sur les embryons.

La tranche d'homocystéinémie 10-12.5 :mol/l correspond suivant la classification établie plus haut à une hyperhomocystéinémie qui se dévoilerait si on effectuait un test MLT. Pour des raisons pratiques (dosage de l'homocystéinémie effectué seulement sur des déchets de prise de sang), nous n'avons pu doser l'homocystéinémie suivant le test MLT. Ceci implique que le mécanisme de cette "hyperhomocystéinémie" soit dû à un déficit partiel en Vitamine B6 ou en CBS et, donc seule la voie de la transulfuration est en cause pour ces patientes avec , pour conséquence un stress oxydatif sans problème de méthylation.(Cf. supra). Par contre, pour les patientes dont le dosage est supérieur à 12.5 :mol/l, la voie de la méthylation est en cause avec une participation de l'hyperhomocystéinémie sur le stress oxydatif malgré l'absence de conséquence sur la voie de la transulfuration.

Dans la suite de la discussion, nous verrons les différents effets que peut entraîner l'hyperhomocystéinémie sur l'embryon en se reportant à la physiopathologie et aux résultats observés dans l'étude. Nous envisagerons à la fois les effets avec 12.5 comme norme pathologique et les effets à 10.

2- Aspect de l'embryon à J1 :

Chez l'embryon de souris, Croteau *et al.* (142) et Menezo *et al.* (143) ont étudié la biosynthèse du SAM. Chez la souris, la conversion du SAM en méthionine est dépendante du pool endogène de méthionine. La concentration de SAM est relativement stable du stade d'ovocyte non fécondé à celui de morula. La synthèse du SAM est augmentée à partir du stade de la compaction entraînant la formation du blastocyste. Chez ceux-ci, bien que la concentration en méthionine soit plus importante, le taux de conversion de la méthionine est assez bas. Par contre, chez l'Homme (sur des ovocytes infertiles ou des embryons non utilisés), on observe une incorporation plus importante de la méthionine et une conversion plus fréquente du SAM. Menezo a étudié l'effet de deux inhibiteurs de la méthylation (l'éthionine et l'homocystéine) sur des embryons de souris aux stades 1 et 2 cellules. L'éthionine est très toxique sur ces embryons même à de faibles concentrations. L'homocystéine semble plus toxique sur le stade 1 cellule que sur le 2 cellules. Cette molécule bloque partiellement la formation du blastocyste à partir du stade 2 cellules.

Notre étude montre qu'il n'existe pas de corrélation entre l'aspect du zygote ou de l'ovocyte à J1 et la concentration sanguine en homocystéine avec comme seuil 12.5 :mol/l. On peut penser que ce résultat reflète un nombre trop restreint de cas pathologiques.

L'aspect à J1 est le reflet d'un bon déroulement de la fécondation puisque le stade optimal est 2 PN soit la formation d'une diploïde. Ce phénomène est, en fait la somme d'une multitude d'opérations antérieures.

Une des plus importantes est la phase de croissance folliculaire jusqu'au stade de follicule tertiaire. Cette croissance est caractérisée par une importante activité transcriptionnelle et par

l'accumulation de macromolécules (144, 145, 146). C'est durant cette période que presque tous les ARN sont synthétisés pour être utilisés pour la synthèse de protéines nécessaires à la maturation méiotique de l'ovocyte, à la fécondation et au développement embryonnaire précoce (147). Avant l'activation du génome embryonnaire qui se produit au stade 8 cellules dans l'espèce humaine, les synthèses protéiques de l'embryon dépendent exclusivement des transcrits maternels accumulés pendant l'ovogenèse. Cette intense activité transcriptionnelle diminue très fortement lorsque l'ovocyte achève sa croissance au stade antral. Cependant de faibles quantités d'ARN continuent à être synthétisés jusqu'au moment de la reprise de la méiose (148).

Nous avons dans le chapitre des effets cellulaires de l'hyperhomocystéinémie que celle-ci interfère par des phénomènes d'hypométhylation dans la production d'au moins un ARN : l'ARNr 5.8S qui est une sous-unité du ribosome (41). Ce dernier étant le site de production cytoplasmique des protéines, on peut penser que les patientes hyperhomocystéinémiques ont une synthèse protéique déficiente au niveau de leur follicule. De plus, l'hyperhomocystéinémie doit aussi avoir des effets délétères sur les autres ARN. Il existe aussi une toxicité de l'homocystéine à fortes doses sur la synthèse des glycoprotéines dans le reticulum endoplasmique(5). La modification du statut redox par l'hyperhomocystéinémie empêche la création des ponts disulfures des protéines et compromet donc leur stabilité. Ces phénomènes doivent contribuer à une immaturité cytoplasmique de l'ovocyte qui est un phénomène que l'on ne peut pas apprécier à l'examen mais qui doit conduire à une absence d'activation par reprise de la méiose bloquée en Métaphase II lors de la fécondation.

La mauvaise qualité de la fécondation peut aussi être le fait d'une immaturité nucléaire. L'acquisition de la compétence à maturer (blocage en Métaphase II) dépend de phénomènes de méiose qui nécessitent un apport de bases puriques et pyrimidiques ainsi que l'activation

d'enzymes comme la polymérase. D'une part l'homocystéine bloque la synthèse de thymidine (42) et d'autre part, en présence d'ion cuprique, les thiols peuvent entraîner des dommages sur le brin d'ADN lors du clivage de la molécule.(149, 150).

Lors de la fécondation, se produit le phénomène de largage du contenu des granules corticaux qui sont des extensions de la membrane ovocytaire. Ils contiennent des enzymes dont le rôle est de modifier la membrane pellucide et d'empêcher la pénétration de plusieurs spermatozoïdes (151).

Dans notre étude, si l'on prend comme norme 10:mol/l, il existe une différence entre les embryons issus de patientes normo ou hyperhomocystéinémiques.

Cette différence porte sur 3 critères :

- ✓ 10% de plus de 2 PN et 33 % de plus de 1 PN chez les patientes normales : ceci prouve que la fécondation se soit bien passée avec comme corollaire une absence d'influence de l'hyperhomocystéinémie sur les étapes précédemment citées. On peut penser que ceci est le fait de patientes présentant une hyperhomocystéinémie très modérée et dont les effets ne se sont pas encore faits sentir.
- ✓ Trois fois plus de polyspermie chez les patientes pathologiques : on peut mettre en cause le déficit de synthèse protéique sur le contenu des granules corticaux qui empêche la polyspermie. Ce résultat n'a pas été confirmé par une étude in vitro.

3- Evolutivité de l'embryon à J2 :

Que ce soit avec 12.5 ou avec 10 :mol/l, on observe de façon significative trois fois moins d'évolutivité des embryons dans la classe pathologique.

Plusieurs mécanismes sont surement en cause.

On peut impliquer en premier l'épuisement précoce des réserves en ARN, en protéines, glycoprotéines et phospholipides. En effet, chez l'embryon ces éléments sont uniquement issus des transcrits maternels et la transcription embryonnaire ne commence que vers le stade 8 cellules (152). De plus, mis à part leur rôle dans les réserves nutritives, les transcrits maternels sont essentiels puisqu'ils modifient progressivement la structure chromatiniene du génome embryonnaire et participent à son activation transcriptionnelle (153, 154).

Le deuxième mécanisme qui peut être mis en cause est le stress oxydatif. Chez les embryons de patientes hyperhomocystéinémiques, les mécanismes tampons présents chez l'embryon sont vite dépassés car soit la voie de la transulfuration est dépassée (chez les patientes présentant une hyperhomocystéinémie > 10 :mol/l), soit l'hyperhomocystéinémie provoque un largage de radicaux libres malgré une voie de la transulfuration intacte (chez les patientes présentant une hyperhomocystéinémie > 12.5 :mol/l).

4- La fragmentation de l'embryon à J2 :

Les résultats observés dans cette étude sont paradoxaux puisqu'ils montrent que plus une patiente est hyperhomocystéinémique, moins ses embryons sont fragmentés.

Les fragments cytoplasmiques sont constitués des produits de produits d'origine inconnue. Nous ne pouvons porter aucune conclusion sur le fait que les embryons de patientes hyperhomocystéinémiques soient moins fragmentés .

