

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة منتوري قسنطينة
Université Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

N° d'ordre : 175/Ds/2017

Série :09/BioA/2017

THESE

Présentée par

Mme Amel ABBAS ép. TEBDJOUNE

En vue de l'obtention du diplôme de doctorat en sciences

Option : Génétique des Pathologies Humaines

Etude de certains polymorphismes génétiques dans les
métabolismes des folates et de l'homocystéine et anomalies
de fermeture du tube neural

Devant le Jury :

Présidente:	SATTA Dalila	Professeur Université Constantine 1
Directeur de thèse:	ABADI Nouredine	Professeur Université Constantine 3
Examineurs :	DJABI Farida	Professeur Université Ferhat Abbas Sétif
	TEBIBEL Soraya	Professeur Université Constantine 1
	SIFI Karima	Professeur Université Constantine 3

Année Universitaire : 2016/2017

قال الله تعالى

وما أوتيتم من العلم الا قليلا

سورة الاسراء 85

À mes parents ; Nassira et Akli

À Ouissam, Hakim, Lamine, Rania, Djalil...

Remerciements

Il est naturel de remercier, à la fin d'un travail de thèse doctorale, tous ceux qui ont contribué à le rendre possible et l'aboutir. J'éprouve une sincère gratitude envers tous ceux qui ont participé, de manière directe ou indirecte, à ce travail et je tiens à les remercier. J'espère n'oublier personne.

*Mes remerciements s'adressent tout d'abord à mon Directeur de thèse **Professeur Nouredine ABADI**, pour la confiance que vous m'aviez témoignée en me proposant de m'accueillir dans votre laboratoire, la pertinence de votre encadrement et vos conseils avisés tout au long de ce doctorat. Je tiens aussi à vous remercier pour votre gentillesse et vos indéniables qualités humaines.*

*Je remercie **Professeur Dalila SATTI**, d'avoir accepté de réviser cette thèse. Vos remarques pertinentes et vos conseils précieux m'ont beaucoup aidé à améliorer la qualité de ce travail. Je vous en suis très reconnaissante. C'est un honneur de vous avoir comme présidente de mon jury.*

*Ma gratitude va également à l'égard des honorables membres du jury **Professeur Farida DJABI**, **Professeur Soraya TEBIBEL** et **Docteur Karima SIFI** pour leur généreuse disponibilité et pour l'intérêt qu'ils accordent au présent travail. Je vous remercie pour le temps que vous aviez accordé à la lecture de cette thèse et à l'élaboration de vos rapports.*

Mes vifs remerciements vont également à Docteur Karima SIFI et Docteur Karima BENMBAREK pour m'avoir apportée une précieuse aide lors de la phase expérimentation de ce doctorat. Vos conseils avisés, vos qualités humaines et professionnelles, ont contribué au bon déroulement et à la réussite de ce travail. Dr SIFI, je suis honorée du fait que vous examiniez ce travail.

Je ne peux manquer de remercier Docteur Pascale HILBERT et son équipe du laboratoire de pathologies humaines pour son accueil chaleureux. Toute l'expression de ma reconnaissance pour les efforts déployés afin de garantir la réussite de mon stage doctoral.

Il est important de souligner que ce travail n'aurait été possible sans la collaboration efficace du personnel des maternités de l'Hôpital Universitaire de Constantine et de l'Hôpital de Ouragla. Mes plus grands remerciements vont à l'ensemble des patients qui ont participé à cette étude et qui grâce à eux et leur coopération ce travail a pu voir le jour.

Je remercie toutes les personnes qui m'ont prodiguées des encouragements, merci à tout le personnel du Laboratoire de biologie et génétique moléculaire au CHU Dr-Benbadis de Constantine.

Je souhaite pour finir exprimer mes plus grands remerciements à mes chers parents, pour qui j'éprouve mon immense gratitude et mon plus grand respect, car je ne pourrais jamais oublier la tendresse et l'amour dévoués par lesquelles ils m'ont toujours entourée depuis mon enfance. Puisse Dieu, le tout puissant, garder ma mère et lui procurer santé et bonheur. Paix à son âme, mon père.

J'ai de la chance d'avoir une famille dévouée qui a toujours été là pour moi dans les moments les plus difficiles de ce parcours; mon mari Tebdjoune Lamine, mon Fils Djalil, ma fille Rania, mon frère Hakim et ma sœur Ouissam. Je vous remercie pour votre amour, aide et grand soutien moral.

Enfin, Je remercie, toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Publications scientifiques

Abbas A., Abadi N., Naimi D., Sifi K., Benlatreche C. Mutation C677T research in gene coding for methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) in neural tube defects (NTDs) in Constantine. IBS 2012; 27:122-127.

Abbas A., Sifi K., Naimi D., Benmebarek K., Abadi N. Genetic Polymorphisms in Methionine Synthase and Methionine Synthase Reductase, their Metabolic Effects, and Risk of Neural Tube Defects in Algerian Population. Int J Pharm Sci Rev Res 2016 ; 40(2): 238-244.

Posters

Abbas A., Abadi N., Naimi D., Sifi K., Benlatreche C. Recherche de la mutation C677T du gène codant pour la Méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) dans les Anomalies de fermeture du tube neural (AFTN) à Constantine. 3^{ème} Séminaire International de Biologie Animale, 9-11 Mai 2011, Constantine, Algérie.

Abbas A., Abadi N., Naimi D., Sifi K., Benlatreche C. Recherche de la mutation C677T du gène codant pour la Méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) dans les Anomalies de fermeture du tube neural (AFTN) à Constantine. 2^{ème} journée internationale francophone de médecine de laboratoire, 2-3 Mai 2009, Alger, Algérie.

Table des matières

Liste des abréviations	I
Liste des figures	III
Liste des tableaux	IV
INTRODUCTION	I
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I Anomalies de fermeture du tube neural (AFTNs)	6
I.1. Notion de neurulation	6
I.2. Formes des AFTNs	7
I.3. Prévalence des AFTNs	8
I.4. Etiologie des AFTNs	9
I.4.1. Origine multifactorielle des AFTNs	9
I.4.2. Implication des folates	10
I.4.3. Implication de l' homocystéine.....	11
II Métabolismes des folates et de l'homocystéine	12
II.1. Métabolisme des folates	12
II.1.1. Définition et structure de l'acide folique	12
II.1.2. Absorption et transport des folates	13
II.1.3. Cycle des folates	16
II.2. Métabolisme de l'homocystéine	19
II.2.1. Trans-méthylation de la méthionine	19
II.2.2. Reméthylation de l'homocystéine	20
II.2.3. Trans-sulfuration de l'homocystéine	21
II.2.4. Régulation du métabolisme de l'homocystéine	22
III Enzymes intervenant dans les métabolismes des folates et de l'homocystéine et polymorphismes génétiques abordés	23
III.1. Reduced Folate Carrier (RFC)	23
III.1.1. Gène.....	23
III.1.2. Protéine.....	24
III.1.3. Polymorphisme RFC G80A.....	25
III.2. 5,10 Méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR)	26
III.2.1. Gène.....	26
III.2.2. Protéine.....	26
III.2.3. Polymorphisme MTHFR C677T	27
III.2.4. Polymorphisme MTHFR A1298C	28
III.3. Méthionine synthase (MTR)	29
III.3.1. Gène.....	29
III.3.2. Protéine.....	29
III.3.3. Polymorphisme MTR A2756G.....	30

III.4. Méthionine synthase réductase (MTRR)	31
III.4.1. Gène.....	31
III.4.2. Protéine.....	31
III.4.3. Polymorphisme MTRR A66G	31
III.5. Cystathionine β synthase (CBS)	32
III.5.1. Gène.....	32
III.5.2. Protéine.....	32
III.5.3. Polymorphisme CBS 844ins68	33
IV Perturbation métabolique Folates/Homocystéine et AFTNs	35
IV.1. Perturbation du métabolisme des folates et survenue des AFTNs	35
IV.1.1. Etudes montrant l'existence des perturbations métaboliques chez les mères et les enfants à risque	35
IV.1.2. Implication des polymorphismes génétiques dans la perturbation du métabolisme des folates	36
IV.2. Perturbation du métabolisme de l'homocystéine et survenue des AFTNs	37
IV.2.1. Facteurs nutritionnels associés à l'hyperhomocystéinémie et la survenue des AFTNs	37
IV.2.2. Facteurs génétiques associés à l'hyperhomocystéinémie et la survenue des AFTNs	38
V Physiopathologie des AFTNs	40
V.1. Déficience en folates et altération de la fermeture du tube neural	40
V.1.1. Effet sur la synthèse des acides nucléiques.....	41
V.1.2. Effet sur la méthylation	42
V.2. Augmentation de l'homocystéine et altération de la fermeture du tube neural	44
V.2.1. Embryo-toxicité	44
V.2.2. Altération métabolique	44
<i>PATIENTS ET METHODES</i>	46
I Populations d'étude	47
II Prélèvements sanguins	48
III Analyses biochimiques	49
III.1. Dosage des folates	49
III.2. Dosage de l'homocystéine	51
IV Analyses génétiques	52
IV.1. Extraction et dosage de l'ADN génomique du sang	52
IV.2. Principe de la recherche des mutations par la technique PCR/RFLP	54
IV.3. Génotypage des polymorphismes RFC G80A, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G et CBS 844ins68	55
IV.3.1. Amplification de l'ADN.....	55
IV.3.2. Contrôle des produits de PCR.....	57
IV.3.3. Digestion enzymatique	57
IV.3.4. Migration des fragments de restriction	58
IV.3.5. Profils électrophorétiques	59
V Analyses statistiques	62

RESULTATS ET DISCUSSION	63
I Caractéristiques des populations d'étude	64
I.1. Patients	64
I.2. Mères à risque	65
II Analyse du statut folique chez les mères à risque	67
II.1. Comparaison des taux des folates et de l'homocystéine entre les mères et les témoins 67	
II.1.1. Comparaison des moyennes des folates et de l'homocystéine.....	67
II.1.2. Comparaison des taux des folates et de l'homocystéine par percentiles.....	68
II.2. Etude de l'Evolution du risque d'apparition des AFTNs en relation avec les niveaux des folates et de l'homocystéine	69
II.3. Folates et AFTNs	71
II.4. Homocystéine et AFTNs	72
II.5. Corrélations folates /homocystéine et AFTNs	73
III Analyse génétique	75
III.1. Polymorphisme G80A du gène RFC	75
III.1.1. Etude de la distribution des fréquences alléliques et génotypiques.....	75
III.1.2. Influence du polymorphisme G80A sur le risque d'AFTNs.....	76
III.1.3. Etude de l'impact du polymorphisme G80A sur les taux des folates et de l'homocystéine.....	78
III.2. Polymorphismes C677T et A1298C du gène de la MTHFR	79
III.2.1. Polymorphisme C677T du gène de la MTHFR.....	79
III.2.1.1. Etude de la distribution des fréquences alléliques et génotypiques.....	79
III.2.1.2. Influence du polymorphisme C677T sur le risque d'AFTNs.....	80
III.2.2. Polymorphisme A1298C du gène de la MTHFR.....	82
III.2.2.1. Etude de la distribution des fréquences alléliques et génotypiques.....	82
III.2.2.2. Influence du polymorphisme A1298C sur le risque d'AFTNs.....	83
III.2.3. Interaction des deux polymorphismes C677T et A1298C du gène de la MTHFR.....	84
III.2.4. Etude de l'impact des polymorphismes C677T et A1298C sur les taux des métabolites.....	85
III.3. Polymorphisme A2756G du gène de la MTR	89
III.3.1. Etude de la distribution des fréquences alléliques et génotypiques.....	89
III.3.2. Influence du polymorphisme A2756G sur le risque d'AFTNs.....	90
III.3.3. Etude de l'impact du polymorphisme A2756G sur les taux des folates et de l'homocystéine.....	91
III.4. Polymorphisme A66G du gène de la MTRR	93
III.4.1. Etude de la distribution des fréquences alléliques et génotypiques.....	93
III.4.2. Influence du polymorphisme A66G sur le risque d'AFTNs.....	94
III.4.3. Etude de l'impact du polymorphisme A66G sur les taux des folates et de l'homocystéine.....	95
III.5. polymorphisme 844ins68 du gène CBS	96
III.5.1. Etude de la distribution des fréquences alléliques et génotypiques.....	96
III.5.2. Influence du polymorphisme 844ins68 sur le risque d'AFTNs.....	97
III.5.3. Etude de l'impact du polymorphisme 844ins68 sur les taux des folates et de l'homocystéine.....	97
DISCUSSION GENERALE	99

<i>CONCLUSION</i>	106
<i>PERSPECTIVES</i>	110
<i>RESUME</i>	113
<i>ANNEXES</i>	117
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	127

LISTE DES ABREVIATIONS

10-F-THF	10-formyl tétrahydrofolate
5-MTHF	5 -methyl tétrahydrofolate
AdoHcy	Adénosyl homocysteine
AdoMet	Adénosyl methionine
AFTNs	Anomalies de fermeture du tube neural
BBP	Bleu de Bromophénol
BET	Bromure d'éthidium
BHMT	Bétaine-homocystéine méthyle transférase
Cbl	Cobalamine
CBS	Cystathionine bêta-synthase
CGL	Cystéine- γ -lyase
CHUC	Centre Hospitalier Universitaire de Constantine
dUMP	Desoxy-uridilate-mono- phosphate
dTMP	Desoxy-thymidilate-mono- phosphate
DHF	Dihydrofolate
DHFR	Dihydrofolate reductase
DNMT3B	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta
DRVs	Dietary Reference Values
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FGCP	Folylpoly- γ -glutamate carboxypeptidase
FMN	Flavin mononucleotide
FOLT	Folate transporter
FPGS	Folyl polyglutamate synthase
FR	Folate receptor
GAMT	Guanidino acétate méthyl transférase
GCPII	Glutamate carboxypeptidase II
GNMT	Glycine N-méthyl transférase
Hcy	Homocysteine
HHcy	Hyper homocystéinémie
IFC-1	Intestinal folate Carrier
MAT	Méthionine adénosyl transférase
MRC	Medical research council
Met	Méthionine
MTR	Méthyl tétrahydrofolate-homocystéine méthyl transferase ou Méthionine synthase
MTRR	Méthyl tétrahydrofolate-homocystéine méthyl transferase réductase ou Méthionine synthase réductase
MTHFD	Méthylène tétrahydrofolate déshydrogénase
MTHFR	Méthylène tétrahydrofolate réductase
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NMDAR	N-methyl-D-aspartate receptor

OMS	Organisation mondiale de la santé
PABA	Para-amino-benzoïque acid
PCR	Polymerase chain reaction
PEMT	Phosphatidyl éthanolamine méthyl transférase
PCFT-1	Proton-coupled folate transporter1
PteGlu	Ptéroyl-glutamate
RFC-1	Reduced folate carrier1
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SAH	S-adénosyl homocysteine
SAHH	S-adénosyl homocystéine hydrolase
SAM	S-adénosyl méthionine
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SHMT	Sérine hydroxyméthyl transférase
THF	Tétrahydrofolate
TS	Thymidylate synthase
UTR	Untranslated region
MRP	Multidrug-resistance associated protein

LISTE DES FIGURES

Figure 01	Formation du tube neural	6
Figure 02	Différentes formes d'anomalies de fermeture du tube neural	8
Figure 03	Structure chimique du tétrahydrofolate et ses dérivés	13
Figure 04	Absorption des folates alimentaires	14
Figure 05	Transport cellulaire des folates	15
Figure 06	Métabolismes des folates et de l'homocystéine	18
Figure 07	Trans-méthylation de la méthionine	20
Figure 08	Reméthylation de l'homocystéine en méthionine	21
Figure 09	Trans-sulfuration de l'homocystéine	22
Figure 10	Gène et protéine RFC	25
Figure 11	Gène, protéine et polymorphismes de la MTHFR	27
Figure 12	Gène, protéine et polymorphisme A2756G de la MTR	30
Figure 13	protéine et polymorphisme A66G de la MTRR	31
Figure 14	Domaines de la protéine CBS	33
Figure 15	Insertion 844ins68 dans le gène CBS	34
Figure 16	Implication des folates dans plusieurs réactions métaboliques	40
Figure 17	Perturbation du métabolisme de l'homocystéine	45
Figure 18	Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 4% des fragments présentant différents génotypes du polymorphisme G80A	59
Figure 19	Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 3% des fragments présentant différents génotypes du polymorphisme C677T	59
Figure 20	Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 3%/ Nusieve1% des fragments présentant différents génotypes du polymorphisme A1298C	60
Figure 21	Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 3% des fragments présentant différents génotypes du polymorphisme A2756G	60
Figure 22	Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 3% des fragments présentant différents génotypes du polymorphisme A66G	61
Figure 23	Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 3% des fragments présentant différents génotypes du polymorphisme 844ins68	61
Figure 24	Représentation graphique de la comparaison des moyennes des folates et d'homocystéine entre les mères ayant un enfant atteint d'AFTN et les témoins	68
Figure 25	Corrélations entre les taux des folates sérique et érythrocytaire, folate sérique et homocystéine et folate érythrocytaire et homocystéine	74

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01	Amorces et conditions d'amplification	56
Tableau 02	Programmes d'amplification par PCR	56
Tableau 03	Conditions et résultats de la digestion	57
Tableau 04	Caractéristiques générales des enfants avec AFTN	64
Tableau 05	Caractéristiques cliniques des mères ayant des enfants atteints	65
Tableau 06	Comparaison des moyennes des folates et de l'homocystéine entre les mères ayant un enfant atteint d'AFTN et les témoins	68
Tableau 07	Répartition des taux des folates sérique et érythrocytaire et de l'homocystéine par percentiles chez les mères et chez le groupe témoin	69
Tableau 08	Odds ratio représentant le risque d'avoir un enfant atteint chez les mères associé aux quartiles des folates sérique et érythrocytaire et de l'homocystéine des témoins	70
Tableau 09	Fréquences génotypiques et alléliques de la mutation G80A du gène de la RFC	75
Tableau 10	Risque (Odds Ratio) d'AFTNs lié au variant G du polymorphisme G80A chez les enfants et les mères	76
Tableau 11	Risque (Odds Ratio) d'AFTNs lié au variant A du polymorphisme G80A chez les enfants et les mères	76
Tableau 12	Impact du polymorphisme G80A sur les taux des folates et de l'homocystéine chez les mères des enfants atteints	78
Tableau 13	Fréquences génotypiques et alléliques de la mutation C677T du gène de la MTHFR	80
Tableau 14	Risque (Odds Ratio) d'AFTNs lié au polymorphisme C677T chez les enfants et les mères	80
Tableau 15	Fréquences génotypiques et alléliques de la mutation A1298C du gène de la MTHFR	82
Tableau 16	Risque (Odds Ratio) d'AFTNs lié au polymorphisme A1298C chez les enfants et les mères	83
Tableau 17	Interaction des polymorphismes C677T et A1298C et risque d'AFTNs chez les enfants	84
Tableau 18	Impact des polymorphismes C677T et A1298C sur les taux des folates et de l'homocystéine chez les mères des enfants atteints	86
Tableau 19	Fréquences génotypiques et alléliques de la mutation A2756G du gène de la MTR	89
Tableau 20	Risque (Odds Ratio) d'AFTNs lié au polymorphisme A2756G chez les enfants et les mères	89
Tableau 21	Impact du polymorphisme A2756G sur les taux des folates et de l'homocystéine chez les mères des enfants atteints	92
Tableau 22	Fréquences génotypiques et alléliques de la mutation A66G du gène de la MTRR	93
Tableau 23	Risque (Odds Ratio) d'AFTNs lié au polymorphisme A66G chez les enfants et les mères	93
Tableau 24	Impact du polymorphisme A66G sur les taux des folates et de l'homocystéine chez les mères des enfants atteints	95
Tableau 25	Fréquences génotypiques et alléliques de la mutation 844ins68 du gène de la CBS	96
Tableau 26	Risque (Odds Ratio) d'AFTNs lié au polymorphisme 844ins68 chez les enfants et les mères	96
Tableau 27	Impact du polymorphisme 844ins68 sur les taux des folates et de l'homocystéine chez les mères des enfants atteints	98

INTRODUCTION

Le tube neural représente le système nerveux primitif de l'embryon, qui se développera pour former le cerveau et la moelle épinière. Les perturbations dans le processus de neurulation en embryologie conduisent à des anomalies de fermeture du tube neural (AFTNs), qui représentent une cause majeure de mortalité infantile parmi les malformations congénitales. Les principales formes de ces anomalies sont l'encéphalocèle et l'anencéphalie qui résultent de la non fermeture du tube neural au niveau de l'extrémité crânienne, ainsi que le *spina bifida* qui résulte de la non fermeture du tube neural au niveau de l'extrémité caudale (Larsen, 2003).

En fait, le statut nutritionnel de la mère est un facteur déterminant du résultat de la grossesse. Il influence l'environnement auquel l'embryon est exposé au cours de son développement. Les études cliniques et observationnelles montrent que la prise d'acide folique en période périconceptionnelle réduit considérablement, de 50% à 70% le risque des AFTNs (Czeizel et Dudàs, 1992 ; De Wals et al., 2007 ; Blencowe et al., 2010). L'organisation mondiale de la santé (OMS) recommande l'administration d'une supplémentation en folates débutant un mois avant la conception et se poursuivant jusqu'à trois mois de grossesse. La supplémentation est adaptée au profil de la future mère : 0,4 mg/j d'acide folique pour prévenir l'occurrence et 5mg/jour pour une femme à risque, présentant des antécédents de grossesse avec AFTN ou faisant l'objet d'un traitement « anti-folique » de type antiépileptique ou anti inflammatoire (De-regil et al., 2010).

L'acide folique est un métabolite qui présente une importance majeure pendant l'embryogénèse (Guéant et al., 2013). Son mécanisme d'action semble être double: d'une part, comme cofacteur de la biosynthèse de l'ADN et de l'ARN et d'autre part, comme donneur de radicaux méthyles dans le cycle de la méthylation qui convertit l'homocystéine (Hcy) en méthionine (Met). Cette dernière, est utilisée aussi bien pour la synthèse des protéines, que pour la S-adénosyl-L-méthionine (SAM), donneur universel des groupements méthyles régulant ainsi l'expression des gènes (Lynn et Jesse, 1999 ; Wagner, 2010 ; Faulk et Dolinoy, 2011). L'importance des folates dans ces processus métaboliques peut déjà laisser prévoir qu'une déficience en ce métabolite ne pourrait être que néfaste, et une altération métabolique de ces deux voies pourrait affecter le processus de neurulation (Greene et al., 2011 ; Chang et al., 2011 ; Christensen et al., 2013).

La déficience en folates peut résulter d'un apport nutritionnel maternel inadéquat, ou d'une augmentation des besoins, liée à des altérations et des prédispositions génétiques, d'absorption, de transport et du métabolisme des folates (Ueland et Vollset, 2004).

Les femmes de notre population, malheureusement, ont peu de connaissances sur cet élément nutritionnel. Peu de femmes savent que l'acide folique aide à prévenir ces anomalies et qu'elles doivent commencer leur supplémentation avant la grossesse. De plus, les femmes avec un bas niveau socio-économique en particulier éducatif, ont moins de chance d'avoir entendu parler d'acide folique. Il a été rapporté, qu'un taux de 69 % des femmes Algériennes de la population générale ont un apport alimentaire moyen en folates inférieur aux valeurs nutritionnelles de références (Dietary Reference Values DRVs) (Houcher et al., 2003).

Par ailleurs, des taux anormalement élevés de l'homocystéine ont été observés chez les mères d'enfants atteints d'AFTNs. Cette hyperhomocystéinémie (HHcy) pourrait exercer un effet haussier sur le processus de neurulation due à sa cyto-toxicité (Ueland et Vollset, 2004). Elle est considérée comme un facteur de risque majeur (Felkner et al., 2009 ; Godbole et al., 2011 ; Gu et al., 2012). L'intervention des folates dans le métabolisme de l'Hcy peut être un élément qui explique, en partie, leur effet préventif (Nancy et Green, 2002).

L'ensemble des données, à savoir l'effet protecteur de l'acide folique, l'implication de l'Hcy dans les malformations du tube neural et l'interdépendance des métabolismes des folates et de l'homocystéine laissent supposer que les gènes régulant ces voies métaboliques peuvent être la cause de la survenue de ces malformations. En effet, un intérêt grandissant a porté sur les polymorphismes de ces gènes, cependant, les résultats sont souvent conflictuels et la question sur l'étiologie exacte de ces malformations est encore non résolue.

Ce sujet demeure peu étudié et mal compris en Afrique du nord tel le cas de l'Algérie. Plusieurs polymorphismes en relation avec le risque de survenue des AFTNs sont pour la première fois étudiés dans le cadre du présent travail.

Objectifs de la recherche

A travers ce travail, nous nous sommes intéressés à :

L'évaluation du statut folique chez les femmes à risque (ayant des enfants atteints), elle consiste à mesurer les concentrations sérique et érythrocytaire des folates et plasmatique de l'homocystéine.

L'étude de certains polymorphismes agissant sur les métabolismes des folates et de l'homocystéine à savoir :

- Le polymorphisme G80A du gène Reduced Folate Carrier (RFC).
- Le polymorphisme C677T du gène de la 5-10 méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR).
- Le polymorphisme A1298C du gène de la MTHFR.
- Le polymorphisme A2756G du gène de la 5-méthyl tétrahydrofolate-homocystéine méthyl transferase ou méthionine synthase (MTR).
- Le polymorphisme A66G du gène de la 5-méthyl tétrahydrofolate-homocystéine méthyl transferase réductase ou méthionine synthase réductase (MTRR).
- Le polymorphisme 844ins68 du gène de la cystathionine β synthase (CBS).

Le but étant de:

- § Rechercher ces polymorphismes dans une cohorte d'enfants atteints d'AFTNs et de mères d'enfants atteints appariés à un groupe de témoins.
- § Evaluer les impacts de ces polymorphismes sur la survenue de ces malformations.
- § Estimer les effets de ces polymorphismes sur les taux des métabolites, folates et homocystéine.

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

I ANOMALIES DE FERMETURE DU TUBE NEURAL (AFTNS)

I.1. NOTION DE NEURULATION

La neurulation est le processus de formation du tube neural au cours de l'embryogénèse. Après la fécondation, à la fin de la deuxième semaine, l'embryon est un disque didermique formé de cellules épiblastiques et hypoblastiques (Ghanassia, 1999). La neurulation débute au 19^{ème} jour lorsque la partie médiane de l'épiblaste s'épaissit et formera la plaque neurale. Cette dernière est large à l'extrémité crâniale (céphalique) et, est à l'origine du cerveau et étroite à l'extrémité caudale donnant par la suite, la moelle épinière. Au 20^e jour, les bordures latérales de la plaque s'élèvent pour délimiter la gouttière neurale (Langman et Salder, 2007). Les bords de la gouttière se rapprochent et la fermeture se fait en plusieurs sites d'une manière discontinue (Greene et Copp, 2014). La fusion initiale se produit dans la région cervicale, à la mi-longueur de l'embryon et progresse simultanément, en direction caudale et crâniale formant ainsi le tube neural, les extrémités ouvertes du tube neural sont appelées neuropores. Le neuropore crânial se ferme au 25^e jour alors que le neuropore caudal complète la fermeture au 28^e jour (Langman et Salder, 2007 ; Greene et Copp, 2014) (**Figure 01**).

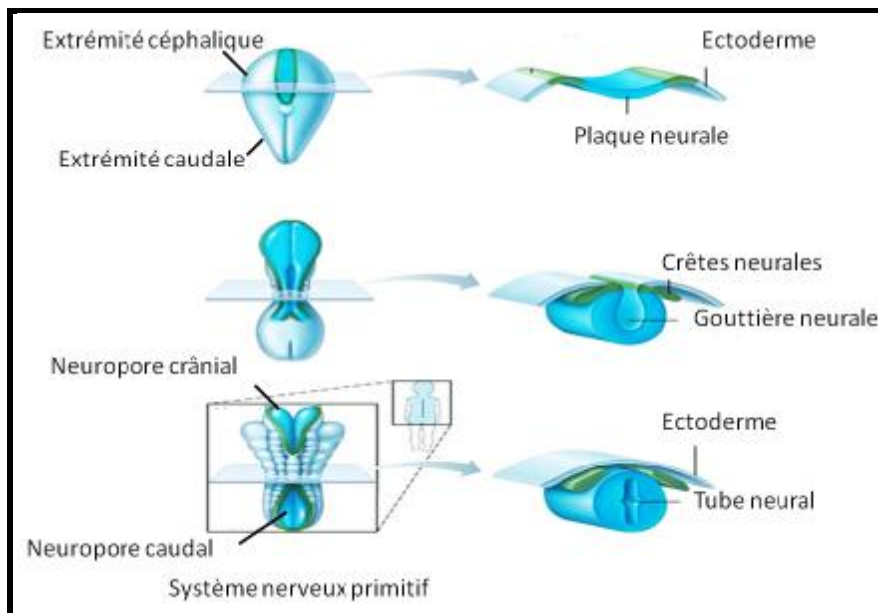


Figure 01 : Formation du tube neural (*Modifié d'après Marieb et Hoehn, 2013*).

I.2. FORMES DES AFTNS

Le terme « anomalies de fermeture du tube neural » s'applique à une variété de malformations qui découlent d'un défaut de fermeture du tube neural lors de la 4^{ème} semaine de l'embryogénèse. L'accident peut survenir à tout niveau de la plaque neurale, de l'extrémité céphalique à l'extrémité caudale et sur une étendue variable, il en résulte des anomalies du tissu nerveux correspondant (cérébral ou médullaire), des méninges, des structures osseuses (vertèbres ou crâne) et des téguments. Elles entraînent ainsi un spectre de pathologies diverses à expression clinique variable létale, sévère ou insignifiante (Lorenzo et al., 1999 ; Cabaret, 2004) (**Figure 02**).

L'absence totale de fermeture du tube neural cause le *Craniorachisis* qui s'observe uniquement dans les embryons ayant fait l'objet d'un avortement spontané (Larsen, 2003).

Le défaut de fermeture du tube neural à l'extrémité céphalique cause plusieurs formes de malformations, dont les plus fréquentes sont :

L'anencéphalie : l'anomalie est dite ouverte, car il s'agit de l'absence de fermeture du neuropore antérieur et le tissu nerveux est désorganisé et exposé à la base du crâne. C'est une forme très sévère des AFTNs puisque tous les enfants atteints meurent à la naissance. (Larsen, 2003 ; Greene et Copp, 2014).

L'encéphalocèle : anomalie ayant un impact grave, elle est caractérisée par une hernie de méninges et/ou du tissu cérébral à travers une ouverture localisée de la voûte crânienne (Haddad, 2001).

Concernant le défaut de fermeture du tube neural à l'extrémité caudale, il cause fréquemment :

Le spina bifida cystica : les méninges et/ou moelle épinière sont exposées à travers l'ouverture des arcs vertébraux provoquant des problèmes majeures (Haddad, 2001).

Le spina bifida occulta : est une forme mineure des anomalies du tube neural puisqu'elle est « fermée » (recouverte de peau) et il n'y a pas d'hernie des tissus nerveux (Cabaret, 2004).

L'encéphalocèle et le *spina bifida cystica* sont les anomalies les plus fréquentes entraînant souvent des handicaps graves. S'ils ne sont pas traités, les enfants atteints peuvent mourir dans les 6 premiers mois d'une méningite ou d'hydrocéphalie. Cependant, les avancées chirurgicales et la prise en charge attentive ont réduits le risque (Haddad, 2001 ; Greene et Copp, 2014). Malheureusement, dans la plupart des populations africaines, ces traitements et le suivi ne sont pas assurés.

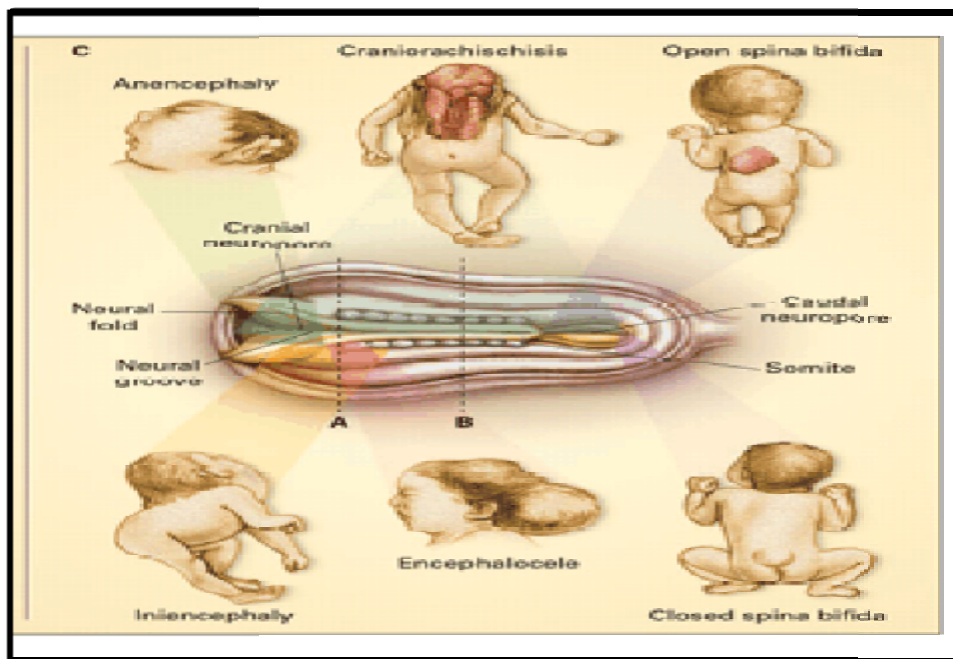


Figure 02 : Différentes formes d'anomalies de fermeture du tube neural (Modifié d'après Botto et al., 1999).

I.3. PREVALENCE DES AFTNS

Une revue systématique de la prévalence des AFTNs à travers le monde, réalisée récemment par Zaganjor et al. (2016) a montré que les moyennes de prévalence étaient de 11,7 pour 10 000 naissances en Afrique, de 21,9 pour 10 000 naissances en Méditerranée orientale, de 9,0 pour 10 000 naissances en Europe, de 11,5 pour 10 000 naissances en Amérique, de 15,8 pour 10 000 naissances en Sud-Est d'Asie et de 6,9 pour 10 000 naissances dans le Pacifique occidental.

Les résultats sur les taux d'AFTNs publiés dans les pays du monde arabe (Afrique du Nord et Moyen-Orient) oscillent entre (0,62 et 13,8 par 1000 naissances) (Hamamy, 2014).

En Algérie, dans la région de sétif, une fréquence de 7,5 par 1000 naissances a été rapportée par Houcher et al. (2008).

I.4. ETIOLOGIE DES AFTNS

I.4.1. ORIGINE MULTIFACTORIELLE DES AFTNS

La pathogénèse des AFTNs reste mal comprise, un complexe impliquant des facteurs environnementaux, nutritionnels et génétiques, semble contribuer à leur forte incidence et explique la variation de leur fréquence à travers le monde (Greene et Copp, 2014). Nous citerons quelques exemples :

- Ø Les facteurs environnementaux représentés essentiellement par de nombreux produits tératogènes tel que, les antagonistes des folates, certains antidépresseurs et anti-épileptiques qui sont aussi, des anti-foliques influençant l'absorption de l'acide folique (Pilon, 2010).
- Ø Les carences nutritionnelles telles que les carences en folates, en vitamines B12, B6, en zinc et en inositol. Ces vitamines jouent un rôle important dans la multiplication cellulaire, la migration et la réparation tissulaire. elles sont donc fortement impliquées dans l'organogénèse et le développement fœtal (Favier et Hininger-Favier, 2005).
- Ø L'obésité maternelle et le diabète préexistant à la grossesse sont aussi associés à la survenue des AFTNs, ils causes des déficiences nutritionnelles, particulièrement un niveau des folates réduits (Stothard et al., 2009 ; Yazdy et al., 2010).
- Ø Le bas niveau socio-économique, le non suivi des grossesses et la consommation maternelle de fenugrec en période gestationnelle sont aussi, des facteurs prédictifs de développement d'anomalies du tube neural (Radouani et al., 2015).
- Ø Les facteurs génétiques qui contribuent à l'étiologie de ces malformations sont représentés essentiellement par deux types de gènes, ceux intervenant dans le développement du tube neural (Allache et al., 2015) et ceux impliqués dans les processus métaboliques, essentiellement les métabolismes des folates et de l'homocystéine.

I.4.2. IMPLICATION DES FOLATES

Depuis la suggestion d'Hibbard et Smithells (1965) d'un lien existant entre l'insuffisance de l'apport maternel en acide folique et les défauts du tube neural, le métabolisme des folates a attiré l'attention des chercheurs et a représenté une proportion substantielle de l'étiologie de ces anomalies.

Les études ont montré que la prise d'acide folique en période périconceptionnelle (4 semaines avant la conception et au moins 8 semaines après) réduit de manière significative l'occurrence et aussi la récurrence des AFTNs (Medical research council (MRC), 1991; Bestwick et al., 2014). De ce fait, une supplémentation obligatoire en acide folique est systématisée dans plusieurs pays (De-regil et al., 2010).

Les différentes autorités en santé publique n'étaient pas convaincues que, les campagnes d'éducation permettraient à elles seules, d'atteindre les objectifs en matière de supplémentation. Ainsi, la fortification en acide folique de certains produits céréaliers, tels la farine, la semoule de maïs et les pâtes alimentaires, est devenue obligatoire depuis 1999. Les pays arabes qui ont mis en œuvre l'enrichissement en acide folique du blé sont le Bahreïn, l'Égypte, la Jordanie, le Koweït, le Maroc, Oman, la Palestine, le Qatar, le Soudan, les Émirats arabes unis ainsi que le Yémen (Abdollahi et al., 2011 ; Castillo-Lancellotti et al., 2013 ; Hamamy, 2014). Quant à l'Algérie, ce programme n'est, cependant, pas encore d'application, à ce jour.

Cette stratégie a été associée à une réduction significative du taux des défauts du tube neural dans les pays arabes (Amarin et Obeidat, 2010 ; Abdollahi et al., 2011) et dans le monde entier (Castillo-Lancellotti et al., 2013 ; Arth et al., 2016 ; Santos et al., 2016) .

La question posée, est de savoir si l'acide folique agit pour prévenir une déficience alimentaire ou encore corriger une perturbation métabolique. En effet, certaines études ont montré que les mères des enfants atteints possèdent des concentrations des folates sanguins ayant tendance à être plus faibles par rapport à celles des mères ayant des grossesses non affectées mais qui, néanmoins, restent dans les normes physiologiques (Steegers-Theunissen et al., 1994 ; Wald et al., 1996). De ce fait, plusieurs recherches ont été menées sur les polymorphismes de gènes codant les protéines impliquées dans son métabolisme. En effet, il a été trouvé que quelques uns causent des perturbations et représentent un facteur de risque

pour ces malformations. Néanmoins, ils peuvent être corrigés par une dose suffisante d'acide folique (Yamada et al., 2001 ; Crider et al., 2014).

De ce qui précède nous constatons que l'acide folique est clairement associé à la survenue de ces malformations. Son métabolisme est incriminé, directement ou indirectement, dans la susceptibilité à développer les AFTNs.

1.4.3. IMPLICATION DE L' HOMOCYSTEINE

Du fait de l'implication des folates dans l'étiologie des AFTNs et comme le métabolisme de cette vitamine et celui de l'homocystéine sont interdépendants, les recherches se sont focalisées, également, sur l'homocystéine et la possibilité de variations génétiques des enzymes de son métabolisme dans le développement de ces anomalies. En effet, la perturbation du métabolisme de l'homocystéine génère un approvisionnement inadéquat des métabolites essentiels et des niveaux excessifs de produits toxiques (Mills et Conley, 1996).

Les tests du fonctionnement du métabolisme de l'Hcy chez les mères ayant des fœtus atteints ont montré l'existence des défauts dans ses voies métaboliques. Initialement, en 1991, Steegers-Theunissen et ses collaborateurs ont examiné la transulfuration de l'homocystéine chez les femmes qui avaient une grossesse affectée par une AFTN et chez un groupe témoin. Une élévation du taux d'homocystéine a été observée chez les femmes ayant des fœtus affectés, concluant ainsi qu'il s'agit d'un défaut dans cette voie.