5- Le type de l'embryon à J2 :

Les résultats de l'étude montrent que la répartition des embryons chez les patientes hyperhomocystéinémiques que ce soit à 10 ou à 12.5 :mol/l suit une sorte de loi du tout ou rien. En effet, la différence entre les deux populations porte sur les qualités extrêmes embryonnaires I et V. Celles-ci sont, respectivement, 2 et 3 fois plus représentées chez les patientes pathologiques. Le type V correspond à un embryon chez lequel tous les blastomères sont très irréguliers.

Cette irrégularité peut venir des deux mécanismes imputables à l'hyperhomocystéinémie mais c'est vraisemblablement le stress oxydatif qui est le plus en cause avec les détériorations de la membrane cellulaire qu'il entraîne. Cela dit, il faut nuancer cette affirmation car elle ne porte que sur quelques embryons.

Le fait qu'il y ait plus de type I peut s'expliquer par des hypothèses que la recherche in vivo pourrait démontrer : une sorte de gel de l'embryon qui "économise" ces réserves et donc préserve un aspect correct.

6- Le nombre de cellules à J2 :

Les résultats les plus probants concernant les effets que peut avoir l'hyperhomocystéinémie se révèlent au niveau du nombre de cellules embryonnaires à J2.

En effet, si l'on rapporte le nombre de cellules à la qualité de l'embryon, on peut estimer qu'un embryon ayant un développement correct présente un nombre de cellules à J2 compris entre 4 et 8 cellules.

Un nombre inférieur à 3 indique un défaut de développement et de division cellulaire. Il existe en moyenne entre 1.5 et 2.5 fois plus d'embryons avec ce nombre de cellules chez les patientes hyperhomocystéinémiques. Ce fait est compatible avec un arrêt de développement précoce par épuisement des réserves, par défaut de division cellulaire due à un manque de métabolites et à une mauvaise duplication de l'ADN ou par action délétère du stress oxydatif.

S'il est vrai qu'un nombre insuffisant de cellules traduit une mauvaise qualité embryonnaire, l'inverse est aussi vrai et un embryon possédant plus de 8 cellules à J2 doit être considéré comme posant problèmes. Dans notre étude, nous avons sélectionné, à J2 uniquement les embryons issus d'ovocytes à 2 PN éliminant ainsi les embryons issus de polyspermie. Il semblerait donc que cette hypercellularité soit le fait de l'homocystéine qui perturberait la division cellulaire en l'activant de façon exagérée. Comme pour le problème de la fragmentation, nous n'avons pas assez d'échantillons de cette classe pour conclure formellement et apporter un début de réponse.

Nos résultats ont été confortés lorsque nous avons isolés les "meilleurs"embryons dont le nombre de cellules étaient compris entre 3 et 8 cellules. Le résultat montre une différence largement significative entre les deux populations de patientes.

7- L'obtention d'une grossesse :

La finalité de notre étude était de voir s'il existait une différence entre les populations de patientes hyperhomocystéinémiques ou non. Si ce résultat n'est pas significatif pour les patientes

dont l'homocystéinémie est supérieure à 12.5 :mol/l, on constate qu'aucune grossesse n'a été obtenue. Ce résultat est à pondérer du fait de la petitesse de l'échantillon des patientes pathologiques .

Néanmoins, si l'on considère la norme de 10 :mol/l, on observe presque 3 fois moins de grossesses dans le groupe pathologique. Ce résultat n'est pas étonnant si on se réfère aux résultats obtenus en observant les effets de l'hyperhomocystéinémie sur l'embryon.

8- Comparaison entre les deux normes d'hyperhomocystéinémie considérées dans cette étude :

Comme nous l'avons exposé en préambule, on peut supposer qu'il existe une différence entre les mécanismes physiopathologiques du groupe 10 et ceux du groupe 12.5. La voie de la méthylation n'est pas atteinte dans le groupe 10 mais celle de la transulfuration est en cause. Le contraire se passe pour le groupe 12.5.

En tenant compte du biais que peu entrainer la petitesse de l'échantillon des patientes > 12.5 :mol/l, le seul résultat statistiquement significatif porte sur le nombre de cellules. En effet, dans le groupe 10, le nombre moyen de cellules était de 2.32 alors que dans le groupe 12.5 il était de 1.8. L'interprétation de ce résultat est quelle corrobore les mécanismes physiopathologiques que l'on supposait être en cause pour les deux groupes. En effet, il est normal que le groupe 10 ait plus de cellules puisque la voie de la méthylation n'est pas déficiente et donc la synthèse de l'ADN, des ARN et des protéines n'est pas perturbée.

V- CONCLUSION :

Au terme de cette thèse, nous avons pu voir les effets importants que peut engendrer l'hyperhomocystéinémie. Cette pathologie de découverte relativement récente est, actuellement, au centre de nombreuses études dans des domaines aussi variés que la Cancérologie, l'Immunologie, la Néphrologie ou la Psychiatrie. Depuis 1962, pas moins de 3052 articles ont été publiés concernant cette pathologie. Il nous a semblé intéressant de voir le rôle que pouvait avoir cette pathologie dans l'Aide Médicale à la Procréation. Manifestement, elle semble à l'origine de complications assez importantes dans le développement de l'embryon. Mais beaucoup de choses reste à faire.

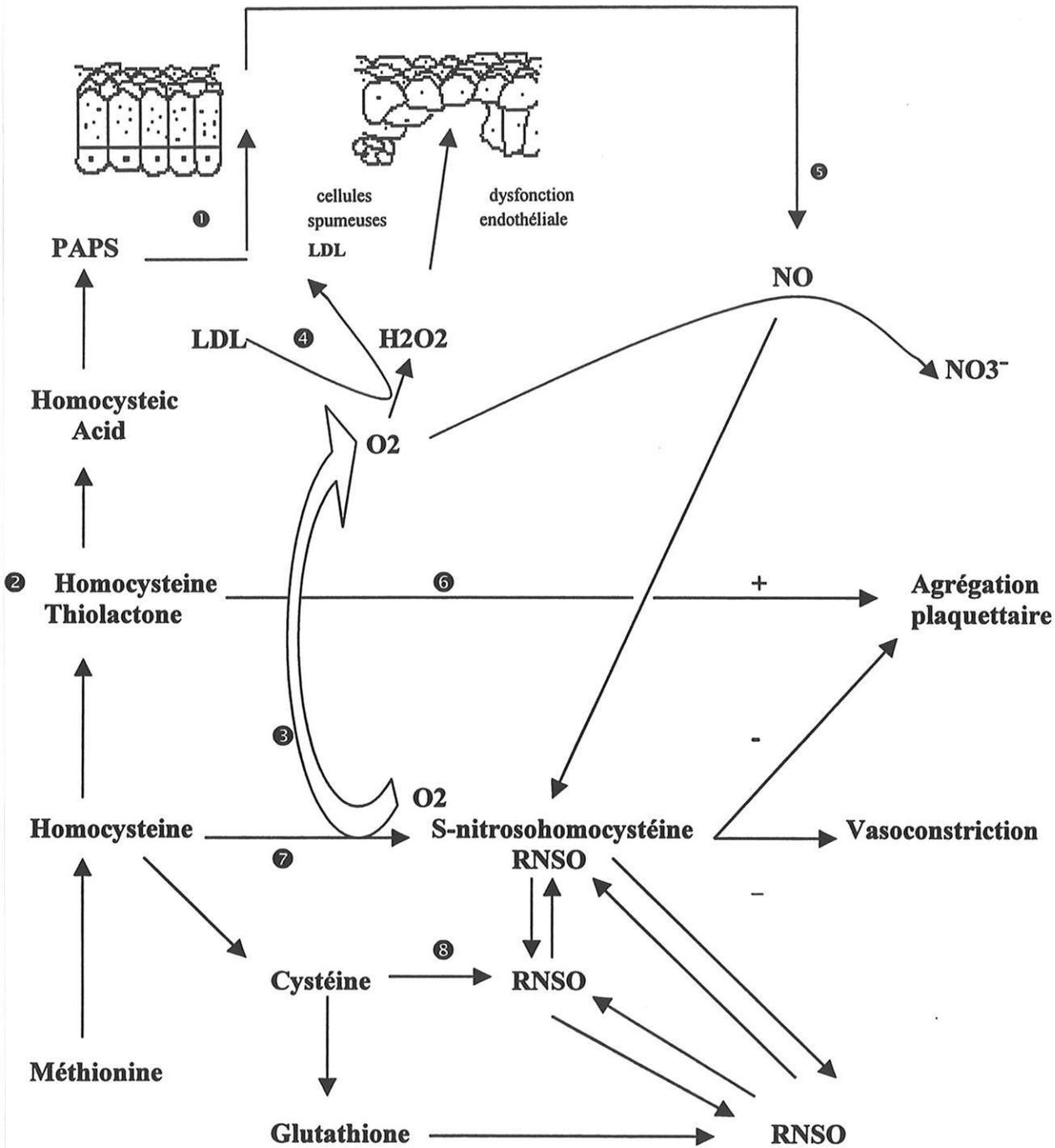
Dans un premier temps, nous prévoyons de traiter toutes les patientes dont l'homocystéinémie est supérieure à 10 :mol/l après accord du CPPRB. Ce traitement comportera 5 mg/j de folates, 100 mg/j de vitamine B6 (nous ne préjugeons pas du mécanisme de l'hyperhomocystéinémie) et 500 mg/10 j de vitamine B12. De plus, il est prévu de faire un dosage de l'homocystéinémie par MLT lors des prochains cycles de FIV, un dosage de la folatémie et des folates intra érythrocytaires associés à la recherche des principales mutations de la CBS et de la MTHFR. Une nouvelle confrontations des résultats au niveau embryonnaire sera fait pour apprécier le bénéfice du traitement.