Par la suite, Mills et Conley (1996), ont utilisé des échantillons de sang prélevés pendant la grossesse chez des femmes portant des fœtus atteints, et chez des sujets contrôles ayant tous des taux de vitamine B12 abaissés. Les mères à risque ont montré des niveaux d'homocystéine significativement plus élevés que les mères contrôles. Ils suggèrent de ce fait une perturbation de la voie de reméthylation.

Jusqu'à lors ces perturbations sont sujettes à de nombreuses études (Zhang et al., 2009; Cech et Burau, 2010; Gu et al., 2012 ; Aydin et al., 2016) .

II METABOLISMES DES FOLATES ET DE L'HOMOCYSTEINE

II.1. METABOLISME DES FOLATES

II.1.1. DEFINITION ET STRUCTURE DE L'ACIDE FOLIQUE

L'acide folique tire son nom du mot latin *folium* qui signifie feuille. Il a été ainsi nommé par Mitchell et ses collaborateurs, en 1941, en raison de son abondance dans les feuilles d'épinards (Mitchell et al., 1941). L'homme ne peut pas synthétiser l'acide folique et dépend donc des sources alimentaires de cette vitamine. Les aliments (légumes verts frais, foie, levure et quelques fruits) contiennent du folate en quantité importante. Cependant, des sources modérées de la vitamine tel que le pain, la pomme de terre et les produits laitiers qui sont consommés en grande quantité fournissent un bon apport en folates (Lucock et al., 2000).

L'acide folique est formé par l'association d'un noyau ptéridine, d'un acide para-amino-benzoïque (Para-amino-benzoïque acid PABA) et d'un acide glutamique, il est nommé, ainsi, acide ptéroylglutamate (PteGlu). Le terme de folates regroupe les différents complexes de la vitamine qui présentent différents degrés de réduction du noyau ptéridine, un nombre variable de résidus d'acide glutamique et associant différentes unités monocarbonées en positions N5 ou N10 ou les deux. L'acide folique représente la forme la plus simple (Scott, 1999) (**Figure 03**).

Les folates alimentaires existent essentiellement sous forme de formyl tetrahydrofolate (10-formyl H₄PteGlu_n ou 10-F-THF) et de 5-méthyl tetrahydrofolate (5-méthyl H₄PteGlu_n ou 5-MTHF). Ce dernier est facilement oxydé en 5-méthyl-5,6-dihydrofolate (5-méthyl-5,6-H₂PteGlu_n) (Donaldson et Keresztesy, 1962 ; Ratanasthien et al., 1977 ; Stokstad et Koch, 1967 ; Brody et Shane, 2001) (**Figure 03**).

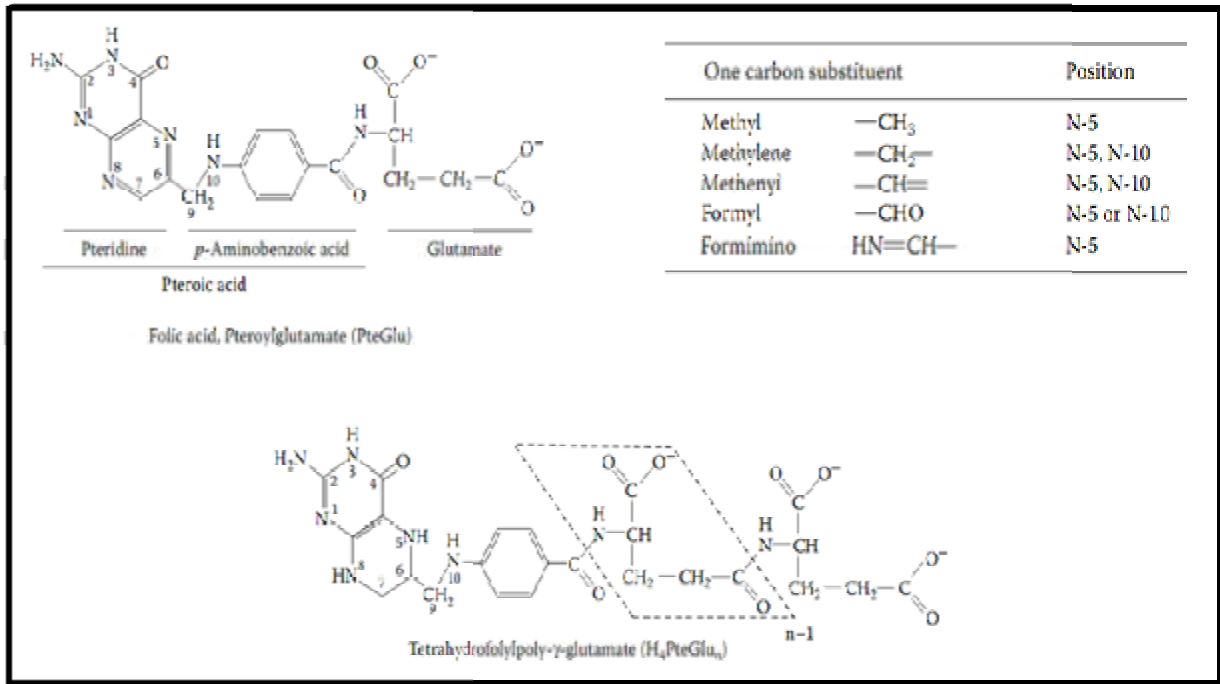


Figure 03 : Structure chimique du tétrahydrofolate et ses dérivés (Shane, 2010).

II.1.2. ABSORPTION ET TRANSPORT DES FOLATES

Les formes alimentaires des folates sont complexes, polyglutamates, et doivent être hydrolysés en monoglutamates pour être absorbés et transportés. L'enzyme folylpoly- γ -glutamate carboxypeptidase (FGCP) qui est ancré à la bordure en brosse apicale de l'intestin (codé par le gène glutamate carboxypeptidase II (GCPII)) est responsable de cette hydrolyse (Chandler et al., 1991). Les folates monoglutamates sont ensuite absorbés, à un pH acide, dans le duodénum et la partie supérieure du jéjunum par le transporteur proton-couplé folate (PCFT-1) (Qiu et al., 2006).

Un récepteur nommé Intestinal folate Carrier (IFC-1) se trouve également sur la bordure en brosse des cellules intestinales, mais son activité est à pH neutre ce qui empêche son fonctionnement (Nguyen et al., 1997). Cependant, il a été trouvé qu'il assure le transport en cas de la perte de fonction du gène PCFT-1 (Zhao et al., 2007). Le gène du récepteur IFC-1 est aussi exprimé dans les tissus périphériques, et a été nommé Reduced Folate Carrier (RFC-1) (Wong et al., 1995; Zhao et al., 2009) (**Figure 04**).

Après absorption dans les entérocytes, les monoglutamates intracellulaires sont réduits en H₄PteGlu₁ (THF) ensuite méthylés et convertis en 5MTHF. Ils sont transportés par la suite à travers la membrane basolatérale des entérocytes. Pour de fortes doses, les folates arrivent dans le sang sans modification (Shane, 2010).

Les récepteurs RFC-1 et PCFT-1 ne sont pas exprimés sur la membrane basolatérale, le transport est médié par un transporteur de la famille des «multidrug-resistance-associated protein 3» MRP3. (Rost et al., 2002) (**Figure 04**).

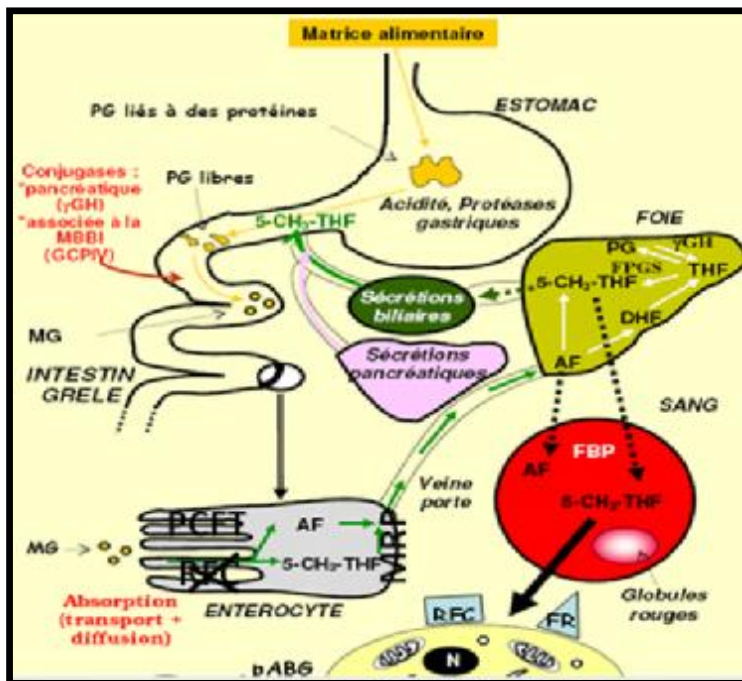


Figure 04: Absorption des folates alimentaires (Preynat, 2009).

Les folates entrent dans la circulation sanguine sous forme 5MTHF. La majeure partie est absorbée par le foie, transformée en polyglutamates pour être retenue et joue, ainsi, un rôle central dans l'homéostasie des folates. Une autre partie est libérée dans la bile où elle va être réabsorbée par l'intestin grêle et recyclée dans la voie entérohépatique. (Masuda et al., 1997; Zhao et al., 2009) (**Figure 04**).

Les folates sont également incorporés dans les érythrocytes, au stade d'érythroblastes (**Figure 04**). Les formes des folates trouvées dans les érythrocytes sont essentiellement le F-THF et le 5-MTHF, sous forme de folylpolyglutamates avec principalement des penta- et des hexaglutamates (Lucock et al., 1989 ; Quinlivan et al., 2005). Ces folates érythrocytaires n'ont pas de rôle métabolique connu mais forment le réservoir en folates de notre organisme. Le taux de folate érythrocytaire est le moyen le plus fiable pour mesurer le statut en folates de l'organisme, puisqu'il n'est pas affecté par l'apport alimentaire récent (Herbert, 1990 ; Gibson, 2005).

Dans le plasma, 40 % des folates circulant sont liés par une faible affinité à l'albumine, le reste étant lié à la transferrine et à l' α 2-macroglobuline. Le taux de folate plasmatique à jeun représente également le statut de l'organisme, cependant, il peut être influencé par l'apport alimentaire récent. Ces folates sont transportés vers les tissus périphériques pour y jouer leur rôle (Lucock et al., 2000).

La forme plasmatique circulante, 5-MTHF monoglutamate, est reprise à la surface de la cellule utilisatrice par deux mécanismes d'absorption (Fan et al., 1992), soit par le récepteur RFC-1, qui facilite l'échange d'anions, ou par un processus de potocytose médié par l'un des récepteurs des folates membranaires (folate receptors $FR\alpha$, $FR\beta$ et $FR\gamma$). En effet, dans ce dernier mécanisme, les folates sont regroupés dans une caveole qui est l'invagination de la membrane plasmique. Une acidification rapide de la teneur de la cavéole provoque la dissociation des folates du récepteur et, sa libération dans le cytosol (Kamen et Smith, 2004). Les voies d'absorption des folates monoglutamates réduits, peuvent être distinctes dans différentes cellules selon l'efficacité spécifique des mécanismes, les deux systèmes (FR et RFC) peuvent, ne pas être opérationnels dans tous les types de cellules (Corona et al., 1998) (**Figure 05**) .

Notons que le récepteur PCFT-1 est souvent coexprimé avec le récepteur RFC-1, mais sa fonction est faible dans les cellules périphériques. Il a été supposé qu'il joue un rôle dans le cas où les échanges Na^+/H^+ génèrent un microenvironnement acide. Il peut également avoir un rôle dans le transport FR dépendant. (Zhao et al., 2009) (**Figure 05**).

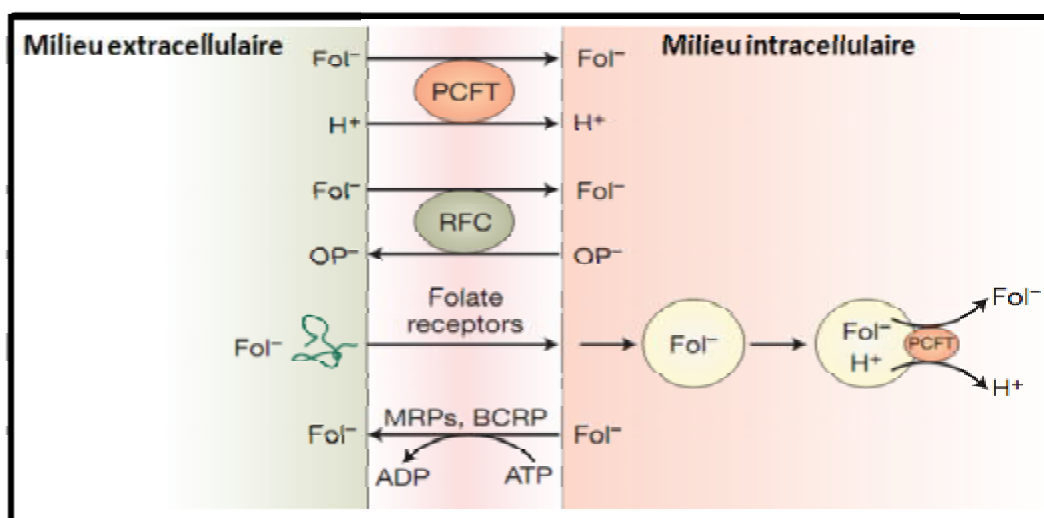


Figure 05: Transport cellulaire des folates (Zhao et al., 2009).

II.1.3. CYCLE DES FOLATES

Une fois entré dans la cellule, le 5-MTHF fonctionne comme donneur de groupement méthyle pour l'homocystéine qui génère la méthionine. Cette réaction de reméthylation est une voie très importante et critique pour le métabolisme des folates car elle permet son recyclage en formant le THF monoglutamate. Ce dernier qui sera directement reconverti en THF polyglutamate par l'enzyme folylpolyglutamate synthase (FPGS) (Stokstad, 1990). Cette polyglutamation permet la rétention des folates à l'intérieur de la cellule. Aussi les polyglutamates sont de meilleurs substrats pour les enzymes folates dépendantes comparés aux monoglutamates (Lucock et al., 2000). Les formes monoglutamates non métabolisées seront perdues de la cellule (Shane, 2010) (**Figure 06**).

Les THF polyglutamates seront donc, recyclés et associent des groupements méthyle, formyl, méthylène ou méthényle en positions N5 ou/et N10. Ces dérivés entrent comme cofacteurs dans de multiples réactions enzymatiques, en effet, ils sont impliqués dans les transferts des groupements mono-carbonés (Zhao et al., 2009).

Le THF polyglutamate peut être directement converti en 5,10-méthylèneTHF par l'action de la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT) qui utilise la sérine comme donneur d'un groupement mono-carboné (Garrow et al., 1993) (**Figure 06**).

La conversion du THF en 5,10-méthylène THF, *via* le 10-formyl THF et le 5,10-méthényle THF, est catalysée par l'enzyme trifonctionnelle méthylène tétrahydrofolate déshydrogénase (MTHFD) qui possède les activités formyl tétrahydrofolate synthétase, méthényle tétrahydrofolate cyclohydrolase et méthylène tétrahydrofolate déshydrogénase (Field et al., 2006) (**Figure 06**).

Les dérivés foliques générés des deux réactions précédentes jouent un rôle important dans la synthèse des bases pyrimidiques et puriques et aussi dans le processus de méthylation.

Le 10-formyl THF peut donner des groupements monocarbonés pour la biosynthèse des purines (ADN) (Zhao et al., 2009). Le 5,10-méthylène THF est utilisé pour la méthylation du dUMP (désoxy-uridylylate-mono-phosphate) en dTMP (désoxy-thymidylylate-mono-phosphate) *via* la thymidylylate synthase (TS), et participe donc à la synthèse des pyrimidines (ADN). Cette dernière réaction produit du dihydrofolate (DHF), qui nécessite une réduction ultérieure

vers le THF par l'action de l'enzyme dihydrofolate réductase (DHFR) (Wagner, 2010) **(Figure 06)**.

En plus d'être un co-substrat pour la synthèse du dTMP, le 5,10-méthylène THF peut aussi être réduit en 5-méthyl THF par une réaction irréversible assurée par l'enzyme méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR) avec la flavine adénine dinucléotide (FAD) comme cofacteur. C'est une enzyme clé du métabolisme des folates qui régule le cycle des folates et va orienter le 5-méthylTHF à nouveau vers la reméthylation de l'homocystéine (Wagner, 2010) **(Figure 06)**.

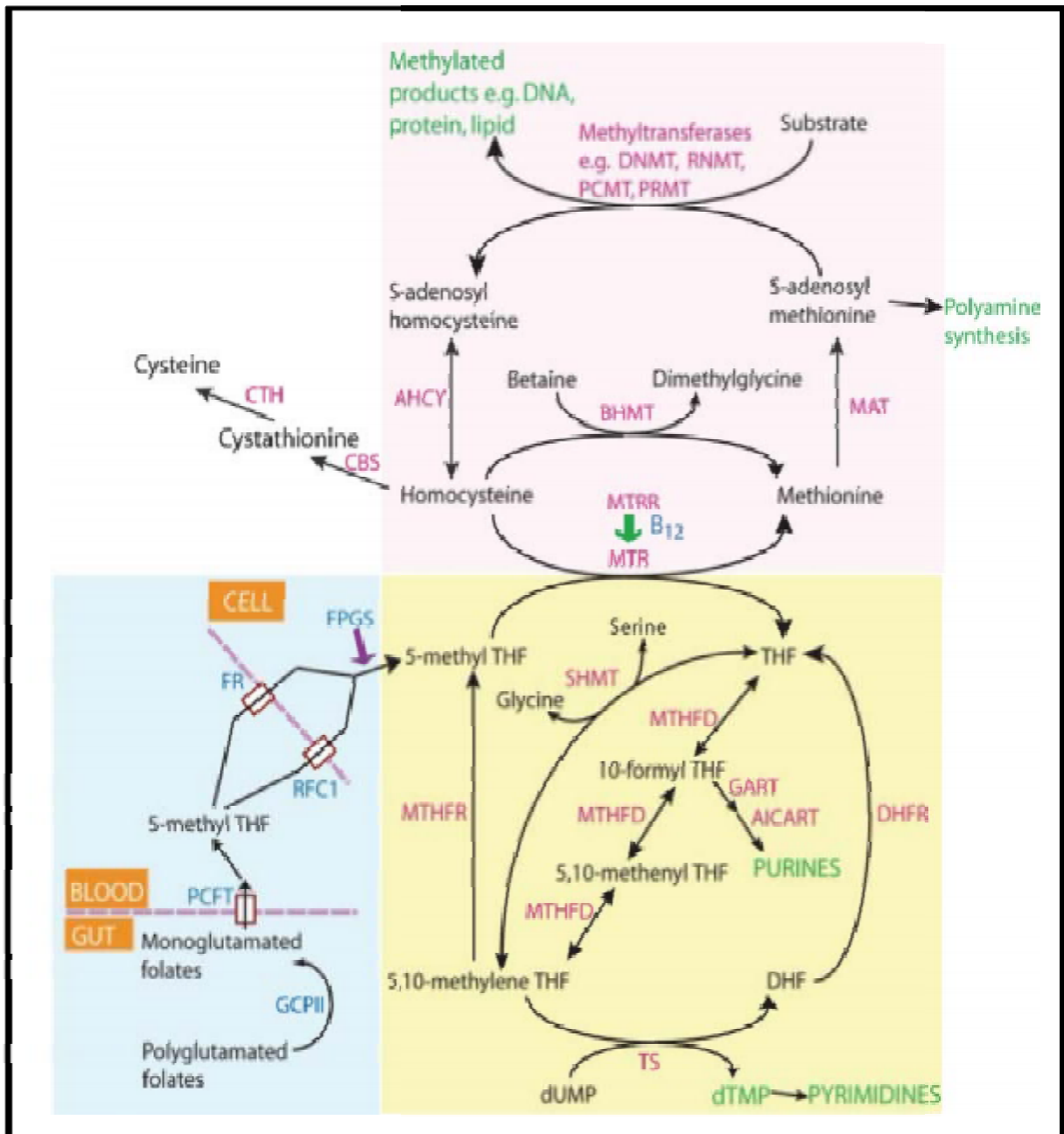


Figure 06 : Métabolismes des folates et de l'homocysteine (Greene et al., 2011).

Zone bleu : Absorption des folates

Zone jaune : Cycle des folates

Zone rose : Reméthylation de l'Hcy et trans-méthylation de la méthionine

Zone blanche: Trans-sulfuration de l'Hcy

II.2. METABOLISME DE L'HOMOCYSTEINE

L'homocystéine est un acide aminé soufré intermédiaire du métabolisme de la méthionine, il est à l'intersection d'importantes voies métaboliques :

- La trans-méthylation, qui permet la formation de l'homocystéine à partir de la méthionine
- La reméthylation, qui permet la reformation de la méthionine
- La transsulfuration qui permet la formation de la cystéine et le catabolisme de l'homocystéine (**Figure 06**).

II.2.1. TRANS-METHYLATION DE LA METHIONINE

La méthionine est un acide aminé essentiel qui permet la synthèse de l'homocystéine par une série de réactions. En effet, la méthionine permet la biosynthèse de la S-adénosyl méthionine (SAM), réaction assurée par l'enzyme méthionine adénosyl transférase (MAT) (Ryan et Weir, 2001) (**Figure 07**). La SAM, ainsi produite, est le principal donneur de groupements méthyles *via* une centaine de méthyltransférases, comme la guanidino acétate méthyl transférase (GAMT), la glycine N-méthyl transférase (GNMT) et la phosphatidyl éthanolamine méthyl transférase (PEMT). La S-adénosyl homocystéine (SAH) qui résulte de ces transferts de méthyles est un inhibiteur compétitif de nombreuses méthyl transférases (Ryan et Weir, 2001). La S-adénosyl homocystéine hydrolase (SAHH) catalyse, par la suite, la réaction de conversion de la SAH en homocystéine et en adénosine. C'est la seule réaction réversible parmi toutes les réactions chimiques impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine. Elle est en plus en faveur de la synthèse de la SAH plutôt que de la synthèse de l'homocystéine (Schalinske et Smazal, 2012) (**Figure 07**).

Cette série de réactions est appelée la trans-méthylation. Elle se déroule dans toutes les cellules de l'organisme. Elle permet le passage de la méthionine à l'homocystéine en donnant un groupe méthyle, ce qui permet notamment la méthylation de l'ADN, de l'ARN et des protéines, et ainsi, la régulation de l'expression des gènes (Schalinske et Smazal, 2012).

L'homocystéine et l'adénosine doivent être métabolisées ou transportées hors de la cellule pour empêcher l'accumulation de l'Adénosyl homocysteine (AdoHcy) (Schalinske et Smazal, 2012).

L'Hcy est métabolisée selon deux voies : voie de la reméthylation et voie de la transsulfuration.

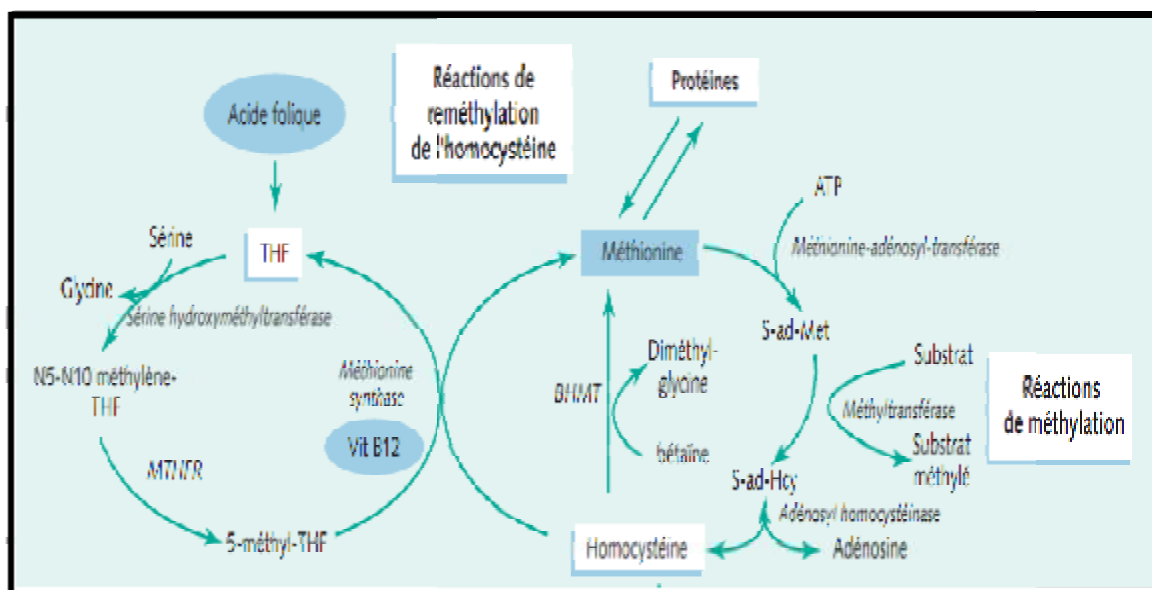


Figure 07 : Trans-méthylation de la méthionine (modifié d'après Gillery, 1999).

II.2.2. REMETHYLATION DE L'HOMOCYSTEINE

La voie de reméthylation dépend des apports en folates et de la vitamine B12 (Li et al., 1996) (Figure 07).

Elle est assurée par l'enzyme ubiquitaire MTR qui permet la reformation de la méthionine à partir de l'homocystéine en récupérant un groupe méthyle à partir du 5-MTHF. En effet, la MTR requiert la cobalamine (Cbl) comme cofacteur, et le complexe résultant Cbl (I) MTR lie le groupe méthyle du 5-MTHF pour former le methylcbl(III) MTR. Lors du transfert du groupement méthyle à l'homocystéine, le Cbl(I) MTR est reformé et peut accepter un autre groupement méthyle à partir du 5-MTHF. Le cob(I)alamin peut également être oxydé en cob(II)alamin, ce qui conduit à la formation d'un complexe MTR Cbl (II) inactif (Li et al., 1996). L'enzyme MTRR réactive le complexe Cbl(II) MTR par une méthylation réductrice, en utilisant la SAM comme donneur de groupement méthyle (Leclerc et al., 1999) (Figure 08).

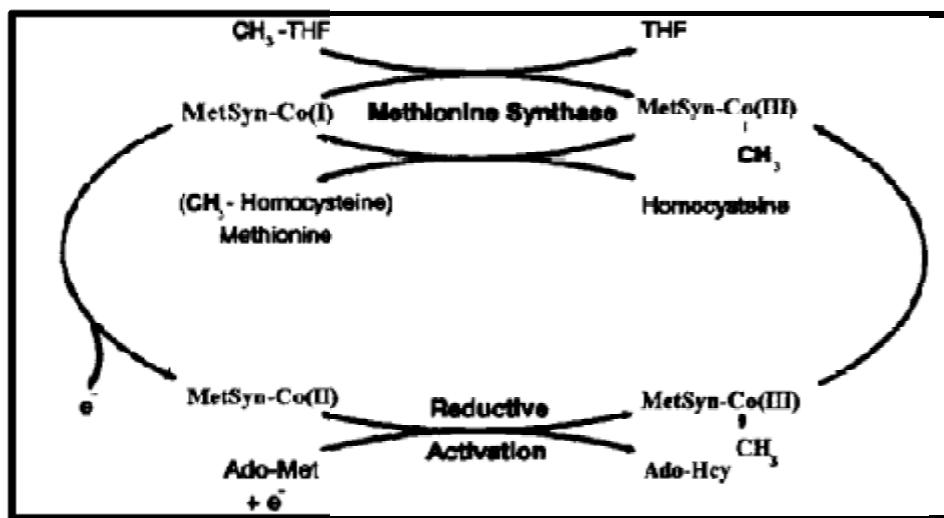


Figure 08 : Reméthylation de l'homocystéine en méthionine (Leclerc et al., 1999).

Il importe de savoir qu'il existe une deuxième réaction de reméthylation de faible activité qui utilise la bétaine comme donneur de méthyle et sous l'action d'une enzyme la bétaine-homocystéine méthyle transférase (BHMT) (Wilcken et al., 1983). Cette réaction n'a lieu que dans le foie et le rein (McKeever et al., 1991) (**Figure 07**).

II.2.3. TRANS-SULFURATION DE L'HOMOCYSTEINE

Lorsqu'il y a un excès en méthionine ou lorsqu'il existe un besoin accru en cystéine, la voie de « trans-sulfuration » est privilégiée. Cette dernière, est la seule voie de catabolisme de l'homocystéine chez les mammifères. Elle permet la formation de l'acide aminé cystéine. La cystathionine β synthase ou CBS condense le groupement thiol de l'Hcy avec l'hydroxyle d'une sérine pour former la L-cystathionine. Ensuite la L-cystathionine est clivée et désaminée en cystéine et en α -cétobutyrate par la Cystéine- γ -lyase (CGL). Ces deux réactions irréversibles nécessitent la présence d'un cofacteur, le pyridoxal 5' phosphate ou la vitamine B6. La cystéine issue de la trans-sulfuration peut ensuite servir à la synthèse du glutathion, un anti-oxydant essentiel dans la désintoxication de nombreux xénobiotiques. L'excès de cystéine est ensuite oxydé en taurine et en sulfates inorganiques (Quere et al., 1999) (**Figure 09**).

La trans-sulfuration n'a lieu que dans certains organes : foie, rein intestin grêle et pancréas et aussi pendant l'embryogenèse précoce dans les systèmes nerveux et cardiaque (Quere et al., 1999).

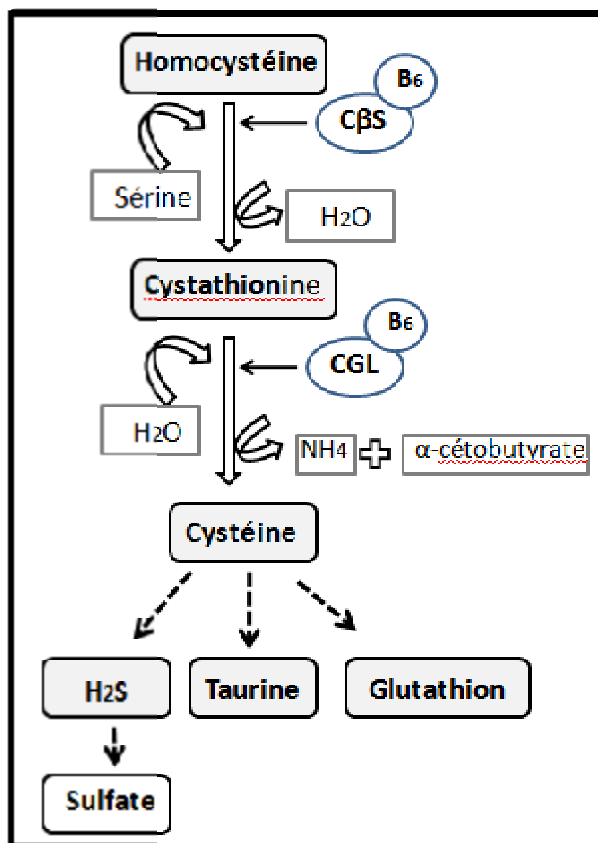


Figure 09 : Trans-sulfuration de l'homocystéine (Modifié d'après Dorszewska et al., 2015).

II.2.4. REGULATION DU METABOLISME DE L'HOMOCYSTEINE

Ces différentes voies du métabolisme de l'homocystéine sont finement régulées par un mécanisme faisant intervenir la SAM. Cette dernière, est un inhibiteur allostérique de la MTHFR. Lorsque la SAM est présente en concentration élevée, la MTHFR est inhibée, ce qui diminue la synthèse du 5-méthyl-THF et donc la reméthylation de l'homocystéine. Dans ce cas, il va y avoir un basculement du métabolisme de l'homocystéine vers son catabolisme, *via* l'activation de la voie de trans-sulfuration. La liaison de la SAM au domaine de régulation de la CBS favorise un changement de la conformation de l'enzyme, libérant le site actif (Janosik et al., 2001). Inversement, lorsque la concentration de la SAM est faible, elle favorise la reméthylation de l'homocystéine (Crider et al., 2012).

III ENZYMES INTERVENANT DANS LES METABOLISMES DES FOLATES ET DE L'HOMOCYSTEINE ET POLYMORPHISMES GENETIQUES ABORDES

Les gènes qui codent les enzymes intervenant dans les métabolismes des folates et de l'homocystéine sont des candidats évidents dans la recherche de la causalité des AFTNs. Plusieurs polymorphismes génétiques ont été identifiés et sont sujets de nombreuses études dans différentes populations.

III.1. REDUCED FOLATE CARRIER (RFC)

III.1.1. GENE

Le gène humain RFC (Famille ; solute carrier SLC19A1), dont les noms et les symboles alternatifs sont : folate transporter (FOLT) ou intestinal folate carrier 1 (IFC-1) (Yang-Feng et al., 1995) est situé sur le chromosome 21(q22.2-22.3). La région codante contient 1776 pb (GenBank U19720 and U15939) (Wong et al., 1995 ; Prasad et al., 1995). Il contient cinq exons avec un degré élevé d'homologie entre les espèces (Matherly et Goldman, 2003).

Cependant, sa caractérisation a montré qu'il existe une complexité dans la nature hétérogène de la région 5'UTR en amont du codon du début de la traduction AUG. Elle contient sept régions non codantes à savoir (A1, A2, A, B, C, D et E) qui s'étalent sur une longueur de 35kb et contient plusieurs sites de début de la transcription, permettant ainsi, l'épissage alternatif et donnant au moins 18 transcrits uniques (Whetstine et al., 2002)(**Figure 10a**). Il en résulte des isoformes de la protéine avec une extrémité N-terminale variable et dont la signification biologique n'est pas encore claire (Zhao et al., 2009)

En outre, le gène comporte deux promoteurs basaux (hRFCA et hRFCB) régulés par différentes familles de facteurs de transcription (Whetstine et al., 2002). Les modèles cellulaires et animaux montrent que la déplétion en folates exerce une régulation positive sur l'absorption des folates comportant une augmentation des ARNm et des protéines RFC (Jansen et al., 1997; Said et al., 2000). La multiplicité des promoteurs de hRFC pourrait fournir un moyen potentiellement puissant pour garantir des niveaux adéquats de transcrits et de protéines hRFC en réponse aux besoins métaboliques en folates et/ou en réponse aux signaux cellules/tissus spécifiques (Worm et al., 2001).

III.1.2. PROTEINE

La protéine RFC est une voie importante pour l'absorption des folates alimentaires dans les cellules de mammifères et joue un rôle crucial dans le maintien du niveau des folates intracellulaire normal. Elle est exprimée de façon ubiquitaire, avec des niveaux plus élevés dans le placenta (où elle est exprimée à la fois sur la membrane des microvillosités ainsi que sur la membrane basolatérale). De ce fait, elle est importante pour le développement des embryons, assurant le transport des folates à travers le placenta (Antony, 1992 ; Whetstine et al., 2002).

La protéine humaine a une masse moléculaire allant de 80 à 120 kDa (Chango et al., 2000b)

C'est un transporteur des folates bidirectionnel intégré dans les membranes cellulaires, qui génère un gradient transmembranaire (Hou et Matherly, 2009). La protéine contient environ 12 domaines transmembranaires, avec un site de N-glycosylation orienté vers l'extérieur (position 58) et une boucle cytosolique au niveau des domaines transmembranaires 6 et 7. Cette boucle est importante pour l'espacement entre les domaines permettant d'assurer un transport optimal des folates (Patterson et al., 2008 ; Zhao et al., 2009) (**Figure 10b**) .

Les domaines transmembranaires 4, 5, 7, 8, 10 et 11 sont importants pour la structure et la fonction de la protéine, et sont essentiels pour la liaison avec les folates (Sadlish et al., 2002; Sharina et al., 2002 ; Zhao et al., 2009) (**Figure 10b**) .

L'enzyme véhicule préférentiellement des folates réduits tels que le méthyl-THF et le formyl-THF (Prasad et al., 1995 ; Nguyen et al., 1997), mais elle a une affinité relativement faible pour les formes de folates oxydés tels que l'acide folique (Chango et al., 2000a). Le transport se fait à des concentrations physiologiques et à un pH neutre optimal de (~ 7,4). Cependant, la protéine peut modifier sa spécificité sous certaines conditions acides. Son mécanisme de transport détaillé n'est pas encore bien connu (Hou et Matherly, 2009).

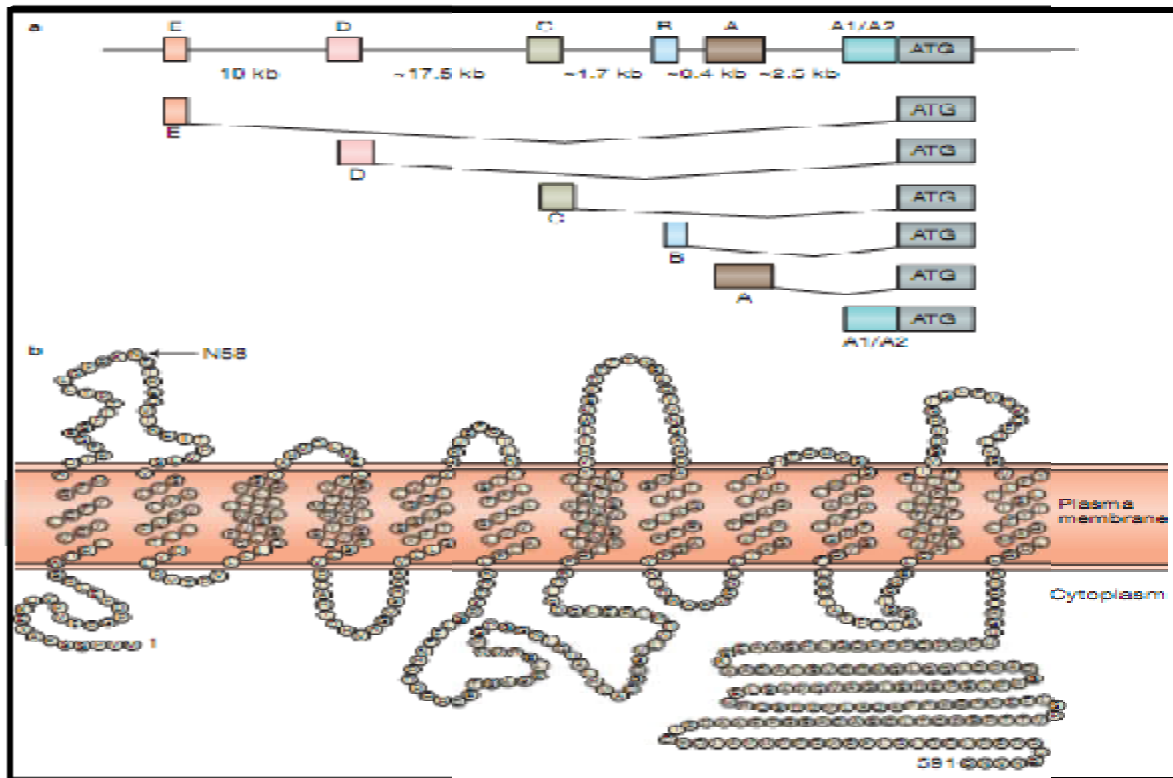


Figure 10 : Gène et protéine RFC (Zhao et al., 2009).

III.1.3. POLYMORPHISME RFC G80A

Chango et al. (2000b) ont examiné la région codante de l'ADNc du gène RFC à partir de cellules cutanées cultivées (fibroblaste normal). Le séquençage complet leur a permis d'identifier un polymorphisme dans l'exon 2 du gène qui est commun dans la population générale. Une guanine a été substituée en adénine en position 80 et dont la fréquence des deux allèles est pratiquement identique. La mutation affecte le résidu 27 de la protéine et remplace l'arginine par l'acide aminé histidine.

Les chercheurs ignorent si ce polymorphisme affecte la fonction de la protéine. Cependant, la mutation est située à l'extrémité amino-terminale où est localisée la séquence signal responsable de l'insertion de la protéine dans la membrane. Ainsi, un tel changement pourrait être critique pour le ciblage et l'intégration de la protéine à la membrane plasmique (Heidkamper et al., 1996 ; Karbach et al., 1998).

III.2. 5,10 METHYLENE TETRAHYDROFOLATE REDUCTASE (MTHFR)

III.2.1. GENE

Le gène de la MTHFR humain est localisé sur le chromosome 1 en position (1p36.3) comportant 11 exons (Goyette et al., 1994). La région codante entière comporte 1 980 bp (GenBank NM_005957).