Afin de valider les résultats de cette étude, une étude multicentrique sera effectuée.

Des études chez l'embryon de bovin seraient à faire pour valider l'importance des mécanismes physiopathologiques de l'hyperhomocystéinémie chez l'embryon.

-. *FIN*.-

ANNEXE 1 : ATHEROGENICITE DE L'HOMOCYSTEINE.



Mécanismes athérogéniques de l'homocystéine et leur modulation par les nitrogène oxydes :

- ① - métabolisme oxydatif de l'homocystéine en phospho-adénosyl phosphosulfate (PAPS).
- ② - activation des facteurs de coagulation V et XII.
- ③ - thiol-dépendant fabrication de radical oxyde facilitant l'oxydation des LDL (O₂^{·-}) et induisant des dommages endothéliaux.
- ④ - formation des cellules spumeuses.
- ⑤ - en conditions normales, l'oxyde nitrique (NO) est produit par les cellules endothéliales et réagit pour former le vasodilatateur S-nitrosohomocystéine.
- ⑥ - cette voie contrebalance chacun des mécanismes prothrombotiques athérogéniques en amont.
- ⑦ - S-nitrosohomocystéine est en équilibre avec les autres espèces de S-nitrosothiol (RNSO).

Reproduit avec la permission de Stamler JS.

CBS : séquence génomique

LOCUS HUMCBSA 2500 bp mRNA PRI 29-APR-1996
 DEFINITION Homo sapiens cystathionine beta-synthase (CBS) mRNA, complete cds.
 ORGANISM Homo sapiens
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 2500)
 AUTHORS Kruger,W.D. and Cox,D.R.
 TITLE A yeast system for expression of human cystathionine beta-synthase:
 structural and functional conservation of the human and yeast genes
 JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91 (14), 6614-6618 (1994)
 REFERENCE 2 (bases 1 to 2500)
 AUTHORS Kruger,W.D.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (18-NOV-1993) Warren D. Kruger, Population Science, Fox
 Chase Cancer Center, Philadelphia, PA 19111, USA
 REFERENCE 3 (bases 1 to 2500)
 AUTHORS Kruger,W.D.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (01-MAR-1996) Warren D. Kruger, Population Science, Fox
 Chase Cancer Center, Philadelphia, PA 19111, USA
 BASE COUNT 545 a 695 c 772 g 488 t

ORIGIN

```

1 tgaatcgccc ggggtcgccg tctccgctc gccgcagtcg gggcagccg tgcctcttt
61 tccatgtatc gtccaggatc ccatgcacaga ttctgttctc acgtctcctt acagagtttg
121 agcgggtgctg aactgtcagc acatctgtcc ggtccagcat gccttctgag acccccagg
181 cagaagtggg gccacagggc tgccccacc gctcagggcc aactcggcg aaggggagcc
241 tggagaaggg gtccccagag gataaggaag ccaaggagcc cctgtggatc cggcccgatg
301 ctccgagcag gtgcacattg cagctgggccc ggcctgcctc cgagtcccca catcaccaca
361 ctgccccggc aaaatctcca aaaatcttgc cagatattct gaagaaaatc ggggacacc
421 ctatggtcag aatcaacaag attgggaaga agttcggcct gaagtgtgag ctcttgcca
481 agtgtgagtt cttcaacgcy ggcgggagcg tgaaggaccg catcagcctg cggatgattg
541 aggatgctga gcgcgacggg acgctgaagc cgggggacac gattatcgag ccgacatccg
601 ggaacaccgg gatcgggctg gccctggctg cggcagtgag gggctatcgc tgcacatcgc
661 tgatgccaga gaagatgagc tccgagaagg tggacgtgct gcgggactg ggggctgaga
721 ttgtgaggac gccaccaat gccaggttcg actccccgga gtcacacgtg ggggtggcct
781 ggcggctgaa naacgaaatc cccaattctc acatcctaga ccagaccgc aacgccagca
841 accccctggc tcaactagac accaccgctg atgagatcct gcagcagtg gatgggagc
901 tggacatgct ggtggcttca gtgggcacgg gcggcacat cacgggcatt gccaggaagc
961 tgaaggagaa gtgtcctgga tgcaggatca ttgggtgga tcccgaagg tccatcctcg
1021 cagagccgga ggcggtgac cagagcgagc agacaaccta cgaggtgga gggatcggct
1081 acgacttcat ccccaggtg ctggacagga cgggtggtg caagtgttc aagagcaacg
1141 atgaggagc gttcacctt gcccgatgc tgatcgcga agagggctg ctgtgcccgtg
1201 gcagtgtgag cagcaggtg gcggtggccg tgaaggctg gcaggagctg caggaggcc
1261 agcgtctcgt ggtcattctg cccgactcag tgcggaaacta catgaccaag ttcctgagcg
1321 acaggtggat gctgcagaag ggcttctga aggaggagga cctcacggag aagaagcct
1381 ggtggtggca cctccgtgtt caggagctgg gcctgtcagc cccgctgacc gtgctcccga
1441 ccatcacctg tgggcacacc atcgagatcc tccgggagaa gggcttcgac caggcgccc
1501 tgggtgatga ggcgggggta atcctgggaa tggtagcgt tgggaacatg ctctcgtccc
1561 tgcttgccg gaaggtgag ccgtcagacc aagttggca agtcatctac aagcagttca
1621 aacagatccg cctcacggac acgctgggca ggctctcga catcctggag atggaccact
1681 tcgcccctgt ggtgcacgag cagatccagt accacagcac cgggaagtcc agtcagcggc
1741 agatggtgtt cggggtggtc accgccattg acttgctgaa cttcgtggcc gccaggagc
1801 gggaccagaa gtgaagtccg gagcgtggg cgtgctggag cgggcccgc accctgccc
1861 acttctcctt cgctttcctg agccctaaac acacgcgtga ttggtaactg cctggcctgg
1921 caccgttatc cctgcagagc gcacagagca tccgtctccc ctggttaaca catggcttc
1981 taaatggccc gttttacggc ctatgagatg aaatatgta ttttctctaa tgaacttcc
2041 tcttaggatg tttcaccaag gaaatattga gagagaagtc ggccaggtag gatgaacaca
2101 ggcaatgact gcgcagagtg gattaaagc aaaagagaga agagtccagg aaggggccc
2161 gagaagcctg ggtggctcag catcctccac gggctgcgcy tctgctcggg gctgagctgg
2221 cgggagcagt ttgctgtttt gggttttta attgagatga aattcaata acctaaaaat
2281 caatcacttg aaagtgaaca atcagcggca tttagtagat ccagaaagt gtgtaggcac
2341 cacctctgtc acgttctgga acattctgtc atacccccgt gaagcaatca tttcccctcc
2401 cgtcttctc ctcccctgac aactgctgat cgactttgtg tctctgtgtg ctaaaatagg
2461 ttttccctgt tctggacatt tcatataaat ggaatcacac
  
```

MTHFR : séquence génomique

LOCUS NM_005957 2196 bp mRNA PRI 22-DEC-1999
DEFINITION Homo sapiens 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (NADPH)
(MTHFR), mRNA.
ORGANISM Homo sapiens
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE 1 (bases 1 to 2196)
AUTHORS Goyette, P., Sumner, J.S., Milos, R., Duncan, A.M., Rosenblatt, D.S.,
Matthews, R.G. and Rozen, R.
TITLE Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA,
mapping and mutation identification
JOURNAL Nat. Genet. 7 (2), 195-200 (1994)
REFERENCE 2 (bases 1 to 2196)
AUTHORS Frosst, P., Blom, H.J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C.,
Matthews, R., Boers, G., den Heijer, M., Kluijtmans, L., van den
Heuvel, L. and Rozen, R.
TITLE A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common
mutation in methylenetetrahydrofolate reductase
JOURNAL Nat. Genet. 10 (1), 111-113 (1995)
REFERENCE 3 (bases 1 to 2196)
AUTHORS Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M and
Rozen R.
TITLE Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate
reductase
JOURNAL Mamm. Genome 9 (8), 652-656 (1998)

BASE COUNT 482 a 657 c 618 g 439 t
ORIGIN

```
1 aattccggag ccatggtgaa cgaagccaga gaaacagca gcctcaacc ctgcttggag
61 ggcagtgcc gcaagtggcag tgagagctcc aaagatagtt cgagatgttc caccocgggc
121 ctggaccctg agcggcatga gagactccgg gagaagatga ggcggcgatt ggaatctggt
181 gacaagtgg tctccctgga attcttccct cctcgaactg ctgagggagc tgtcaatctc
241 atctcaaggt ttgaccggat ggcaagcaggt ggccccctct acatagacgt gacctggcac
301 ccagcaggtg accctggctc agacaaggag acctcctcca tgatgatcgc cagcaccgcc
361 gtgaactact gtggcctgga gaccatcctg cacatgacct gctgccgtca gcgcctggag
421 gagatcacgg gccatctgca caaagctaag cagctgggcc tgaagaacat catggcgctg
481 cggggagacc caataggtga ccagtgggaa gaggaggagg gaggcttcaa ctacgcagtg
541 gacctggtga agcacatccg aagtgagttt ggtgactact ttgacatctg tgtggcaggt
601 tacccaaag gccacccga agcagggagc tttgaggctg acctgaagca ctgaaggag
661 aaggtgtctg cgggagccga tttcatcatc acgcagcttt tctttgaggc tgacacattc
721 ttccgctttg tgaaggcatg caccgacatg ggcatcactt gccccatcgt ccccgggatc
781 tttcccatcc agggctacca ctcccttcgg cagcttgtga agctgtccaa gctggagggtg
841 ccacaggaga tcaaggacgt gattgagcca atcaaagaca acgatgctgc catccgcaac
901 tatggcatcg agctggccgt gagcctgtgc caggagcttc tggccagtgg cttggtgcca
961 ggcctccact tctacaccct caaccgogag atggctacca cagaggtgct gaagcgcctg
1021 gggatgtgga ctgaggacct caggcgtccc ctaccctggg ctctcagtgc ccacccaag
1081 cgccgagagg aagatgtacg tcccatcttc tgggcctcca gaccaaagag ttacatctac
1141 cgtaccagag agtgggacga gttccctaac ggcgctggg gcaattcctc tccccctgcc
1201 tttggggagc tgaaggacta ctacctcttc tacctgaaga gcaagtcccc caaggaggag
1261 ctgctgaaga tgtgggggga ggagctgacc agtgaagcaa gtgtctttga agtctttggt
1321 ctttacctct cgggagaacc aaaccggaat ggtcacaagag tgacttgctt gccctggaac
1381 gatgagcccc tggcggctga gaccagctg ctgaaggagg agctgctgcy ggtgaaccgc
1441 cagggcatcc tcaccatcaa ctcacagccc aacatcaacg ggaagccgtc ctccgacccc
1501 atcgtgggct ggggccccag cgggggctat gtcttcaga aggctactt agagtttttc
1561 acttcccgcg agacagcgga agcacttctg caagtgtgga agaagtaga gctccggggtt
1621 aattaccacc ttgtcaatgt gaagggtgaa aacatcacca atgcccctga actgcagccg
1681 aatgctgtca cttggggcat ctccctggg cgagagatca tccagcccac cgtagtggat
1741 cccgtcagct tcatgttctg gaaggacgag gcctttgccc tgtggattga gcggtgggga
1801 aagctgtatg aggaggagtc cccgtcccgc accatcatcc agtacatcca cgacaactac
1861 ttctgtgtca acctgggtgga caatgacttc ccaactggaca actgcctctg gcaggtggtg
1921 gaagacacat tggagcttct caacaggccc acccagaatg cgagagaaac ggaggctcca
1981 tgaccctgcy tctgacgcc ctgctgttga gccactctg tcccgccttc ctctccaca
2041 gtgctgcttc tcttgggaac tccactctcc ttcgtgtctc tcccacccc gcctcactc
2101 cccacactga caatggcagc tagactggag tgaggcttcc aggctcttcc tggacctgag
2161 tcggccccac atgggaacct agtactctct gctcta
```

BIBLIOGRAPHIE

1. **Carson NA, Neil DW.** Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child.* 1962 ;37:505-13.
2. **McCully KS.** Vascular pathology of homocystéinémie : implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol.* 1969 ;56:11-28.
3. **Wilcken DE.** Novel risk factors for vascular disease : the homocysteine hypothesis of cardiovascular disease. *J Cardiovasc Risk.* 1998 ;5:217-21.
4. **Langman L.J.** Homocysteine. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1999 ;36(4):365-406.
5. **Selhub J.** Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr.* 1999 ;19 :217-46.
6. **Finkelstein J. D.** The metabolism of homocysteine : pathways and regulation. *Eur J Pediatr.* 1998 ; 157[Suppl 2] : S40-S44.
7. **Matthews R. G.** Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthétase : biochemistry and molecular biology. *Eur J Pediatr.* 1998 ;157[Suppl 2] : S54-S59.
8. **Kraus J.P.** Biochemistry and molecular genetics of cystathionine- β -synthetase deficiency. *Eur J Pediatr.* 1998 ;157[Suppl 2] : S50-S53.
9. **Walker M.C.** Changes in homocystéine levels during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1999 Mar ;180 (3 Pt 1) : 660-4.
10. **Malinow M R.** the relationship between maternal and neonatal umbilical cord plasma Homocyst(e)ine suggests a potential role for maternal homocyst(e)ine in fetal metabolism. *Am J Obstet Gynecol.* 1998 Feb ;178(2) : 228-33.
11. **Stegers-Theunissen RP.** Study of the presence of homocysteine in ovarian follicular fluid. *Fertil Steril.* 1993 Dec ;60(6) : 1006-10.
12. **Nygård O, Refsum H, Ueland PM et al.** Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution : the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr.* 1998 ; 67 : 263-270
13. **Nygård O, Refsum H, Ueland PM et al.** Coffee consumption and plasma total homocystéine : the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr.* 1998 ; 65 : 136-143.
14. **Arnadottir M.** Hyperhomocysteinemia in cyclosporin-treated renal transplant recipients. *Transplantation.* 1996 ;61 : 509-512.
15. **Pettersson T.** Serum homocystéine and methylmalonic acid in patients with rheumatoid arthritis and cobalaminopenia. *J Rheumatol.* 1998 ;25 : 859-863.
16. **Selhub J , Miller JW.** 1994. Regulation of plasma homocysteine concentration by nutrients and drugs. Dans *Methionine Metabolism : Molecular Mechanisms and Clinical Implications*, ed. JM Mato, A Caballero, pp. 89-98. Madrid : Cons Super. De Invest. Cient.
17. **Bostom A, Silbershatz H, Jacques P, Selhub J, D'Agostino R et al.** Post-methionine load hyperhomocysteinemia in persons with normal fasting total plasma homocysteine--- initial results from the NHLBI Family Heart Study. *Atherosclerosis.* 1995 ;116 : 147-51.
18. **van den Berg M, de Jong SC.** Variability of fasting and post-methionine plasma homocysteine levels in normo- and hyperhomocysteinaemic individuals. *Neth J Med.* 1999 Jul ;55(1) : 29-38.
19. **Sibani S, Christensen B.** Characterization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with hyperhomocystinuria. *Hum. Mutat.* 2000 ; 15 : 280-87.