Gaughan et al. (2000) ont montré que le gène ne contient pas de TATA box, mais contient plusieurs îlots CpG très importants représentant des sites d'union pour des facteurs de transcription. Sa région promotrice est similaire aux séquences promotrices d'autres gènes codant les enzymes intervenant dans le métabolisme de l'homocystéine telle que, la cystathionine β synthase, la méthionine synthase et la méthionine synthase réductase (Hombarger et al., 2000).

L'exon 1 du gène comporte un « site alternatif d'épissage », la région non traduite (untranslated region UTR) de ce gène est longue, montrant la complexité dans sa régulation. Deux ARNm de 7,5 kb et de 8,5 kb ont été identifiés dans les tissus (Goyette et al., 1998)(Figure 11).

III.2.2. PROTEINE

La 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase représente l'enzyme clé du métabolisme des folates. C'est une flavoprotéine cytosolique qui agit avec la flavine adénine dinucléotide (FAD) comme cofacteur, en catalysant la réduction irréversible du 5,10-méthylène tétrahydrofolate en 5-méthyl tétrahydrofolate, indispensable à la reméthylation de l'homocystéine en méthionine. Chez l'homme, la protéine présente deux isoformes : l'une de poids moléculaire de 77 KDa et l'autre de 70 kDa, dont la plus petite a été découverte uniquement dans le foie de l'adulte ainsi que dans le foie et les reins fœtaux (Frosst et al., 1995 ; Miner et al., 1997).

L'enzyme possède deux sous unités chacune comportant deux domaines, le domaine catalytique représenté par l'extrémité N-terminale de poids moléculaire de 40 KDa, liant le FAD (cofacteur), le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate NADPH (donneur d'électrons) et le 5,10 méthylène tétrahydrofolate, et le domaine régulateur à l'extrémité C-terminale de poids moléculaire de 37 KDa où l'inhibiteur allostérique AdoMet se lie

et régule l'activité enzymatique en réponse au taux de la méthionine dans la cellule (Gos et Szepecht-Potocka, 2002) (**Figure 11**).

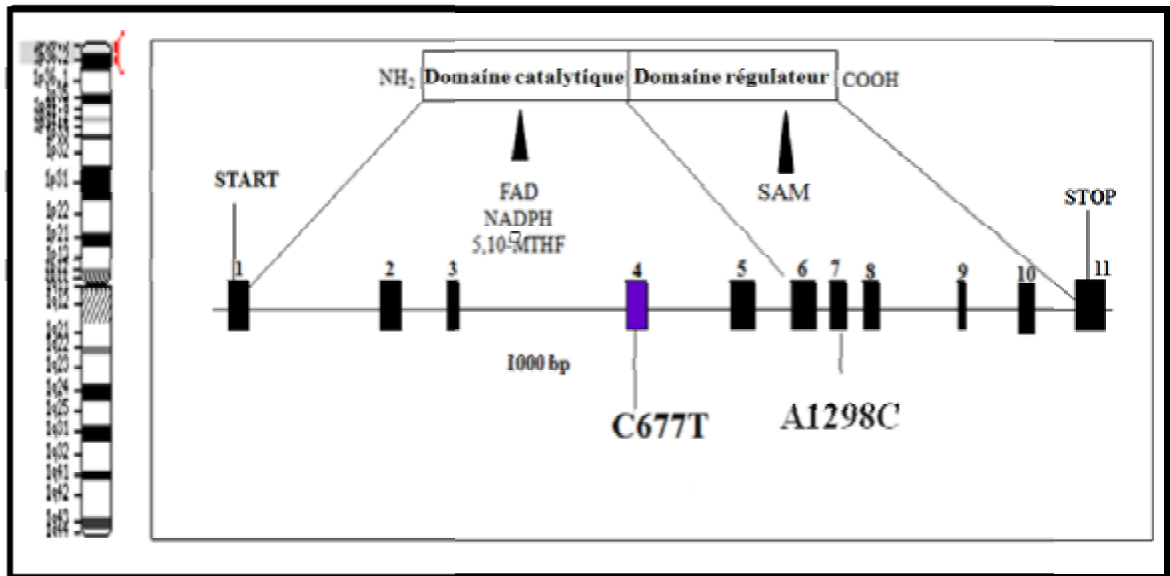


Figure 11 : Gène, protéine et polymorphismes de la MTHFR
(Gos et Szepecht-Potocka, 2002).

III.2.3. *POLYMORPHISME MTHFR C677T*

Le polymorphisme C677T est une substitution d'une cytosine par une thymine en position 677 dans l'exon 4 de la séquence nucléotidique. Elle se traduit dans la séquence protéique par la substitution d'une alanine en une valine sur le codon 222, situé à l'extrémité N-terminale de l'enzyme (Frosst et al., 1995; Goyette et al., 1996) (**Figure 11**).

L'étude de l'activité enzymatique de la protéine mutée, comparée au phénotype sauvage a montré que la mutation affecte l'affinité de l'enzyme à son cofacteur FAD (Homberger et al., 2000). En effet, la protéine modifiée perd son cofacteur FAD rapidement, ce qui diminue sa stabilité et par conséquent son activité (Yamada et al., 2001).

L'activité spécifique est réduite de 50 % par rapport à la protéine normale, avec 30 % d'activité résiduelle après chauffage à 46 °C pendant cinq minutes. En fait, la mutation a pour conséquence de rendre la protéine thermolabile (Rozen, 1997).

Le polymorphisme provoque, ainsi, la diminution du métabolisme 5,10 méthylèneTHF en 5-méthylTHF et par voie de conséquence la quantité du méthyl-THF limitant ainsi partiellement la voie de la reméthylation de l'homocystéine (Frosst et al, 1995; Van der Put et al, 1996). Il en résulte, de cette perturbation, une augmentation du taux de l'homocystéine et la diminution du taux de la méthionine et donc du potentiel méthylant de l'organisme. Elle cause, par ailleurs, un ralentissement de l'activité du cycle folique et un changement de la composition cellulaire des dérivés foliques (Van der Put et al., 2001 ; Friso et al., 2002 ; Davis et al., 2005).

La prévalence du polymorphisme C677T dans la population générale varie considérablement selon les régions et les groupes ethniques. Ainsi, la fréquence du génotype TT varie de 2% à 54,5% dans diverses populations. Selon la littérature une fréquence de 6% à 14% a été rapportée chez les blancs en Amérique du Nord. Le génotype est particulièrement fréquent chez les populations mexicaines et autres hispaniques de 15% à 35%. Chez les populations européennes, la fréquence semble augmenter du nord au sud : 6% à 14% dans le nord de l'Europe et 15% à 24% en Europe du Sud (Christensen et Rozen, 2010).

En Asie, les fréquences varient de 12% à 18%. Elle est, cependant, élevée en Chine 23,2% (Yang et al., 2015). Moins de 2% des populations africaines et afro-américaines sont homozygotes pour la variante (Christensen et Rozen, 2010).

III.2.4. POLYMORPHISME MTHFR A1298C

Ce polymorphisme est une transversion d'une adénine en une cytosine en position 1298 de l'exon 7, qui conduit à une substitution d'un résidu d'acide glutamique en une alanine à la position 429 dans le domaine régulateur de la protéine (Van der Put et al., 1998) (**Figure 11**).

La mutation est associée à une réduction de l'activité enzymatique moins sévère que celle observée dans le cas du polymorphisme C677T. L'activité est estimée à 68 % par rapport à la protéine normale et, contrairement à la mutation C677T, elle ne rend pas la protéine thermolabile (Weisberg et al., 1998 ; Van der Put et al., 1998). Aussi, l'hétérozygotie combinée des deux polymorphismes 677CT/ 1298AC résulte en une activité protéique plus faible que l'hétérozygotie de l'un des deux polymorphismes séparément (Van der put et al., 1998).

Cependant, la caractérisation de la protéine montre que l'inhibition par la SAM et le taux de libération du FAD n'ont pas été affectés par la mutation, aussi bien séparément qu'en combinaison avec la mutation C677T (Yamada et al., 2001).

Comme pour la mutation C677T, il existe une grande hétérogénéité dans la fréquence du polymorphisme A1298C à travers le monde. Elle varie selon la géographie et le groupe ethnique. En Afrique des fréquences variant de 2% à 4% du génotype CC ont été rapportées (Christensen et Rozen, 2010).

III.3. METHIONINE SYNTHASE (MTR)

III.3.1. GENE

Le gène humain codant pour la méthionine synthase a été localisé sur le chromosome 1 (1q43) et comprend 33 exons. La région codante a une longueur de 3795 pb (GenBank U71285) (Leclerc et al., 1996 ; Li et al., 1996 ; Chen et al., 1997).

III.3.2. PROTEINE

La reméthylation de l'homocystéine en méthionine nécessite l'enzyme 5 méthyl tétrahydrofolate homocystéine méthyltransférase, mieux connue sous le nom de méthionine synthase. Cette enzyme a comme cofacteur la cobalamine (vitamine B12). La protéine comporte 1265 acides aminés et son poids moléculaire moyen est de 140 kDa. L'enzyme possède trois domaines : Le domaine N-terminal liant l'homocystéine (résidus 2-353) et les substrats pour la réaction à savoir le 5- méthyl THF (résidus 354-649), le domaine central est fortement conservé et lie la cobalamine (résidus 650 -896), tandis que le domaine C-terminal est un domaine régulateur, interagissant avec la SAM (résidus 897 -1227) qui est nécessaire pour l'activation réductrice de la méthionine synthase par l'enzyme méthionine synthase réductase (Chen et al., 1997 ; Leclerc et al., 1998)(**Figure 12**).

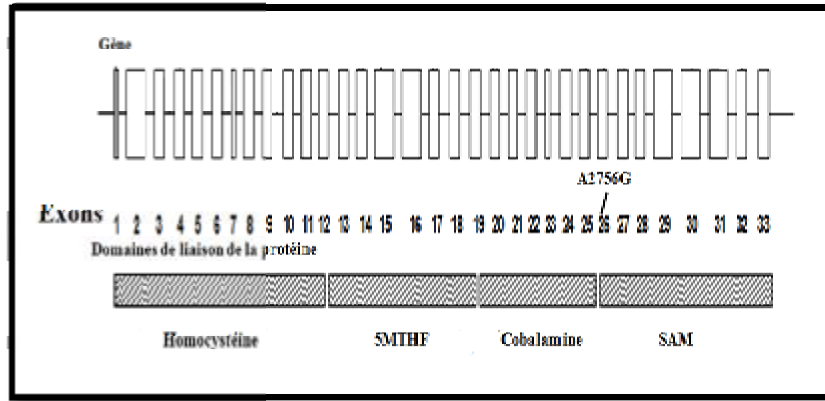


Figure 12 : Gène, protéine et polymorphisme A2756G de la MTR (Modifié d'après Watkins et al., 2002).

III.3.3. POLYMORPHISME MTR A2756G

Le polymorphisme le plus connu dans le gène MTR est la substitution d'une adénine par une guanine en position 2756 sur l'exon 26 du gène, entraînant au niveau traductionnel le changement de l'acide aspartique par l'acide aminé glycine en position 919 de la protéine. La mutation est située au niveau d'une hélice, entre le domaine de liaison de la cobalamine et le domaine régulateur liant la S-adénosylméthionine (Chen et al., 1997) (**Figure 12**).

L'acide aspartique est un acide aminé polaire fort localisé dans la région responsable de la liaison des protéines participant à la réduction du cofacteur cobalamine. La modification de l'acide aspartique par l'acide aminé non polaire (glycine) peut, donc, changer la structure secondaire de la protéine et par conséquent sa fonction (Van der Put et al., 1997c). Il a été supposé que ce polymorphisme conduit à un niveau d'oxydation inadéquat du cobalamine, qui peut diminuer l'activité de la méthionine synthase et augmenter le taux de l'homocystéine cellulaire (Chen et al., 1997).

Dans la population générale, la mutation montre une fréquence de l'allèle G allant de 0,15 à 0,38 selon les populations (Fodinger et al., 2002). La fréquence du génotype GG est, d'une manière générale, homogène à travers le monde allant de 1% à 5% dans les populations asiatiques, européennes, nord-américaines et australiennes (Christensen et Rozen, 2010) et africaines (Afifi et al., 2014).

III.4. METHIONINE SYNTHASE REDUCTASE (MTRR)

III.4.1. GENE

Le gène de la MTRR a été localisé sur le chromosome 5 (5p15.2 – p15.3). C'est un gène « domestique », car son expression est faible et presque identique dans tous les tissus. Il comporte 15 exons qui représentent 10 % du gène entier, avec ses 14 introns, il a une taille d'environ 34 kbp. La longueur de la région codante est de 2094 pb et son promoteur n'a pas de boîte TATA. Un ARNm prédominant de 3,6 kb est présent dans les tissus humains (Leclerc et al., 1998).

III.4.2. PROTEINE

La méthionine synthase réductase est une enzyme qui maintient la fonction de la méthionine synthase. Son ARNm donne une protéine comportant 698 acides aminés, et son poids moléculaire est d'environ 77 KDa (Leclerc et al., 1998 ; Wilson et al., 1999). L'enzyme est une protéine cytoplasmique et, est un membre de la famille des transférases d'électrons, elle comporte trois sites caractéristiques, qui lient le Flavine mononucleotide (FMN), le FAD et le NADPH (Leclerc et al., 1999) (**Figure 13**).

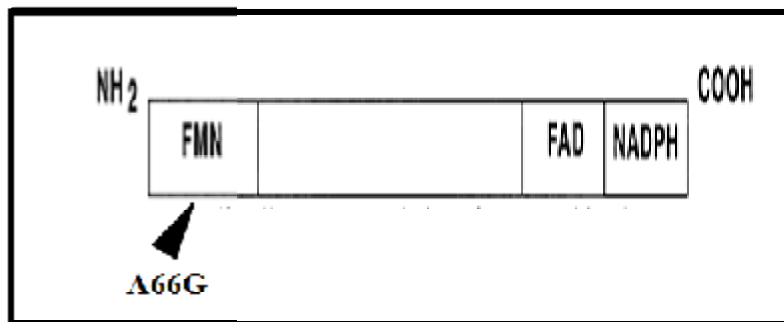


Figure 13 : protéine et polymorphisme A66G de la MTRR (Modifié d'après Leclerc et al., 1999).

III.4.3. POLYMORPHISME MTRR A66G

La mutation est une transition d'une adénine en une guanine sur l'exon 2 du gène, qui conduit à la modification d'une isoleucine par une méthionine en position 22 de la protéine, elle est située dans le domaine de liaison du FMN à l'enzyme (**Figure 13**). Bien que la fréquence rapportée de l'allèle G soit élevée (0,51), la forme contenant la méthionine a été

désignée comme la protéine "mutante" en raison de la conservation de l'isoleucine à cette position chez d'autres espèces (Wilson et al., 1999).

Olteanu et al. (2002) ont analysé les propriétés biochimiques, cinétiques et spectroscopiques du variant MTRR 66G. Aucun changement majeur de la conformation de la protéine n'a été trouvé associé à la mutation. Cependant, quatre fois plus la quantité de la protéine mutante était nécessaire pour atteindre une activité maximale.

La fréquence de l'homozygotie 66 GG du gène de la MTRR, à travers le monde, montre qu'elle est la plus élevée chez les Blancs (20% à 38%) et beaucoup plus faible en Asie (7% à 10%), et chez les populations mexicaines (6% à 7%) (Christensen et Rozen, 2010). En Afrique, aucune fréquence n'a été rapportée.

III.5. CYSTATHIONINE B SYNTHASE (CBS)

III.5.1. GENE

Le gène codant pour la cystathionine β synthase a été localisé sur le chromosome 21 (21q22.3). Il est constitué de 23 exons, mais, seuls les exons 1-14 et 16 codent pour une séquence peptidique active de 551 acides aminés. Le gène possède au moins deux séquences promotrices utilisées, mais aucune d'entre elles n'a une boîte TATA (Gos et Szpecht-Potocka, 2002).

III.5.2. PROTEINE

L'homocystéine est trans-sulfurée en cystéine *via* la cystathionine β synthase qui utilise comme cofacteur la vitamine B6 sous sa forme active, le pyridoxal 5'phosphate (Zittoun, 1998 ; Blacher et al., 2005) . C'est une protéine cytoplasmique, la plus petite forme active est un tétramère qui comporte quatre monomères identiques de poids moléculaire d'environ 63 KDa. Des structures plus complexes sont observées dans des conditions d'oxydation (Gos et Szpecht-Potocka, 2002).

Chaque sous-unité du tétramère comporte trois domaines, le domaine N-terminal lie une molécule d'hème dont la fonction n'a pas encore été identifiée, elle participe probablement au repliement correcte de la protéine et / ou est responsable des interactions enzyme - vitamine B6. Un domaine central catalytique avec une séquence d'acides aminés conservée liant le

pyridoxal 5'phosphate, et le domaine régulateur fixant la SAM, activateur allostérique de la protéine (Gos et Szpecht-Potocka, 2002) (**Figure 14**).

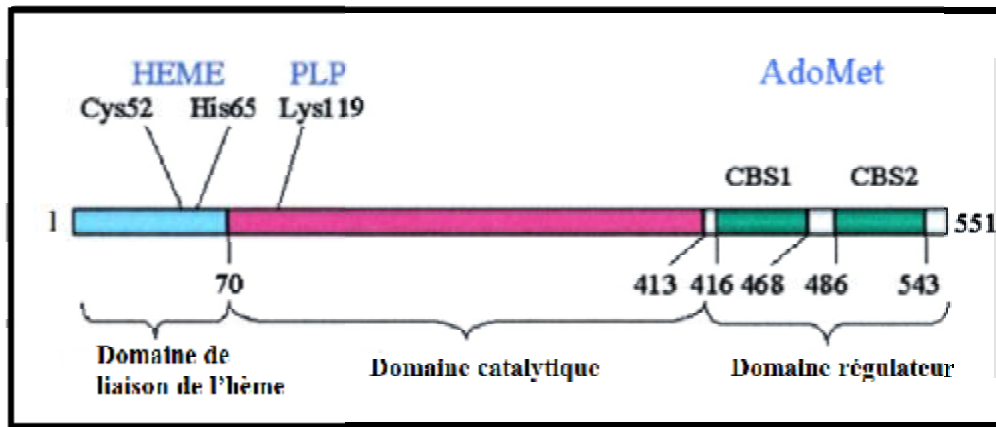


Figure 14 : Domaines de la protéine CBS (Miles et Kraus, 2004).

III.5.3. *POLYMORPHISME CBS 844INS68*

La mutation est une insertion de 68 pb dans l'exon 8 du gène, L'ADN inséré comprend une duplication d'une partie de l'extrémité finale de l'intron 7 et de l'extrémité 5' de l'exon 8. Elle provoque un changement de cadre de lecture introduisant deux codons stop dans le même exon, de ce fait, elle résulterait en une protéine tronquée (Sebastio et al., 1995) (**Figure 15**).

Cependant, Sperandio et al. (1996), ont trouvé que la mutation crée un nouveau site d'épissage, préférentiellement utilisé, qui permet l'élimination de la partie insérée donnant ainsi un ARNm de taille normale. En fait, il n'est pas entièrement clair comment la mutation affecte la fonction de l'enzyme (**Figure 15**).

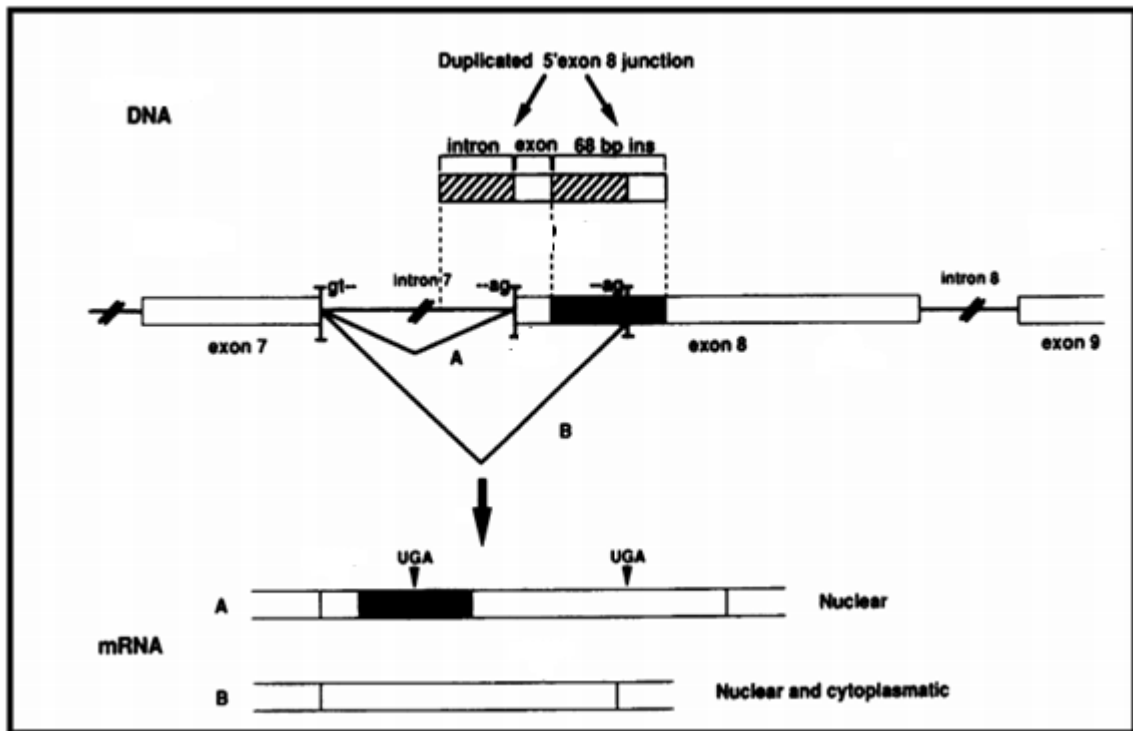


Figure 15 : Insertion 844ins68 dans le gène CBS (Sperandeo et al., 1996).

Comme pour plusieurs autres polymorphismes, la fréquence allélique de cette insertion est variable selon les ethnies, cependant elle reste toujours faible. Des fréquences de 0,08 pour les Américains Blancs et 0,063 pour les Mexicains Américains ont été rapportées (Chang et al., 2010). Ce polymorphisme s'est avéré complètement absent dans les populations Chinoise et Japonaise (Pepe et al., 1999). Ce qui explique l'absence ou le faible taux de l'homozygotie de la mutation trouvés à travers les différentes populations.

IV PERTURBATION METABOLIQUE FOLATES/HOMOCYSTEINE ET AFTNS

IV.1. PERTURBATION DU METABOLISME DES FOLATES ET SURVENUE DES AFTNS

Une baisse des folates sérique et érythrocytaire se produit presque constamment au cours de la grossesse chez les femmes non supplémentées (Ek et Magnus, 2009). Cette baisse est en partie due à l'hémodilution, mais elle traduit aussi des modifications métaboliques liées à la grossesse, aux transferts à l'unité foetoplacentaire et au catabolisme de l'acide folique qui est considérablement accru (McPartlin et al., 1993). Le degré de la carence dépend de l'importance des réserves en début de grossesse.

Les conséquences de la carence en folates sur le développement fœtal sont bien établies, différentes malformations peuvent être induites expérimentalement par l'administration d'anti-foliques. De plus, le rôle de l'acide folique dans la prévention des anomalies du tube neural a été démontré, un statut folique adéquat réduit le risque de perturbations au stade précoce du développement embryonnaire. L'apport des folates avant que le processus de neurulation soit initié et terminé est particulièrement important (Pitkin, 2007).

Il a été observé que, les taux d'acide folique chez les mères ayant une grossesse affectée par une AFTN au cours du premier trimestre sont, encore, plus faibles que ceux trouvés chez les femmes enceintes témoins, différence notée, surtout, pour le taux de folate érythrocytaire. La significativité statistique a été notée dans des études effectuées chez des populations irlandaises, chinoises et mexicaines connue pour avoir une prévalence relativement élevée des AFTNs (Kirke et al., 1993 ; Mills et al., 1995 ; Zhang et al., 2009 ; Cech et Burau, 2010). Le folate érythrocytaire est, de ce fait, considéré comme un facteur de risque indépendant pour les AFTNs (Cech et Burau, 2010).

IV.1.1. ETUDES MONTRANT L'EXISTENCE DES PERTURBATIONS METABOLIQUES CHEZ LES MERES ET LES ENFANTS A RISQUE

Une déficience en folates, chez les mères à risque, peut être due à une insuffisance diététique mais aussi à des besoins liés à un trouble du métabolisme. Dans une étude de Lucock et al. (2000), réalisée sur des lysats cellulaires, des perturbations métaboliques ont été observées dans les échantillons des mères ayant un enfant affecté par une AFTN. En effet, après traitement par le substrat exogène 5-MTHF, ce dernier était moins utilisé par les

échantillons des mères à risque et la différence avec les échantillons contrôles était significative. De plus la production du 5,10-méthylène THF à partir de ce substrat exogène était significativement réduite.

Par ailleurs, d'autres défauts métaboliques ont pu être observés. Habibzadeh et al. (1993) ont montré que le groupe méthyle du 5-MTHF est plus lentement incorporé dans l'ADN du trophoblaste des fœtus affectés par une AFTN comparés aux témoins. Ceci indique une perturbation dans l'absorption ou l'utilisation du 5-MTHF et donc dans le métabolisme des folates.

En outre, des perturbations ont été observées chez les fœtus malformés. En effet, dans l'étude réalisée par Dunlevy et al. (2007), les auteurs ont évalué le métabolisme des folates dans les fibroblastes des fœtus avec AFTN en utilisant le test de suppression dU, qui est un test spécifique pour évaluer le fonctionnement du cycle des folates d'une manière plus sensible comparé à un simple dosage des métabolites dans le sang. Ils ont détecté un dysfonctionnement métabolique dans environ un tiers de l'échantillon. Dans le reste de l'échantillon, d'autres causes pourraient expliquer la survenue de la malformation.

IV.1.2. IMPLICATION DES POLYMORPHISMES GENETIQUES DANS LA PERTURBATION DU METABOLISME DES FOLATES

La prise en compte des polymorphismes dans les gènes des enzymes intervenant dans le métabolisme des folates et aussi de l'homocystéine, montre qu'ils semblent influencer le profil folate-coenzymes des cellules et donc reflète et explique la perturbation du métabolisme, ce qui pourrait avoir une implication directe ou indirecte dans l'étiologie des AFTNs. Par exemple, les variants mutants du polymorphisme C677T du gène de la MTHFR, enzyme clé dans le cycle des folates, influencent la distribution des formes des folates ; ils augmentent les formylfolates mais réduisent les méthylfolates. Un défaut qui bloquerait le cycle de la méthionine et par conséquent les processus de méthylations (Lucock et al., 2000).

Par ailleurs, le folate 5-MTHF est un substrat pour la réaction de reméthylation de l'homocystéine par l'enzyme MTR ; un déficit de cette enzyme provoquerait une accumulation de folate sous cette forme. Le 5-MTHF ne peut être métabolisé par aucun autre mécanisme, ceci entraînerait le piégeage du folate sous une forme non fonctionnelle avec une réduction concomitante du niveau des autres coenzymes-folates requis pour d'autres réactions du métabolisme des unités monocarbonées (Chen et al., 1997).

En plus, le processus de polyglutamation diminue en l'absence des formes déméthylées des folates. La rétention des folates dans les cellules est donc faible (Van der Put et al., 2001).

Une déficience en folates serait, donc, imposée par la déficience fonctionnelle causée par le piège méthylique (Chen et al., 1997 ; Dunlevy et al., 2007).

D'autre part, Il a été trouvé que l'activité réduite de l'enzyme MTR implique une diminution de la SAM. Le manque de cette dernière augmente l'activité de la MTHFR par abolition de son inhibition et donc un épuisement du THF et de ses différentes formes nécessaires pour la synthèse de la thymidine et de la purine (Van der Put et al., 2001).

IV.2. PERTURBATION DU METABOLISME DE L'HOMOCYSTEINE ET SURVENUE DES AFTNS

Le métabolisme de l'homocystéine joue un rôle important dans le transfert des unités mono-carbonées, produisant des groupements et des molécules indispensables à la synthèse et à la régulation de l'ADN, de l'ARNm et des protéines ; mécanismes essentiels pour les cellules embryonnaires. Tout déficit (génétique ou acquis) portant sur les enzymes ou sur les cofacteurs de ce métabolisme (vitamines B9, B12, B6) provoque des perturbations et induira une diminution du catabolisme de l'homocystéine qui se traduira par une hyperhomocystéinémie (HHcy) plus ou moins importante.

La teneur en homocystéine plasmatique est comprise entre 5-15 $\mu\text{mol/l}$. L'hyperhomocystéinémie, lorsqu'elle résulte de carences vitaminiques ou d'un polymorphisme génétique, est habituellement modérée (16 à 30 $\mu\text{mol/l}$) ou moyenne (31 à 100 $\mu\text{mol/l}$). L'hyperhomocystéinémie sévère ($> 100 \mu\text{mol/l}$) est dans la plupart des cas associée à des mutations rares (Chango et al., 1999). Chez les mères dont l'enfant est affecté par une malformation du tube neural, l'homocystéine plasmatique est souvent élevée, de type modéré.

IV.2.1. FACTEURS NUTRITIONNELS ASSOCIES A L' HYPERHOMOCYSTEINEMIE ET LA SURVENUE DES AFTNS

L'HHcy chez les mères d'enfants atteints d'AFTN est généralement attribuée à une dérégulation de la réaction de reméthylation dépendante des folates, souvent réduite après administration d'acide folique. Cette constatation a été prorogée et confirmée par de

nombreuses études (Van der Put et al., 1997a ; Gaber et al., 2007 ; Li et al., 2009 ; Zhang et al., 2009 ; Cech et Burau, 2010).

Chez les enfants atteints de spina bifida, le métabolisme est également perturbé ; une forte corrélation a été observée entre l'homocystéine plasmatique et le taux des folates. L'étiologie liée à des taux de l'homocystéine au-dessus du 95^{ème} percentile et à des taux plasmatiques des folates au-dessous du 5^{ème} percentile représente les pourcentages de 30,7 % et 25,7 %, respectivement. L'étiologie liée à l'hyperhomocystéinémie qui n'est pas associée aux taux des folates était de 9,6 % (Vander Put et al., 1997b). Récemment, Wang et al. (2015a) ont aussi observé une perturbation métabolique, un taux bas des folates associé à un taux élevé d'Hcy chez les enfants atteints.

Plusieurs chercheurs ont également trouvé une relation entre le taux maternel de la vitamine B12, de l'homocystéine et le risque d'AFTNs (Zhang et al., 2009; Cech et Burau, 2010; Gu et al., 2012 ; Aydin et al., 2016) .

Van der Put et al. (1997b) ont démontré que le risque chez les mères d'avoir un enfant atteint de spina bifida était augmenté au 75^{ème} percentile des valeurs de l'homocystéine et au 5^{ème} et au 25^{ème} percentile des valeurs de la vitamine B12. De même, Gaber et al. (2007) ainsi que Li et al. (2009) ont montré une augmentation significative de l'homocystéine chez les femmes portant un fœtus atteint qui a été liée au déficit de la vitamine B12 (co-facteur de la réaction de reméthylation de l'Hcy).

IV.2.2. FACTEURS GENETIQUES ASSOCIES A L' HYPERHOMOCYSTEINEMIE ET LA SURVENUE DES AFTNS

Les chercheurs ont constaté, également, des déficiences enzymatiques qui étaient à l'origine de l'HHcy. En effet, une déficience de l'enzyme MTHFR à la suite de la mutation C677T chez les familles atteintes présentant des AFTNs a été trouvée. Daly et Scott (1998), ont démontré qu'il y avait une activité enzymatique réduite dans le tissu placentaire associée à ce variant C677T. Cela indique qu'une étape importante dans le métabolisme de l'acide folique est déficiente dans le placenta. La mutation C677T était associée à une augmentation du taux de l'homocystéine, et du fait du risque d'AFTNs (Czeizel, 2010).

Un résultat similaire a été observé pour l'hétérozygotie combinée des deux mutations C677T et A 1298C du gène de la MTHFR ; elles étaient associées à une activité spécifique

réduite de MTHFR et à des niveaux de l'homocystéine plasmatiques plus élevés, conférant un risque accru d'AFTNs. Les deux mutations peuvent expliquer 35 à 50 % de l'effet clinique de l'acide folique (Van der Put et al., 1998).

En résumé, les causes génétiques de cette hyperhomocystéinémie font actuellement l'objet de nombreuses investigations. Un grand nombre d'études épidémiologiques visent à établir une association entre les déterminants génétiques de l'homocystéine et les AFTNs. Selon les populations, les résultats de ces recherches indiquent des effets génétiques indépendants variables, des interactions de gènes et des associations gènes-vitamines en relation avec le risque de ces malformations.

V PHYSIOPATHOLOGIE DES AFTNS

V.1. DEFICIENCE EN FOLATES ET ALTERATION DE LA FERMETURE DU TUBE

NEURAL

Il est admis que l'acide folique a un effet direct sur le processus de neurulation, car l'injection de cette vitamine, *in vitro*, dans les embryons de souris génétiquement prédisposés a normalisé la fermeture du tube neural. La manière dont le folate intervient particulièrement dans la fermeture du tube neural a reçu peu d'attention comparativement aux centaines de publications sur les aspects cliniques et épidémiologiques de la supplémentation en acide folique (Copp et al., 2013).

Il existe différentes voies du métabolisme des folates dans les cellules de mammifères qui peuvent être importantes durant le processus de neurulation dans des cellules embryonnaires. Il existe, également, de nombreuses façons dont ces voies peuvent être perturbées ce qui pourrait entraîner la fermeture anormale du tube neural.

La **figure 16** représente les deux principales fonctions des folates, à savoir, la synthèse de l'ADN et sa méthylation. Ces deux processus sont négativement affectés par l'apport insuffisant des folates, le profil folate-coenzymes perturbé et / ou par des mutations génétiques dans ces voies. Bien que nous nous intéressons à l'étude du folate, son interaction avec les autres métabolites, la méthionine, la vitamine B12 et la vitamine B6 sont, également, évidentes pour le maintien d'un métabolisme normal.

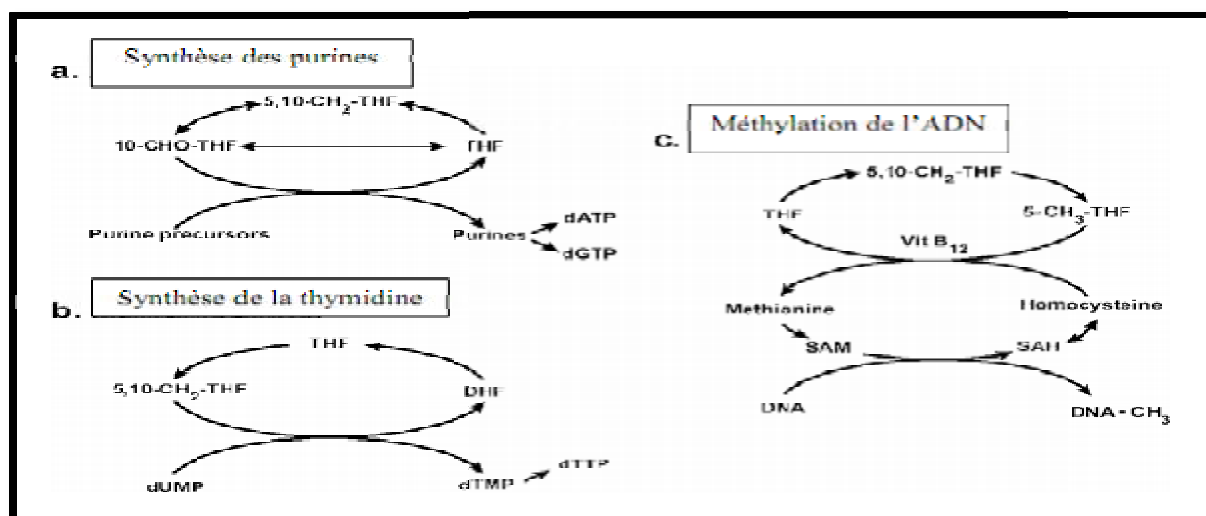


Figure 16 : Implication des folates dans plusieurs réactions métaboliques (Greene et al., 2011).

V.1.1. EFFET SUR LA SYNTHÈSE DES ACIDES NUCLEIQUES

Le rôle de l'acide folique, comme cofacteur dans la production des bases puriques et pyrimidiques, est primordial à la biosynthèse de l'ADN et, est impliqué dans la multiplication rapide des cellules jouant un rôle important dans la fermeture du tube neural en embryogénèse (Miner et al., 1997 ; Lynn et Jesse, 1999).

Barber et al. (1999) proposait l'hypothèse que si les cellules neuro-épithéliales épuisent leur approvisionnement interne en nucléotides, la réplication cellulaire sera ralentie et le développement des plis neuronaux sera retardé. Cette hypothèse a été soutenue par le modèle d'embryons de souris « Splotch » affectés par des AFTNs ; une déficience de la biosynthèse de la dTMP a été observée. Les embryons affectés ont été sauvés par la supplémentation en acide folique ou en thymidine (Fleming et Copp, 1998 ; Wlodarczyk et al., 2006). Cette découverte suggère que l'acide folique prévient la malformation du tube neural par la biosynthèse de thymidylate de novo. Dans ce modèle, au niveau cellulaire, la supplémentation en acide folique a un effet sur la prolifération, la différenciation et la formation des jonctions dans la neuro-sphère (Ichi et al., 2012).

La perturbation de la biosynthèse du thymidylate a été également observée dans un modèle de souris avec « *exencephaly* », conséquence d'une fonction nulle du gène SHMT (responsable de cette voie) et d'une alimentation maternelle déficiente en folates (Beaudin et al., 2011, 2012).

En fait, le 5,10-méthylène-THF, substrat de cette réaction est responsable de la méthylation du dUMP en dTMP. La réaction représente la seule source de synthèse de thymidine et est l'étape limitant la vitesse de la synthèse d'ADN chez les mammifères (Choi et Mason, 2002).

Par ailleurs, la déficience en folates entraîne l'accumulation du dUMP par défaut de sa méthylation (Fenech, 2012). Cette accumulation du dUMP dans la cellule au détriment du dTMP cause son incorporation par erreur dans l'ADN au cours de sa synthèse « mis-incorporation d'uraciles » (Achon et al., 2009). Cette dernière crée ainsi des cassures des brins d'ADN provoquant une instabilité de celui-ci et augmentant le taux des mutations (Liu et Ward, 2010). Ce phénomène a été observé dans des échantillons de sang et des tissus de rongeurs et d'humains déficients en folates (Duthie et al., 2002 ; Choi et al., 2004 ; Liu et Ward, 2010 ; Knock et al., 2011).

De même, la synthèse de purine altérée restreint la capacité de la cellule à synthétiser et à réparer l'ADN. Dans le modèle de souris knock-out homozygotes mutés pour le gène MTHFD1, la synthèse des purines a été altérée et la fermeture du tube neural était anormale, les embryons sont morts prématurément. Par contre, aucune AFTN n'a été observée chez les souris hétérozygotes (Christensen et al., 2013).

V.1.2. EFFET SUR LA METHYLATION

L'acide folique joue un rôle de donneur de radicaux méthyles dans le cycle de la méthylation qui convertit l'Hcy en Met. Cette dernière est utilisée pour la synthèse des protéines ainsi que pour celle de la SAM, donneur universel des groupements méthyles régulant l'expression des gènes (Wagner, 2010) (**Figure 16**).

En effet, la méthylation de l'ADN est reprogrammée au cours de l'embryogenèse précoce et, est un élément de la régulation épigénétique affectant les cytosines des îlots CpG déterminant, ainsi, la régulation de l'expression de gènes cibles (Reik et al., 2001 ; Dean et al., 2005).

Plusieurs arguments supportent l'implication de la méthylation dans l'étiologie des AFTNs :

Dans une étude de Pogribny et al. (2008), la déficience de l'acide folique chez le rat modifie l'expression de 33 gènes intervenant notamment dans le développement du système nerveux.

D'autre part, la culture d'embryons de rats dans des milieux contenant de faibles concentrations de la méthionine a entraîné une hypométhylation des protéines qui fonctionnaient spécialement dans le tube neural, les embryons montrent un défaut dans l'élévation des bords latéraux de la plaque neurale. Ce qui laisse supposer une altération dans l'action des micro-filaments ; la méthylation des protéines de contraction dans les cellules de l'épithélium neural est une étape importante dans le processus de fermeture du tube neural (Coelho et Klein, 1990 ; Moephuli et al., 1997). Dans les mutants de souris Axd et Amt, par contre, les doses élevées de méthionine administrées pendant l'embryogenèse ont réduit l'incidence des AFTNs (Essien et Wannberg, 1993 ; Narisawa et al., 2012).

Afman et al. (2005) ont observé un retard dans la fermeture du tube neural chez des embryons de poulet traités avec des inhibiteurs du cycle de méthylation. Dunlevy et al.

(2006a,b), de leur part, ont perturbé le cycle de méthylation chez des embryons de souris pendant la période de neurulation crânienne. Le résultat est une augmentation de la prévalence des AFTNs sans retard de croissance ou du développement.

Les mécanismes moléculaires par lesquels la méthylation interfère avec la neurulation peuvent être expliqués par l'inactivation des méthyltransférases. Okano et al. (1999) ont observé que l'inactivation de la méthyltransférase de l'ADN « DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 beta (DNMT3B) » chez la souris a provoqué plusieurs défauts au cours du développement embryonnaire incluant les AFTNs.

De plus, la déficience en folates se traduit fréquemment par une réduction de la concentration cellulaire et/ou circulante de la méthionine et donc de la SAM, et par conséquent, une augmentation de la concentration de la SAH. Le ratio SAM/SAH sanguin est ainsi diminué (Guerra-Shinohara et al., 2004). La diminution de ce ratio pourrait avoir un impact sur la méthylation de l'ADN car la SAH est un puissant inhibiteur de la plupart des méthyltransférases (Finkelstein et al., 2007) (**Figure 16**).

Chez l'homme, des études ont examiné le statut de méthylation de l'ADN en relation avec les AFTNs. Des diminutions aussi bien du ratio AdoMet / AdoHcy que de la méthylation de l'ADN ont été observées dans un cas ayant une trisomie 21 et un *spina bifida* dans l'étude d' Al-Gazali et al. (2001). Zhao et al. (2006), aussi, ont rapporté que pour les mères d'enfants atteints, le ratio AdoMet / AdoHcy était bas.

Récemment, l'altération de la méthylation globale de l'ADN, de la méthylation d'histones ou le remodelage de la chromatine, qui sont des déterminants importants de l'expression génique, ont été associés aux AFTNs lors de la déficience en précurseurs de méthyles (Greene et al., 2011 ; Chang et al., 2011).

D'après l'ensemble de ces données, la supplémentation en acide folique peut prévenir les AFTNs à travers le maintien d'un processus de méthylation normale (Blom et al., 2006).

V.2. AUGMENTATION DE L'HOMOCYSTEINE ET ALTERATION DE LA FERMETURE DU TUBE NEURAL

V.2.1. EMBRYO-TOXICITE

L'Hcy en elle-même peut être embryo-toxique pendant le processus de neurulation (Steegers-Theunissen et al., 1994). En effet, dans un modèle animal, l'exposition des embryons de poussins à des taux élevés d'Hcy a montré que 27% des cas avaient une AFTN suggérant un effet tératogène direct de l'homocystéine sur le développement embryonnaire (Afman et al., 2003; Ueland et Vollset, 2004). Ces auteurs supposent que le mécanisme biologique de la toxicité de l'Hcy est basé sur ses propriétés cytotoxiques, les cellules affectées sont particulièrement celles de la crête neurale.

Une autre hypothèse a été émise, l'homocystéine pouvait induire les AFTNs en agissant comme un antagoniste d'un récepteur, N-méthyl-D-aspartate receptor (NMDAR) qui est capable de réguler plusieurs fonctions potentiellement pertinentes, y compris la mort cellulaire programmée (Lipton et al., 1997). En effet, une étude sur des embryons aviaires avec des anomalies du tube neural induites par l'HHcy a été réalisée, les embryons avaient des duplications fréquentes de la notocorde ou de la moelle épinière, ou des deux, et il semble y avoir une hyper abondance de cellules (Rosenquist et al., 1996). L'hypothèse a été, par la suite, renforcée par le fait que l'administration des agonistes du NMDAR avec l'homocystéine ont été en mesure de sauver le phénotype normal (Rosenquist et al., 1999).

V.2.2. ALTERATION METABOLIQUE

L'hyperhomocystéinémie cause une demande accrue du 5-MTHF par la méthionine synthase et, de ce fait, réduirait le taux de 5,10-méthylène THF, un substrat pour la production du dTMP. De plus, le détournement de la sérine, qui est indispensable pour la synthèse du 5,10-méthylène THF, vers la voie de trans-sulfuration pour catalyser l'Hcy limiterait également sa synthèse (Fell et Selhub, 1990).

Des taux élevés de l'homocystéine pourraient agir d'une manière secondaire sur l'augmentation des niveaux de la SAH dans la cellule, réaction réversible avec une thermodynamique qui favorise la synthèse de la SAH plutôt que son hydrolyse (Finkelstein, 1990) (**Figure 17**).

Enfin, un autre mécanisme pouvant expliquer l'implication de l'Hcy dans la survenue des AFTNs est le fait qu'elle peut être convertie en Hcy-thiolactone par la méthionyl-ARNt synthétase. Mécanisme qui empêche l'incorporation de l'Hcy dans les protéines au cours de la traduction. Cependant, l'Hcy-thiolactone est un acide aminé réactif; il peut provoquer une homocystéinylation des protéines à des résidus de lysine, perturbant ainsi leur fonction (Massaro et Rogers, 2002) (Figure 17).

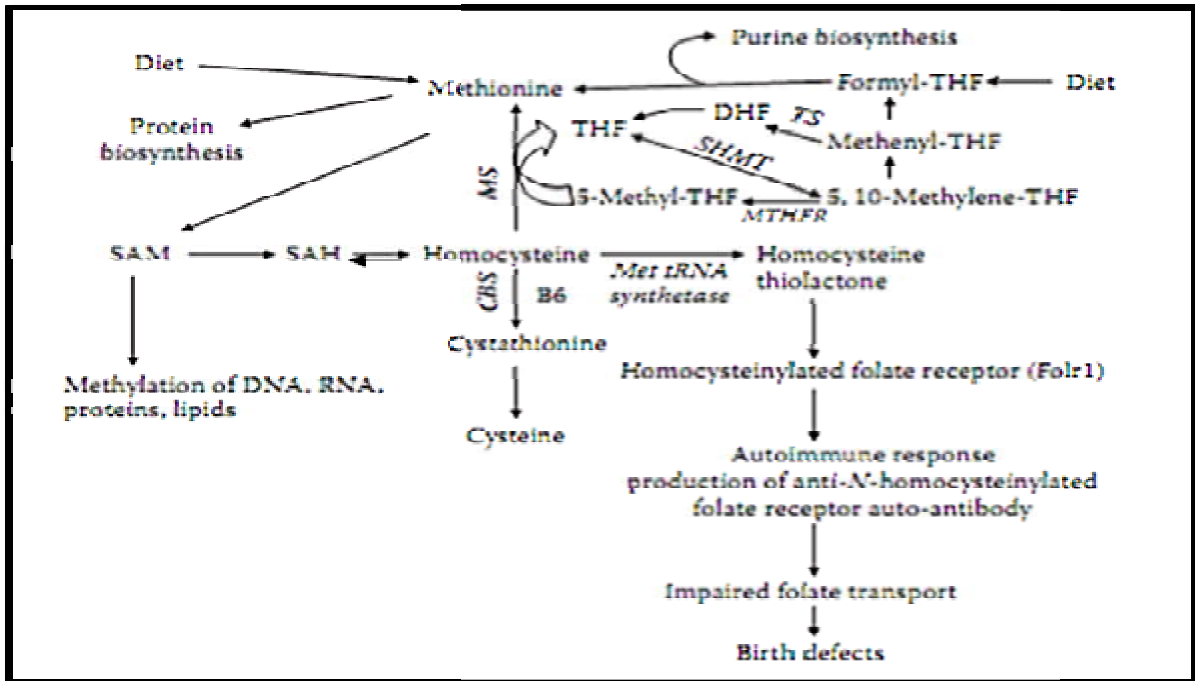


Figure 17: Perturbation du métabolisme de l'homocystéine (Massaro et Rogers, 2002).

PATIENTS ET METHODES

I POPULATIONS D'ETUDE

Ce travail concerne une étude transversale de type cas-témoins. Cette dernière a porté sur trois populations admises au niveau des services de néonatalogie et de la maternité du Centre Hospitalier Universitaire de Constantine (CHUC) et de l'Hôpital de Ouargla. Les deux établissements se situent dans la région Est de l'Algérie.

La première population comporte 48 nouveaux nés, ayant une anomalie de fermeture du tube neural quelque soit son type. Seuls les enfants ayant une AFTN syndromique ont été exclus de l'étude.

La deuxième population consiste en 38 mères à risque d'âge moyen de $29,96 \pm 6,22$. Ce sont des mères suite de couche ayant eu un enfant atteint d'une AFTN. Les critères d'exclusion pour ces mères sont la présence des pathologies (épilepsie, maladies cardiovasculaires, diabète, HTA), la prise de traitements médicamenteux ou encore l'utilisation d'antagonistes de l'acide folique connus pour interférer avec le métabolisme des folates et augmenter le taux d'Hcy. En effet, ceci pourrait gêner l'interprétation des résultats.

En outre, l'utilisation des suppléments vitaminiques trois mois avant la période du prélèvement est aussi un critère que nous avons considéré.

La troisième population est une population témoin représentée par 67 femmes dont l'âge moyen est de $29,78 \pm 6,59$. Ce sont des femmes en bonne santé, qui ont déjà accouché sans jamais avoir eu d'enfants atteints d'AFTN. L'âge, le niveau socioéconomique et les critères d'exclusion pour les témoins sont les mêmes que ceux des mères à risque.

Pour l'ensemble des individus, les prélèvements sanguins ont été effectués au niveau des services d'hospitalisation concernés. Par ailleurs, un recueil de données a été effectué, il consiste en une étude du dossier médical des enfants et en un interrogatoire auprès des mères. **(Annexe 1)**

II PRELEVEMENTS SANGUINS

Les prélèvements de sang ont été recueillis:

Pour le dosage des folates : les prélèvements doivent être fait à jeun et conservés à l'abri de la lumière.

Pour le folate sérique : il est nécessaire d'obtenir du sérum par prélèvement de 5 ml du sang sur tube sec et après centrifugation à 4000 tours/min pendant 10 minutes. De bonnes conditions de conservation sont indispensables pour l'obtention de résultats fiables. Si le sérum n'est pas dosé dans les 8 heures, il faut l'aliqoter et le congeler à -20°C afin d'assurer une stabilité pendant 6 à 8 semaines. Les sérums hémolysés ne conviennent pas aux dosages.

Pour le folate érythrocytaire : il est nécessaire d'obtenir du sang total frais recueilli sur un tube EDTA traité par l'acide ascorbique (puissant agent antioxydant permettant la lyse des globules rouges). Après récupération de l'échantillon, l'hématocrite du patient devra être connu pour transcrire les résultats obtenus dans le sang total en résultats d'acide folique érythrocytaires. Les cellules du sang total sont lysées en diluant l'échantillon au 1/21 dans une solution d'acide ascorbique à 1% fraîchement préparée à chaque utilisation. L'hémolysât est ensuite vortexé et laissé 90 minutes à température ambiante ($+15^{\circ}\text{C}/+28^{\circ}\text{C}$) à l'obscurité. L'hémolysât peut être conservé jusqu'à 3 heures à $+2^{\circ}\text{C}/+8^{\circ}\text{C}$ ou congelé 2 semaines à -20°C .

Pour le dosage de l'Hcy : les prélèvements se font à jeun sur des tubes EDTA. Les échantillons doivent être conservés dans la glace entre le moment du prélèvement et la centrifugation qui se fait à 4000 tr / min pendant 8 min, le plasma obtenu est congelé à -20°C . Il est important de séparer le plasma des cellules dès que possible après le prélèvement, car la synthèse de l'Hcy peut avoir lieu dans les hématies.

Pour la recherche des mutations : des prélèvements sanguins en quantité de 6 à 10 ml sont réalisés sur des tubes vacuténaires K3EDTA qui est un chélateur ou un inhibiteur de l'action des enzymes Dnase ou nucléase et ce, pour que l'ADN reste intacte et ne se casse pas (le prélèvement ne se fait pas sur héparine car c'est un inhibiteur de la *Taq* polymérase).

III ANALYSES BIOCHIMIQUES

Les concentrations des métabolites folates/homocystéine ont été déterminées pour les mères d'enfants atteints d'AFTN et pour les témoins.

III.1. DOSAGE DES FOLATES

III.1.1. PRINCIPE

C'est un immunodosage par compétition. Le test en chimiluminescence utilise un principe de compétition en phase liquide avec un ligand marqué et une immobilisation *in situ* avec une protéine porteuse. La révélation s'effectue au moyen d'un anti ligand marqué par de la phosphatase alcaline. Les échantillons à doser doivent subir une ébullition préalable.

L'acide folique de l'échantillon entre en compétition avec l'analogue de l'acide folique marqué par le ligand vis-à-vis d'une quantité limitée d'une protéine porteuse de l'acide folique.

Cette protéine porteuse est capturée par l'anticorps fixé à la surface de la bille.

III.1.2. DOSAGE (IMMULITE 2000)

Le dosage quantitatif de l'acide folique se fait dans le sérum et dans les globules rouges.

Les taux circulants d'acide folique sont fortement influencés par les ingestions récentes, ainsi, les taux d'acide folique mesurés dans le sérum peuvent être normaux lors d'une carence en acide folique. Il est ainsi important de déterminer les taux des folates dans les globules rouges même si les dosages sériques ont été réalisés. De plus, afin d'obtenir un résultat érythrocytaire précis, il est important de connaître également le taux sérique d'acide folique du patient.

• Préparation de la solution de travail

Les échantillons qui vont être testés en acide folique doivent être prétraités par une solution préparée quotidiennement. Si elle n'est pas utilisée immédiatement, elle peut être conservée à +2°C/ +8°C pendant 24 heures au plus.

Solution	µl/ test
Solution borate / tampon KCN	1000
Folate marqué par un ligand	20
Solution de dithiothréitol	20

• **Préparations des échantillons**

200 µl de chaque ajusteur, contrôle et échantillon de patient, sérum ou hémolysât, est mélangé à 1000 µl de la solution de travail. Les tubes non hermétiquement fermés sont placés dans un bain d'eau chaude à ébullition (100°C) pendant 15 à 20 minutes, ensuite ils sont refroidis dans un bain d'eau à température ambiante pendant 5 minutes. 350 µl de l'échantillon ainsi préparé est mise dans une unité Echantillon IMMULITE.

III.1.3. CALCUL

Le résultat R en nano grammes par millilitre (ng / ml) d'hémolysât est multiplié par le facteur de dilution 21 afin d'obtenir la concentration en acide folique dans le sang total (en ng / ml). Pour obtenir la concentration d'acide folique dans les globules rouges :

$$21R \times (100/H) \text{ (H : hématoците en pourcentage)}$$

Pour plus de précision la concentration sérique d'acide folique doit être soustraite de la concentration en acide folique du sang total et on obtient :

$$\text{La concentration d'acide folique érythrocytaire : } 21R - (S \times (100-H)/100) \times (100/H)$$

• **Valeurs de références**

Acide folique sérique	3-17 ng/ml (6-39 nmol/l)
Acide folique dans le sang total	43-295 ng/ml (97-668 nmol/l)
Acide folique dans les globules rouges	93-641 ng/ml (212-1453 nmol/l)

III.2. DOSAGE DE L'HOMOCYSTEINE

III.2.1. PRINCIPE

C'est un immunodosage par compétition. Le test inclut une étape préliminaire manuelle de prétraitement des échantillons. L'Hcy des échantillons plasmatiques est séparée des protéines de liaison et convertit en SAH après incubation de 30 minutes à 37°C en dehors du système et en présence de SAHH et de di-thio-threitol (DTT).

L'échantillon prétraité et l'anticorps anti SAH marqué à la phosphatase alcaline sont introduits simultanément dans l'unité test qui contient une bille de polystyrène recouverte de SAH. Pendant une incubation de 30 minutes, le SAH provenant de l'échantillon prétraité entre en compétition avec la SAH fixé pour se lier à l'anticorps anti-SAH marqué à la phosphatase alcaline.

III.2.2. DOSAGE (IMMULITE 2000)

- *Préparation de la solution de travail*

La solution est préparée quotidiennement. Elle doit être utilisée dans les 2 heures suivant la préparation. Un volume suffisant de la solution B de prétraitement (DDT dans un tampon) est dilué au 1/10 dans l'eau distillée avant de l'ajouter à la solution A de prétraitement (SAHH bovine dans un tampon). Les deux solutions A et B (diluées) sont mélangées à volume égal. Les quantités doivent être suffisantes pour le nombre de tests à réaliser.

- *Préparations des échantillons*

- Pour les contrôles et échantillons de patients

15 µl de chaque contrôle et échantillon de patient (plasma) est ajoutée à 300µl de la solution de travail. Les tubes fermés et mélangés sont placés dans un bain-marie à 37°C pendant 30 minutes, ensuite ils sont transférés dans les unités Echantillon IMMULITE.

- Pour les ajusteurs

20 µl de chacun des ajusteurs (SAH synthétique dans une matrice protéine/tampon) est ajoutée à 400µl de la solution de travail. Les autres étapes sont les mêmes. Les échantillons

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

- *Valeurs de références*

Le test IMMULITE 2000 Homocystéine présente un domaine de référence de 5 – 15µmol/l.

IV ANALYSES GENETIQUES

IV.1. EXTRACTION ET DOSAGE DE L'ADN GENOMIQUE DU SANG

IV.1.1. PRINCIPE

Les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN, pour pouvoir les isoler, le sang doit être initialement mélangé à une solution hypotonique pour permettre la lyse des globules rouges. Après récupération des leucocytes, ces derniers vont être traités par un mélange représenté par un détergeant Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) et la protéinase K et ce, dans le but de dégrader tout ce qui est protéine. L'ADN nucléaire est libéré dans le milieu et les protéines qui lui sont associés sont éliminées par précipitation au NaCl. Le surnageant ainsi récupéré est traité par l'éthanol dans lequel une pelote d'ADN se forme par précipitation.

IV.1.2. TECHNIQUE

- *La lyse des globules rouges et la préparation des leucocytes*
 - Dans un tube Falcon de 50 ml ; le sang total complété à 50 ml avec du TE 20 :5 mis et laissé 10 min dans la glace puis centrifugé pendant 10 min à 3800 tour/min. (TE 20 :5 : tris 20 mM mélangés à l'EDTA 5mM, complété avec l'eau distillée jusqu'à 1000 ml à pH = 7,5).
 - Le surnageant est ensuite déversé.
 - Le TE 20 :5 est ajouté jusqu'à 30 µL au culot, le tout est agité et laissé 10 min dans la glace puis centrifugé dans les mêmes conditions précédentes.
 - Ensuite le surnageant est encore une fois déversé pour obtenir du culot de leucocytes.
 - Enfin du TE 10 :1 est ajouté et le culot est conservé à (-20°C) dans le congélateur. (TE 10 :1 :10 mM de tris mélangés à 1mM d'EDTA à pH = 7,5)

- ***Extraction de l'ADN***

- Les leucocytes sont décongelés puis centrifugés pendant 10 minutes à 4000 tour/min et le culot de leucocytes est repris dans un tube Falcon de 15 ml.
- Au culot leucocytaire sont ajoutés 3 ml de tampon de lyse (Tris 1M mélangé à l'EDTA 0,5 M, complété jusqu'à 100 ml d'eau à pH = 8,2). Ensuite 200 µL de SDS à 10%, puis 100 µL de protéinase K (10 mg / ml).
- Le tube, sur une roue, est ensuite agité à 37°C pendant une nuit.
- Le lendemain ; il est refroidi dans la glace, auquel l'on rajoute du NaCl 4M. Le tout est agité rigoureusement à la main.
- Le surnageant, après centrifugation, est repris dans un tube Falcon de 15 ml où il faut ajouter 2 fois son volume d'éthanol absolu préalablement refroidi. Par retournement, la pelote d'ADN se forme. Si elle n'apparaît pas, on laisse 30 min à -20°C.
- La pelote d'ADN est récupérée avec une pipette pasteur et rincée en deux reprises dans l'éthanol à 70%.
- Enfin la pelote est mise dans un tube Nunc.

- ***Solubilisation***

Selon la grosseur de la pelote et la concentration souhaitée, l'on ajoute entre 300 et 1000 µl de TE10:1 et on laisse le tube nunc durant une nuit sur un agitateur rotateur à 37°C puis à température ambiante jusqu'à dissolution complète (1 à 2 jours).

IV.1.3. DOSAGE ET PURIFICATION

La concentration des ADN extraits est estimée par la mesure de l'absorbance à 260 nm. Sachant qu'une unité de DO à 260 nm est équivalente à 50 µg /ml d'ADN, il est possible d'évaluer la quantité d'ADN d'un échantillon par la formule : facteur de dilution x 50 x DO₂₆₀. Par ailleurs, la qualité de l'ADN est évaluée par un rapport de DO 260/DO 280; un ADN de bonne qualité, dépourvu de contamination par les protéines ou par l'ARN, doit présenter un rapport compris entre 1,6 et 2.

La pureté de l'ADN est essentielle pour une action efficace des enzymes de restriction utilisées par la suite. Dans le cas où l'ADN est contaminé, un bon résultat est à écarter dans les étapes suivantes de son analyse par PCR. Il est donc indispensable de procéder par la

réextraction de la pelote de l'ADN afin d'obtenir la pureté souhaitée. Les échantillons d'ADN purs sont conservés à + 4°C jusqu'à utilisation.

IV.2. PRINCIPE DE LA RECHERCHE DES MUTATIONS PAR LA TECHNIQUE PCR/RFLP

- ***Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase chain reaction PCR)***

La réaction de polymérisation en chaîne permet l'obtention d'un très grand nombre de copies d'un segment particulier d'ADN. Le principe de cette technique consiste à utiliser deux amorces, courtes séquences d'ADN (18-24 nucléotides), qui s'hybrident à des sites complémentaires situés en orientation inversée sur les deux brins de l'ADN qui encadrent la région que l'on veut amplifier. L'élongation des brins complémentaires à partir des amorces est assurée par une enzyme *Taq* polymérase (source *Thermus aquaticus*).

La réaction de PCR repose sur trois étapes : la dénaturation de l'ADN qui conduit à la séparation des brins d'ADN, l'hybridation des amorces et l'élongation des brins d'ADN.

- ***Etude du polymorphisme de longueur de fragments de restriction (Restriction fragment length polymorphism RFLP)***

Le RFLP reflète une différence (un polymorphisme) au niveau d'un site particulier de reconnaissance d'une enzyme de restriction donnée. Cette variabilité se manifeste par la présence ou l'absence de celui-ci, ce qui se traduit par un polymorphisme des longueurs des fragments de restriction. Après digestion enzymatique, les fragments de restrictions sont soumis à une électrophorèse sur gel qui permet leur séparation en fonction de leur taille. Après migration, les fragments sont révélés par l'utilisation du bromure d'éthidium (BET) fluorescent aux rayons ultraviolets.

IV.3. GENOTYPAGE DES POLYMORPHISMES RFC G80A, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G ET CBS 844INS68

IV.3.1. AMPLIFICATION DE L'ADN

L'ADN cible de chaque gène est amplifié par PCR dans un thermocycler. Pour l'ensemble des polymorphismes et pour chaque tube de réaction sont mélangés :

- ü 5 µl d'un tampon de réaction 10X
- ü 2,5 mM du mix des 4 dNTPs (2 mM pour l'amplification des fragments contenant les polymorphismes G80A du gène RFC et C677T du gène de la MTHFR)
- ü 25 mM de MgCl₂ (50 mM pour l'amplification des fragments contenant le polymorphisme A2756G du gène MTR)
- ü les amorces de concentration spécifique pour chaque fragment à amplifier d'un polymorphisme donné (**Tableau 01**)
- ü l'enzyme *Taq* polymérase de concentration spécifique pour chaque fragment à amplifier d'un polymorphisme donné (**Tableau 01**)
- ü eau pour 50 µl du volume total
- ü La quantité d'ADN était fonction du polymorphisme recherché (1 à 2 µl)

Notons que pour le polymorphisme A66G du gène MTRR le tampon de réaction contenait du MgCl₂, l'eau pour 25 µl du volume total et la quantité d'ADN était de 2,5 µl.

Tableau 01 : Amorces et conditions d'amplification

Polymorphisme (Taille fragment à amplifier)	Séquences des amorces	Concentration amorces	Concentration <i>Taq</i>
G80A <i>rs1051266</i> (230 pb)	5' AGT GTC ACC TTC GTC CCC TC3' 5' CTC CCG CGT GAA GTT CTT 3' Chango et al. (2000)	1mM	4U
C677T <i>rs1801131</i> (198 pb)	5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA 3' 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG 3' Frosst et al. (1995)	0.032 pmole/μl	2.5 U
A1298C <i>rs1801133</i> (163 pb)	5'CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC3' 5' CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG3' Van der Put et al. (1998)	40 ng	2U
A2756G <i>rs1805087</i> (189 pb)	5'CATGGAAGAATATGAAGATATTAGAC3' 5'GAACTAGAAGACAGAAATTCTCTA3' Morrison et al. (1998)	7 pmole/μl	1.2U
A66G <i>rs1801394</i> (150 pb)	5' CAGGCAAAGGCCATCGCAGAAGACAT3' 5' CACTTCCCAACCAAAATTCTTCAAAG 3' Relton et al. (2004b)	20μM	5U
CBS 844ins68 (184 pb sans ins 252 pb avec ins)	5'CTG GCC TTG AGC CCT GAA3' 5' GGC CGG GCT CTG GAC CTC3' Morrison et al. (1998)	10 pmole/μl	4U

pb : paires de bases, ins : insertion

Une fois le mix préparé, la PCR se déroulera en plusieurs phases.

Tableau 02 : Programmes d'amplification par PCR

		POLYMORPHISME					
		G80A	C677T	A1298C	A2756G	A66G	CBSins68
PHASE	Dénaturation initiale						
	T°- Temps	94°C-2min	94°C - 5min	94 °C- 12min	95°C-2min	95°C-5min	95°C-2min
	Nombre Cycles	45	30	30	35	45	30
	Dénaturation						
	T°- Temps	94°C-30s	94°C - 30s	94 °C-30s	94°C-40s	94°C-20s	94°C-30s
	Hybridation						
T °- Temps	58°C-30s	65°C- 30s	56 °C-30s	50°C-40s	58°C-40s	62°C-25s	
Elongation							
T °- Temps	72°C-45s	72°C -40s	72°C-30s	72°C-1min	72°C-20s	72°C-25s	
Elongation finale							
T °- Temps	72°C-7min	72°C- 10min	72°C-3 min	72°C- 10min	72°C-3	72°C-5min	

IV.3.2. CONTROLE DES PRODUITS DE PCR

Pour le contrôle de la taille des fragments amplifiés, un dépôt de 10 µl du produit de PCR et de 2 µl de bleu de Bromophénol (BBP) a été effectué sur un gel d'agarose à 1,5 % additionné de 10 µl de BET. La migration est réalisée à 90-120 volts pendant une heure.

IV.3.3. DIGESTION ENZYMATIQUE

Pour chaque polymorphisme l'ADN amplifié est digéré dans une réaction contenant un tampon 10X, l'enzyme de restriction et l'eau. Les particularités de cette étape pour chaque polymorphisme sont résumées dans le tableau 03 :

Tableau 03 : Conditions et résultats de la digestion

Polymorphisme (Effet)	Enzyme de restriction (quantité)	T°	Temps	Tailles des fragments en pb après digestion	
G80A (Abolition d'un site de restriction)	<i>HhaI</i> (10u/ µl)	37°C	4h	Homozygote sauvage GG	125-68- 37 NV
				Homozygote muté AA	162-68
				Hétérozygote AG	162-125-68-37 NV
C677T (Création d'un site de restriction)	<i>Hinf I</i> (10u/µl)	37°C	une nuit	Homozygote sauvage CC	198
				Homozygote muté TT	175- 23NV
				Hétérozygote CT	198-175-23 NV
A1298C (Abolition d'un site de restriction)	<i>MboII</i> (5u/µl)	37°C	4h	Homozygote sauvage AA	56-31-30-28 NV -18 NV
				Homozygote muté CC	84-31-30-18 NV
				Hétérozygote AC	84-56-31-30-28 NV-18NV
A2756G (Création d'un site de restriction)	<i>HaeIII</i> (10u/µl)	37°C	4h	Homozygote sauvage AA	189
				Homozygote muté GG	159- 30 NV
				Hétérozygote AG	189-159-30 NV
A66G (Création d'un site de restriction)	<i>AflIII</i> (10u/ µl)	37°C	1h	Homozygote sauvage AA	150
				Homozygote muté GG	123- 27 NV
				Hétérozygote AG	150-123-27 NV

NV: Bande non visible sur le gel d'électrophorèse utilisé, T° : Température, pb : paires de bases, *Hha I* : source *Haemophilus haemolyticus*, *Hinf I* : source *Haemophilus influenzae*, *MboII* : source *Moraxella bovis*, *HaeIII* : source *Haemophilus aegyptius*, *AflIII* : source *Anabaena flos-aquae*

Seule la recherche du polymorphisme CBSins68 n'a pas nécessité une étape de restriction puisqu'il s'agit d'une insertion.

IV.3.4. MIGRATION DES FRAGMENTS DE RESTRICTION

Les fragments d'ADN digérés par l'enzyme de restriction sont séparés par électrophorèse sur un gel additionné de 10 µl de BET et coulé sur une plaque de la cuve horizontale. 10 µl du produit de la digestion sont mélangés à 3 µl de BBP et déposés dans les puits du gel. Dans chaque gel on dépose également un marqueur de taille (ref-GEPMQR01-26). La migration est réalisée de 80 à 100 volts pendant une heure dans un tampon 1X.

IV.3.5. PROFILS ELECTROPHORETIQUES

Polymorphisme G80A

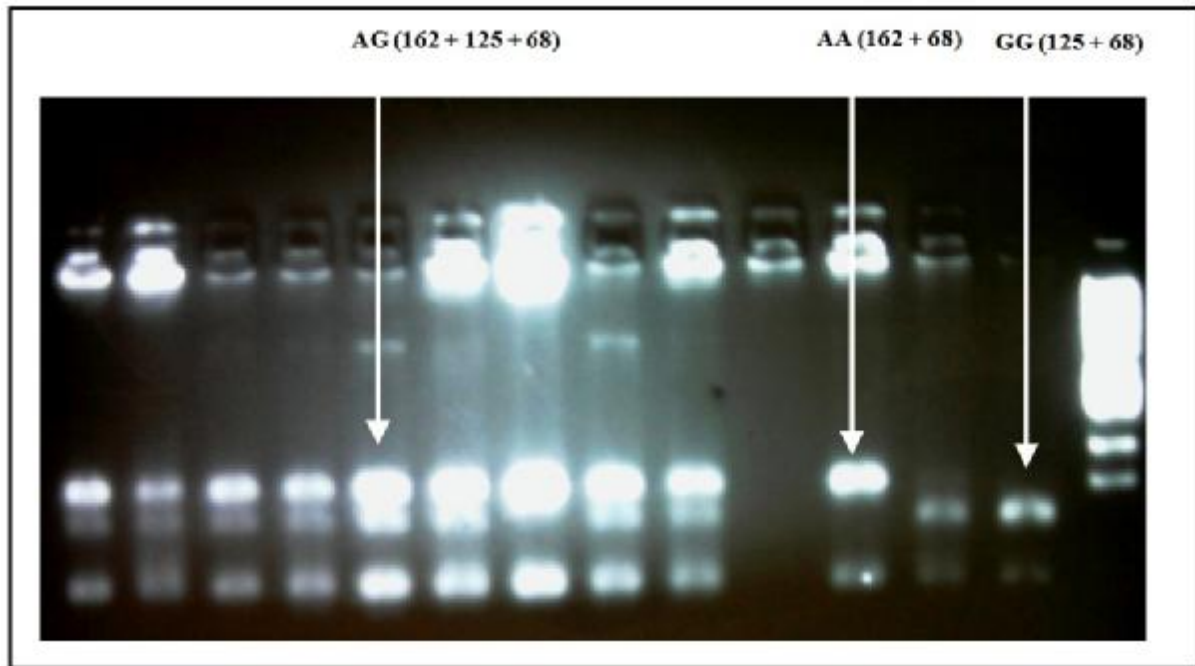


Figure 18 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 4% des fragments présentant différents génotypes du polymorphisme G80A.

Polymorphisme C677T

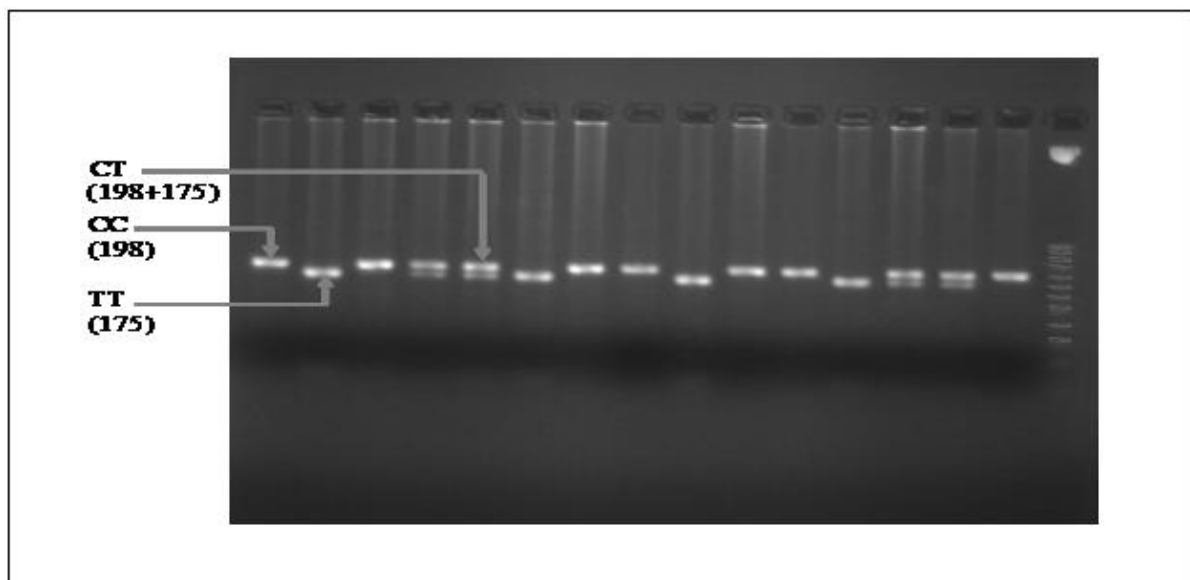


Figure 19: Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 3% des fragments présentant différents génotypes du polymorphisme C677T.

Polymorphisme A1298C

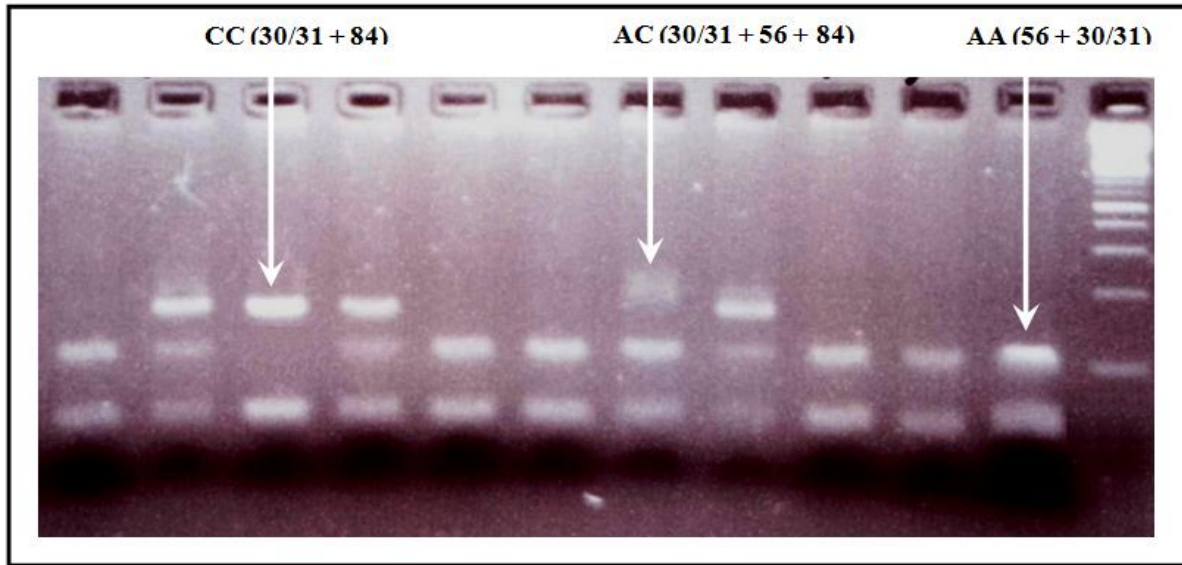


Figure 20: Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 3%/ Nusieve 1% des fragments présentant différents génotypes du polymorphisme A1298C.

Polymorphisme A2756G

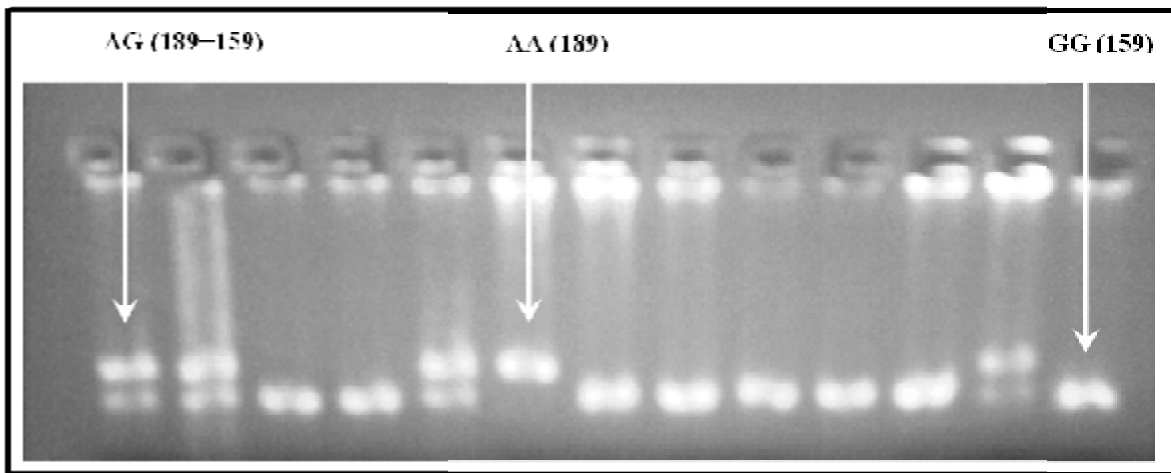


Figure 21: Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 3% des fragments présentant différents génotypes du polymorphisme A2756G.

Polymorphisme A66G

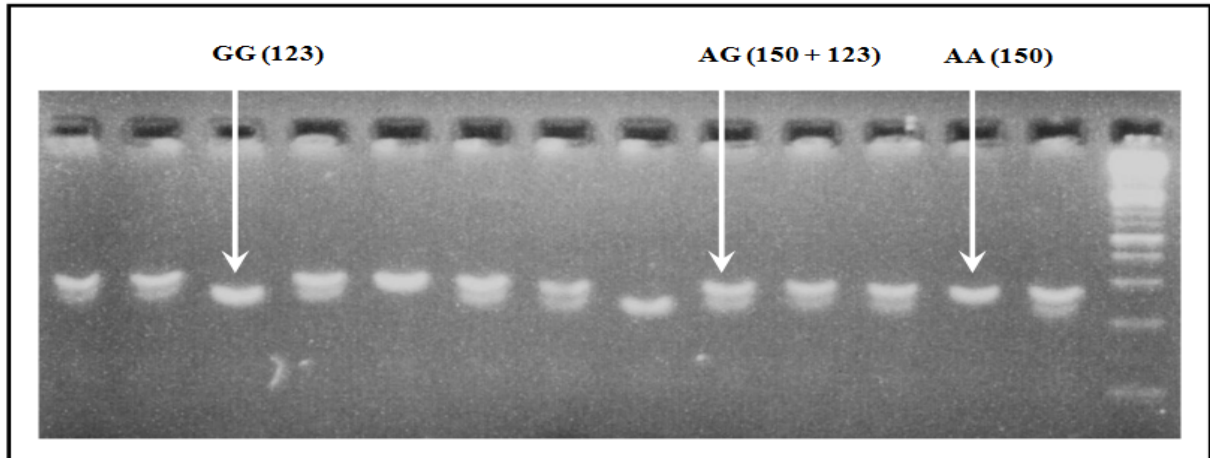


Figure 22 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 3% des fragments présentant différents génotypes du polymorphisme A66G.