20. **Goyette P, Summer JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt D, Matthews R.** Human methylenetetrahydrofolate reductase : isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genet.* 1994 ;7 : 195-200.
21. **Frosst P, Blom H, Milos R, Goyette P, Sheppard C, Matthews RG, Boers GJ.** A candidate genetic risk factor for vascular disease : a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genet.* 1995 ;10 : 111-13.
22. **Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeld JH.** Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation.* 1996 Jan ; 93(1) : 7-9.
23. **van der Put NMJ, Gabreels F, Stevens EMB, Smeitink JAM, Trijbels FJM.** A second mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene : an additional risk factor for neural-tube defects ? *Am J. Hum. Genet.* 1998 ; 62 : 1044-51.
24. **Kluijtmans LAJ, Wendel U, Stevens AMB, van den Heuvel LPW.** Identification of four novel mutations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Europ. J. Hum. Genet.* 1998 ;6 : 257-65.
25. **Wendel U, Bremer HJ.** Betaine in treatment of homocystinuria due to 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Europ. J. Pediat.* 1984 ;142 : 147-50.
26. **Hyland K, Smith I, Bottiglieri T, Perry J, Wendel U, Clayton PT.** Demyelination and decreased S-adenosylmethionine in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Neurology.* 1988 ;38 : 459-62.
27. **Tonetti C, Burtscher A, Bories D, Tulliez M, Zittoun J.** Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency in four siblings : a clinical, biochemical, and molecular study of the family. *Am. J. Med. Genet.* 2000 ; 91 : 363-67.
28. **Nugent A, Hadden DR, Carson NAJ.** Long-term survival of homocystinuria : the first case. *Lancet .* 1998 ;352 : 624-25.
29. **Carson NAJ, Neill DW.** Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch. Dis. Child.* 1962 ;37 : 505-13.
30. **Gu Z, Ramesh V, Kozich V, Korson MS, Kraus JP, Shih VE.** Identification of a molecular genetic defect in homocystinuria due to cystathionine beta-synthetase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 1991 ;49 : 406 seulement.
31. **Kozich V, de Franchis R, Kraus JP.** Molecular defect in a patient with pyridoxine-responsive homocystinuria. *Hum. Molec. Genet.* 1993 ;2 : 815-16.
32. **Hu FL, Gu Z, Kozich V, Kraus JP, Ramesh V, Shih VE.** Molecular basis of cystathionine beta-synthetase deficiency in pyridoxine responsive and nonresponsive homocystinuria. *Hum. Molec. Genet.* 1993 ;2 : 1857-60.
33. **Kluijtmans LAJ, Boers GHJ, Kraus JP, van den Heuvel LPWJ, Cruysberg JRM, Trijbels FJM, Blom HJ.** The molecular basis of cystathionine beta-synthetase deficiency in Dutch patients with homocystinuria : effect of CBS genotype on biochemical and clinical phenotype and on response to treatment. *Am. J. Hum. Genet.* 1999 ;65 : 59-67.
34. **Tsai MY, Bignell M, Schwichtenberg K, Hanson NQ.** High prevalence of a mutation in the cystathionine beta-synthetase gene. *Am. J. Hum. Genet.* 1996 ;59 : 1262-67.
35. **Sebastio G, Sperandeo MP, Panico M, de Franchis R, Kraus JP, Andria G.** The molecular basis of homocystinuria due to cystathionine beta-synthetase deficiency in Italian families, and report of four novel mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 1995 ; 56 : 1324-33.

36. Aral B, Coude M, London J, Aupetit J, Chasse J-F, Zabot M-T, Chadefaux-Vekemans B, Kamoun P. Two novel mutations (K384E and L539S) in the C-terminal moiety of the cystathionine beta-synthetase protein in two French pyridoxine-responsive homocystinuria patients. *Human. Mutat.* 1997 ;9 : 81-82.
37. Kim CE, Gallagher PM, Guttormsen AB, Refsum H, Ueland PM, Ose L, Folling I, Whitehead AS, Tsai MY, Kruger WD. Functionnal modelling of vitamin responsiveness in yeast : a common pyridoxine-responsive cystathionine beta-synthetase mutation in homocystinuria. *Hum. Molec. Genet.* 1997 ;6 : 2213-21.
38. Kluijtmans LAJ, Boers GHJ, Stevens EMB, Renier WO, Kraus JP, Trijbels FJM, van den Heuvel LPWJ, Blom HJ. Defective cystathionine beta-synthetase regulation by S-adenosylmethionine in a partially pyridoxine responsive homocystinuria patient. *J. Clin. Invest.* 1996 ;98 : 285-89.
39. Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Hine RJ, James SJ. Increase of plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DAN hypomethylation. *J. Biol. Chem.* 2000 ;275(38) : 29318-23.
40. Wainfan E, Dizik M, Stender M, Christman JK. Rapid appearance of hypomethylated DANN in livers of rats fed cancer-promoting, methyl-deficient diets. *Cancer Res.* 1989 Aug ;49(15) : 4094-97.
41. Sitz TO, Godburn KE, Somers KD, Nazar RN. Significance of S-adenosylmethionine pools in the hypomethylation of ribosomal RNA during the propagation of tissue cells and oncogenesis. *Cancer Res.* 1983 Dec ;43(12Pt 1) : 5681-6.
42. Fell D, Selhub J. Disruption of thymidylate synthesis and glycine-serine interconversion by L-methionine and L-homocystine in Raji cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1990 Jan ;1033(1) : 80-4.
43. Hoffman T, Hirata F, Bougnoux P, Fraser BA, Golgfarb RH, Heberman RB, Axelrod J. Phospholipid méthylation and phospholipase A2 activation in cytotoxic by human natural killers cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981 Jun ;78(6) : 3839-43.
44. Wall RT, Rubinstein MD, Cooper SL. Studies on the cellular basis of atherosclerosis : the effects of atherosclerosis risk factors on platelets and the vascular endothelium. *Diabetes.* 1981 ;30(suppl 2) : 39-43.
45. Wall RT, Harlan JM, Harker LA, Striker GE. Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro : a model for the study of vascular injury. *Thromb. Res.* 1980 Apr ;18(1-2) : 113-21.
46. Harker LA, Harlan JM, Ross R. Effect of sulfinpyrazone on homocysteine-induced endothelial injury an arteriosclerosis in baboons. *Circ. Res.* 1983 Dec ;53(6) : 731-9.
47. Domagala TB, Undas A, Libura M, Szczeklik A. Pathogenesis of vascular disease in hyperhomocysteinaemia. *J. Cardiovasc. Risk.* 1998 ;5 : 239-47.
48. Celermajer DS, SorensenK, Ryalls M, Robinson J, Thomas O, Leonard JV. Impaired endothelail function occurs in the systemic arteries of children with homozygous homocystinuria but not in their heterozygous parents. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1993 ;22 : 854-58.
49. Lentz SR, Sobey CG, Piegors DJ, Bhopaktar MY, Faraci FM. Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. *J. Clin. Invest.* 1996 ;98 : 24-29.

50. Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, Hsieh CM, Haber E. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine : a link to atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994 ;91 : 6369-73.
51. Tsai JC, Wang H, Perrella MA, Yoshizumi M, Sibinga ES. Induction of Cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cell. *J. Clin. Invest.* 1996 ;97 : 146-53.
52. Lubec B, Labudova O, Hoeger H, Muehl A. Homocysteine increases cyclin-dependant kinase in aortic rat tissue. *Circulation* . 1996 ;94 : 2620-25.
53. Hirano K, Ogihara T, Miki M, Yasuda H, Tamai H, Kawamura N. Homocysteine induces iron-catalysed lipid peroxydation of low-density lipoprotein that is prevented by alpha-tocopherol. *Free Radical Res.* 1994 ;21 : 267-75.
54. de Jong SC, Stehouwer CD, van den Berg M, Vischer UM. Endothelial marker proteins in hyperhomocysteinemia. *Thromb. Haemost.* 1997 ;78 : 1332-37.
55. Freyburger G, Labrousche S, Sassoust G, Rouanet F. Mild hyperhomocysteinemia and hemostatic factors in patients with arterial vascular diseases. *Thromb. Haemost.* 1997 ;77 : 466-71.
56. Domagala B, Undas A, Jankowski M, Libura M. Thrombin generation in hyperhomocysteinemia before and after treatment with folic acid and vitamin B12. *Thromb. Haemost.* 1997 ;77(Suppl.) : 530 (PS 2169).
57. Cedar H. DNA méthylation and gene activity. *Cell.* 1988 ;53 : 3-4.
58. Clarke S. Protein méthylation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1993 ;5 : 977-83.
59. Barber JR, Clarke S. Inhibition of protein carboxyl méthylation by S-adenosyl-L-homocystein in intact erythrocytes. Physiological consequences. *J. Biol. Chem.* 1984 ;259 : 7115-22.
60. Wong H, Yoshizumi M, Lai K, Tsai JC, Perrella MA, Haber E. Inhibition of growth and p21^{ras} méthylation in vascular endothelial cells by homocysteine but not cysteine. *J. Biol. Chem.* 1997 ;272 : 25380-85.
61. Sobotka-Briner C, Chelsky D. COOH-terminal méthylation of lamin B and inhibition of méthylation by farnesylated peptides corresponding to lamin B and other CAAX motif proteins. *J. Biol. Chem.* 1992 ;267 : 12116-22.
62. Xie H, Clarke S, Protein phosphatase 2A is reversibly modified by methyl esterification at its C-terminal leucine residue in bovine brain. *J. Biol. Chem.* 1994 ;269 : 1981-84.
63. Jakubowski H. Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. *J. Biol. Chem.* 1997 ;272 : 1935-42.
64. Kim WK, Pae Y-S. Involvement of N-methyl-D-aspartate receptor and free radical in homocysteine-mediated toxicity on rat cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience Lett.* 1996 ;216 : 117-20.
65. Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, d'Emilia DM. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997 ;94 : 5923-28.
66. Dalton ML, Gadson PF Jr, Wrenn RW, Rosenquist TH. Homocysteine signal cascade : production of phospholipid, activation of protein kinase C, and the induction of c-fos and c-myc in smooth muscle cells. *FASEB J.* 1997 ;11 : 703-11.
67. Majors AK, Jacobsen DW, Pyeritz RF. Upregulation of collagen accumulation by homocysteine and its abrogation by heparin(s). *Netherlands J. Med.* 1998 ;52(Suppl.) : S57.

68. **Bescond A, Augier T, Chareyre C, Charpiot P, Garçon D.** Homocysteine-induced elastolysis in arterial media : activation of MMP2. *Netherlands J. Med.* 1998 ;52(Suppl.) :S56-S57.
69. **Guo XW, Dudman NPB.** Homocysteine alters interactions between human leucocytes and vascular endothelial cells in vitro. *Netherlands J. Med.* 1998 ;52(Suppl.) : S58.
70. **Jacobsen DW, Poddar R.** Vascular dysfunction at the cellular level. *Nederlands J. Med.* 1998 ;52(Suppl.) : S1.
71. **Clarke R, Daly L, Robinson K.** Hyperhomocysteinemia : an independent risk factor for vascular disease. *N. Engl. J. Med.* 1991 ;324 : 1149-55.
72. **Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS.** A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA.* 1995 ;274 : 1049-57.
73. **Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D.** A prospective study of plasma Homocyst(e)ine and risk of myocardial infraction in US physicians. *JAMA.* 1992 Aug ;268(7) : 877-81.
74. **Nygård O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE.** Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 1997 Jul ;337(4) : 230-6.
75. **Boers GH.** The case for mild hyperhomocysteinemia as a risk factor. *J. Inherit Metab Dis.* 1997 Jun ;20(2) : 301-6.
76. **Thompson SG, Pyke Sd, Wood DA.** Using a coronary risk score for screening and intervention in general practice. British Family Heart Study. *J. Cardiovasc. Risk.* 1996 Jun ;3(3) : 301-6.
77. **Boers GH, Smals AG, Trijbels FJ, Fowler B, Bakkeren JA.** Heterozygosity for homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease. *N. Engl. J. Med.* 1985 Sep ;313(12) : 709-15.
78. **Boers GH.** Hyperhomocysteinemia as a risk factor for arterial and venous disease. A review of evidence and relevance. *Thromb. Haemost.* 1997 Jul ;78(1) : 520-2.
79. **Brattstrom L, Israelsson B, Hultberg B.** Plasma homocysteine tolerance in early-onset vascular disease. *Haemostasis.* 1989 ;19(Suppl. 1) :35-44.
80. **Malinow R.** Homocyst(e)ine and arterial occlusive disease. *J. Intern. Med.* 1994 Dec ;236(6) :603-17.
81. **Bienvenu T, Ankri A, Chadeaux B, Montalescot G, Kamoun P.** Elevated total plasma homocysteine, a risk factor for thrombosis. Relation to coagulation and fibrinolytic parameters. *Thromb. Res.* 1993 Apr ;70(2) : 123-9.
82. **den Heijer M, Koster T, Blom HJ, Bos GM, Briet E, Reitsma PH.** Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N. Engl. J. Med.* 1996 Mar ;334(12) :759-62.
83. **Kluijtmans LA, den Heijer M, Reitsma PH, Heil SG, Blom HJ.** Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase and factor V Leiden in the risk of deep-vein thrombosis. *Thromb. Haemost.* 1998 Feb .79(2) : 254-8.
84. **Kapusta L, Haagmans ML, Steegers EA, Cuypers MH, Blom HJ, Eskes TK.** Congenital heart defects and maternal derangement of homocysteine metabolism. *J. Pediatr.* 1999 Dec ;135(6) : 773-4.
85. **Bjorke-Monsen AL, Ueland PM, Schneede J, Vollset SE, Refsum H.** Elevated plasma total homocysteine and C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with spina bifida. *QJM.* 1997 Sep ;90(9) : 593-6.
86. **Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Blom HJ, Nijhuis JG, Thomas CM, Borm GF, Eskes TK.** Neural tube defects and elevated homocysteine levels in amniotic fluid. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1995 May ;172(5) : 1436-41.

87. **Mills JL, Scott JM, Kirke PN, McPartlin JM.** Homocysteine and neural tube defects. *J. Nutr.* 1996 Mar ;126(3) : 756S-60S.
88. **van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK.** Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet.* 1995 Oct ;346(8982) : 1070-1.
89. **Posey DL, Khoury MJ, Mulinare J, Adams MJ Jr, Ou CY.** Is mutated MTHFR a risk factor for neural tube defects ? *Lancet.* 1996 Mar ;347(9002) : 686-7.
90. **Beardsley T.** Spina bifida : MRC folate trials to start at last. *Nature.* 1983 Jun ;303(5919) :647.
91. **MRC Vitamin Study Group.** Prevention of neural tube defects : results of the Medical Research Council vitamin study. *Lancet.* 1991 ;338 : 131-137.
92. **Czeizel AE.** Periconceptional folic acid containing multivitamin supplementation. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1998 Jun ;78(2) : 151-61.
93. **Haddow JE, Hill LE, Kloza EM, Thanhauser D.** Neural tube defects after gastric bypass. *Lancet.* 1986 Jun ;1(8493) : 1330.
94. **Ubbink JB.** Should all elderly people receive folate supplements? *Drugs Aging.* 1998 Dec ;13(6) : 415-20.
95. **Nilsson K, Gustafson L, Faldt R, Andersson A, Brattstrom L.** Hyperhomocystenaemia : a common finding in a psychogeriatric population. *Eur. J. Clin. Invest.* 1996 Oct ; 26(10) : 853-9.
96. **Metz J.** Cobalamin deficiency and the pathogenesis of nervous system disease. *Annu. Rev. Nutr.* 1992 ;12 : 59-79.
97. **Dekker GA, van Geijn HP.** Endothelial dysfunction in preeclampsia : Part I : Primary prevention. Therapeutic perspectives. *J. Perinat. Med.* 1996 ;24 : 99-117.
98. **Dekker GA, van Geijn HP.** Endothelial dysfunction in preeclampsia : Part II : Reducing the adverse consequences of endothelial cell dysfunction in preeclampsia ; therapeutic perspectives. *J. Perinat. Med.* 1996 ;24 : 119-139.
99. **Vane JR, Anggard EE, Botting RM.** Regulatory functions of the vascular endothelium. *N. Engl. J. Med.* 1990 ;323 : 27.
100. **Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM.** Preeclampsia : an endothelial cell disorder. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1989 ;161 : 1200.
101. **Taylor RN, Heilbron DC, Roberts JM.** Growth factor activity in the blood of women in whom preeclampsia develops is elevated from early pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1990 ;163 : 1839.
102. **Redman CWG.** The placenta, preeclampsia and chorionic villitis. In : Redman CWG, Sargent LL, Starkey PM : The human placenta, Blackwell Scientific Publications, Oxford 1993.
103. **Smarason AK, Sargent LL, Starkey PM, Redman CWG.** The effect of placental syncytiotrophoblast microvillous membranes from normal and preeclamptic women on the growth of endothelial cells in vivo. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 1993 ;100 : 943.
104. **Endresen MJ, Lorentzen B, Henriksen T.** Increased lipolytic activity and high ratio of free fatty acids to albumin in sera from women with preeclampsia leads to triglyceride accumulation in cultured endothelial cells. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1992 ;167 : 440.
105. **Fisher S.** Cytotrophoblasts in preeclampsia have an altered adhesion phenotype that reduces invasive capacity. (Abstarct N°1, State of the Art Lecture, Ixth ISSHP World Congress, March 1994, Sydney). In : Hypertension and Pregnancy Vol. 13 1994.