Polymorphisme CBS 844ins 68

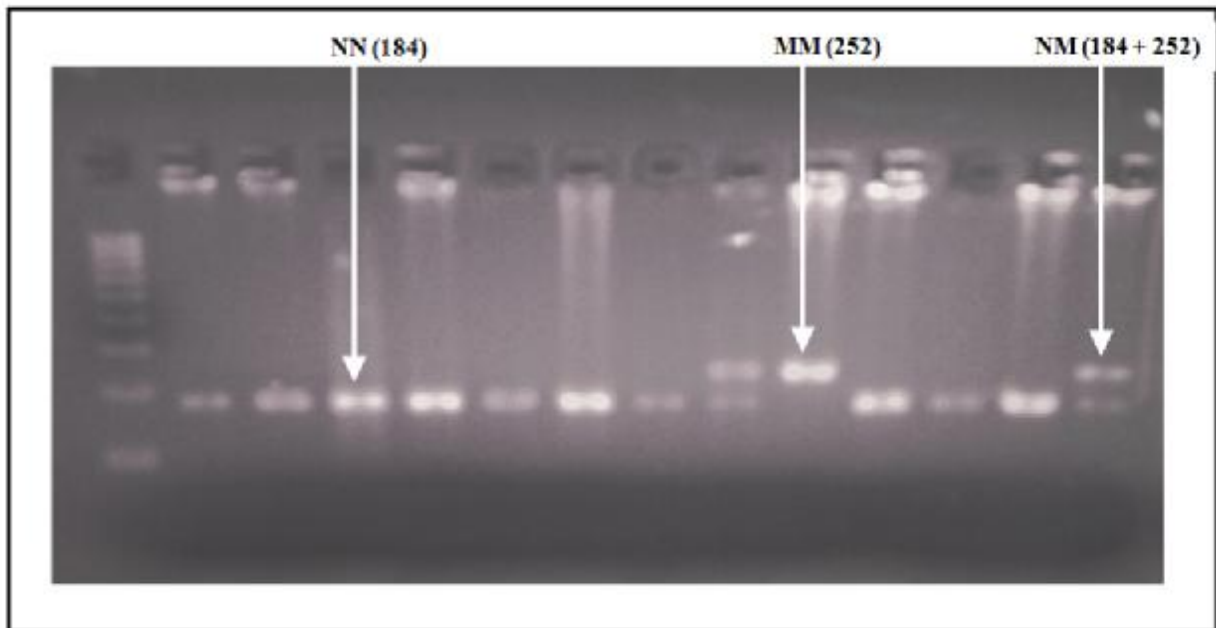


Figure 23 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 3% des fragments présentant différents génotypes du polymorphisme 844ins68.

V ANALYSES STATISTIQUES

Les variables qualitatives sont exprimées sous forme de nombre de cas et de pourcentages et les variables continues sous forme de moyenne \pm écart-type ou des centiles.

Pour la comparaison des concentrations moyennes des folates et de l'homocystéine des deux groupes, nous avons utilisé l'analyse des variances (Anova) en cas de distribution normale. Dans le cas des variances différentes, objectivées grâce au test d'homogénéité des variances de Bartlett, nous avons utilisé le test non paramétrique de Mann-Whitney.

L'*odds ratio* (son intervalle de confiance CI à 95%) exprime le degré de dépendance entre les variables, il permet de mesurer l'effet d'un facteur. Il a été calculé dans notre étude :

- ü Pour évaluer le risque lié aux différentes variables folates et homocystéine.
- ü Pour estimer le risque de la maladie lié aux mutations.

Le seuil critique a priori est de 0,05. Si la valeur de p calculée est inférieure à ce seuil, il existe une relation logique entre les variables et, la différence entre les paramètres des malades et des témoins est déclarée statistiquement significative.

Les résultats statistiques de tous les échantillons obtenus ainsi que tous les paramètres considérés ont été réalisés par le logiciel Epi info version 6,0.

RESULTATS ET DISCUSSION

I CARACTERISTIQUES DES POPULATIONS D’ETUDE

I.1. PATIENTS

Un ensemble de 48 enfants atteints d’AFTN non-syndromique ont été diagnostiqués à la naissance par un neurochirurgien, chez lesquels nous avons réalisé une étude génétique en recherchant les mutations dans les gènes susceptibles d’intervenir dans le métabolisme des folates et de l’homocystéine.

Pour chaque enfant les caractéristiques générales ont été relevées : le sexe, le type de malformation ainsi que les malformations associées (**Tableau 04**).

Tableau 04: Caractéristiques générales des enfants avec AFTN

Variables		Patients N= 48 n (%)
Sexe	Masculin	25 (52,08)
	Féminin	23 (47,92)
Formes cliniques	Spina Bifida	43 (89,58)
	Encephalocèle	5 (10,42)
Malformations associées	Hydrocéphalie	8 (16,67)
	Hydrocéphalie et Paraplégie des membres inférieurs	11 (22,92)
	Paraplégie des membres inférieurs	5 (10,42)
	Arnold Chiari II	3 (6,25)
	Malformations des pieds	5(10,42)
	Total	32 (66,68)

La répartition des sujets selon le sexe montre que, les AFTNs affectent avec des fréquences proches, aussi bien les garçons que les filles. Un résultat similaire a été rapporté dans la population Marocaine par Radouani et al. (2015). Contrairement, une prédominance du sexe féminin est observée par Houcher et al. (2008) dans la région de Sétif en Algérie.

Les enfants, de notre population d’étude, possèdent les formes *Spina bifida* (myéломéningocèle ou méningocèle) et encéphalocèle. Nous n’avons pas retenu les cas d’anencéphalies car ils meurent tous, soit à la naissance soit *in utero*.

La grande majorité des patients ont présenté la forme *spina bifida* (89,58 %). Seuls, cinq enfants ont un encéphalocèle. *Spina bifida* est l'anomalie la plus fréquente aussi bien dans la présente étude que dans la plupart des travaux de la littérature (Rankin et al., 2000 ; Safdar et al., 2007 ; Dey et al., 2010).

L'atteinte motrice (paraplégie des membres inférieurs) et/ou la présence des malformations secondaires (l'hydrocéphalie et les malformations des pieds) est observée chez 32 enfants soit 66.66 % des cas. Cette constatation concorde bien avec les données de la littérature où la déficience neurologique résultant du *spina bifida* conduit généralement à des troubles moteurs et sensitifs affectant les membres inférieurs. De plus, le *spina bifida* est fréquemment accompagné d'autres anomalies cliniquement significatives du système nerveux central, essentiellement l'hydrocéphalie qui est souvent associée à la malformation d'Arnold-Chiari II. Une association des encéphalocèle et l'hydrocéphalie est également notée (Copp et al., 2013).

I.2. MÈRES A RISQUE

Pour chacune des mères, ont été révélées les caractéristiques cliniques suivantes: la consanguinité, le nombre d'avortements et la présence ou non d'antécédents (**Tableau 05**).

Tableau 05 : Caractéristiques cliniques des mères ayant des enfants atteints

Caractéristiques	Mères N= 38 n(%)	
Cansanguinité	0	
Avortements	11(28,94%)	
Antécédents Personnels et/ou Familiaux (ATCD P/F)	ATCD P 2(5,26%)	2 enfants atteints (1 ^{er} degré) 1 enfant atteint (1 ^{er} degré)
	ATCD P et F 1(2,63%)	un enfant et une sœur atteints (1 ^{er} degré)
	ATCD F 3(7,89%)	Frère atteint (1 ^{er} degré) Cousin atteint (3 ^{ème} degré)
		Apparenté lointin atteint
TOTAL	6 (15,79%)	

Aucun cas de mariage consanguin n'a été observé chez ces mères (**Tableau 05**), ce qui est en accord avec les résultats. Selon Zaoui et Biemont (2002), le mariage entre cousins germains du premier degré présente une faible fréquence en Algérie ; il ne représente que 10 à 16% seulement. Par ailleurs, Salih et al. (2014) en Arabie Saoudite n'ont pas rapporté un risque lié à la consanguinité.

Dans notre groupe de mères, le pourcentage de femmes ayant eu un ou plusieurs avortements spontanés était de 28,94 %. Ce constat confirme ce qui a été rapporté par Creasy et Alberman (1976) où des fréquences très élevées de fœtus avec AFTN ont été sujets de fausses couches. Il importe de savoir que parmi ces mères à risque, la moitié était hyperhomocysteinémique.

Dans notre cohorte 15,78% avaient des antécédents personnels ou familiaux pour la malformation, suggérant ainsi une forme génétique. Ce résultat concorde avec ce qui a été rapporté par Safi et al. (2012), où 15% des malformations congénitales sont d'origine génétique. Deux femmes, avaient des antécédents personnels (l'une ayant déjà deux enfants avec AFTN et la deuxième un enfant), une femme ayant une histoire personnelle et une histoire familiale de la malformation et trois autres ayant des antécédents familiaux (dont une a fait en plus quatre avortements ultérieurs) (**Tableau 05**). Ainsi, un risque de récurrence est observé dans la fratrie et chez les apparentés. Selon la littérature, après la naissance d'un enfant atteint, le risque de récurrence a été estimé entre 2 à 5%, et dans la fratrie de 5 à 10 fois plus que celui de la population générale (Copp et al., 2010). En fait, ces fréquences de récurrence s'adaptent plus à une hérédité multifactorielle, plutôt qu'à un mode dominant ou récessif avec pénétrance réduite (Harris et Juriloff, 2007).

II ANALYSE DU STATUT FOLIQUE CHEZ LES MERES A RISQUE

Cette partie de notre étude, menée sur des mères algériennes ayant des grossesses affectées par des AFTNs, a permis de fournir des données sur leur statut folique. Elle vise à évaluer l'ampleur de l'abaissement des taux des folates et/ou l'augmentation du taux de l'homocystéine chez des femmes à risque en âge de procréer.

Le taux de folate érythrocytaire est l'indicateur principal de ce statut, étant stable, il n'est pas influencé par les ingestions alimentaires récentes et représente la forme de réserve de l'organisme (Gibson, 2005). En revanche, le folate sérique (Shane, 2010) et l'homocystéine plasmatique (Ueland et Rozen, 2005) sont également des paramètres qui représentent le statut du folate.

Une analyse comparative des paramètres biochimiques a été réalisée entre les mères d'enfants atteints et les témoins.

II.1. COMPARAISON DES TAUX DES FOLATES ET DE L'HOMOCYSTEINE ENTRE LES MERES ET LES TEMOINS

II.1.1. COMPARAISON DES MOYENNES DES FOLATES ET DE L'HOMOCYSTEINE

Le tableau ci-après montre la différence des moyennes des folates et de l'homocystéine entre les mères et les témoins.

Les moyennes des folates sérique et érythrocytaire chez les mères sont dans les normes physiologiques. Elles ne diffèrent pas de celles des témoins ($p > 0,05$), bien qu'elles soient plus faibles (**Tableau 06**).

La comparaison des moyennes de l'homocystéine montre qu'elle était significativement élevée ($p = 0,006$) chez les mères des enfants atteints. L'hyperhomocystéinémie (taux supérieure à $15 \mu\text{mol/l}$) est observée chez 26,31% des mères à risque contre 5,97% retrouvé chez les témoins. Elle a augmenté presque de 6 fois le risque d'avoir un enfant atteint ($p = 0,003$). (**Tableau 06**).

Tableau 06 : Comparaison des moyennes des folates et de l’homocystéine entre les mères ayant un enfant atteint d’AFTN et les témoins

Métabolite	Mères	Contrôles	P value
Folate sérique (ng/ml)	9,39 ± 6,03	11,08 ± 6,77	NS
Folate érythrocytaire (ng/ml)	367,28 ± 212,20	496,34 ± 352,30	NS
Homocystéine (µmol/l)	14,00±10,88	7,75±4,58	P=0,006
Hhcy ≥ 15 n mères/n témoins (%)	10/38 (26,31)	4/67(5,97)	p= 0,003

Hhcy ≥ 15 µmol/l OR 5,63 (1,45-23,58), NS: non significatif

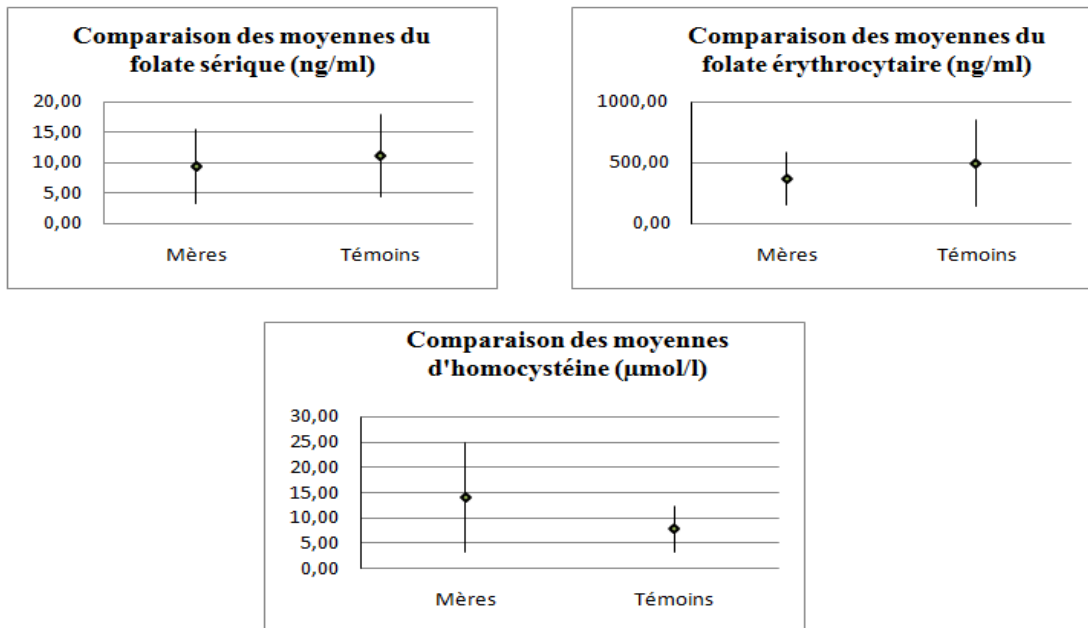


Figure 24: Représentation graphique de la comparaison des moyennes des folates et de l’homocystéine entre les mères ayant un enfant atteint d’AFTN et les témoins

II.1.2. COMPARAISON DES TAUX DES FOLATES ET DE L’HOMOCYSTEINE PAR PERCENTILES

Pour une meilleure précision par rapport à la comparaison des moyennes, nous avons opté pour une approche percentile.

Le tableau 07 présente une comparaison des taux des folates sériques et érythrocytaires ainsi que de l’homocystéine aux 10^{ème}, 25^{ème}, 50^{ème}, 75^{ème} et 90^{ème} percentiles entre les mères et les témoins.

Nous avons divisé les niveaux des folates érythrocytaires, sériques et de l'homocystéine en cinq groupes ou percentiles ensuite, les valeurs trouvées à chaque limite d'intervalle pour les mères et les témoins ont été comparées.

Nous avons observé que les taux des folates aux différents percentiles chez les mères à risque sont inférieurs à ceux des témoins montrant que le statut folique reste faible. Concernant l'homocystéine, les taux sont plus élevés aux 10^{ème}, 25^{ème}, 50^{ème}, 75^{ème} et 90^{ème} percentiles chez les mères confirmant ainsi le résultat de la comparaison des moyennes (Tableau 07).

Tableau 07 : Répartition des taux des folates sérique et érythrocytaire et de l'homocystéine par percentiles chez les mères et chez le groupe témoin

Percentiles		10	25	50	75	90
Folate sérique (ng/ml)	Mères	2,98	5,1	6,9	12,6	21,7
	Témoins	4,25	6,1	8,65	15,6	24
Folate érythrocytaire (ng/ml)	Mères	111,23	190,58	295,36	562,12	728
	Témoins	179,21	228,95	395,2	635,12	1149,68
Homocystéine (µmol/l)	Mères	4,53	6,45	10,49	15,91	36,06
	Témoins	4,1	4,63	6,44	9,77	14,59

II.2. ETUDE DE L'EVOLUTION DU RISQUE D'APPARITION DES AFTNS EN RELATION AVEC LES NIVEAUX DES FOLATES ET DE L'HOMOCYSTEINE

Le tableau 08 comporte l'évolution du risque d'apparition de la malformation en relation avec les niveaux des folates et de l'homocystéine.

Nous avons classé les taux des folates sériques, érythrocytaires et de l'homocystéine des témoins par quartiles et, nous avons répartie les mères et les témoins selon leur appartenance à ces intervalles afin de calculer le risque à chaque classe. L'utilisation des quartiles et non pas les percentiles dans ce cas a pour objectif, d'avoir un nombre d'individus plus élevé dans chaque intervalle. Le quartile le plus élevé des folates est utilisé comme classe de référence pour le calcul des ORs et les intervalles de confiance. Tandis que pour l'homocystéine, nous avons utilisé le quartile le plus bas comme référence.

L'estimation du risque par rapport aux différents taux des folates nous a permis de noter que les Odds ratio présentent des valeurs qui augmentent en passant du quartile supérieur (taux des folates élevés) au quartile inférieur (taux des folates bas) ; ils sont égaux à 1,33, 1,78 et 1,93 pour le folate sérique et 1,25, 1,63 et 2,17 pour le folate érythrocytaire, respectivement. La diminution de la concentration des folates a conduit à l'augmentation du risque, bien que statistiquement l'effet n'est pas significatif (**Tableau 08**).

Par contre, les valeurs des Odds ratio pour l'homocystéine augmentent du quartile inférieur (taux de l'hcy bas) au quartile supérieur (taux de l'hcy élevés), ce dernier a montré une augmentation de six fois le risque ($p < 0,01$) chez les mères d'enfants atteints (**Tableau 08**).

Tableau 08 : Odds ratio représentant le risque d'avoir un enfant atteint chez les mères associé aux quartiles des folates sérique et érythrocytaire et de l'homocystéine des témoins

Métabolite		Q1 (bas)	Q2	Q3	Q4 (élevé)
Folate sérique (ng/ml)	Intervalle	2,6-6,1	6,1-8,65	8,65-15,6	15,6-24
	n mères /n témoins	13/18	10/15	09/18	06/16
	OR(CI 95%)	1,93 (0,51-7,42)	1,78 (0,44-7,33)	1,33 (0,33-5,46)	1 (Référence)
Folate érythrocytaire (ng/ml)	Intervalle	104,32-228,96	228,95-395,3	395,2-635,12	635,12-1468,9
	n mères/n témoins	13/16	11/18	08/17	06/16
	OR(CI 95%)	2,17 (0,57-8,48)	1,63 (0,42-6,44)	1,25 (0,3-5,31)	1 (Référence)
Homocystéine (µmol/l)	Intervalle	3,27-4,64	4,63-6,45	6,44-9,77	9,77-24
	n mères/n témoins	04/18	06/16	06/15	22/16
	OR(CI 95%)	1 (Référence)	1,69 (0,33-8,91)	1,80 (0,35-9,59)	6,19** (1,54-26,88)

** $P < 0.01$; n, nombre ; Q, quartile ; OR, Odds Ratio.

II.3. FOLATES ET AFTNS

Une absence d'un taux bas des folates par rapport aux normes physiologiques chez les mères dans notre population montre qu'une déficience nutritionnelle ne représente pas un facteur de risque indépendant pour ces malformations, notre résultat est cohérent avec plusieurs études entre autres celles citées dans le (**tableau 01 en annexe**) (Groenen et al., 2004 ; Ratan et al., 2008). En effet, selon ces études il n'y avait pas de différences significatives des taux des folates par rapport aux témoins, les dosages des folates bien qu'inférieurs à ceux des mères d'enfants normaux, demeurent dans l'intervalle des valeurs normales. Dans la littérature, les travaux qui ont pu rapporter un taux de folates déficient chez les mères sont généralement issus de populations dont le régime alimentaire est pauvre en folate. Parmi ces études, celle de Gu et al. (2012) réalisée dans la région de Xinjiang en Chine se caractérisant par un long hiver et un climat sec et par conséquent, par une alimentation pauvre en légumes et fruits frais, sources majeures des folates. Le même constat a été rapporté par des études effectuées sur des populations de race blanche principalement non végétariennes et dont la déficience en folates était un déterminant majeur du risque de ces malformations (Centers for Disease Control, 2004; Beaudin et Stover, 2007).

Par ailleurs, un niveau de folate normal ne reflète pas un taux suffisant pour la prévention des AFTNs. Les chercheurs ont établi une relation dose-réponse continue entre les folates et le risque de survenue des AFTNs. Daly et al. (1995) ont montré que les femmes avec un folate érythrocytaire entre 0-150 ng/ml présentaient un risque plus élevé par rapport aux femmes à folate érythrocytaire de 200-299 ng/ml. Le risque, pour ces dernières, est élevé par rapport à celles avec un taux supérieur à 400 ng/ml, il passe de 6,6 à 2,3 à 0,8 cas par 1000 naissances. Ceci prouve qu'il ya une relation inverse entre le taux des folates et le risque d'AFTN. Ce constat a été également supporté récemment par Crider et al. (2014).

Les résultats de notre étude concordent bien; les Odds ratios présentent des valeurs qui s'abaissent en passant du quartile inférieur (taux des folates bas) au quartile supérieur (taux des folates élevés) (**Tableau 08**).

En 2015, et sur la base des résultats des études de Daly et al. (1995) et Crider et al. (2014), l'organisation mondiale de la santé a recommandé une concentration de folate érythrocytaire de 400 ng/ml (906 nmol/l) nécessaire pour la prévention des AFTNs (Li et al., 2016).

Or, deux tiers de notre population de mères (65.78%) présentent des concentrations basales de folate érythrocytaire inférieures à la valeur acceptée comme la concentration optimale de folate afin de minimiser l'incidence des AFTNs (400ng/ml). Par ailleurs, les taux des folates chez les mères à risque de notre population aux différents percentiles restent inférieurs comparés à ceux des témoins, même en absence de significativité statistique qui est peut être due à la taille de l'échantillon (**Tableau 07**). De ce fait, nous ne pouvons pas exclure l'intervention des folates dans la survenue des AFTNs dans notre population, le statut folique chez les mères à risque est probablement insuffisant.

Des concentrations optimales des folates sanguins sont nécessaires et doivent être définies et adoptées comme référence pour l'évaluation des besoins (Crider et al., 2014)

D'autre part, bien que les premières associations entre les AFTNs et l'acide folique ont été observées chez des femmes présentant des carences en folates, il a été aussi constaté que la supplémentation par l'acide folique réduit le plus souvent la survenue de ces malformations en l'absence de déficit de folate. (Molloy et al., 1985 ; Kirke et al., 1993), Ces études soulignent que chez ces femmes, le problème est plus complexe qu'un simple déficit nutritionnel, l'effet protecteur de l'acide folique pourrait donc être la correction de besoins accrus par prédisposition génétique (Stegers-Theunissen et al., 1994; Mills et al., 1995 ; Castro et al., 2004)

II.4. HOMOCYSTEINE ET AFTNS

Nous avons trouvé que les niveaux d'Hcy aux différents percentiles (**Tableau 07**), ainsi que la moyenne et la fréquence des mères à risque ayant une hyperhomocystéinémie étaient significativement élevées (**Tableau 06**). Nos résultats concordent avec ceux observés dans la littérature (Felkner et al., 2009 ; Godbole et al., 2011 ; Gu et al., 2012) et confirment que, l'homocystéine représente un facteur de risque important dans notre population.

L'augmentation de l'homocystéine peut refléter une dérégulation de son métabolisme. Ce dernier est responsable de la production des groupements et des molécules indispensables à la synthèse et à la régulation de l'ADN, de l'ARNm et des protéines indispensables en embryogénèse. En effet, dans l'étude de Wang et al. (2010), les auteurs ont trouvé que les mères des sujets avec AFTN avaient un taux bas de vitamine B12 et un taux de

l'homocystéine élevé reflétant un défaut dans ces voies métaboliques, corrélé à un phénomène d'hypométhylation chez leurs enfants. Le niveau de méthylation de l'ADN génomique LINE-1 était significativement bas dans le tissu nerveux de ces sujets. Les auteurs ont suggéré qu'une amélioration du statut nutritionnel des femmes au cours de la grossesse peut prévenir ces malformations, éventuellement par le don de groupements méthyles importants pour le développement embryonnaire.

L'hyperhomocystéinémie observée chez 26,31 % des mères de notre échantillon peut expliquer sa cytotoxicité. En effet, les résultats obtenus par Afman et al. (2003) et Ueland et Vollset (2004) sur un modèle animal expliquerait ce qui se produit chez l'homme. Leurs études portant sur l'exposition des embryons du poussin à des taux élevés d'Hcy ont montré que 27 % des cas avaient une AFTN et ont suggéré un effet tératogène direct de l'homocystéine sur le développement embryonnaire. Felkner et al. (2009) ont montré que l'hyperhomocystéinémie chez les femmes enceintes peut inhiber la fermeture du tube neural, et, est considérée comme principal facteur de risque pour les AFTNs.

II.5. CORRELATIONS FOLATES /HOMOCYSTEINE ET AFTNS

Les coefficients de corrélations ont été calculés entre les différents niveaux des folates et entre ces derniers et les taux de l'homocystéine.

Le taux sérique de folate est corrélé au taux érythrocytaire pour l'ensemble des mères et des témoins ($r=0,543$, $p<0,01$). Il est inversement relié à l'homocystéinémie ($r= -0,428$, $p<0,01$). De même, le taux de folate érythrocytaire est inversement corrélé au taux de l'homocystéine ($r= -0,311$, $p=0,01$). (**Figure 25**)

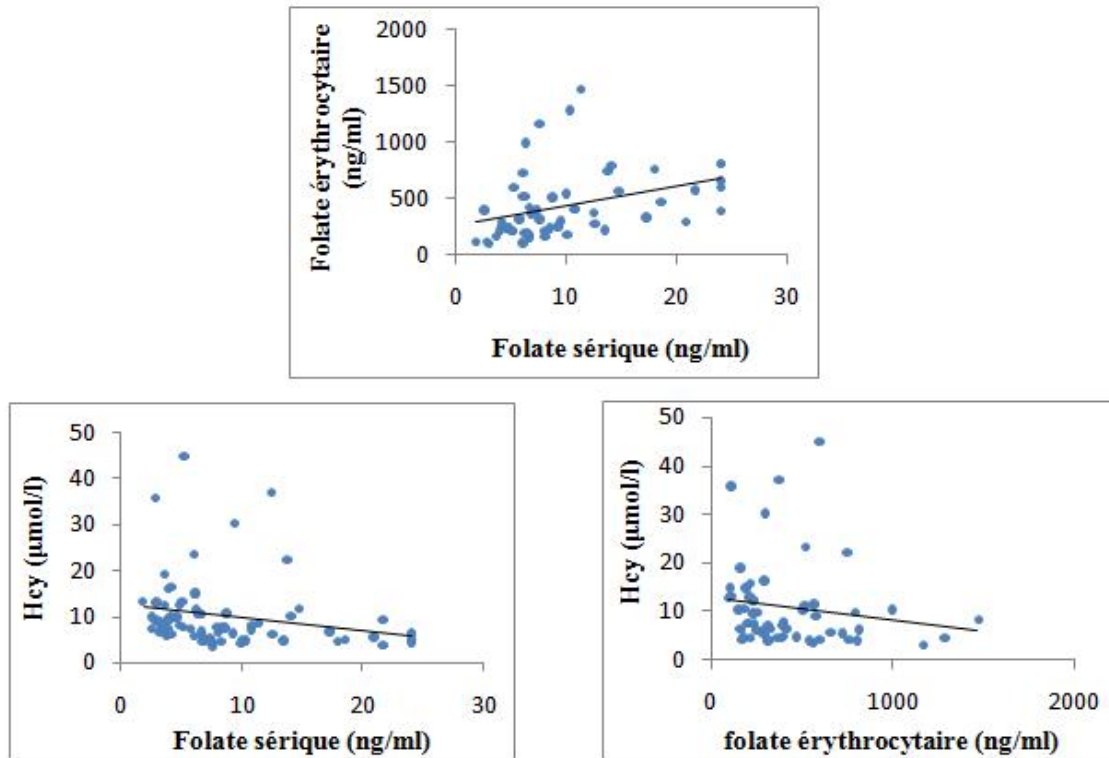


Figure 25 : Corrélations entre les taux des folates sérique et érythrocytaire, folate sérique et homocystéine et folate érythrocytaire et homocystéine

La corrélation inverse entre les taux des folates et les niveaux de l'homocystéine plasmatique observée dans notre étude et dans de nombreuses autres (Felkner et al., 2009 ; Gu et al., 2012) reflète la relation étroite existante entre le statut en folates et le métabolisme de l'homocystéine. L'apport alimentaire en folates ainsi que l'activité des enzymes dépendantes des folates déterminent le déroulement du métabolisme de l'homocystéine. Dans notre cas, les folates ne représentent pas un facteur de risque indépendant, le plus probable est que les facteurs génétiques innés sont responsables du changement du profil folate-coenzymes des cellules, affectant le statut en Hcy. Le taux des folates que nous avons observé chez nos mères, peut aussi influencer l'effet des gènes, car les polymorphismes des enzymes du cycle des folates conditionnent les besoins nutritionnels relatifs de la population concernée. Notre hypothèse est également soutenue par les données rapportées par Steegers-Theunissen et al. (1994).

III ANALYSE GENETIQUE

III.1. POLYMORPHISME G80A DU GENE RFC

III.1.1. *ETUDE DE LA DISTRIBUTION DES FREQUENCES ALLELIQUES ET GENOTYPIQUES*

Le tableau 21 montre la prévalence de la mutation G80A du gène RFC.

L'ADNc du gène RFC a été séquencé en 2000 par Chango et ses collaborateurs et ils ont pu identifier ce polymorphisme commun dans la population générale, où une guanine (G) a été substituée en adénine (A) en position 80 de l'exon 2 du gène. Cependant, étant donné que les fréquences alléliques pour les deux allèles sont pratiquement identiques, certains chercheurs se sont appuyés sur le test de déséquilibre de la transmission et ont proposé l'allèle G comme responsable de l'augmentation du risque des malformations du tube neural. (DeMarco et al., 2003)

En se basant sur cette hypothèse, le tableau 10 montre le risque lié à ce variant G du polymorphisme G80A dans notre étude.

Dans notre population, les fréquences de l'allèle G sont égales à 0,41 en ce qui concerne les enfants atteints d'AFTNs, à 0,46 concernant les mères et à 0,49 pour les témoins (**Tableau 09**). Nous n'avons pas détecté d'association significative entre ce variant allélique G et la susceptibilité aux AFTNs aussi bien chez les mères que chez les enfants (**Tableau 10**).

Les fréquences génotypiques des enfants nous incitent à penser que le risque n'est pas lié aux génotypes AG et GG. L'OR pour l'hétérozygotie est égal à 1,22 (0,46-3,25), et 0,27 (0,05-1,33) pour l'homozygotie. De même pour les mères, l'OR estimé pour le génotype hétérozygote est de 1,14 (0,39-3,35), et 0,71 (0,17-2,93) pour le génotype homozygote. (**Tableau 10**)

Tableau 09 : Fréquences génotypiques et alléliques de la mutation G80A du gène RFC.

RFC G80A	% (n)				
	GG	AG	AA	G	A
Enfants atteints d'AFTN	6,25(3)	68,75(33)	25,00(12)	0,41	0,59
Mères d'enfants atteints	15,79(6)	60,53(23)	23,68(9)	0,46	0,54
Témoins	22,39(15)	53,73(36)	23,88(16)	0,49	0,51

Tableau 10 : Risque (Odds Ratio) d'AFTNs lié au variant G du polymorphisme G80A chez les enfants et les mères

	E n f a n t s		M è r e s	
	OR	95% CI	OR	95% CI
AA vs AG	1,22	(0,46-3,25)	1,14	(0,39-3,35)
AA vs GG	0,27	(0,05-1,33)	0,71	(0,17-2,93)
A vs G	0,70	(0,40-1,24)	0,88	(0,48-1,61)

Par ailleurs, une étude publiée par Relton et al. (2003) a démontré que c'est l'allèle A qui augmente le risque d'avoir un enfant atteint. En se basant sur cette hypothèse, nos résultats montrent une augmentation du risque associée au variant A de ce polymorphisme chez les enfants. Les OR sont de 4,58(1,10-22,03) pour l'hétérozygotie AG et 3,75(0,75-20,92) pour l'homozygotie AA avec des valeurs de p inférieures à 0,01 et égale à 0,06, respectivement (Tableau 11).

Tableau 11 : Risque (Odds Ratio) d'AFTNs lié au variant A du polymorphisme G80A chez les enfants et les mères

	E n f a n t s		M è r e s	
	OR	95% CI	OR	95% CI
GG vs AG	4,58	(1,10-22,03)**	1,6	(0,48-5,43)
GG vs AA	3,75	(0,75-20,92) ^a	1,41	(0,34-5,90)
G vs A	1,42	(1,81-2,50)	1,14	(0,62-2,08)

** : p<0,01, a :p=0,06

III.1.2. INFLUENCE DU POLYMORPHISME G80A SUR LE RISQUE D'AFTNs

Le transport du folate et son absorption par la cellule est d'une grande importance. Un défaut à ce niveau pourrait expliquer la façon dont la susceptibilité aux AFTNs peut être largement prévenue par sa supplémentation périconceptionnelle (Molloy, 2000). Ainsi, les récepteurs des folates ont fait l'objet de nombreux travaux de recherches en génétique moléculaire. Le transporteur du folate RFC est particulièrement important au cours du développement embryonnaire, il est fortement exprimé dans le sac de la vésicule viscérale, le placenta ainsi que le tube neural (Zohn et Sarkar, 2010). Il a même été trouvé qu'il joue un rôle dans la régulation épigénétique du développement de la crête neurale (origine du tube neural) (Li et al., 2011).

Plusieurs études ont été réalisées pour vérifier si ce polymorphisme était associé à un risque élevé d'AFTNs (**Tableau 02 en annexe**).

La présente étude représente la première investigation épidémiologique du gène de transport des folates RFC et du rôle du polymorphisme G80A dans la survenue des AFTNs dans la population algérienne.

Un total de huit études a été rapporté pour voir l'effet de ce polymorphisme à travers le monde. En Europe, une étude italienne a permis de constater que le variant 80G représente un facteur de risque significatif (De Marco et al., 2003), cependant, l'étude réalisée en Irlande par O'Leary et al.(2006) ne supporte pas le résultat de De Marco et al. (2003). De même, le risque indépendant lié à l'allèle G est déclaré comme non significatif par les études réalisées en Amérique (Shaw et al., 2002 ; Morin et al., 2003), cependant ils ont constaté que ce variant augmente le risque si le statut folique maternel est bas. En Chine, l'association entre le variant G et les malformations du tube neural a été observée aussi bien par Shang et al. (2008) que par Pei et al. (2009) mais pour ce dernier elle était abolie lorsqu'il ya une prise périconceptionnelle d'acide folique par les mères.

Les analyses menées lors de ce travail, conformément à celles de O'leary et al.(2006), ont montré que ce variant du polymorphisme ne s'est pas révélé associé à un risque de développement des AFTNs. Ce constat est valable pour les enfants atteints comme pour les mères. Vu la divergence entre les résultats des études, une méta-analyse a été menée par Wang et al. (2012), elle n'appuyait pas son association au risque de survenue de ces anomalies.

Le schéma d'hérédité multifactorielle des AFTNs peut en être une explication à ces conclusions négatives. En effet, les variants mutants des différents polymorphismes conservent un certain niveau de la fonction de la protéine et, indépendamment, n'ont pas un effet considérable. Comme le montrent les études suscitées, l'association de l'allèle G avec le bas statut folique, représente un facteur de risque.

Par ailleurs, l'étude de Relton et al. (2003) a révélé que l'allèle A présentait un risque significativement élevé pour le spina bifida occulta et l'anencéphalie chez les mères ayant le génotype homozygote AA. Nos résultats concordent avec ceux de Relton et son équipe car nous avons pu démontrer que les génotypes AG et AA augmentent le risque chez les enfants de notre population. D'autres travaux sont nécessaires pour confirmer ce résultat.

III.1.3. ETUDE DE L'IMPACT DU POLYMORPHISME G80A SUR LES TAUX DES FOLATES ET DE L'HOMOCYSTEINE

Selon les génotypes, les taux moyens des folates sérique et érythrocytaire ainsi que de l'homocystéine plasmatique ont été étudiés chez les mères. Les résultats nous ont montré qu'il n'y avait pas d'association significative entre les variants génotypiques et les taux des métabolites, bien que les chiffres semblent montrer une différence (**Tableau 12**).

Tableau 12 : Impact polymorphisme G80A du gène RFC sur les taux des folates et de l'homocystéine chez les mères des enfants atteints

	Mères des enfants atteints		
	Folate érythrocytaire (ng/ml)	Folate sérique (ng/ml)	Hcy (µmol/l)
RFC G 80 A			
GG	376,07±245,71	11,45±8,44	10,40±3,71
AG / AA	354,34±212,62	9,4±5,97	14,2±11,79
P	0,857	0,564	0,536

La relation entre le polymorphisme G80A et les métabolismes folates / homocystéine n'est pas claire et la discordance des résultats est rapportée par les études (Relton et al., 2004a ; Morin et al., 2003). Plusieurs chercheurs n'ont pu observer d'association significative du polymorphisme avec le taux de folate érythrocytaire (Vesela et al., 2005 ; Sukla et Raman, 2012) contrairement à Stanisławska-Sachadyn et al. (2009) qui ont trouvé que le polymorphisme est significativement associé avec un taux bas chez les femmes de génotype GG. En outre, le polymorphisme n'influence pas de manière significative la concentration de folate sérique (Devlin et al., 2006). En revanche, la plus large étude à ce jour (N> 10 000) a montré une diminution significative des niveaux de folate sérique chez les individus avec des génotypes comportant l'allèle A. La relation avec le niveau de folate érythrocytaire n'a pas été rapportée dans cette étude (Fredriksen et al., 2007). Nos résultats tendent vers les observations de cette dernière. En effet, le taux de folate sérique, même en absence de significativité, est plus bas chez les mères portant les génotype AG/AA comparé à celles portant le génotype GG.

En ce qui concerne le taux de l'homocystéine, conformément à nos résultats, Devlin et al. (2006) ont observé une absence de l'effet significatif du polymorphisme.

De ce qui précède, nous constatons que le polymorphisme G80A du gène RFC n'influence pas fortement les taux des métabolites, même dans les études qui ont rapporté une association, la significativité n'est pas toujours observée. Whestine et al. (2001), ont comparé les propriétés du transport des deux variantes de la protéine, et n'ont pas trouvé des changements fonctionnels majeurs. Quelques différences concernant l'affinité des cofacteurs des folates réduits au récepteur ont pu être observées. L'interaction de ce polymorphisme avec d'autres facteurs pouvant être responsable d'une perturbation métabolique et du fait de l'augmentation du risque. De plus, d'autres transporteurs de folate peuvent compenser l'activité réduite de la protéine RFC-1. Par conséquent, les variants mutés peuvent affecter le métabolisme des folates uniquement dans des circonstances spécifiques (Bailey, 2010).

Ce que nous pouvons conclure à travers les études faites sur les AFTNs est que l'augmentation du folate sérique maternel par l'alimentation ou par la consommation de suppléments pourrait palier à la réduction des cinétiques de transport qui résulte des variants mutants de la protéine.