106. Greer IA, Leask R, Hodson BA, Dawes J, Kilpatrick DC, Liston WA. Endothelin, élastase and endothelial dysfunction in preeclampsia. *Lancet*. 1991 ;337 : 558.
107. Ware Branch D, Mitchell MD, Miller E, Palinski W, Witztum JL. Preeclampsia and serum antibodies to oxidised low-density lipoprotein. *Lancet*. 1994 ;343 : 645.
108. Zeeman GG, Dekker GA. Pathogenesis of preeclampsia. *Clin Pbstet. Gynecol*. 1992 ;35 : 317.
109. Tsukimori K, Ishida K, Maeda H, Koyanagi T, Nakano H. The superoxyde generation of neutrophils in normal and preeclamptic pregnancies. *Obstet. Gynecol*. 1993 ;81 : 536.
110. Walsh SW. Maternal-placental interactions of oxydative stress and antioxydants in preeclampsia. *Semin. Reprod. Endocrinol*. 1998 ;16(1) : 93-104.
111. Walsh SW. Trophoblast and placental villous core production of lipid peroxides, Thromboxane and prostacyclin in preeclampsia. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 1995 ;80(6) : 1888-93.
112. Walsh SW, Wang Y. Deficient glutathione peroxydase activity in preeclampsia is associated with increased placental production of thromboxane and lipid peroxydes. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 1993 ;169(6) : 1456-61.
113. Wang YP, Walsh SW, Guo JD, Zhang JY. The imbalance between thromboxane and prostacyclin in preeclampsia associated with an imbalance between lipid peroxydes and vitamine E in maternal blood. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 1991 Dec ;165(6 Pt 1) : 1695-700.
114. Uotila JT, Tuimala RJ, Aarnio TM. Findings on lipid peroxydation and antioxydant function in hypertensive complications of pregnancy.
115. Harrison GA, Humphrey KE, Wilton AN, Kave JA. Linkage analysis of preeclampsia (Abstract n°73, Ixth ISSHP World Congress, March 1994, Sidney) In : Hypertension in Pregnancy, Vol. 13, 1994.
116. Powers RW, Rhobert WE, Majors AK, Ojimba JI, Ness RB, Cromblehome WR, Roberts JM. Plasma homocysteine concentration is increased in preeclampsia and is associated with evidence of endothelial activation. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 1998 Dec ;179 (6 Pt 1) : 1605-11.
117. Nelen WLD, van der Molen EF, Blom HJ, Heil SG, Steegers EAP, Eskes TKAB. Recurrent early pregnancy loss and genetic-related disturbances in folate and homocysteine metabolism. *Br. J. Hosp. Med*. 1998 Nov-Dec ;58(10) : 511-3.
118. Nelen WLD, Blom HJ, Steegers EAP, den Heijer M, Thomas CM, Eskes TK. Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss. *Obstet. Gynecol*. 2000 Apr ;95(4) : 519-24.
119. Burke G, Robinson K, Refsum H, Stuart B, Drumm J, Graham I. Intrauterine growth retardation, perinatal death and maternal homocysteine levels. *N. Engl. J. Med*. 1992 Jan ;326(1) : 69-70.
120. Aubard Y, Darodes N, Cantaloube M, Aubard V, Diallo D, Teissier MP. Hyperhomocysteinemia and pregnancy : a dangerous association. *J. Gynecol. Biol. Reprod. (Paris)*. 2000 Jun ;29(4) : 363-72.
121. de Vries JI, Dekker GA, Huijgens PC, Jakobs C, Blomberg BM, van Geijn HP. Hyperhomocysteinemia and protein S deficiency in complicated pregnancies. *Br. J. Obstet. Gynecol*. 1997 Nov ;104(11) : 1248-54.
122. Leeda M, Riyazi N, de Vries JI, Jacobs C, van Geijn HP, Dekker GA. Effects of folic acid and vitamine B6 supplementation on women with

- hyperhomocysteinemia and a history of preeclampsia or fetal growth retardation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1998 Jul ;179(1) : 135-9.
123. **Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, Emblem BM, Tverdal A, Gjessing HK, Monsen AL, Ueland PM.** Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcome : The Hordaland Homocysteine Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000 Apr ;71(4) : 962-8.
 124. **Goddjin-Wessel TA, Wouters MG, van der Molen EF, Spuijbroek MD, Steegers-Theunissen RP, Blom HJ, Boers GH, Eskes TK.** Hyperhomocysteinemia : a risk factor for placental abruption or infarctii. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1996 May ;66(1) : 23-9.
 125. **Quere I, Bellet H, Hoffet M, Jambon C, Mares P, Gris JC.** A woman with five consecutive fetal deaths : case report and retrospective analysis of hyperhomocysteinémie prevalence in 100 consecutive women with recurrent miscarriages. *Fertil. Steril.* 1998 Jan ;69(1) : 152-4.
 126. **Gerding H.** Ocular complications and a new surgical approach to lens dislocation in homocystinuria due to cystathionine- β -synthetase. *Eur. J. Pediatr.* 1998 ;157(Suppl. 2) : S94-S101.
 127. **Irreverre F, Mudd SH, Heizer WD, Laster L.** Sulfite oxydase deficiency : studies of a patient with mental retardation, dislocated ocular lenses, and abnormal urinary excretion of S-sulfo-L-cysteine, sulfite, and thiosulfate. *Biochem. Med.* 1967 ;1 : 187-92.
 128. **Johnson JL, Wadman SK.** Molybdenum cofactor deficiency. In : Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D : The metabolic basis of inherited diseases, 6th edn. McGraw-Hill, New York, p 1463.
 129. **Kato I, Dnistrian AM, Schwartz M, Toniolo P, Koenig K, Shore RE.** Serum folate, homocysteine and colorectal cancer risk in women : a nest case-control study. *Br. J. Cancer.* 1999 Apr ;79(11-12) : 1917-22.
 130. **Goodman MT, McDuffie K, Hernandez B, Wilkens LR, Selhub J.** Case-control study of plasma folate, homocysteine, vitamin B(12), and cysteine as markers of cervical dysplasia. *Cancer.* 2000 Jul ;89(2) : 376-82.
 131. **Thomson SW, Heimbürger DC, Cornwell PE, Turner ME, Sauberlich HE, Fox LM, Butterworth CE.** Correlates of total plasma homocysteine : folic acid, copper, and cervical dysplasia. *Nutrition.* 2000 Jun ;16(6) : 411-6.
 132. **Wu K, Helzlsouer KJ, Comstock GW, Hoffman SC, Nadeau MR, Selhub J.** A prospective study on folate, B12, and pyridoxal 5'-phosphate (B6) and breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1999 Mar ;8(3) : 209-17.
 133. **Walter JH, Wraith JE, White FJ, Bridge C, Till J.** Strategies for the treatment of cystathionine β -synthetase deficiency : the experience of the Willink Biochemical Genetics Unit over the past 30 years. *Eur. J. Pediatr.* 1998 ;157(Suppl.2) : S71-S76.
 134. **Woo KS, Chook P, Lolin YI, Sanderson JE.** Folic acid improves arterial endothelial function in adults with hyperhomocysteinémie. *JACC.* 1999 ;34(7): 2002-6.
 135. **Carmody BJ, Arora S, Avena R, Cosby K, Sidawy AN.** Folic acid inhibits homocysteine-induced proliferation of human arterial smooth muscle cells. *J. Vasc. Surg.* 1999 Dec. ;30(6) : 1121-27.
 136. **Clarke R, Collins R.** Can dietary supplements with folic acid or vitamin B6 reduce cardiovascular risk ? Design of clinical trials to test the homocysteine hypothesis of vascular disease. *J. Cardiovasc. Risk.* 1998 ;5(4) : 249-55.