III.2. POLYMORPHISMES C677T ET A1298C DU GENE DE LA MTHFR

III.2.1. POLYMORPHISME C677T DU GENE DE LA MTHFR

III.2.1.1. Etude de la distribution des fréquences alléliques et génotypiques

Afin d'évaluer la liaison des AFTNs au polymorphisme C677T du gène de la MTHFR, une comparaison de fréquences des mères et des enfants séparément avec celle des témoins a été effectuée. Les fréquences de l'allèle T du polymorphisme C677T sont égales à 0,38 et 0,33 chez les enfants atteints d'AFTN et les mères des enfants atteints, respectivement. Bien que les valeurs soient légèrement plus élevées chez les patients et les mères par rapport aux témoins (0,29), aucune différence significative dans la fréquence de cet allèle muté n'a été observée. La valeur du p est supérieure à 0,05 (**Tableau 13**).

Egalement, nous n'avons pas observé de différences significatives dans les fréquences génotypiques homozygotes ou hétérozygotes entre les cas et les témoins et entre les mères et les témoins ($p > 0,05$). Cependant, l'homozygotie de la mutation MTHFR 677TT reste plus élevée chez les cas atteints (14,58%) et chez les mères (13,16%) par rapport aux cas témoins (7,46%). Cet effet est plus remarquable chez les enfants dont l'Odds ratio est de 2,43 (0,58-10,51) par rapport aux homozygotes de type sauvage (CC) (**Tableau 14**).

Tableau 13 : Fréquences génotypiques et alléliques de la mutation C677T du gène de la MTHFR.

MTHFR C677T	% (n)				
	CC%(n)	CT	TT	C	T
Enfants atteints d'AFTN	39,58(19)	45,83(22)	14,58(7)	0,63	0,38
Mères d'enfants atteints	47,37(18)	39,47(15)	13,16(5)	0,67	0,33
Témoins	49,25(33)	43,28(29)	7,46 (5)	0,71	0,29

Tableau 14 : Risque (Odds Ratio) d'AFTNs lié au polymorphisme C677T chez les enfants et les mères

	E n f a n t s		M è r e s	
	OR	95% CI	OR	95%CI
CC vs CT	1,32	(0,55-3,14)	0.85	(0,37-2,41)
CC vs TT	2,43	(0,58-10,51)	1,83	(0,39-8,71)
C vs T	1,46	(0,81-2,65)	1,19	(0,62-2,29)

III.2.1.2. Influence du polymorphisme C677T sur le risque d'AFTNs

Les données de plusieurs études sur différents groupes ethniques ont abouti à des conclusions différentes sur le rôle de la mutation C677T du gène de la MTHFR en tant que facteur de risque des AFTNs.

Le **tableau 03 en annexe** comporte la synthèse de certains travaux se référant à un total de treize études sur les populations européennes, quatre autres concernant les populations asiatiques, un ensemble de sept études ayant comme sujet des populations américaines et, trois autres ont porté sur les populations africaines.

A travers ces études, nous avons pu constater que la mutation était associée à une augmentation significative du risque de survenue des AFTNs dans plusieurs populations européennes. Une fréquence élevée de l'allèle T est observée, chez les contrôles allant jusqu'à 52%, et chez les mères et les enfants allant jusqu'à 65% (Van der Put et al., 1995 ; Pietrzyk et al., 2003 ; Kirke, 2004 ; Relton et al., 2004b ; Grandone et al., 2006 ; Cyhan et al., 2008 ; Morales de Machin et al., 2015). Quelques études portant sur ces populations n'ont pas observé de risque significatif (Lucock et al., 2001 ; Candito et al., 2008 ; Behunova et al 2010 ; Aydin et al., 2016) alors que d'autres auteurs ont pu montrer un effet protecteur de la mutation (Guéant-Rodriguez et al., 2003 ; Doudney et al., 2009).

Les populations asiatiques quant à elles, montrent que la mutation représente un risque dans 50 % des études entreprises. Nous avons aussi constaté, que dans la population chinoise, le variant thermolabile C677T était lié à un risque accru de grossesse affectée par ces malformations selon l'étude réalisée par Liu et al. (2014) (non mentionnée dans le tableau par manque de données), contrairement à Shang et al. (2008) qui n'ont rapporté aucun effet, alors que Yu et al. (2014) ont montré dans leur étude que le génotype TT et l'allèle T diminuent significativement l'incidence des AFTNs.

Contrairement aux populations européennes, la majorité des études réalisées sur des populations américaines, quelque soit leur ethnie, n'ont pas conclu sur une corrélation significative entre cette mutation et le risque de développer ces anomalies. Deux études seulement, ont rapporté une élévation du risque. La première effectuée au Mexique (Munoz et al., 2007) et la deuxième concerne les Etats Unis d'Amérique (Johanning et al., 2000).

Aucune association significative n'a été rapportée chez les populations africaines aussi bien dans l'étude de Houcher et al. (2009) au nord, que celle de Ubbink et al. (1999) au sud. Dans notre cas, nous avons noté une légère élévation de la fréquence du génotype homozygote muté chez les mères et chez les enfants par rapport aux témoins, ce qui laisse supposer qu'elle peut participer à l'augmentation du risque de développement de ces anomalies dans notre population.

En Egypte, ni l'homozygotie, ni l'hétérozygotie, pour le polymorphisme C677T, n'est considérée comme un facteur de risque pour l'ensemble des AFTNs. Cependant, il a été rapporté qu'elles pourraient constituer un risque pour le spina bifida aperta (Abdel-Aleem et al., 2006).

Les méta-analyses récentes réalisées sur ce polymorphisme ont confirmé que les génotypes TT et CT, chez la mère ou chez l'enfant, augmentent la susceptibilité aux AFTNs (Carter et al., 2011 ; Yan et al., 2012 ; Yadav et al., 2015 ; Yang et al., 2015). Le risque lié au génotype TT était représenté par des Odds ratio de 1,4 à 1,9 pour l'enfant et de 1,6 à 2,0 pour la mère selon ces études. Cependant, Comme nous le constatons, la mutation ne représentait pas un facteur de risque majeur dans certaines populations. D'un autre côté, un effet protecteur a été observé dans d'autres populations. En fait, il s'agit d'une grande hétérogénéité des résultats dont les chercheurs l'ont attribué aux variations ethniques des populations (Amorim et al., 2007), aux types d'AFTNs (Volcik et al., 2003), aux interactions avec d'autres

variantes génétiques (Relton et al., 2004b), en plus des facteurs environnementaux (Volcik et al., 2003).

III.2.2. POLYMORPHISME A1298C DU GENE DE LA MTHFR

III.2.2.1. Etude de la distribution des fréquences alléliques et génotypiques

Concernant la susceptibilité aux AFTNs liée au polymorphisme A1298C, nous avons trouvé des fréquences de l'allèle muté C égales à 0,24, 0,20 et 0,16 chez les enfants atteints, les mères et les témoins, respectivement. Nous n'avons pas observé de différences significatives des fréquences, des enfants et des mères par rapport à celle des témoins (**Tableau 15**).

L'étude des fréquences génotypiques montre que le génotype homozygote muté 1298CC est absent chez les patients et les témoins, et n'est présent que chez une mère d'enfant atteint (2,63%) (**Tableau 15**). En ce qui concerne le génotype hétérozygote 1298AC, il n'est pas lié à l'augmentation du risque chez les mères. Cependant, chez les enfants le pourcentage est de 47,92%, alors que celui des témoins, est égal à 31,34%. La fréquence est plus élevée chez les enfants atteints (OR=2,02(0,87-4,67) p=0.07), montrant que ce génotype peut contribuer à la survenue de ces malformations dans notre population (**Tableau 16**).

Tableau 15 : Fréquences génotypiques et alléliques de la mutation A1298C du gène de la MTHFR

MTHFR A1298C	% (n)				
	AA	AC	CC	A	C
Enfants atteints d'AFTN	52,08(25)	47,92(23)	0	0,76	0,24
Mères d'enfants atteints	63,16(24)	34,21(13)	2,63(1)	0,80	0,20
Témoins	68,66(46)	31,34(21)	0	0,84	0,16

Tableau 16 : Risque (Odds Ratio) d’AFTNs lié au polymorphisme A1298C chez les enfants et les mères

	E n f a n t s		M è r e s	
	OR	95% CI	OR	95%CI
AA vs AC	2.02	(0,87-4,67) ^a	1,19	(0,47-3,02)
AA vs CC	--		--	
A vs C	1,7	(0,83-3,46)	1,32	(0,60-2,92)

a : p = 0.07

III.2.2.2. Influence du polymorphisme A1298C sur le risque d’AFTNs

Un total de 14 études ont été rapportées dans le **tableau 04 en annexe** montrant les fréquences du variant mutant A1298C ainsi que son risque pour les AFTNs à travers le monde.

A notre connaissance, aucune étude concernant le risque des AFTNs lié à ce polymorphisme n’a été réalisée sur une population africaine. Par ce travail, nous sommes pionniers. En effet, à travers cette étude nous avons observé une élévation de la fréquence de l’hétérozygotie chez les enfants, mais avec une significativité statistique limite (p=0.07), ce qui est en bonne concordance avec la suggestion de Boduroglu (2005), qui explique que ce génotype peut influencer le risque, mais agissant seul, ne représente pas une prédisposition majeure aux AFTNs. Son effet combiné avec la mutation C677T, par contre, confère un risque de survenue de ces anomalies (Boduroglu, 2005).

Pour les autres continents aussi et d’une manière générale, le polymorphisme A1298C n’est pas un facteur de risque indépendant (Relton et al., 2004b ; Guéant-Rodriguez et al., 2003 ; Grandone et al., 2006 ; Doudney et al., 2009 ; Behunova et al., 2010 ; Aydin et al., 2016). Seule une étude réalisée en Amérique a concerné des enfants brésiliens (Cunha et al., 2002) et une autre en Europe concernant des mères et des enfants italiens (De Marco et al., 2002) ont pu constater une corrélation significative. D’autres études, par contre, ont rapporté un effet protecteur de la mutation (Candito et al., 2008 ; Godbole et al., 2011).

Par ailleurs, de larges et récentes études de méta-analyses menées par Wang et al.(2012) sur les mères et les enfants, par Zhang et al.(2013) sur les enfants et par Yadav et al.(2015) sur les mères, confortent nos résultats, à savoir que le polymorphisme A1298C n'a pas été associé indépendamment au risque d’AFTNs.

III.2.3. INTERACTION DES DEUX POLYMORPHISMES C677T ET A1298C DU GENE DE LA MTHFR

Nous avons aussi étudié l'influence de l'effet interactif des deux polymorphismes C677T et A1298C du gène de la MTHFR sur le risque d'AFTNs (**Tableau 17**).

Les génotypes composites 677CT / 1298AC se sont avérés plus fréquents chez les enfants atteints, comparativement à la distribution des génotypes «sans risque» 677CC / 1298AA. La combinaison a entraîné une augmentation de 3,57 fois le risque de développement des AFTNs, et nous avons trouvé qu'elle conférait une influence significative $p < 0.05$. Cependant, le risque lié à cette combinaison «double hétérozygote» ne s'est pas révélé significatif, chez les mères d'enfants atteints.

Tableau 17 : Interaction des polymorphismes C677T et A1298C et risque d'AFTNs chez les enfants

Combinaison génotypique	Enfants atteints	Témoins	OR 95%CI	P
677CC/1298AA	14,58 (7)	29,85(20)	Référence	
677CC/1298AC	22,91 (11)	17,91(12)	2,62(0,69-10,25)	NS
677CC/1298CC	---	---	---	---
677CT/1298AA	31,25(15)	31,34(21)	2,04(0,61-6,99)	NS
677CT/1298AC	20,83(10)	11,94(8)	3,57(0,85-15,63)	0,04*
677CT/1298CC	---	---	---	---
677TT/1298AA	8,33(4)	8,95(6)	1,9(0,32-11,36)	NS
677TT/1298AC	2,08(1)	---	---	---
677TT/1298CC	---	---	---	---

NS :Non Significatif , OR : Odds Ratio, * : $p < 0.04$

Nos résultats sont en accord avec ceux de Vander Put et al. (1998) et Boduroglu (2005). Ceci appuie l'hypothèse selon laquelle les polymorphismes à deux loci au sein du même gène perturbent sa fonction de manière plus importante comparé à l'existence d'un seul polymorphisme.

En outre, nos résultats corroborent avec ceux de nombreuses études, où aucune personne (enfant atteint, mère ou témoin) n'a été observée avec une homozygotie combinée pour les deux polymorphismes (Vander Put et al., 1998 ; Stegmann et al., 1999 ; Boduroglu, 2005). On pourrait présumer que la double homozygotie provoque des problèmes métaboliques sévères conduisant à un phénotype clinique sévère et par conséquent, une

sélection contre ces individus. Le rôle combiné des génotypes 677TT / 1298CC sur la viabilité du fœtus a été étudié par Isolato et al. (2000) chez un groupe de femmes enceintes. Il a été trouvé que ces génotypes homozygotes composites sont présents chez les fœtus avortés et non chez les nouveaux nés, par conséquent, ils sont incompatibles avec la vie fœtale.

III.2.4. ETUDE DE L'IMPACT DES POLYMORPHISMES C677T ET A1298C SUR LES TAUX DES METABOLITES

L'augmentation du risque de malformation liée aux polymorphismes du gène de la MTHFR peut être également reflétée par son influence sur le taux des métabolites, et par conséquent sur la perturbation métabolique.

Une diminution limite du folate sérique est observée chez le groupe de mères de génotypes CT/TT du polymorphisme C677T ($P = 0,06$), mais aucune significativité n'a été notée pour la mutation A1298C. Le taux de folate érythrocytaire ne diffère pas entre les génotypes et cela pour les deux polymorphismes C677T et A1298C (**Tableau 18**).

Nous avons observé que les concentrations de l'homocystéine plasmatique sont significativement influencées par ces polymorphismes. Des taux élevés de l'homocystéine sont associés aux variants mutants du polymorphisme C677T. En effet, l'homocystéine présente la valeur la plus élevée chez les mères homozygotes TT ($28,36 \pm 17,5$) comparée à celle des mères hétérozygotes CT ($14,89 \pm 9,03$) et des mères homozygotes CC ($10,68 \pm 8,79$) ($p < 0,05$).

Pour le polymorphisme A1298C, les mères ayant un génotype 1298AA présentait des concentrations de l'homocystéine significativement plus élevées que celles des mères ayant des génotypes mutants 1298AC / 1298CC ($p < 0,05$) (**Tableau 18**).

Tableau 18 : Impact des polymorphismes A1298C et C677T du gène de la MTHFR sur les taux des folates et de l'homocystéine chez les mères des enfants atteints

	Mères des enfants atteints			
	Folate érythrocytaire (ng/ml)	Folate sérique (ng/ml)	Hcy (µmol/l)	
MTHFR C677T				
CC	382,76 ± 223,37	10,77 ± 6,47	CC	10,68±8,79
CT/TT	330,36 ± 206,43	6,76 ± 3,5	CT	14,89 ± 9,03
P	0,543	0,06	TT	28,36 ± 17,5
			P	P < 0,05
MTHFR A1298C				
AA	378,175 ± 218,47	10,06 ± 6,4	AA	17,67 ± 13,17
AC / CC	334,08 ± 213,83	9,36 ± 6,29	AC / CC	8,71 ± 4,5
P	0,624	0,791	P	P < 0,05

Nos résultats concernant l'effet de la mutation C677T sur le taux de folate sérique sont cohérents avec ceux de la littérature. La majorité des études publiées rapportent des concentrations inférieures du folate sérique chez les personnes ayant le génotype TT par rapport au génotype CC (Van der Put et al., 1995 ; Geisel et al., 2001 ; Moriyama et al., 2002 ; Fohr et al., 2002 ; Castro et al., 2003). Ce génotype diminue l'efficacité de l'enzyme et provoque une diminution de la quantité du méthyl-THF et une augmentation du méthylène-THF (Seyoum, 1998). Comme le méthyl-THF est la principale forme circulante du folate, les variants mutés sont habituellement associés à une réduction de 10% à 35% du folate sérique (O'Leary et al., 2004 ; Jacques et Choumenkovitch, 2005 ; Guéant-Rodriguez et al., 2006 ; Yang et al., 2008).

Cependant, il existe une hétérogénéité des résultats concernant son influence sur le niveau de folate érythrocytaire (Van der Put et al., 1995 ; Molloy et al., 1997 ; Relton et al., 2004a). La différence dans les résultats des études peut être expliquée par l'utilisation de diverses méthodes de dosage spécifiques aux différentes formes des folates. En effet, l'influence de la mutation est essentiellement un changement de la distribution des dérivés foliques. Ces derniers peuvent être estimés différemment selon le test utilisé (Jacques et Choumenkovitch, 2005). Les érythrocytes des individus homozygotes pour la mutation présentaient environ 30% de formyl THF par rapport aux individus de type sauvage dont le folate érythrocytaire était exclusivement le 5-méthylTHF. En fait, l'activité réduite de la

MTHFR provoque une diminution du métabolisme du 5,10 méthylèneTHF en 5-méthylTHF permettant une accumulation du 5,10 méthylène-THF et son oxydation en formes de folates formylées (Friso et al., 2002).

Concernant l'homocystéine, plusieurs études ont révélé que le polymorphisme C677T est lié à une hyperhomocystéinémie modérée en limitant partiellement la voie de la reméthylation (Frosst et al., 1995; Van der Put et al., 1996). Cette dernière est considérée comme un facteur de risque pour le développement des défauts du tube neural (Steegers et al., 1994 ; Godbole et al., 2011 ; Gu et al., 2012). Dans notre population nous avons également montré que cette mutation était principalement responsable de l'augmentation de l'homocystéine chez les mères d'enfants atteints (Abbas et al., 2012).

Il a été trouvé que les individus portant le génotype 677TT avaient des besoins plus élevés en folate afin de maintenir des concentrations physiologiques de l'homocystéine (Frosst et al., 1995; Van der Put et al., 1998 ; Ueland et Rosen, 2005). En effet, le changement de l'Alanine par la valine due à la mutation augmente le degré de dissociation du FAD, et la perte de ce dernier induit des changements importants de conformation (structures quaternaire). Cependant, les concentrations physiologiques de folate stabilisent l'enzyme, suggérant le mécanisme par lequel le folate peut réduire le taux de l'homocystéine (Guenther et al., 1999 ; Yamada et al., 2001) et aussi la susceptibilité aux AFTNs.

Dans leur étude de synthèse, Jacques et Choumenkovitch en 2005, ont rapporté le taux d'Hcy associé à la mutation (génotype TT) de plusieurs travaux. Ils ont trouvé que, lorsque le statut folique est bas les valeurs de l'homocystéine étaient de 11 à 24,8 $\mu\text{mol/l}$, mais si le statut folique est élevé les taux varient de 6,8 à 16,6 $\mu\text{mol/l}$. L'effet de la mutation dépendant des folates s'explique aussi dans notre étude (Abbas et al., 2012) .

Crider et al. (2014) ont montré qu'un risque accru d'AFTNs est associé au génotype TT de la MTHFR chez les individus ayant un faible apport en folate, Par exemple, une diminution de 200 nmol / l de la concentration en folate des globules rouges (de 700 à 500 nmol / l) \approx augmentation de 14,4 à 25,5 du risque par 10 000 naissances. L'augmentation de l'apport d'acide folique pourrait avoir le plus grand effet sur la réduction du risque chez les femmes ayant les concentrations basales du folate érythrocytaire.

De ce fait, un apport suffisant en folate par l'alimentation peut compenser le déficit en folate métaboliquement disponible et peut aussi corriger l'effet de la mutation.

Par ailleurs, les études ont montré que la mutation A1298C abaisse aussi l'activité de l'enzyme mais avec un moindre degré par rapport à la mutation C677T (Van der Put et al., 1998 ; Weisberg et al., 1998). Le nucléotide 1298 est situé dans le domaine régulateur de la protéine, où sa substitution peut influencer la stabilisation de la protéine (Shan et al., 1999). Cela suggère que la réduction de l'activité de la MTHFR par ce polymorphisme affecte le métabolisme de l'homocystéine. Cependant, selon la littérature, la mutation n'augmente pas significativement les taux de l'homocystéine (Dekou et al., 2001 ; Decarvalho et al., 2013). Dans notre étude, comme dans d'autres (Cunha et al., 2002; Godbole et al., 2011) les résultats ont montré un effet inverse, nous avons constaté que la mutation A1298C affecte le métabolisme de l'homocystéine avec un taux de l'homocystéine plus élevé chez les mères portant un génotype normal et plus bas chez celles ayant des génotypes mutants.

En effet, Friedman et al. (1999) ont observé des concentrations de l'homocystéine plasmatique significativement plus faibles chez les sujets portant le génotype 677CC / 1298CC, en comparaison avec d'autres ayant le génotype 677CC / 1298AA. Aussi, Cunha et al. (2002) ont constaté que les enfants atteints d'AFTN portant le génotype 1298AA présentaient un taux de l'homocystéine totale élevé, comparé à ceux ayant les génotypes 1298AC / CC. Dans cette dernière étude, les enfants avec le génotype normal 1298AA ont un taux de folate érythrocytaire et de vitamine B12 légèrement bas. Pour leur part, Godbole et al. (2011), dans leur étude sur des mères ayant des enfants affectés par les AFTNs ont révélé que le génotype 1298AA est associé significativement à des niveaux plus élevés d'Hcy totale.

Plus récemment, Zappacosta et al. (2014), dans leur étude sur une large population, ont montré une augmentation d'Hcy chez les individus de génotype normal et un abaissement chez les individus homozygotes mutés. Concernant le folate sérique l'inverse est observé, le taux est plus élevé chez les individus de génotype CC comparé aux sujets de génotype AA.

Il est clair que la mutation A1298C pourrait entraîner une altération des métabolismes folates/homocystéine, mais le mécanisme de cette perturbation reste encore mal compris. Zappacosta et ses collaborateurs expliquent cette augmentation chez les individus de génotype AA par son association majeure avec le génotype TT. Dans notre cas cette dernière association n'a pas été observée suggérant un effet interactif avec d'autres polymorphismes. En effet, la perturbation peut refléter l'effet de l'interaction gène-gène.

III.3. POLYMORPHISME A2756G DU GENE DE LA MTR

III.3.1. ETUDE DE LA DISTRIBUTION DES FREQUENCES ALLELIQUES ET GENOTYPIQUES

Le tableau ci-après montre la prévalence de la mutation A2756G du gène de la MTR.

Les fréquences de l'allèle muté G sont égales à 0,10 et 0,11 chez les enfants atteints et les mères respectivement, en comparaison à 0,13 chez les témoins. Il n'ya aucune différence dans les fréquences aussi bien pour les enfants que pour les mères par rapport aux témoins (Tableau 19).

En ce qui concerne les génotypes, nous constatons que le génotype homozygote muté 2756GG est absent chez les mères et les témoins. Il est présent seulement chez un enfant atteint (2,08%). Nous ne révélons pas de différences significatives pour les fréquences des génotypes hétérozygotes observées tant pour les mères que pour les enfants en comparaison avec les témoins ($p > 0,05$) (Tableau 20).

Tableau 19 : Fréquences génotypiques et alléliques de la mutation A2756G du gène de la MTR.

MTR A2756G	% (n)				
	AA	AG	GG	A	G
Enfants atteints d'AFTN	81,25(39)	16,67(8)	2,08(1)	0,90	0,10
Mères d'enfants atteints	78,95(30)	21,05(8)	0	0,89	0,11
Témoins	74,63(50)	25,37(17)	0	0,87	0,13

Tableau 20 : Risque (Odds Ratio) d'AFTNs lié au polymorphisme A2756G chez les enfants et les mères

	Enfants		Mères	
	OR	95% CI	OR	95% CI
AA vs AG	0,72	(0,22-2,37)	0,75	(0,21-2,62)
AA vs GG	--		--	
A vs G	0,8	(0,35-1,83)	0,81	(0,34-1,95)

III.3.2. INFLUENCE DU POLYMORPHISME A2756G SUR LE RISQUE D'AFTNs

Étant donné que l'hyperhomocystéinémie et les bas taux de la vitamine B12 sont des facteurs de risque indépendants pour les AFTNs, beaucoup de chercheurs se sont intéressés à l'étude de la méthionine synthase dans leurs populations. Enzyme responsable avec la vitamine B12 de la reméthylation de l'homocystéine en méthionine.

Un total de 12 études a été identifié dans cette étude comparative (**Tableau 05 en annexe**).

En effet, Lucock et al. (2000), De Marco et al. (2002), O'leary et al. (2005), Candito et al. (2008) en plus de Doudney et al. (2009) n'ont pas démontré une association significative entre le polymorphisme A2756G et le risque de développement des AFTNs dans les populations européennes (britannique, italienne, irlandaise et française). Par contre, la présence de l'allèle G s'est avérée être associée à un risque accru d'avoir un enfant atteint d'AFTN, selon l'étude de Gos et al. (2004) sur des familles polonaises (non mentionnée dans le tableau par manque de données). De même, les génotypes AG / GG semblent augmenter le risque chez les enfants atteints de spina bifida en Pologne et aussi dans le sud de l'Italie (Gos et al., 2004 ; Guéant-Rodriguez et al., 2003).

L'étude de Wang et al. (2015b) qui représente l'Asie a aussi trouvé un lien significatif entre ce polymorphisme et la survenue d'une AFTN chez l'enfant.

En Amérique, par contre, toutes les études citées suggèrent que le polymorphisme A2756G ne présente aucun risque d'avoir une AFTN, aussi bien pour les populations hispaniques que non hispaniques (Christensen et al., 1999 ; Johanning et al., 2000 ; Zhu et al., 2003).

Al Farra (2010) dans la population jordanienne n'a pas pu observer de relation significative entre l'homozygotie de la mutation et l'occurrence des AFTNs. Il a montré que, par rapport au génotype AA, le génotype AG est plus observé chez les mères d'enfants atteints (AG vs. AA: OR= 3,02, 95% CI 1,05–8,71). Le risque, par contre, reste toujours non significatif.

De même, notre étude, seule rapportée en Afrique, ne montre pas que la mutation représente un facteur de risque indépendant. En outre, une méta-analyse récente effectuée par Ouyang et al. (2013a) n'a pas révélée une association significative entre le polymorphisme

A2756G et la susceptibilité aux AFTNs chez les mères. Les auteurs ont également réalisé une méta-analyse comprenant de nombreuses études évaluant l'association entre ce polymorphisme et le risque d'AFTNs chez les enfants, le travail n'a pas montré d'association significative avec le risque chez les enfants de la race caucasienne (Ouyang et al., 2013b).

En effet, bien que la méthionine synthase joue un rôle crucial dans le métabolisme des folates et de l'homocystéine et malgré que la transition de A en G dans la position 2756 se produit près d'un site important de liaison à la vitamine B12 et pourrait influencer la structure secondaire de l'enzyme, la mutation dans ce gène ne semble pas être un facteur de risque direct pour le développement des AFTNs. Cependant, elle peut l'être par son association avec d'autres polymorphismes notamment la mutation A66G dans le gène MTRR (Zhu et al., 2003) et aussi par son influence sur le taux des folates et de l'homocystéine.

III.3.3. ETUDE DE L'IMPACT DU POLYMORPHISME A2756G SUR LES TAUX DES FOLATES ET DE L'HOMOCYSTEINE

Les mères de notre échantillon ne présentent pas de génotype GG, raison pour laquelle la comparaison n'a été réalisée qu'entre des mères ayant le génotype AG et celles ayant le génotype AA.

Nous avons observé que le taux de folate érythrocytaire était significativement bas chez les mères possédant un génotype AG par rapport aux mères ayant le génotype normal AA ($p = 0,02$). Nous avons aussi constaté que le génotype 2756AG entraîne une diminution du taux de folate sérique, mais en absence de significativité statistique ($p > 0,05$). Les valeurs étaient de $10,10 \pm 6,29$ pour le génotype AA vs $4,5 \pm 2,74$ pour le génotype AG (**Tableau 21**).

La concentration moyenne de l'homocystéine était légèrement plus élevée chez les mères possédant le génotype 2756AG par rapport à celles ayant un génotype AA, mais la différence n'était pas statistiquement significative (**Tableau 21**).

Tableau 21 : Impact du polymorphisme A2756G du gène de la MTR sur les taux des folates et de l'homocystéine chez les mères des enfants atteints

	Mères des enfants atteints		
	Folate érythrocytaire (ng/ml)	Folate sérique (ng/ml)	Hcy (µmol/l)
MTR A 2756 G			
AA	403,78 ± 213,18	10,10 ± 6,29	12,83 ± 10,18
AG	148,25 ± 47,55	4,5 ± 2,74	14,28 ± 10,89
<i>P</i>	0,02*	0,14	0,76

***P<0.05**

Selon la littérature, le polymorphisme A2756G peut réduire le taux de conversion du 5-méthyl-THF en THF, ce qui entraîne une carence physiologique en folates imposée par la déficience fonctionnelle causée par le piège méthylique (Lucock et al., 2000) . En effet, dans leur étude récente, Li et al. (2015) ont constaté que les génotypes MTR 2756AG + GG réduisaient le taux de folate sérique et augmentaient le risque de carence en folates.

Dans notre population, la concentration du folate sérique était plus basse chez les mères portant le génotype mutant MTR 2756AG mais, sans significativité statistique. Cependant, nous avons trouvé que la mutation était associée à une diminution significative du taux de folate érythrocytaire. Ce dernier représentant les réserves de notre organisme et ayant un aspect important en embryogénèse (Herbert, 1990). Sur base de nos résultats nous concluons que, chez les mères à risque de la population algérienne, le polymorphisme MTRA2756G contribue au risque d'AFTNs par la perturbation du métabolisme du folate résultant en l'épuisement du pool de folate érythrocytaire à long terme.

Concernant son influence sur le taux de l'homocystéine, Harmon et al. (1999) ont trouvé que la mutation était responsable de l'augmentation de son taux. Cette association n'a pas été identifiée par d'autres études. Nos résultats sont cohérents avec plusieurs travaux qui n'ont pas démontré de lien significatif entre la mutation A2756G et ce métabolite quelle que soit la taille de l'échantillon étudié (Van der Put et al., 1997c ; Morrison et al., 1997; Yakub et al., 2012). Laraqui et al. (2006) ont constaté, par contre, qu'un effet combiné des deux mutations MTR A2756G et MTRR A66G augmente le risque d'hyperhomocystéinémie. Par conséquent, la mutation A2756G semble avoir un effet significatif sur le taux de l'homocystéine en étant associée à une autre mutation.

III.4. POLYMORPHISME A66G DU GENE DE LA MTRR

III.4.1. ETUDE DE LA DISTRIBUTION DES FREQUENCES ALLELIQUES ET GENOTYPIQUES

Le tableau ci-après montre la prévalence de la mutation A66G du gène de la MTRR.

L'allèle G du polymorphisme MTRR A66G présente des fréquences de 0,32 et 0,47 chez les patients et les mères, respectivement contre 0,46 chez les témoins (**Tableau 22**). Il n'y a pas de différences significatives pour ces valeurs de fréquences aussi bien entre les enfants atteints et les témoins qu'entre les mères et les témoins (**Tableau 23**).

De même, en ce qui concerne les génotypes, les fréquences des génotypes mutants n'étaient pas significativement différentes de celles des sujets témoins ($p > 0,05$) aussi bien chez les mères que chez les enfants (**Tableau 23**).

Tableau 22 : Fréquences génotypiques et alléliques de la mutation A66G du gène de la MTRR.

MTRR A66G	% (n)				
	AA	AG	GG	A	G
Enfants atteints d'AFTN	41,67(20)	52,08(25)	6,25(3)	0,68	0,32
Mères d'enfants atteints	26,32(10)	52,63(20)	21,05(8)	0,53	0,47
Témoins	22,39 (15)	64,18 (43)	13,43(9)	0,54	0,46

Tableau 23 : Risque (Odds Ratio) d'AFTNs lié au polymorphisme A66G chez les enfants et les mères

	E n f a n t s		M è r e s	
	OR	95% CI	OR	95%CI
AA vs AG	0,43	(0,16-1,12)	0,74	(0,25-2,21)
AA vs GG	0,29	(0,05-1,53)	1,30	(0,30-5,71)
A vs G	0,98	(0,66-1,46)	1,08	(0,61-1,91)

III.4.2. INFLUENCE DU POLYMORPHISME A66G SUR LE RISQUE D'AFTNS

La méthionine synthase réductase est impliquée dans le maintien de l'activité de la méthionine synthase, vitamine B12 dépendante, qui assure la transformation de l'homocystéine en méthionine. Le polymorphisme au niveau de la MTRR pourrait donc avoir un impact sur le taux de l'homocystéine et de ce fait sur la perturbation métabolique.

Le tableau 06 en annexe montre les fréquences du variant mutant A66G et le risque d'AFTNs, dans plusieurs populations à travers le monde où une hétérogénéité des résultats a été constaté. Un ensemble de dix études publiées a été présenté, deux ont été réalisées sur le continent américain (Wilson et al., 1999; Zhu et al., 2003), deux sur le continent asiatique (Naushad et Devi, 2010 ; Wang et al., 2015b), cinq études concernaient le continent européen (Pietrzyk et al., 2003 ; Relton et al., 2004b ; O'Leary et al., 2005 ; Candito et al., 2008, Doudney et al., 2009). Seule notre étude représente le continent africain.

Dans la population européenne, deux études ont montré un risque lié à la mutation chez les enfants et/ou les mères (Pietrzyk et al., 2003 ; Doudney et al., 2009). Le groupe de Candito et al. (2008) aussi a décrit une élévation de 2,2 fois (AA vs AG / GG: IC 95% 1,0- 4,6) le risque chez les mères mais sans significativité statistique. Les études de O'Leary et al. (2005) et Relton et al. (2004b), par contre, n'étaient pas concluantes pour les enfants ainsi que pour les mères à risque.

En Amérique, Wilson et al. (1999) et Zhu et al. (2003) n'ont pas trouvé de risque indépendant lié à ce polymorphisme, mais plutôt en combinaison respective avec un taux de vitamine B12 bas et du polymorphisme A2756G du gène de la MTR.

En Asie, L'étude menée par Naushad et Devi (2010) n'a pas révélé un risque lié à la mutation chez les mères, mais celle de Wang et al. (2015b) a constaté une augmentation du risque chez les enfants en Chine.

Dans notre population, nous avons constaté qu'il n'y a pas d'influence du polymorphisme MTRR A66G sur le risque d'AFTNs chez les enfants. Récemment, dans leur méta-analyse réalisée sur les enfants atteints d'AFTNs de différentes populations, Ouyang et al. (2013b) n'ont pas trouvé, non plus, de corrélation significative entre ce polymorphisme et le risque de ces malformations. De même pour les mères, nous n'avons pas pu observer une

association significative entre ce polymorphisme et le risque d'AFTNs, ce qui est en bon accord avec d'autres études (O'Leary et al., 2005 ; Naushad et Devi, 2010).

Par ailleurs, nous avons aussi constaté que plusieurs travaux soutiennent la présence d'une relation entre le polymorphisme A66G et un risque accru d'avoir un enfant affecté. Dans une large et récente méta-analyse entreprise par Yadav et al. (2015), les auteurs ont constaté que le polymorphisme A66G était un facteur de risque pour les mères d'avoir des enfants portant ces malformations. Cependant, l'effet est essentiellement influencé par les interactions avec d'autres variantes des gènes du métabolisme des folates et les concentrations de vitamines. En effet, le génotype GG chez les mères combiné à un faible taux de la vitamine B12 ou à des concentrations élevées de MMA augmente le risque d'avoir un enfant atteint (Wilson et al., 1999 ; Zhu et al., 2003 ; van der Linden et al., 2006). En revanche, l'apport en folates n'a pas affecté l'impact de la mutation (Christensen et Rozen, 2010). Des études futures avec un dosage de la vitamine B12 sont nécessaires dans notre population.

III.4.3. ETUDE DE L'IMPACT DU POLYMORPHISME A66G SUR LES TAUX DES FOLATES ET DE L'HOMOCYSTEINE

La stratification selon les génotypes n'a montré aucune influence des génotypes AG et GG sur le taux des nutriments et de l'homocystéine (**Tableau 24**).

Tableau 24: Impact du polymorphisme A66G du gène de la MTRR sur les taux des folates et de l'homocystéine chez les mères des enfants atteints

	Mères des enfants atteints		
	Folate érythrocytaire (ng/ml)	Folate sérique (ng/ml)	Hcy (µmol/l)
MTRR A 66 G			
AA	405,48 ± 169,05	11,2 ± 7,08	16,53 ± 15,76
AG / GG	345,46 ± 225,22	9,06 ± 6,17	11,10 ± 6,73
P	0,586	0,567	0,297

Nos résultats concordent avec ceux de la littérature, le polymorphisme A66G n'influence pas en soi le taux de folate sérique (Wilson et al., 1999 ; Barbosa et al., 2008; Li et al., 2015) ou l'incidence de la carence en folate (Li et al., 2015). De même, dans la plupart des études, l'effet indépendant de ce polymorphisme sur l'homocystéine plasmatique n'a pu être observé (Wilson et al., 1999; Kluijtmans et al., 2003 ; O'Leary et al., 2005).

L'effet du polymorphisme sur l'activité de l'enzyme MTRR est minimal; Olteanu (2002) a noté que la mutation ne conduit pas à un changement majeur dans la conformation de la protéine. Cependant, en sa présence, un ratio de 3 à 4 fois plus élevé de MTRR par rapport à MTR était nécessaire pour atteindre une activité enzymatique maximale. Ainsi, la déficience en MTRR affectera négativement la fonction normale de la MTR, ce qui peut entraîner une perturbation de la reméthylation de l'homocystéine. De ce qui précède, nous supposons que la mutation n'affecte pas les niveaux de métabolites en raison de son faible effet indépendant.

III.5. POLYMORPHISME 844INS68 DU GENE CBS

III.5.1. ETUDE DE LA DISTRIBUTION DES FREQUENCES ALLELIQUES ET GENOTYPIQUES

Nous constatons d'après le tableau 25 une fréquence très faible de l'allèle M (muté contenant l'insertion) parmi les patients et les mères de notre population, elles sont de 0,07 et 0,08 respectivement. De plus, Nous n'avons trouvé aucune mère à risque possédant l'homozygotie de la mutation. Les fréquences du génotype homozygote sont 2,08% chez les enfants contre 2,99 chez les témoins, ne représentant aucune différence significative (**Tableau 26**). Les fréquences du génotype hétérozygote étaient de 10,42% pour les enfants atteints et de 15.79% pour les mères, inférieures à celle des témoins (23,88%).

Tableau 25: Fréquences génotypiques et alléliques de la mutation 844ins 68 du gène de la CBS.

CBS ins68	% (n)				
	NN	NM	MM	N	M
Enfants atteints d'AFTN	87,50(42)	10,42(5)	2.08(1)	0,93	0,07
Mères d'enfants atteints	84,21(32)	15,79(6)	0	0,92	0,08
Témoins	73,13(49)	23,88(16)	2,99(2)	0,85	0,15

Tableau 26 : Risque (Odds Ratio) d'AFTNs lié au polymorphisme 844insS68 chez les enfants et les mères

	E n f a n t s		M è r e s	
	OR	95% CI	OR	95%CI
NN vs NM	0,36	(0,11-1,18)	0,57	(0,18-1,79)
NN vs MM	0,51	(0,02-7,62)	--	
N vs M	0,45	(0,16-1,18)	0,49	(0,17-1,37)

III.5.2. INFLUENCE DU POLYMORPHISME 844INS68 SUR LE RISQUE D'AFTNS

Bien que l'enzyme codée par le gène Cystathionine β synthétase ne soit exprimée que dans le foie et les reins, il a été rapporté qu'elle est exprimée au cours de l'embryogenèse précoce, et des modifications au niveau de son gène peuvent donc l'influencer (Quere et al., 1999).

Peu d'études ont évalué l'association entre l'insertion dans le gène de la CBS et la survenue des AFTNs. Morrison et al. (1998), en Europe, n'ont pas démontré une association significative entre le polymorphisme et le risque d'AFTNs chez les enfants et chez les mères dans les populations néerlandaise et britannique respectivement. Les études sur la population américaine ont également suggéré que le polymorphisme 844ins68 n'est pas lié à la susceptibilité aux AFTNs. Notre étude a permis d'aboutir à ces mêmes observations (**Tableau 07 en annexe**).

Néanmoins, d'autres études ont suggéré que la mutation peut être l'une des causes d'AFTNs. Tilley et al. (2012) ont observé une fréquence d'enfants atteints supérieure à celle des témoins, Saxena et al. (2011) en Inde ont trouvé que la mutation peut augmenter le risque de deux fois chez les mères. Cependant, dans les deux études il y avait un manque de significativité. Houcher et al. (2009) avaient montré une différence statistiquement significative concernant la fréquence du génotype hétérozygote entre les mères et les témoins.

Selon certaines chercheurs, le risque est fortement accru par la coexistence de l'insertion avec la mutation C677T du gène de la MTHFR (Ramsbottom et al., 1997).

III.5.3. ETUDE DE L'IMPACT DU POLYMORPHISME 844INS68 SUR LES TAUX DES FOLATES ET DE L'HOMOCYSTEINE

Aucune influence des génotypes NM et MM sur les taux du folate érythrocytaire ainsi que de l'homocystéine n'a été observée. Une significativité limite est notée pour le taux de folate sérique associé à la mutation (**Tableau 27**).

Tableau 27: Impact du polymorphisme 844ins68 du gène de la CBS sur les taux des folates et de l'homocystéine chez les mères des enfants atteints

	Mères des enfants atteints		
	Folate érythrocytaire (ng/ml)	Folate sérique (ng/ml)	Hcy (µmol/l)
CBS 844 ins 68			
NN	397,07 ± 217,05	11,07 ± 6,6	13,48 ± 11,01
NM	250,65 ± 178,58	5,66 ± 2,60	13,62 ± 12,94
P	0,183	0,09	0,98

L'effet de la mutation sur l'activité de l'enzyme n'est pas clair. En effet, la mutation est une duplication à la jonction intron7-exon 8 qui crée un site d'épissage alternatif éliminant la séquence d'insertion. Cependant, il a été rapporté que l'allèle portant l'insertion est mal transcrit (Franco et al., 1998). Il semble que la présence de l'insertion de 68 pb pourrait potentiellement moduler les niveaux des métabolites intervenant dans le cycle de la méthionine. Dans notre étude un effet modeste a été trouvé pour la concentration du folate, cependant aucun lien significatif n'a été trouvé pour l'homocystéine. Résultat aussi trouvé dans de nombreuses études (Yakub et al., 2012 ; kumar et al., 2010 ; Nienaber-Rousseau et al., (2013). Seule l'étude de Fredriksen et al. (2007) a montré une association significative du polymorphisme 844ins68 avec les niveaux de l'homocystéine. Sur base des résultats obtenus par Fredriksen et nous mêmes, l'effet de la mutation sur la perturbation métabolique ne peut être exclu.

DISCUSSION GENERALE

La relation entre l'alimentation et la santé a été mise en évidence, et l'objectif de l'organisation mondiale de santé est d'améliorer les apports alimentaires notamment le statut en folates des femmes en âge de procréer. Malgré les recommandations, peu de femmes concernées sont au courant des risques associés à une déficience. Un taux de 69 % des femmes Algériennes de la population générale ont un apport alimentaire moyen en folate qui reste inférieur aux valeurs de références nutritionnelles (DRV) (Houcher et al., 2003). En effet, Le folate est un donneur de groupements méthyles jouant un rôle primordial dans le métabolisme des unités monocarbonées, un processus essentiel pour la synthèse, la réparation et la méthylation de l'ADN. Une dérégulation dans l'une des voies métaboliques peut expliquer la pathogénèse des AFTNs. La prévention primaire de la plupart des AFTNs, peut être obtenue en atteignant un taux élevé de folate maternel. L'atteinte d'une concentration protectrice est représentée par un taux de folate érythrocytaire ≥ 400 ng/ml mais qui reste un défi chez les femmes en âge de procréer (Daly et al., 1995 ; Crider et al., 2014).

Les paramètres les plus couramment utilisés pour évaluer le statut en folates sont leurs concentrations sérique (ou plasmatique) et érythrocytaire (Yetley et al., 2011). Dans notre population, bien que des taux moyens des folates normaux ont été relevés chez les mères et qui ne diffèrent pas significativement de ceux des témoins, le statut folique érythrocytaire, chez deux tiers de mères à risque, reste inférieur comparé à la valeur établie comme marqueur pour la réduction du risque d'AFTNs. De plus, l'analyse par centile, permettant une meilleure évaluation du statut, montre qu'à chaque percentile le taux est faible chez les mères par rapport aux témoins. Aussi, nous avons pu observer, pour la première fois, une relation dose-réponse entre le folate sérique et érythrocytaire et le risque chez les mères d'origine africaine. Le risque pour les mères s'élève en passant du quartile supérieur au quartile inférieur de la distribution normale. De ce fait, nous ne pouvons pas exclure l'intervention des folates dans la perturbation du métabolisme chez les mères à risque de notre population.

Les normes physiologiques décrites pour les taux des folates ne reflètent pas un taux de folate suffisant pour la prévention des AFTNs, des concentrations optimales sont nécessaires et devraient être utilisées comme référence pour améliorer le suivi par le taux des métabolites et l'évaluation des besoins (crider et al., 2014)

Par ailleurs, plusieurs études réalisées sur l'homme et les animaux ont montré que les carences en folate, voire des niveaux normaux mais limites, de cette vitamine entraînent des concentrations élevées de l'homocystéine totale (tHcy). En raison de cette relation, l'Hcy représente un indicateur fonctionnel du statut de folate (Ueland et Rozen, 2005). En effet, le folate sérique est la mesure du 5-méthyltétrahydrofolate, la principale forme circulante du folate, c'est le déficit d'apport alimentaire ou d'absorption qui peut entraîner son abaissement. Le folate érythrocytaire intracellulaire peut être affecté par la perturbation du métabolisme. L'augmentation de l'homocystéine quand à elle peut résulter d'une déficience nutritionnelle et/ou métabolique des folates (Lucock et al., 2000 ; Felkner et al., 2009). Ainsi, les chercheurs l'utilisent pour sa sensibilité permettant de refléter des déficiences cellulaires ou fonctionnelles des folates (Klee, 2000).

Dans notre cohorte de mères, le statut folique a été marqué par un taux de l'homocystéine moyen significativement élevé par rapport aux témoins. Une élévation à chaque percentile, ainsi qu'une hyperhomocystéinémie qui a augmenté cinq fois le risque chez 26,47 % des mères. Ce qui prouve l'existence d'une perturbation métabolique et le rôle potentiel de son élévation dans l'étiologie des AFTNs dans notre population. Cette association a été aussi observée dans des études réalisées chez les femmes enceintes (Gaber et al., 2007), chez les femmes en suite de couche (Felkner et al., 2009), dans le liquide amniotique (Brouns et al., 2008 ; Liu et Li, 2011) et chez les enfants atteints (Ratan et al., 2008) : l'homocystéine en excès quelle que soit sa cause pourrait jouer un rôle indépendant dans le développement des AFTNs (Felkner et al., 2009).

La relation inverse que nous avons pu constater entre le taux de folate et de l'homocystéine, en l'absence d'une déficience nutritionnelle, permet de supposer l'implication des mutations génétiques dans l'élévation de son taux. Elle peut aussi refléter l'insuffisance du statut folique de nos mères à risque nécessaire pour répondre aux besoins physiologiques de la grossesse, les études ont montré que lorsque le taux de folate est bon, la relation ne s'observe plus et un statut folique est considéré adéquat quand il n'a pas d'influence sur le taux d'Hcy. McNulty et al. (2011) ont trouvé que la relation inverse entre le folate sérique et l'homocystéine n'était observée que chez les femmes qui ont commencé la supplémentation en acide folique après la conception, mais pas chez les femmes supplémentées en période périconceptionnelle. Ces dernières, selon les auteurs, avaient atteint un statut optimal en folate.

Dans notre étude, les mères témoins, aussi, présentent cette relation inverse avec un taux des folates qui peut les exposer au risque, ce qui est en accord avec l'étude d'Abdessamed et al. (2009) menée sur une population Algérienne saine, cependant, ce taux reste meilleur en comparaison à celui des mères à risque. De plus, l'interaction du statut folique avec d'autres facteurs notamment génétiques chez les mères d'enfants atteints peut être la cause de la perturbation du métabolisme. Le déficit en vitamine B12 peut causer également une diminution de la méthylation de l'homocystéine et de ce fait, son augmentation chez les mères d'enfants atteints.

Les polymorphismes génétiques dans le métabolisme des folates ont été identifiés au cours des 15 dernières années. Ces variantes ont des phénotypes beaucoup plus subtils que les mutations rares causant des erreurs innées du métabolisme des folates. Ils peuvent avoir un impact plus important sur la santé de la population. En effet, ils ont été liés à une grande variété de maladies multifactorielles communes (Bailey, 2010). Le polymorphisme C677T dans le gène de la MHFR a été le premier identifié en tant que facteur de risque pour les AFTNs. Depuis, de nombreux chercheurs se sont intéressés à son étude dans différentes populations. Le variant thermolabile C677T peut influencer le risque de ces malformations par un certain nombre de mécanismes associés à une activité réduite de l'enzyme. L'augmentation de l'Hcy, la diminution des folates, la modification de la distribution des dérivées foliques, la perturbation de la synthèse des nucléotides et la diminution de la capacité des réactions de méthylation peuvent tous conduire à des conséquences cliniques graves (Bailey, 2010).

L'association du polymorphisme C677T à une élévation du taux d'Hcy est démontré dans de nombreuses recherches (Goyette et Rozen, 2000 ; Biselli et al., 2010 ; Yakub et al., 2012 ; Zappacosta et al., 2014). Dans la présente étude, Les mères à risque n'avaient pas une fréquence significativement élevée de la mutation. Cependant, cette dernière était corrélée à une augmentation du taux de l'homocystéine (HHcy). Ce qui implique en partie, une diminution du pool intracellulaire du THF et une augmentation de la toxicité embryonnaire pendant le processus de neurulation.

En effet, le statut de folate joue un rôle important dans la détermination de l'expression phénotypique de l'enzyme thermolabile, car l'augmentation de l'homocystéine chez les individus homozygotes TT ne s'observe que si leur taux en folates est faible, l'enzyme mutante seule n'est pas suffisante pour provoquer une hyperhomocystéinémie

modérée (Ueland et Rozen, 2005). La diminution des taux de folate et la thermolabilité de l'enzyme sont intimement impliquées dans l'augmentation du taux de l'homocystéine. Ces découvertes renforcent notre hypothèse à savoir le niveau de folate impliqué dans l'augmentation du risque dans notre population.

Bien que la majorité des publications concernent ce polymorphisme, et les articles continuent à être publiés chaque année, l'intérêt pour les autres polymorphismes des gènes des métabolismes folates/homocystéine a augmenté au cours de ces dernières années. Les études ont montré une hétérogénéité des résultats dans différentes populations.

Très peu d'études ont été réalisées en Afrique malgré le taux de mortalité lié à ces malformations et leur fréquence élevée. Nous avons analysé, pour la première fois en Algérie, l'effet de six polymorphismes dans cinq gènes impliqués dans le métabolisme des folates et de l'homocystéine (MTHFR C677T et A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G, RFC G80A et CBS 844ins68) sur la survenue des AFTNs ainsi que leur influence sur les niveaux des métabolites. Dans notre étude, à l'exception de l'augmentation du risque observée chez les enfants possédant les variants AG et AA du polymorphisme G80A du gène RFC, aucun variant mutant ne semble augmenter, d'une manière indépendante, le risque de ces malformations aussi bien chez les mères que chez les enfants. Il est clair, d'après notre étude et celles réalisées à travers le monde, que l'interaction gène- gène est plus susceptible d'augmenter le risque. En effet, chez les enfants de notre population, les polymorphismes C677T et A1298C du gène de la MTHFR n'agissent pas indépendamment. Cependant, le risque s'élève par leur coexistence. Les interactions entre le polymorphisme C677T et les autres polymorphismes ont aussi été observées dans plusieurs études. Sa combinaison avec le polymorphisme A66G de la MTRR, le polymorphisme CbS 844ins68 et le polymorphisme A80G, influence de manière significative le risque et accentue l'effet individuel de la mutation (Relton et al., 2004b). Toutefois, étant donné la taille limitée de notre échantillon après sa subdivision en sous-groupes, l'étude interactive entre les gènes n'a pas été concluante. Des travaux futurs dans ce sens, dans notre population, s'avèrent nécessaires.

L'étude de l'interaction entre les génotypes maternel et foetal est également d'une importance majeure. Les efforts dans ce domaine ont été limités par la difficulté de collecte des échantillons pairs mère-enfant de tailles importantes. A ce jour, elle a été partiellement

résolue par l'entreprise des méta-analyses des résultats d'un nombre de groupes de recherches.

En ce qui concerne l'impact de ces polymorphismes sur le taux d'Hcy, nos résultats ont montré que le polymorphisme C677T est une des mutations responsable de l'augmentation de son taux (Abbas et al., 2012). Un effet inverse lié à cette élévation est observé pour le génotype sauvage du polymorphisme A1298C de la MTHFR, cette association a été également rapportée par plusieurs chercheurs (Lucock et al., 2001 ; Cunha et al., 2002; Godbole et al., 2011), elle est difficile à interpréter mais reflète une perturbation du métabolisme intracellulaire (Lucock et al., 2001). D'autre part, nous avons observé une augmentation du taux liée aux variants mutants des polymorphismes G80A du gène RFC et le polymorphisme A2756G de la MTR cependant, reste modeste et non significatif. La biochimie des métabolismes folates/homocystéine est très complexe, plusieurs chercheurs supportent que les polymorphismes agissent en synergie pour les perturber. En effet, il a été trouvé que les génotypes MTR 2756AG et 2756GG avec les génotypes MTHFR 677TT / 1298AA et les génotypes MTHFR 677CT / 1298AC étaient associés à des concentrations plasmatiques de l'homocystéine extrêmement élevées (Feix et al., 2001).

En ce qui concerne la variation du folate érythrocytaire, une influence significative par le polymorphisme A2756G a pu être démontrée dans notre étude (Abbas et al., 2016). Pour les autres polymorphismes, nous n'avons pas détecté une contribution individuelle significative. Cependant, il est encore possible que les polymorphismes individuels influencent la distribution des dérivés de folate au niveau cellulaire qui n'est pas détectable par le taux de folate. Les chercheurs proposent que le folate érythrocytaire ne soit pas approprié "Résultat" mais peut donc être mieux considéré comme un effet modificateur ou une exposition supplémentaire.

Notre étude nous a permis de déduire que le facteur de risque pour la survenue de ces malformations réside dans l'interaction entre les polymorphismes plutôt que dans l'effet individuel. Une perturbation métabolique chez les mères à risque de notre cohorte est observée et, est reflétée essentiellement par le taux de l'homocystéine. La présence d'une significativité statistique de l'influence des polymorphismes C677T de la MTHFR et A2756G de la MTR en association avec un statut folique faible montre un dysfonctionnement de la voie de reméthylation. L'étude supporte l'hypothèse selon laquelle l'hyperhomocystéinémie

est un état multifactoriel complexe dans lequel des facteurs génétiques et nutritionnels sont impliqués.

CONCLUSION

Notre étude vise à rechercher certains facteurs de risque génétiques et biochimiques pour une anomalie qui représente un véritable problème de santé publique. Elle a été menée sur une population d'enfants atteints d'AFTNs et aussi de mères, pour l'importance du statut nutritionnel et du génotype maternel. Ces derniers déterminent l'environnement auquel l'embryon est exposé dans les premiers stades du développement.

Pour ce faire, nous avons analysé les taux de certains paramètres biochimiques des métabolismes des folates / homocystéine ainsi que la fréquence de nombreux polymorphismes intervenant dans ces voies métaboliques. Nous avons étudié la contribution de ces polymorphismes dans l'étiologie des anomalies de fermeture du tube neural ainsi que leur influence sur les concentrations des folates et de l'homocystéine.

Les résultats de l'analyse biochimique réalisée au cours de ce travail viennent nous montrer que le statut folique des mères à risque est marqué par un taux de l'homocystéine élevé, et un taux des folates érythrocytaires qui reste inférieur comparé à la valeur établie comme marqueur pour la réduction du risque d'AFTNs.

L'étude des polymorphismes génétiques nous a montré que les variants AG et AA du polymorphisme G80A du gène RFC sont associés avec l'augmentation du risque chez les enfants.

Le polymorphisme C677T n'a pas présenté un risque indépendant dans notre population. Cependant, l'homozygotie de la mutation tendait à être augmentée chez les enfants, l'Odds ratio était de 2,43 (0,58-10,51), ce qui laisse supposer qu'elle peut participer à l'augmentation du risque de développement de ces anomalies. Toutefois, étant donné la taille limitée de notre échantillon, surtout après sa subdivision en sous-groupes, nos résultats ne permettent que des conclusions préliminaires.

Par ailleurs, nos résultats montrent qu'il n'y a pas d'élévation significative de la fréquence de l'allèle C de la mutation A1298C parmi les enfants atteints et les mères. Ce qui est en accord avec plusieurs résultats publiés antérieurement. Cependant, l'hétérozygotie de la mutation 1298AC tend à augmenter chez les enfants $OR=2,02(0,87-4,67)$ $p=0,07$, suggérant que ce génotype peut influencer le risque, mais agissant seul, ne représente pas une prédisposition majeure aux AFTNs. Son effet combiné avec la mutation C677T confère, par contre, un risque de survenue de ces anomalies dans notre population. L'étude statistique de l'interaction entre les deux polymorphismes nous a montré que la combinaison des génotypes hétérozygotes (MTHFR 677CT / 1298AC) augmente significativement le risque de 3,57 fois

pour les enfants atteints comparativement à la distribution des génotypes «sans risque» 677CC / 1298AA ($p < 0,05$).

Nos résultats appuient l'hypothèse selon laquelle la présence de deux polymorphismes au sein d'un même gène perturbe sa fonction de manière plus importante comparée à l'existence d'un seul polymorphisme.

Ces deux polymorphismes, au niveau du gène MTHFR, affectent le métabolisme de l'homocystéine chez les mères des enfants atteints. Nous avons observé que des concentrations de l'homocystéine plasmatique significativement élevées sont associées aux mutants du polymorphisme C677T chez les mères à risque. En effet, l'homocystéine présente une valeur plus élevée chez les mères homozygotes TT ($28,36 \pm 17,57 \mu\text{mol/l}$), comparé aux mères hétérozygotes CT avec un taux de ($14,89 \pm 9,03 \mu\text{mol /l}$) et les mères homozygotes CC pour qui le taux est de ($10,68 \pm 8,79 \mu\text{mol/l}$) ($p < 0,05$). De même, la mutation A1298C affecte le métabolisme de l'homocystéine conduisant à des concentrations de l'homocystéine plus élevées chez les mères de génotype AA ($17,67 \pm 13,17 \mu\text{mol/l}$) par rapport aux mères de génotype AC/CC ($8,71 \pm 4,5 \mu\text{mol /l}$) ($p < 0,05$).

En ce qui concerne le polymorphisme A2756G du gène de la MTR, bien que, son association avec le risque d'AFTNs semble être négative, nous avons pu constater qu'il réduisait le taux de folate érythrocytaire ($p < 0,05$) ce qui appuie sa contribution dans l'apparition des AFTNs dans notre population.

En résumé, ce qui est important à noter est l'existence d'une perturbation métabolique des folates et de l'homocystéine impliquant une interaction gène-aliments et gène-gène dans la survenue de ces malformations dans la population algérienne. L'ensemble de ces facteurs de risque maternel et foetal participent partiellement dans la détermination de la susceptibilité aux AFTNs et reflète l'origine multi-génique compliquée des AFTNs.

La limite de notre étude est la petite taille de son effectif. Celui-ci ne nous permet pas d'obtenir des résultats très significatifs. Cependant, il est intéressant de constater que nos résultats sont globalement cohérents avec l'ensemble des études publiées sur l'implication du métabolisme des folates et de l'homocystéine dans les AFTNs, et que les tendances observées dans notre étude reproduisent les résultats d'autres travaux obtenus avec des populations plus importantes.

Par ailleurs, l'un des points forts de ce travail est, notre accès aux taux maternels des folates et de l'homocystéine, en plus, de la période du prélèvement et du dosage (suite de couche). En Effet, la limite de plusieurs recherches est que les concentrations de ces métabolites ont été mesurées environ 10 ans après la naissance de l'enfant atteint. De ce fait, ils sont susceptibles d'être influencés par les habitudes alimentaires qui peuvent varier considérablement avec le temps.

PERSPECTIVES

L'implication individuelle d'une mutation dans la survenue de ces malformations est compliquée par l'existence d'un grand nombre de gènes candidats. Les études cas-témoins, incluant la nôtre, ont impliqué plusieurs gènes dans les métabolismes des folates et de l'homocystéine, cependant, ils ne participent qu'en partie dans l'étiologie des AFTNs.

La tendance actuelle est la volonté d'utilisation des outils avancés de bio-statistiques et de bio-informatiques qui facilitera l'analyse de toutes les études épidémiologiques réalisées afin de comprendre ces systèmes complexes.

Les perspectives de ce travail peuvent se décliner sous deux niveaux

En ce qui concerne la continuation de la recherche scientifique :

- ü Un élargissement de la taille de l'échantillon est nécessaire, afin de montrer l'effet interactif des mutations et des différents métabolites autres que l'acide folique.
- ü L'étude de l'interaction entre les génotypes parentaux et fœtaux est également d'une importance majeure. Les efforts dans ce domaine ont été limités par la difficulté de collecte des échantillons père- mère-enfant de tailles importantes.

Sur le plan profit médical :

- ü Un défi majeur reste à traduire les observations d'études dans un contexte clinique où un dépistage des gènes chez les femmes avant la grossesse est nécessaire, car il permet d'identifier la prédisposition. L'optimisme est de mise, du fait que l'alimentation est un élément sur lequel les possibilités d'intervention existent en termes de santé publique et de prévention.
- ü Le dosage de la concentration de l'hcya avant la conception, est aussi nécessaire. Le traitement de l'hyperhomocystéinémie avec l'acide folique et la vitamine B12 diminue de manière significative les niveaux d'homocystéine (Armitage, 2010) essentiellement chez les femmes enceintes (Mukhopadhyay et al., 2017).

- Û Dans notre population, une véritable politique de sensibilisation et de prévention par l'acide folique au profit des femmes est obligatoire, car la majorité des grossesses n'est pas planifiée. Peu de femmes sont supplémentées avant la conception.

- Û Par ailleurs, il existe une proportion des cas ($\approx 30\%$) qui résiste à la supplémentation par l'acide folique (Blencowe et al., 2010). Ce qui laisse penser qu'une prévention optimale des AFTNs nécessitera une combinaison d'interventions vitaminiques multiples (Greene et Copp, 2014).

RESUME

Etude de certains polymorphismes génétiques dans les métabolismes des folates et de l'homocystéine et anomalies de fermeture du tube neural

Résumé

Les anomalies de fermeture du tube neural (AFTNs) représentent une cause majeure de mortalité infantile parmi les malformations congénitales, dont la pathogénèse reste mal comprise. Dans la présente étude, réalisée sur une population algérienne de mères et d'enfants atteints, nous avons investigué la fréquence de nombreux polymorphismes intervenant dans les métabolismes des folates / homocystéine, leur possible contribution dans l'étiologie d'AFTNs ainsi que leur influence sur les concentrations des folates et de l'homocystéine.

Les mutations ont été déterminées par la méthode PCR/RFLP alors que le dosage des paramètres biochimiques a été réalisé par chimiluminescence.

L'analyse des polymorphismes génétiques a montré que les variants AG et AA du polymorphisme G80A du gène RFC sont associés avec l'augmentation du risque chez les enfants atteints.

Par ailleurs, nous avons observé que l'effet combiné des deux polymorphismes C677T et A1298C du gène de la MTHFR confère un risque de survenue de ces anomalies dans notre population. L'étude statistique de l'interaction entre les deux polymorphismes a montré que la combinaison des génotypes hétérozygotes (MTHFR 677CT / 1298AC) augmente le risque d'avoir une AFTN chez les enfants ($p < 0,05$).

Ces deux polymorphismes, au niveau du gène MTHFR, affectent le métabolisme de l'homocystéine chez les mères des enfants atteints conduisant à des concentrations de l'homocystéine élevées chez les mères de génotype TT pour le polymorphisme C677T ($p < 0,05$) et celles de génotype AA pour le polymorphisme A1298C ($p < 0,05$).

Quant au polymorphisme A2756G du gène de la MTR, bien que, son association avec le risque d'AFTNs semble être négative, il a été constaté qu'il réduisait le taux de folate érythrocytaire ce qui appuie sa contribution dans l'apparition des AFTNs dans notre population ($p < 0,05$).

Nos données sur l'association entre les polymorphismes A66G du gène de la MTRR et 844ins68 dans le gène de la CBS et les taux des métabolites ainsi que la relation entre ces mutations et le risque d'AFTNs ne sont pas concluantes.

Cette étude originale par sa primauté en Algérie mais aussi en Afrique aussi bien au niveau de la diversité des polymorphismes examinés que la nature de la population (enfants atteints) mérite d'être poursuivie dans le futur via l'élargissement de la taille de l'échantillon. Ceci permettrait de montrer l'effet interactif des mutations sur l'occurrence des AFTNs et sur les taux des métabolites.

Mots clés : Polymorphismes MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G, RFC A80G, CBS 844ins68, AFTN, FOLATE, HOMOCYSTEINE.

Study of certain genetic polymorphisms of folates and homocysteine metabolisms and neural tube defects

Abstract

Neural tube defects (NTDs) represent a major cause of infant mortality among congenital malformations, whose pathogenesis remains poorly understood. In this study realized on an algerian population of affected children and their mothers, we investigated the frequency of many polymorphisms involved in the of folates / homocysteine metabolisms, Their possible contribution in the etiology of NTDs, as well as their influence on folates and homocysteine concentrations.

The mutations were determined by the PCR / RFLP method, the assay of the biochemical parameters was performed by chemiluminescence.

The analysis of genetic polymorphisms has shown that AG and AA variants of the G80A polymorphism of the RFC gene are associated with the increased risk in affected children.

Moreover, we have observed that the combined effect of C677T and A1298C polymorphisms in MTHFR gene, confers a risk for the occurrence of these abnormalities in our population .Indeed, statistical test of interaction between the two polymorphisms have shown that the combination of heterozygous genotypes(MTHFR 677CT/1298AC) elevate the risk in NTD cases (p <0.05).

These two polymorphisms ,in MTHFR gene, affects homocysteine metabolism in mothers of NTD cases leading to homocysteine concentration values higher in mothers with TT genotype of the C677T (p < 0.05) and that of AA genotype for the polymorphism A1298C (p <0.05).

For the polymorphism A2756G of the MTR gene, Although, Its association with NTDs risk appears to be negative, It was found to decrease the RBC folate level strengthen the contribution of A2756G mutation in NTDs occurrence (p <0.05).

Data on the association between MTRR A66G, CBS 844ins68 polymorphisms and plasma homocysteine and serum/RBC folate concentrations as well as the relationship between this polymorphisms and NTDs risk are inconclusive.

This original study by its primacy in Algeria and also in North Africa, both in terms of the diversity of polymorphisms examined and the nature of the population (children affected) deserves, encourages the extension of the study to a larger sample In order to show the interactive effect of these mutations on the occurrence of NTDs and on the rate of metabolites.

Key words:

Polymorphisms MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G, RFC A80G, CBS 844ins68, NTD, FOLATE, HOMOCYSTEINE.

دراسة بعض الطفرات الوراثية المتعلقة بالتمثيل الغذائي لحمض الفوليك والهوموسستين وعلاقتها بالتشوهات الخلقية لانغلاق الأنبوب العصبي

ملخص :

تعتبر عيوب انغلاق الأنبوب العصبي سببا رئيسيا في وفاة الأطفال من بين التشوهات الخلقية و التي يبقى سبب حدوثها غير محدد. في هذه الدراسة التي أجريت على عينة جزائرية من الأمهات والأطفال الجزائر بين المصابين بطفرة التشوه الخلقي لانغلاق الأنبوب العصبي ، قمنا بالبحث عن نسبة العديد من الطفرات المتدخلة في التمثيل الغذائي لحمض الفوليك/ هوموسستين وإمكانية تسببها بظهور العيوب سالفة الذكر ،بالإضافة إلى مدى تأثيرها على تركيز حمض الفوليك والهوموسستين.

البحث عن الطفرات تم بتقنية PCR/RFLP أما التحاليل الكيميائية فقد تم الكشف عنها بواسطة تقنية chimiluminescence

نتائج المتغيرين AG و AA للطفرة G 80A في المورثة RFC تبين أن لهما علاقة مع ارتفاع الخطر عند الأطفال

من جهة أخرى، تواجد الطفرتين C667T و A1298C على المورث MTHFR في أن واحد يؤثر كثيرا على ظهور العيوب المتعلقة بانغلاق الأنبوب العصبي لدى عينتنا. دراستنا الإحصائية أثبتت أن اجتماع الطفرتين على شكل هيتيروزيجوت يزيد من خطر الإصابة عند الأطفال.

هذه الطفرتين المتواجدتين على المورث MTHFR تؤثر على استقلاب الحمض الأميني هوموسستين عند الأمهات ذوات الأطفال المتضررين ، مما يؤدي إلى ارتفاع مستويات الحمض الأميني عند الأمهات TT بالنسبة للطفرة C667T وعند الأمهات AA بالنسبة للطفرة A1298C.

فيما يخص الطفرة A2756G المتواجدة في المورثة MTR ، فإنه على الرغم من تأثيرها على حدوث تلك العيوب يبدو سلبيا، إلا أنها تسببت في انخفاض مستويات حمض الفوليك في الكريات الدموية الحمراء، الشيء الذي يؤكد مساهمتها الفعالة في ظهور العيوب.

أما بالنسبة للطفرات A66G في المورثة MTRR ، 844ins68 في المورثة CBS ، فإنه لم يتم ملاحظة أي تأثير ملموس لها على مستويات حمض الفوليك والهوموسستين، وأيضا على ارتفاع نسبة ظهور العيوب.

نظرا لأهمية هذه الدراسة، بحيث أنها كانت السبابة والفريدة من نوعها في الجزائر وشمال إفريقيا، فإن توسيع العينة سيتم من دراسة هذه الطفرات الخطيرة بشكل أدق والمساهمة في الحد منها.

الكلمات المفتاحية :

الطفرات المتعددة ، MTHFR C677T ، MTHFR A1298C ، MTR A2756G ، MTRR A66G ، RFC ، CBS 844ins68، A80 التشوهات الخلقية لانغلاق الأنبوب العصبي ، حمض الفوليك، هوموسستين

ANNEXES

Annexe 1 : Questionnaire***Mère***

Nom :

Prénom :

Age :

Adresse :

Origine ethnique :

Consanguinité : Non Oui : (degré)

Antécédents personnels (AFTN) : Non Oui :Type/

Antécédents familiaux (AFTN) : Non Oui :Sujet/ Type/

Troubles sphinctériens : Fratrie : Non Oui Mère : Non Oui

Pathologies maternelles :

Epilepsie :Non Oui

Diabète : Non Oui

Cardiopathie :Non Oui

HTA :Non Oui

Anémie :Non Oui

Prise médicamenteuse : Avant conception :

Pendant grossesse : Durant période de prélèvement :

Pathologies paternelles :Non Oui :Type Alcool / Tabac :Non Oui

Contraceptifs :Non Oui

Poids :

Accouchement : à terme Prématuré Post mature Avortements :

Enfants

Nom :

Prénom :

Age :

Diagnostic :

Malformations associées :

Annexe 02

Tableau 01 : Les moyennes des folates sériques et érythrocytaire et de l'homocystéine chez les mères d'enfants atteint d'AFTN selon des études de la littérature

Métabolites	Mères	Témoins	n mères / n Témoins	P	Référence
Folate sérique					
nmol/l	14 ± 5	14 ± 4	41/50	NS	Steegers et al. (1994)
nmol/l	12,5 (6,4–52,0)	14,0 (6,6–2,4)	60/94	NS	Van der put et al. (1997b)
nmol/l	12,6 (4,2-27,0)	13,3(7,0-30,4)	43/82	NS	Groenen et al. (2004)
nmol/l	8,38 ± 3,23	10,57 ± 8,83	32/36	NS	Wang et al. (2010)
nmol/l	27,1 (14,1–56,0)	35,0 (17,1–58,0)	303/676	NS	Godbole et al. (2011)
µg/l	9,7 ± 8,1	15,0 ± 8,1	30/60	p < 0,001	Gu et al. (2012)
Folate érythrocytaire					
nmol/l	558±194	558±194	41/50	NS	Steegers et al. (1994)
nmol/l	540 (280–1200)	520 (280–1000)	57/72	NS	Van der put et al. (1997b)
nmol/l	615 (146-472)	637(352-1388)	40/83	NS	Groenen et al. (2004)
ng/ml	145,5 ± 66,4	197,6 ± 119,9	35/24	NS	Ratan et al. (2008)
Homocystéine					
µmol/l	11,2 ±4,0	9,8±2,6	41/50	p < 0,05	Steegers et al. (1994)
µmol/l	12,5 [4,0–20,7]	10,1 [6,4–23,0]	63/95	p < 0,001	Van der put et al. (1997b)
µmol/l	15,21 ± 7,30	12,09 ± 7,33	32/36	0,068	Wang et al. (2010)
µmol/l	10,5 (7,3–14,6)	10,2 (7,7–14,1)	309/689	0,026	Godbole et al. (2011)
µmol/l	15,1 ± 7,8	8,5 ± 4,0	30/60	p < 0,001	Gu et al. (2012)

Tableau02: Fréquences du variant mutant G80A et risque d'AFTNs à travers le monde

Population	Personnes examinés	Nbre	Fréquence GG%	Fréquence G	Association significative ?	Référence
Italie	Enfants	174	--	--	Oui	De Marco et al. (2003)
	Mères	43	--	--	Oui	
	Contrôles	156	--	--		
Irlande	Enfants	264	27	52	Non	O'leary et al. (2006)
	Mères	264	30	52,5	Non	
	Contrôles	381	26	49,5		
Chine	Mères	38	13	47	Oui	Shang et al. (2008)
	Contrôles	80	4	32		
Chine	Enfants	104	44,9	67,35	Oui	Pei et al. (2009)
	Mères	99	33,33	63,44	Oui	
	Contrôles P	99	29,41	53,67		
	Contrôles M	100	29,41	54,41		
Etats Unis d'Amérique	Enfants	132	28	50,35	Non	Shaw et al. (2002)
	Contrôles	188	29,3	51,65		
Canada	Mères	56	36	56,5	Non	Morin et al. (2003)
	Contrôles	87	24	51		
Algérie	Enfants	48	6,25	41	Non	Présente étude
	Mères	38	15,79	46	Non	
	Contrôles	67	22,39	49		

Tableau03 : Fréquences du variant mutant C677T et risque d'AFTNs à travers le monde

Population	Personnes examinés	Nbre	Fréquence TT %	Fréquence T%	Association significative ?	Référence
Hollande	Enfants	55	13	36,4	Oui	Van der Put et al. (1995)
	Mères	70	16	35	Oui	
	Contrôles	207	5	25,6		
Royaume uni	Mères	19	11	36	Non	Lucock et al. (2000)
	Contrôles	31	10	34		
Pologne	Enfants	34	10	34	Oui	Pietrzyk et al. (2003)
	Mères	34	8,33	24	Oui	
	Contrôles	100	6	25		
Irlande	Enfants	395	18,5	40,13	Oui	Kirke et al. (2004)
	Contrôles	848	9,8	29		
Royaume uni	Enfants	200	15	34,5	Oui	Relton et al. (2004b)
	Mères	186	11,8	32,8	Non	
	Contrôles P	578	11,1	32,4		
	Contrôles M	512	13,1	37,9		
Sud de l'Italie	Enfants	40	5	28,8	Effet protecteur	Guéant-Rodriguez et al. (2003)
	Contrôles	58	24,1	49,2		
Sud de l'Italie	Enfants	15	26,7	63,3	Oui	Grandone et al. (2006)
	Mères	57	21,1	51,8	Non	
	Contrôles	143	18,2	45,8		
France	Mères	77	15,6	41,5	Non	Candito et al. (2008)
	Contrôles	61	9,9	33,6		
Turquie	Mères	29	20,7	44,8	Oui	Cyhan et al. (2008)
	Contrôles	35	8,6	25,7		
Royaume uni	Enfants	287	9,05	32,92	Effet protecteur	Doudney et al. (2009)
	Contrôles	187	15	37,96		
Slovaquie	Mères	54	9,3	21,7	Non	Behunova et al. (2010)
	Contrôles	143	9,8	21,7		
Espagne	Mères	52	--	51,92	Oui	Morales de machin et al. (2015)
	Contrôles	119	--	34,45		
Turquie	Mères	35	8,57	31,12	Non	Aydin et al. (2016)
	Contrôles	40	7,5	33,8		
Chine	Mères	38	10	37	Non	Shang et al. (2008)
	Contrôles	80	21	45		
Inde	Mères	50	12	23	Oui	Naushad et Devi (2010)
	Contrôles	80	0	10		
Inde	Mères	305	1,6	11,75	Non	Godbol et al. (2011)
	Contrôles	684	0,7	12,25		
Chine	Enfants	269	13	37,2	Effet protecteur	Yu et al. (2014)
	Contrôles	189	20,6	46,6		

Canada	Enfants	56	20	43	Non	Christensen et al. (1999)
	Mères	62	18	40	Non	
	Contrôles P	97	11	34		
	Contrôles M	90	11	31		
Etats unis	Enfants	82	11	--	Oui	Johanning et al. (2000)
	Contrôles	76	3	--		
Texas	Enfants	24	16,66	52	Non	Barber et al. (2000)
	Contrôles	93	15,05	47,3		
Canada	Mères	62	17,74	40	Non	Arbour et al. (2002)
	Contrôles	90	11,11	31		
Brésil	Enfants	25	4	24	Non	Cunha et al. (2002)
	Mères	21	0	14,3	Non	
	Contrôles	75	7	25,3		
Brésil	Enfants	41	14,63	34,14	Non	Félix et al. (2004)
	Mères	41	17,07	35,4	Non	
	Contrôles P	44	15,9	34,1		
	Contrôles M	44	13,36	38,6		
Mexique	Mères	118	42,37	65,25	Oui	Munoz et al. (2007)
	Contrôles	112	26,79	52,23		
Afrique du sud	Mères	53	0	10,38	Non	Ubbink et al. (1999)
	Contrôles	54	0	10,18		
Algérie	Mères	92	16	39	Non	Houcher et al. (2009)
	Contrôles	82	17	38		
Algérie	Enfants	48	14,58	38	Non	Présente étude
	Mères	38	13,16	33	Non	
	Contrôles	67	7,46	29		

Tableau04 : Fréquences du variant mutant A1298C et risque d'AFTNs à travers le monde

Population	Personnes examinés	Nbre	Fréquence CC%	Fréquence C%	Association significative ?	Référence
Italie	Enfants	98	14,3	39	Oui	De Marco et al. (2002)
	Mères	98	21,4	44	Oui	
	Contrôles	202	5,9	25		
Royaume uni	Enfants	194	11,9	32,5	Non	Relton et al. (2004b)
	Mères	185	11,9	34,3	Non	
	Contrôles P	584	12	32,1		
	Contrôles M	522	12,3	34,9		
Sud de l'Italie	Enfants	40	--	30	Non	Guéant-Rodriguez et al. (2003)
	Contrôles	58	--	43,1		
Sud de l'Italie	Enfants	15	0	23,3	Non	Grandone et al.(2006)
	Mères	57	3,5	24,6	Non	
	Contrôles	143	7,7	31,8		
France	Mères	77	7,8	23,4	Effet protecteur	Candito et al. (2008)
	Contrôles	61	14,7	36,9		
Royaume uni	Enfants	273	9,15	31,31	Non	Doudney et al. (2009)
	Contrôles	176	10,79	30,11		
Slovaquie	Mères	54	3,7	31,5	Non	Behunova et al. (2010)
	Contrôles	143	11,9	30,6		
Turquie	Mères	35	11,4	32,85	Non	Aydin et al.(2016)
	Contrôles	40	16,7	40,3		
Inde	Mères	83	6	30	Non	Dallal et al. (2007)
	Contrôles	60	12	39		
Inde	Mères	50	6	31	Non	Naushad et al. (2010)
	Contrôles	80	17,5	42,5		
Inde	Mères	300	14	38	Effet Protecteur	Godbole et al. (2011)
	Contrôles	675	18,8	43		
Brésil	Enfants	25	4	24	Oui	Cunha et al. (2002)
	Mères	21	0	14,3	Non	
	Contrôles	75	7	25,3		
Mexique	Mères	92	5,43	16,85	Non	Munoz et al. (2007)
	Contrôles	80	11,25	23,75		
Algérie	Enfants	48	0	24	Non	Présente étude
	Mères	38	2,63	20	Non	
	Contrôles	67	0	16		

Tableau05: Fréquences du variant mutant A2756G et risque d'AFTNs à travers le monde

Population	Personnes examinés	Nbre	Fréquence GG%	Fréquence G%	Association significative ?	Référence
Royaume uni	Mères	19	0	16	Non	Lucock et al. (2000)
	Contrôles	31	16	24		
Italie	Enfants	203	1,1	11	Non	DeMarco et al. (2002)
	Mères	98	5,3	11	Non	
	Contrôles	210	0,5	15		
Irlande	Enfants	382	4	21,5	Non	O'Leary et al. (2005)
	Mères	386	5	22,5	Non	
	Contrôles	487	4	20		
Sud de l'Italie	Enfants	40	--	21,3	Oui	Guéant-Rodriguez et al. (2003)
	Contrôles	58	--	11,2		
France	Mères	77	2,6	15,6	Non	Candito et al. (2008)
	Contrôles	61	6,5	20,5		
Royaume uni	Enfants	231	3,46	19,91	Non	Doudney et al. (2009)
	Contrôles	188	5,32	21,27		
Chine	Enfants	165	9,09	28,4	Oui	Wang et al. (2015)
	Contrôles	280	5,35	21,6		
Canada	Enfants	55	0	15	Non	Christensen et al.(1999)
	Mères	61	2	18	Non	
	Contrôles P	97	10	25		
	Contrôles M	90	1	20		
Etats Unis d'Amérique	Enfants	77	0	--	Non	Johanning et al. (2000)
	Contrôles	84	1	--		
Texas	Enfants	43	37,2	--	Non	Zhu et al. (2003)
	Mères	122	36	--	Non	
	Contrôles P	124	24,2	--		
	Contrôles M	127	33	--		
Jordanie (Nord)	Mères	17	0	17,64	Non	Al Farra et al. (2010)
	Contrôles	234	2,13	9,61		
Algérie	Enfants	48	2,08	10	Non	Présente étude
	Mères	38	0	11	Non	
	Contrôles	67	0	13		

Tableau06 : Fréquences du variant mutant A66G et risque d'AFTNs à travers le monde

Population	Personnes examinés	Nbre	Fréquence GG%	Fréquence G%	Association significative ?	Référence
Pologne	Enfants	70	14,29	33	Oui	Pietrzyk et al. (2003)
	Mères	72	13,89	35	Oui	
	Contrôles	100	5	20		
Royaume uni	Enfants	201	26,4	57,5	Effet protecteur	Relton et al. (2004b)
	Mères	203	33,5	59,9	Non	
	Contrôles P	601	51,2	73,3		
	Contrôles M	532	39,7	64,4		
Irlande	Enfants	470	17	42,5	Non	O'Leary et al. (2005)
	Mères	447	19	43	Non	
	Contrôles	476	16	39,5		
France	Mères	77	28,6	53,9	Non	Candito et al. (2008)
	Contrôles	61	22,9	43,4		
Royaume uni	Enfants	263	31,55	53,61	Oui	Doudney et al. (2009)
	Contrôles	184	23,91	50,81		
Chine	Enfants	165	17,5	41,15	Oui	Wang et al. (2015)
	Contrôles	280	12,8	37,67		
Inde	Mères	50	34	67	Non	Naushad et Devi (2010)
	Contrôles	80	35	67,5		
Canda	Enfants	56	34	59	Non	Wilson et al. (1999)
	Mères	58	36	59,5	Non	
	Contrôles P	97	30	52,5		
	Contrôles M	89	26	50,5		
Etats Unis d'Amérique	Enfants	43	11,4	--	Non	Zhu et al. (2003)
	Mères	122	73	--	Non	
	Contrôles P	124	9,7	--		
	Contrôles M	127	56	--		
Algérie	Enfants	48	6,25	32	Non	Présente étude
	Mères	38	21,05	47	Non	
	Contrôles	67	13,43	46		

Tableau07 : Fréquences du variant mutant CBSins68 et risque d'AFTNs à travers le monde

Population	Personnes examinés	Nbre	Fréquence MM%	Fréquence M%	Association significative ?	Référence
Royaume uni	Enfants	45	4,4	9	Non	Morrison et al. (1998)
	Mères	36	0	8	Non	
	Contrôles	75	1,3	7		
Pays Bas	Enfants	31	0	8	Non	Morrison et al. (1998)
	Mères	29	0	9	Non	
	Contrôles	75	0	11		
Royaume uni	Enfants	207	1	8,5	Non	Relton et al. (2004b)
	Mères	201	0,5	9,7	Non	
	Contrôles P	601	0,7	7,4		
	Contrôles M	542	0,9	8,4		
Etats Unis d'Amérique	Enfants	111	--	13,1	Non	Speer et al. (1999)
	Mères	127	--	11,4	Non	
	Contrôles	129	--	9,7		
Algérie	Mères	51	1	19,5	Non	Houcher et al. (2009)
	Contrôles	85	6	12,5		
Algérie	Enfants	48	2,08	7	Non	Présente étude
	Mères	38	0	8	Non	
	Contrôles	67	2,9	15		

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Abbas A., Abadi N., Naimi D., Sifi K., Benlatreche C. Mutation C677T research in gene coding for methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) in neural tube defects (NTDs) in Constantine. *IBS* 2012; 27:122-127.