137. Landgren F, Israelsson B, Lindgren A, Hultberg B, Andersson A. Plasma homocysteine in acute myocardial infarction : homocysteine-lowering effect of folic acid. *J. Int. Med.* 1995 ;237 : 381-85.
138. Ubbink JB, Vermaak WJH, van der Merwe A. Vitamin requirements for the treatment of hyperhomocysteinemia in humans. *J. Nutr.* 1994 ;124 : 1927-33.
139. den Heijer M, Brouwer IA, Bos GMJ, Blom HJ. Vitamin supplementantation reduces blood homocysteine levels : a controlled trial in patients with venous thrombosis and healthy volunteers. *Arterioscl Thromb. Vasc. Biol.* 1998 ;18 : 356-61.
140. Eskes TKAB. Open or closed ? A world of difference : a history of homocysteine research. *Nutr. Rev.* 1998 Aug ;56(8) : 236-44.
141. MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects : results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet.* 1991 ;338 : 131-7.
142. Crouteau S, Menezo Y. Methylation in fertilised and parthenogenetic preimplantation mouse embryos. *Zygote* . 1994 Feb ;2(1) : 47-52.
143. Menezo Y, Khatchadourian C, Gharib A, Hamidi J, Greenland T, Sarda N. Regulation of S-adenosyl methionine synthesis in the mouse embryo. *Life Sci.* 1989 ;44(21) : 1601-9.
144. Eppig JJ. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* 1996 ;8(4) : 485-9.
145. Eppig JJ, Schultz RM, O'Brien M, Chesnel F. Relationship between the development programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol.* 1994 Jul ;164(1) : 1-9.
146. Fair T, Hulshof SC, Hyttel P, Greve T, Boland M. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 1997 Feb ;46(2) : 208-15.
147. Masui Y, Markert CL. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Expl. Zool.* 1971 ;177 : 129-46.
148. Bachvavora R, de Leon V, Johnson A, Kaplan G, Paynton BV. Changes in total RNA, polyadenylated RNA, and actin mRNA during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol.* 1985 ;108 : 325-31.
149. Reed CJ, Douglas KT. Single-strand cleavage of DNA by Cu(II) and thiols : a powerful chemical DNA-cleaving system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989 Aug ;162(3) : 1111-7.
150. Reed CJ, Douglas KT. Chemical cleavage of plasmid DNA by glutathione in the presence of Cu(II) ions. The Cu(II)-thiol system for DNA strand scission. *Biochem. J.* 1991 May ;275 (Pt 3) : 601-8.
151. Hoodbhoy T, Talbot PR. Mammalian cortical granules : contents, fate, and function. *Mol. Reprod. Dev.* 1994 ;39(4) : 439-48.
152. Kopecny V, Fléchon JE, Camous S, Fulka J. Jr. Nucleologenesis and the onset of transcription in the eight-cell bovine embryo : fine-structural autoradiographic study. *Mol. Reprod. Dev.* 1989 ;1(2) : 79-90.
153. Thompson EM, Legouy E, Renard JP. Mouse embryos do not wait for the MBT : chromatin and RNA polymerase remodelling in genome activation at the onset of development. *Dev. Genet.* 1998 ;22(1) : 31-42.
154. Christians E, champion E, Thompson EM, Renard JP. Expression of the HSP 70.1 gene, a landmark of early zygotic activity in the mouse embryo, is restricted to the first burst of transcription. *Development.* 1995 Jan ;121(1) : 113-22.

155. **Renard JP, , Baldacci P, Richoux-Duranthon V, Pournin S, Babinet C.** A maternal factor affecting mouse blastocyst formation. *Development*. 1994 Apr ;120(4) : 797-802.

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

NOM et Prénom : CALY Hugues

Sujet de la thèse : Influence de l'hyperhomocystéinémie sur la fécondation in vitro : à propos de 96 cycles.

THESE : MEDECINE-FACULTE DE MEDECINE DE LIMOGES ANNEE 2000

Numero d'identification :

Mots clefs : HYPERHOMOCYSTEINEMIE-FIV-EMBRYONS-SEUIL PATHOLOGIQUE-TAUX DE GROSSESSE

Résumé :

L'hyperhomocystéinémie est connue pour provoquer des défauts de fermeture du tube neural et des pathologies vasculaires, psychiatriques, oculaires, cancéreuses et obstétricales (MFIU, RCIU, pré-éclampsie, fausses couches). Elle est induite par des mutations des gènes de la MTHFR ou de la CBS et par des carences en vitamines B6, folates et B12. Les deux principaux effets de l'hyperhomocystéinémie sont l'hypométhylation de l'ADN, des ARN, des phospholipides et des protéines et une augmentation importante du stress oxydatif. Le traitement consiste en une supplémentation de ces vitamines.

Nous avons dosé l'homocystéinémie par test rapide de 90 patientes, soit 96 cycles de FIV. 1080 ovocytes ont été étudiés. Le seuil pathologique était fixé à 12.5 µmol/l.

Les résultats montrent une corrélation importante entre la concentration en homocystéine sérique et le devenir de ces ovocytes. Il y a eu 3 fois moins de grossesses biochimiques dans le groupe pathologique. L'aspect à J1 et l'évolutivité à J2 sont liés de façon négative à l'homocystéinémie. Parmi les embryons ayant évolués à J2, le nombre de cellules embryonnaires, le typage de l'embryon et le taux de fragmentation montrent une moins bonne qualité dans le groupe hyperhomocystéinémique.

Nous proposons un nouveau seuil pathologique à 10 µmol/l d'homocystéinémie. A cette concentration, sont retrouvés les mêmes effets embryonnaires de l'homocystéine. Les phénomènes physiopathogéniques de l'hyperhomocystéinémie sur l'embryon sont probablement les mêmes que chez l'adulte avec une participation importante de l'hypométhylation sur les transcrits maternels de l'ovocytes et du stress oxydatif.

Il sera nécessaire d'étudier les effets de l'hyperhomocystéinémie sur l'embryon et de comparer les résultats après traitement des patientes par Vitamines B6, folates et B12. Nous proposons d'effectuer une étude multicentrique pour valider cette thèse à la fois sur les résultats et sur le nouveau seuil pathologique envisagé.

Jury :	Président :	M. le Professeur Henri-Jean PHILIPPE
	Juges :	M. le Professeur Jean-Claude ALDIGIER
		M. le Professeur Denis VALLEIX
		M. le Maitre de Conférence Universitaire Paul Michel LAPLAUD
	Directeur :	M. le Docteur Pascal FIVER
	Membres invités :	M. le Docteur Yves AUBARD
		Mme le Docteur Sophie DELCLEVE-PAULHAC

NAME and Firstname: CALY Hugues

Subject: The influence of hyperhomocysteinemia in IVF: study of 96 cycles.

THESIS: MEDECINE-FACULTE DE MEDECINE DE LIMOGES YEAR 2000

Identification Number:

Key words: Hyperhomocysteinemia- IVF- Embryos- Pathologic threshold- Pregnancy rate.

Summary:

Hyperhomocysteinemia is known to induce neural tube defects and vascular, psychiatric, ocular lens, neoplastic, and obstetrical diseases. It's due to mutations of MTHFR and CBS genes or deficiency of B6, folates or B12 vitamins. The two principal effects of hyperhomocysteinemia are the hypomethylation of DNA, RNA, phospholipids and proteins and an important increase of oxidative stress. The treatment consists in supplementation of this vitamins.

A rapid test was done on 90 patients to measure the homocysteinemia. 1080 oocytes were studied. The pathologic threshold was 12.5 µmol/l.

Ours results showed an important correlation between the homocysteinemia and the oocytes outcome. There are three times less biochemist pregnancies in the pathologic group. The aspect at one day and the development at two days were negatively linked to the homocysteinemia. Among the embryos who were developed at two days, the number of embryonic cells, the class of the embryo and its fragmentation were on low grade in the pathologic group.

At the end of our study, we have proposed a new threshold of the hyperhomocysteinemia at 10 µmol/l. With this concentration, the results were the same. The physiopathogenic phenomena are, probably, the same as we found in the adults with a participation of hypomethylation on the maternal oocytes transcription and of the oxidative stress. It should be necessary to study the effects of hyperhomocysteinemia on the embryos and to compare the results after a treatment with vitamins B6, folates and B12.

These results must to be proved by a multicentric study to confirm our study and to validate our new threshold.