Abbas A., Sifi K., Naimi D., Benmebarek K., Abadi N. Genetic Polymorphisms in Methionine Synthase and Methionine Synthase Reductase, their Metabolic Effects, and Risk of Neural Tube Defects in Algerian Population. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2016; 40(2): 238-244.

Abdel-Aleem A.K., Abdel-Salam G.M., Kayed H.F., Zaki M.S. C677T Polymorphism of the 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene As a Risk Factor For Neural Tube Defects Among Egyptian Families. *EJMHG* 2006; 7(2):139-153.

Abdessemed S., Hambaba L., Rodriguez- Gueant RM., Payet C., Philippe G., Laroui S., et al. Contribution des facteurs génétiques et nutritionnels dans les Hyperhomocystéinémies dans la population algérienne saine. *Nutr Clin Metabol* 2009; 23 : 50-54.

Abdollahi Z., Elmadfa I., Djazayery A., Golalipour M.J., Sadighi J., Sadeghian S., et al. Efficacy of Flour Fortification with Folic Acid in Women of Childbearing Age in Iran. *Ann Nutr Metab* 2011; 58:188-196.

Achon M., Alonso-Aperte E., Varela-Moreiras G., Selhub J. Mild methionine excess does not affect thymidylate synthesis or inflammation markers expression in human aortic endothelial cells. *Ann Nutr Metab* 2009; 54: 28-34.

Afifi H.H., Thomas M.M., Amr K.S., Eid M.M., Tosson A.M.S. Maternal Folate Gene Polymorphisms as Risk Factors for Down Syndrome in Egypt. *Med J Cairo Univ* 2014; 82 (1): 907-916.

Afman L.A., Blom H.J., Driittij M.J., Brouns M.R., van Straaten H.W. Inhibition of transmethylation disturbs neurulation in chick embryos. *Brain Res Dev Brain Res* 2005; 158:59-65.

Afman L.A., Blom H.J., Van Der Put N.M.J., Van Straaten H.W.M. Homocysteine interference in neurulation: A chick embryo model. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2003; 67: 421-428.

Allache R., Wang M., De Marco P., Merello E., Capra V., Kibar Z. Genetic studies of ANKRD6 as a molecular switch between Wnt signaling pathways in human neural tube defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2015; 103(1):20-6.

Al Farra H.Y. Methionine synthase polymorphisms (MTR 2756 A>G and MTR 2758 C>G) frequencies and distribution in the Jordanian population and their correlation with neural tube defects in the population of the northern part of Jordan. *Indian J Hum Genet* 2010; 16: 138-143.

Al-Gazali L.I., Padmanabhan R., Melnyk S. Yi P., Pogribny I.P., Pogribna M., Bakir M., et al. Abnormal folate metabolism and genetic polymorphism of the folate pathway in a child with Down syndrome and neural tube defect. *Am J Med Genet* 2001; 103:128-132.

Amarin Z.O., Obeidat Z. Effect of folic acid fortification on the incidence of neural tube defects. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2010; 24:349-351.

Amorim M.R., Lima M.A., Castilla E.E., Orioli I.M. Non-Latin European descent could be a requirement for association of NTDs and MTHFR variant 677C → T: A meta-analysis. *Am J Med Genet A* 2007; 143A:1726–32.

Antony A.C. The biological chemistry of folate receptors. *Blood* 1992; 79:2807–2820.

Arbour L., Christensen B., Delormier T., Platt R., Gilfix B., Forbes P. Spina bifida, Folate metabolism, and dietary folate intake in a northern Canadian aboriginal population. *Int J Circumpolar Health* 2002 ; 61.

Arth A., Kancherla V., Pachon H., Zimmerman S., Johnson Q., Oakley G.P.Jr. A 2015 global update on folic acid-preventable spina bifida and anencephaly. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2016; 106: 520–529.

Aydin H., Arisoy R., Karaman R., Erdogan E., Cetinka A., Geckinli BB. Evaluation of maternal serum folate, vitamin B12, and homocysteine levels and factor V Leiden, factor II g.20210G>A, and MTHFR variations in prenatally diagnosed neural tube defects. *Turk J Med Sci* 2016; 46:489-494.

Barber R.C., Shalat S., Hendricks K., Joggerst B., Larsen R., Suarez L., et al. Investigation of folate pathway gene polymorphisms and the incidence of neural tube defects in a Texas hispanic population. *Mol Genet Metab* 2000; 70: 45-52.

Barber R.C., Lammer E.J., Shaw G.M., Greer K.A., Finnell R.H. The role of folate transport and metabolism in neural tube defect risk. *Mol Genet Metab* 1999; 66:1–9.

Barbosa P.R., Stabler S.P., Machado A.L., Braga R.C., Hirata R.D., Hirata M.H. Association between decreased vitamin levels and MTHFR, MTR and MTRR gene polymorphisms as determinants for elevated total homocysteine concentrations in pregnant women. *Eur J Clin Nutr* 2008; 62: 1010-1021.

Beaudin A.E., Abarinov E.V., Malysheva O., Perry C.A., Caudill M., Stover P.J. Dietary folate, but not choline, modifies neural tube defect risk in SHMT1 knockout mice. *Am J Clin Nutr* 2012; 95: 109–114.

Beaudin A.E., Abarinov E.V., Noden D.M., Perry C.A., Chu S., Stabler S.P. SHMT1 and de novo thymidylate biosynthesis underlie folate-responsive neural tube defects in mice. *Am J Clin Nutr* 2011; 93: 789–798.

Beaudin A.E., Stover P.J. Folate-mediated one-carbon metabolism and neural tube defects: balancing genome synthesis and gene expression. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2007; 81:183–203.

Behunova J., Klimcakova L., Zavadilikova E., Podracka L., Potocekova D. Methylene tetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms and Neural Tube Defects Epidemiology in the Slovak Population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010; 88:695-700.

Bestwick J.P., Huttly W.J., Morris J.K., Wald N.J. Prevention of neural tube defects: A cross-sectional study of the uptake of folic acid supplementation in nearly half a million women. *PLoS ONE* 2014; 9.

- Biselli P.M., Guerzoni A.R., de Godoy M.F., Eberlin M.N., Haddad R., Carvalho V.M.** Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and concentrations of methylmalonic acid and folate on plasma homocysteine and risk of coronary artery disease. *J Thromb Thrombolysis* 2010; 29: 32.
- Blacher J., Czernichow S., Horellou M.H., Conard J., David P., Chadeaux-Vekemans B.** Homocystéine, acide folique, vitamines du groupe B, et risque cardiovasculaire. *Arch Mal Cœur Vaiss* 2005; 98: 145-152.
- Blencowe H., Cousens S., Modell B., Lawn J.** Folic acid to reduce neonatal mortality from neural tube disorders. *Int J Epidemiol* 2010; 39(1):i110– i121.
- Blom H.J., Shaw G.M., den Heijer M., Finnell R.H.** Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7:724-731.
- Boduroglu K.** Analysis of MTHFR 1298A>C in addition to MTHFR 677C>T polymorphism as a risk factor for neural tube defects in the Turkish population. *Turk J Pediatr* 2005; 47: 327-333.
- Botto L.D., Moore C.A., Khoury M.J., Erickson J.D.** Neural-tube defects. *N Engl J Med* 1999; 341: 1509–1519
- Botto L.D., Yang Q.** 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 862-77.
- Botto N., Andreassi M.G., Manfredi S., Masetti S., Cocci F., Colombo M.G.** Genetic polymorphisms in folate and homocysteine metabolism as risk factors for DNA damage. *Eur J Hum Genet* 2003; 11:671–78.
- Brody T., Shane B.** Folic Acid. In: Rucker R. *Handbook of Vitamins*. Ed: Marcel Dekker, New York, USA. 2001; p 427–462.
- Brouns R., Ursem N., Lindemans J., Hop W., Pluijm S., Steegers E.** Polymorphisms in genes related to folate and cobalamin metabolism and the associations with complex birth defects. *Prenat Diagn* 2008; 28:485–493.
- Cabaret A.S.** Troubles de fermeture du tube neural : Etiopathogénie et Facteurs pronostiques. Thèse en vue du diplôme d'état de docteur en médecine .Université de Rennes I Faculté de médecine. 2004.
- Candito M., Rivet R., Herbeth B., Boisson C., Rudigoz R.C., Luton D., et al.** Nutritional and genetic determinants of vitamin B and homocysteine metabolisms in neural tube defects: a multicenter case-control study. *Am J Med Genet A*. 2008; 146 (9):1128-1133.
- Carter T.C., Pangilinan F., Troendle J.F., Molloy A.M., Vander Meer J., Mitchell A., et al.** Evaluation of 64 candidate single nucleotide polymorphisms as risk factors for neural tube defects in a large Irish study population. *Am J Med Genet A* 2011; 155A: 14-21.
- Castillo-Lancellotti C., Tur J.A., Uauy R.** Impact of folic acid fortification of flour on neural tube defects: a systematic review. *Public Health Nutr* 2013; 16:901-911.

Castro R., Rivera I., Ravasco P., Jacob C., Blom H.J., Camilo M.E et al. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T and 1298A-->C mutations are genetic determinants of elevated homocysteine. *QJM* 2003; 96(4):297-303.

Castro R., Rivera I., Ravasco P., Camilo M.E., Jakobs C., Blom H.J., de Almeida I.T. 5,10 - methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C-->T and 1298A-->C mutations are associated with DNA hypomethylation. *J Med Genet* 2004; 41:454–8.

Cech I., Burau K.D. Serological differences in folate/ vitamin B12 in pregnancies affected by neural tube defects. *South Med J* 2010; 103: 419–424.

Czeizel AE. Definition, classification, prevalence and economic burden of neural tube defects. *Gynaecol Forum* 2010; 15: 9–12.

Chandler C.J., Harrison D.A., Buffington C.A., Santiago N.A., Halsted C.H. Functional specificity of jejunal brush-border pteroylpolyglutamate hydrolase in pig. *Am J Physiol* 1991; 260: G865-G872

Chang H., Zhang T., Zhang Z., Bao R., Fu C., Wang Z., et al. Tissue-specific distribution of aberrant DNA methylation associated with maternal low-folate status in human neural tube defects. *J Nut Biochem* 2011; 22: 1172–1177.

Chang M., Lindegren M.L., Butler M.A., et al. Prevalence in the United States of selected candidate gene variants. Third national health and nutrition examination survey 1991–1994. *Am J Epidemiol* 2010; 169:54–66.

Chango A., Emery N., Barbé F., Pfister M., Nicolas J.P., Chanock S.J., et al. Les transporteurs des folates : analyse génétique et relation avec l'homocystéine plasmatique chez le sujet sain. *Ann Biol Clin* 2000a ; 58 : 215.

Chango A., Emery-Fillon N., de Courcy GP., Lambert D., Pfister M., Rosenblatt DS., et al. A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol Genet Metab* 2000b;70(4):310-315.

Chango A., Parrot-Roulaud F., Nicolas J.P. Génétique moléculaire de la reméthylation de l'homocystéine. *Ann Biol Clin* 1999; 57: 37-42.

Chen L.H., Liu M.L., Hwang H.Y., Chen L.S., Korenberg J., Shane B. Human methionine synthase. cDNA cloning, gene localization, and expression. *J Biol Chem* 1997; 272: 3628-3634.

Choi S.W., Friso S., Ghandour H., Bagley P.J., Selhub J., Mason J.B. Vitamin B-12 deficiency induces anomalies of base substitution and methylation in the DNA of rat colonic epithelium. *J Nutr* 2004; 134:750-755.

Choi S.W., Mason J.B. Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *J Nutr* 2002; 132: 2413S– 2418S.

Christensen B., Arbour L., Tran P., Rozen R. Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. *Am J Med Genet* 1999; 84:151-157.

Christensen K.E., Deng L., Leung K.Y., Arning E., Bottiglieri T., Malysheva O.V., et al. A novel mouse model for genetic variation in 10-formyltetrahydrofolate synthetase exhibits disturbed purine synthesis with impacts on pregnancy and embryonic development. *Hum Mol Genet* 2013; 22: 3705–3719.

Christensen K.E., Rozen R. Genetic Variation Effect on Folate Metabolism and Health. In: *Folate in Health and Disease*. Bailey L.B. 2nd edition. Taylor and Francis Group, LLC. ISBN 978-1-4200-7124-5. 2010.

Crider K.S., Devine O., Hao L., Dowling N.F., Li S., Molloy A.M., et al. Population red blood cell folate concentrations for prevention of neural tube defects: Bayesian model. *BMJ* 2014; 29:g4554.

Crider K.S., Yang T.P., Berry R.J., Bailey L.B. Folate and DNA Methylation: A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate's Role. *Adv Nutr* 2012; 3(1): 21–38.

Coelho C.N., Klein N.W. Methionine and neural tube closure in cultured rat embryos: morphological and biochemical analyses. *Teratology* 1990; 42:437-451

Copp A.J., Greene N.D. Genetics and development of neural tube defects. *J Pathol* 2010; 220:217–30.

Copp A.J., Stanier P., Greene N.D.E. Neural tube defects: recent advances, unsolved questions, and controversies. *Lancet Neurol* 2013; 12: 799-810.

Corona G., Giannini F., Fabris M., Toffoli G., Boiocchi M. Role of folate receptor and reduced folate carrier in the transport of 5-methyltetrahydrofolic acid in human ovarian carcinoma cells. *Int J Cancer* 1998; 75:125–133.

Creasy M.R., Alberman E.D. Congenital malformations of the central nervous system in spontaneous abortions. *J Med Genet* 1976; 13: 9–16.

Cunha A.L., Hirata M.H., Kim C.A., Guerra-Shinohara E.M., Nonoyama K., Hirata R.D. Metabolic effects of C677T and A1298C mutations at the MTHFR gene in Brazilian children with neural tube defects. *Clin Chim Acta* 2002; 318:139-43.

Ceyhan S.T., Beyan C., Bahce M., Baser I., Kaptan K., Ifran A., et al. Thrombophilia-associated gene mutations in women with pregnancies complicated by fetal neural tube defects. *Int J Gynaecol Obstet* 2008; 101(2):188–189

Czeizel A.E., Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992; 327: 1832-1835.

Dalal A., Pradhan M., Tiwari D., Behari S., Singh U., Mallik G.K., et al. MTHFR 677C–>T and 1298A–>C polymorphisms: evaluation of maternal genotypic risk and association with level of neural tube defect. *Gynecol Obstet Invest* 2007; 63(3):146–150

Daly S., Scott J.M. The prevention of neural tube defects. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1998 ; 10(2) :85-89.

Daly L.E., Kirke P.N., Molloy A., Weir D.G., Scott J.M. Folate levels and neural tube defects: Implications for prevention. *JAMA* 1995; 274(21):1698-702.

- Davis S.R., Quinlivan E.P., Shelnutt K.P., Maneval D.R., Ghandour H., Capdevila A., et al.** The methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T polymorphism and dietary folate restriction affect plasma one-carbon metabolites and red blood cell folate concentrations and distribution in women. *J Nutr* 2005; 135:1040–1044.
- De Marco P., Calevo M.G., Arata A.M.L., Merello E., Richard H., Zhu F.H., et al.** Study of MTHFR and MS polymorphisms as risk factors for NTD in the Italian population. *J Hum Genet* 2002; 47:319-324.
- De Marco P., Calevo M.G., Moroni A., Merello E., Raso A., Finnell R.H., et al.** Reduced folate carrier polymorphism (80A→G) and neural tube defects. *Eur J Hum Genet.* 2003; 11(3):245-52.
- De-Regil L.M., Fernandez-Gaxiola A.C., Dowswell T., Pea-Rosas J.P.** Effects and safety of periconceptional folate supplementation for preventing birth defects. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; 10: CD007950.
- De Wals P., Tairou F., VanAllen M., Uh S.H., Lowry R.B., Sibbald B., et al.** Reduction in Neural Tube Defects after Folic Acid Fortification in Canada. *N Engl J Med* 2007; 357:135-42.
- Dean W., Lucifero D., Santos F.** DNA methylation in mammalian development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2005; 75:98-111.
- De Carvalho S.C., Muniz, M.T., Siqueira M.D., Siqueira E.R., Gomes A.V., Silva K.A., et al.** Plasmatic higher levels of homocysteine in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Nutr J* 2013; 12:37.
- Dekou V., Whincup P., Papacosta O., Ebrahim S., Lennon L., Ueland P.M., et al.** The effect of the C677T and A1298C polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene on homocysteine levels in elderly men and women from the British regional heart study. *Atherosclerosis* 2001; 154:659- 666.
- Devlin A.M., Clarke R., Birks J., Evans J.G., Halsted C.H.** Interactions among polymorphisms in folate-metabolizing genes and serum total homocysteine concentrations in a healthy elderly population. *Am J Clin Nutr* 2006; 83:708–713.
- Dey A.C., Shahidullah M., Mannan M.A., Noor M.K., Saha L., Rahman S.A.** Maternal and Neonatal Serum Zinc Level and its Relationship with Neural Tube Defects. *J Health Popul Nutr* 2010; 28 : 343–350.
- Donaldson K.O., Keresztesy J.C.** Naturally occurring forms of folic acid. iii. Characterisation and properties of 5-methyldihydrofolate, an oxidation product of 5-methyltetrahydrofolic acid. *J Biol Chem* 1962; 237:3815–3819.
- Dorszewska J., Oczkowska A., Prendecki M, Lianeri M., Kozubski W.** MTHFR and other enzymes associated with the circulation of methyl in neurodegenerative disease. In: *Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) in Health and Disease*. Ed: Roger Evans. ISBN: 978-1-63483-333-2. 2015

- Doudney K., Grinham J., Whittaker J., Lynch S.A., Thompson D., Moore G.E., et al.** Evaluation of folate metabolism gene polymorphisms as risk factors for open and closed neural tube defects. *Am J Med Genet A* 2009; 149A:1585-1589.
- Dunlevy L.P., Burren K.A., Chitty L.S., Copp A.J., Greene N.D.** Excess methionine suppresses the methylation cycle and inhibits neural tube closure in mouse embryos. *FEBS Lett* 2006a; 580: 2803–2807.
- Dunlevy L.P., Burren K.A., Mills K., Chitty L.S., Copp A.J., Greene N.D.** Integrity of the methylation cycle is essential for mammalian neural tube closure. *Birth Defects Res* 2006b; 76: 544–552.
- Dunlevy L.P., Chitty L.S., Burren K.A., Doudney K., Stojilkovic-Mikic T., Stanier P., et al.** Abnormal folate metabolism in fetuses affected by neural tube defects. *Brain* 2007; 130(4) :1043-1049
- Duthie S.J., Narayanan S., Brand G.M., Pirie L., Grant G.** Impact of folate deficiency on DNA stability. *J Nutr* 2002 ; 132: 2444S–2449S.
- Ek J., Magnus E.M.** Plasma and Red Blood Cell Folate During Normal Pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2009 ; 60: 247-251
- Essien F.B., Wannberg S.L.** Methionine but not folinic acid or vitamin B-12 alters the frequency of neural tube defects in axd mutant mice. *J Nutr* 1993; 123: 27–34.
- Fan J., Vitols K.S., Huennekens F.M.** Multiple folate transport systems in L1210 cells. *Adv Enzyme Regul* 1992; 32:3–15.
- Faulk C., Dolinoy D.C.** Timing is everything: the when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals. *Epigenetics* 2011; 6:791-797.
- Favier M., Hininger-Favier I.** Zinc et grossesse. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité* 2005 ; 33 : 253-258.
- Feix A., Fritsche-Polanz R., Kletzmayer J., Vychytil A., Horl W.H., Sunder-Plassmann G., et al.** Increased prevalence of combined MTR and MTHFR genotypes among individuals with severely elevated total homocysteine plasma levels. *Am J Kidney Dis* 2001; 38: 965 – 964.
- Félix TM., Leistner S., Giugliani R.** Metabolic effects and the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism associated with neural tube defects in southern Brazil. *Birth Defects Res Clin Mol Teratol* 2004; 70:459-463.
- Felkner M., Suarez L., Canfield M.A., Brender J.D., Sun Q.** Maternal serum homocysteine and risk for neural tube defects in a Texas- Mexico border population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2009; 85: 574–81.
- Fell D., Selhub J.** Disruption of thymidylate synthesis and gly cine-serine interconversion by L-methionine and L-homocystine in Raji cells. *Biochim Bio phys Acta* 1990; 1033: 80-84.

- Fenech M.** Folate (vitamin B9) and vitamin B12 and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity. *Mutation research* 2012; 733:21-33.
- Field M.S., Szebenyi D.M., Stover P.J.** Regulation of de novo purine biosynthesis by methenyltetrahydrofolate synthetase in neuroblastoma. *J Biol Chem* 2006; 281:4215–4221.
- Finkelstein J.D.** Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990; 1: 228-237.
- Finkelstein J.D.** Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 1694–1699.
- Fleming A., Copp A.J.** Embryonic folate metabolism and mouse neural tube defects. *Science* 1998; 280: 2107–2109.
- Fodinger M., Skoupy S., Sunder-Plassmann G.** Molecular Genetics of Folate Metabolism. In: Folate and human development. Eds: Massaro E.J., Rogers J.M. Springer Science and Business Media, New York. 2002.
- Fohr I.P., Prinz-Langenohl R., Bronstrup A., Bohlmann A.M., Nau H., Berthold H.K., Pietrzik K.** 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase genotype determines the plasma homocysteine-lowering effect of supplementation with 5-methyltetrahydrofolate or folic acid in healthy young women. *Am J Clin Nutr* 2002; 75(2):275-282.
- Franco R.F., Elion J., Lavinha J., Krishnamoorthy R., Tavella M.H., Zago M.A.** Heterogeneous ethnic distribution of the 844ins68 in the cystathionine beta-synthase gene. *Hum Hered* 1998; 48:338–342
- Fredriksen A., Meyer K., Ueland P.M., Vollset S.E., Grotmol T., Schneede J.** Large-scale population-based metabolic phenotyping of thirteen genetic polymorphisms related to one-carbon metabolism. *Hum Mutat* 2007; 28:856–865.
- Friedman G., Goldschmidt N., Friedlander Y., Ben-Yehuda A., Selhub J., Babaey S., et al.** A common mutation A1298C in human methylene tetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations. *J Nutr* 1999; 129:1656-1661.
- Friso S., Choi S.W., Girelli D., Mason J.B., Dolnikowski G.G., Bagley P.J., et al.** A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:5606–5611.
- Frosst P., Blom H.J., Milos R., Goyette P., Sheppard C.A., Matthews R.G., et al.** candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-113.
- Gaber K.R., Farag M.K., Soliman S.E., El-Bassyouni H.T., El-Kamah G.** Maternal vitamin B12 and the risk of fetal neural tube defects in Egyptian patients. *Clin Lab* 2007; 53(1-2):69-75.
- Garrow T.A., Brenner A.A., Whitehead V.M. et al.** Cloning of human cDNAs encoding mitochondrial and cytosolic serine hydroxymethyltransferases and chromosomal localization. *J Biol Chem* 1993; 268:11910-11916

- Gaughan D.J., Barbaux S., Kluijtmans L.A., Whitehead A.S.** The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene. *Gene* 2000; 257(2):279-289.
- Geisel J., Zimbelmann I., Schorr H., et al.** Genetic defects as important factors for moderate hyperhomocysteinemia. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39(8):698-704.
- Ghanassia E.V.** Embryologie biologie du développement et de la reproduction. ISBN2843710693. 1999. p 418.
- Gibson R.S.** Principles of Nutritional Assessment. Oxford University Press, New York, chap. 22. 2005.
- Gillery P.H.** Métabolisme de l'homocystéine. *Le Courrier de l'Arco* 1999 ; 2 :57-59.
- Godbole K., Gayathri P., Ghule S., Sasirekha B.V., Kanitkar-Damle A., Memane N., et al.** Maternal One-Carbon Metabolism, MTHFR and TCN2 Genotypes and Neural Tube Defects in India. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2011; 91: 848-856.
- Gonzalez-Herrera L., Castillo-Zapata I., Garcia-Escalante G., Pinto-Escalante D.** A1298C polymorphism of the MTHFR gene and neural tube defects in the state of Yucatan, Mexico. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2007; 79(8):622-626
- Gos M., Sliwerska E., Szpecht-Potocka A.** Mutation incidence in folate metabolism genes and regulatory genes in Polish families with neural tube defects. *J Appl Genet* 2004; 45: 363-368.
- Goyette P., Christensen B., Rosenblatt D.S., Rozen R.** Severe and mild mutations in cis for the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, and description of five novel mutations in MTHFR. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 1268-1275.
- Goyette P., Pai A., Milos R., Frosst P., Tran P., Chen Z et al.** Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome* 1998; 9:652-6.
- Goyette P., Rozen R.** The thermolabile variant 677C-->T can further reduce activity when expressed in cis with severe mutations for human methylenetetrahydrofolate reductase. *Hum Mutat* 2000 ; 16(2):132-138.
- Goyette P., Sumner J.S., Milos R., Duncan A.M., Rosenblatt D.S., Matthews R.G., et al.** Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1994; 7 : 195-200.
- Grandone E., Corrao A.M., Colaizzo D., Vecchione G., Di Girgenti C., Paladini D., et al.** Homocysteine metabolism in families from southern Italy with neural tube defects: role of genetic and nutritional determinants. *Prenat Diagn.* 2006; 26(1):1-5.
- Greene N.D.E., Copp A.J.** Neural Tube Defects. *Annu Rev Neurosci* 2014; 37: 221-242.
- Greene N.D.E., Stanier P., Moore G.E.** The emerging role of epigenetic mechanisms in the etiology of neural tube defects. *Epigenetics* 2011; 6:875-883.

Groenen P.M., van Rooij I.A., Peer P.G., Gooskens R.H., Zielhuis G.A., Steegers-Theunissen R.P. Marginal maternal vitamin B status increases the risk of offspring with spina bifida. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191(1):11–17

Gu Q., Li Y., Cui Z.L., Luo X.P. Homocysteine, folate, vitamin B12 and B6 in mothers of children with neural tube defects in Xinjiang, China. *Acta Paediatrica* 2012; 101: e486–e490.

Guéant J.L., Namour F., Guéant-Rodriguez R.M., Daval J.L. Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends Endocrinol Metab* 2013; 24:279-289

Guéant-Rodriguez R.M., Gueant J.L., Debard R., Thirion S., Hong L.X., Bronowicki J.P., et al. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: A comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr* 2006; 83:701–707.

Guéant-Rodriguez R.M., Juilliere Y., Candito M., Adjalla C.E., Gibelin P., Herbeth B., et al. Association of MTRRA66G polymorphism (but not of MTHFR C677T and A1298C, MTRA2756G, TCN C776G) with homocysteine and coronary artery disease in the French population. *Thromb Haemost* 2005, 94:510–515.

Guéant-Rodriguez RM., Rendeli C., Namour B., Venuti L., Romano A., Anello G., et al. Transcobalamin and methionine synthase reductase mutated polymorphisms aggravate the risk of neural tube defects in humans. *Neurosci Lett* 2003; 344(3):189-192.

Guenther BD., Sheppard CA., Tran P., Rozen R., Matthews RG., Ludwig ML. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nat Struct Biol* 1999; 6:359-365.

Guerra-Shinohara E.M., Morita O.E., Peres S., Pagliusi R.A., SampaioNeto L.F., D'Almeida V., Irazusta S.P., Allen R.H., Stabler S.P. Low ratio of S-adenosylmethionine to Sadenosylhomocysteine is associated with vitamin deficiency in Brazilian pregnant women and newborns. *Am J Clin Nutr* 2004; 80:1312-1321.

Guttormsen A.B., Ueland P.M., Nesthus I., Nygard O., Schneede J., Vollset S.E., Refsum H. Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (>40 mmol/l). The Hordaland homocysteine study. *J Clin Invest* 1996; 98:2174-2183.

Habibzadeh N., Schorah C.J., Seller M.J., Smithells R.W., Levene M.I. Uptake and utilization of DL-5-[methyl-14C] tetrahydropteroylmonoglutamate by cultured cytotrophoblasts associated with neural tube defects. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993; 203: 45–54.

Haddad J. *Medecine foetale et néonatale.* Springer. ISBN: 2287220828. 2001.

Hamamy H. Epidemiological profile of neural tube defects in Arab countries. *Middle East Journal of Medical Genetics* 2014; 3:1-10.

Harmon D.L., Shields D.C., Woodside J.V., McMaster D., Yarnell J.W.G., Young I.S., et al. Methionine synthase D919G polymorphism is a significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations. *Genet Epidemiol* 1999; 17: 298-309.

- Harris M.J., Juriloff D.M.** Mouse mutants with neural tube closure defects and their role in understanding human neural tube defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2007; 79:187–210.
- Heidkamper D., Muller V., Nelson D.R., Klingenberg M.** Probing the role of positive residues in the ADP/ATP carrier from yeast. The effect of six arginine mutations on transport and the four ATP versus ADP exchange models. *Biochemistry* 1996; 35: 16144– 16152.
- Herbert V.** Development of human folate deficiency. In: *Folic Acid Metabolism in Health and Disease*. Eds: Picciano M.F., Stockstad E.L.R., Gregory J.F. New York Wiley-Liss. 1990; p195-210.
- Hibbard E.D., Smithells R.W.** Folic acid metabolism and human embryopathy *Lancet* 1965; 1: 1254.
- Homberger A., Linnebank M., Winter C., Willenbring H., Marquard T., Harms E., et al.** Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: 725-729.
- Houcher B., Bourouba R., Djabi F., Houcher Z.** The prevalence of neural tube defects in Setif university maternity hospital, Algeria-3 years review (2004-2006). *Pteridines* 2008; 19 :12-18.
- Houcher B., Bourouba R., Djabi F., Yilmaz E., Egin Y., Akar N.** Polymorphisms of 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase and Cystathionine B-Synthase Genes as a Risk Factor for Neural Tube Defects in Sétif, Algeria. *Pediatr Neurosurg* 2009; 45:472-477
- Houcher B., Potier de Courcy G., Candito M., Van Obberghen E., Naimi D.** Nutritional assessment of folate status in a population of Setif, Algeria. *Pteridines* 2003; 14:138-142
- Hou Z., Matherly L.H.** Oligomeric structure of the human reduced folate carrier: Identification of homo- oligomers and dominant-negative effects on carrier expression and function. *J Biol Chem* 2009; 284(5):3285–3293.
- Ichi S., Nakazaki H., Boshnjaku V., Singh R.M., Mania-Farnell B., Xi G., McLone D.G., et al.** Fetal neural tube stem cells from *Pax3* mutant mice proliferate, differentiate, and form synaptic connections when stimulated with folic acid. *Stem Cells Dev* 2012; 21: 321–330.
- Isolato PA., Wells GA., Donnelly JG.** Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. *Am J Hum Genet* 2000; 67:986-990.
- Jacques P.F., Choumenkovitch S.F.** Mild MTHFR deficiency and folate status. In: *MTHFR Polymorphisms and Disease*. Eds: Ueland P.M., Rozen R. Landes Bioscience. Ed: Georgetown, T.X. 2005; p54–70.
- James S.J.** The molecular dynamics of abnormal folate metabolism and DNA methylation: Implications for disease susceptibility and progression. In: *MTHFR Polymorphisms and Disease*. Ed: Ueland P.M., Rozen R. Landes Bioscience. Ed: Georgetown, T.X. 2005; p78–99.

Janosik M., Meier M., Kery V., Oliveriusova J., Burkhard P., Kraus J.P. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the active core of human recombinant cystathionine β -synthase: an enzyme involved in vascular disease. *Acta Crystallogr* 2001; 57: 289–291.

Jansen G., Mauritz R.M., Assaraf Y.G., Sprecher H., Drori S., Kathman L., et al. Regulation of carrier-mediated transport of folates and antifolates in methotrexate-sensitive and-resistant leukemia cells. *Adv Enzyme Regul* 1997; 37: 59-76.

Johanning G.L., Tamura T., Johnston K.E., Wenstrom K.D. Comorbidity of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase gene polymorphisms and risk for neural tube defects. *J Med Genet* 2000; 37: 949-951.

Kamen B.A., Smith A.K. A review of folate receptor alpha cycling and 5-methyltetrahydrofolate accumulation with an emphasis on cell models in vitro. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56:1085-1097.

Karbach D., Staub M., Wood P.G., Passow H. Effect of side-directed mutagenesis of the arginine residues 509 and 748 on mouse band 3 protein-mediated anion transport. *Biochem Biophys Acta* 1998; 1371:114–122.

Kirke P.N., Molloy A.M., Daly L.E., Burke H., Weir D.G., Scott J.M. Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. *Q J Med* 1993; 86:703–708.

Kirke P.N. Impact of the MTHFR C677T polymorphism on risk of neural tube defects: case-control study. *Brit Med J* 2004; 328: 1535-1536.

Klee G.G. Cobalamin and folate evaluation: measurements of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B12 and folate. *Clin Chem* 2000; 46 : 1277-83.

Kluijtmans L.A., Young I.S., Boreham C.A., Murray L., McMaster D., McNulty H., et al. Genetic and nutritional factors contributing to hyperhomocysteinemia in young adults. *Blood* 2003; 101: 2483-2488.

Knock E., Deng L., Krupenko N., Mohan R.D., Wu Q., Leclerc D., et al. Susceptibility to intestinal tumorigenesis in folate deficient mice may be influenced by variation in one-carbon metabolism and DNA repair. *J Nutr biochem* 2011; 22: 1022-1029.

Kumar J., Garg G., Karthikeyan G., Sengupta S. Cystathionine beta-synthase 844Ins68 polymorphism is not associated with the levels of homocysteine and cysteine in an Indian population. *Biomarkers* 2010; 15(3): 283- 287

Langman J., Salder TW. *Embryologie Médicale*. 8 ème Edition. Traduction et adaptation française. Pagès R., Belaisch G., ISBN 978-2-913996-67-0. 2007.

- Laraqui A., Allami A., Carrié A., Coiffard A.S., Benkouka F., Benjouad A., et al.** Influence of methionine synthase (A2756G) and methionine synthase reductase (A66G) polymorphisms on plasma homocysteine levels and relation to risk of coronary artery disease. *Acta Cardiol* 2006; 61(1): 51-61.
- Larsen W.** Embryologie humaine. 2ème édition. Traduit par Antoine Dhem, ISBN2804141217. 2003.
- Leclerc D., Campeau E., Goyette P., Adjalla C.E., Christensen B., Ross M., et al.** Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1867-1874.
- Leclerc D., Odievre M., Wu Q., Wilson A., Huizenga J.J., RozenR., et al.** Molecular cloning, expression and physical mapping of the human methionine synthase reductase gene. *Gene* 1999; 240: 75-88.
- Leclerc D., Wilson A., Dumas R., Gafuik C., Song D., Watkins D., et al.** Cloning and mapping of a eDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:3059-3064.
- Li F., Watkins D., Rosenblatt D.S.** Vitamin B12 and birth defects. *Mol Genet Metab* 2009; 98: 166–172
- Li J., Shi Y., Sun J., Zhang Y., Mao B.** Xenopus Reduced Folate Carrier Regulates Neural Crest Development Epigenetically. *PLoS ONE* 2011; 6(11): e27198.
- Li K., Wahlqvist M.L., Li D.** Nutrition, One-Carbon Metabolism and Neural Tube Defects: A Review. *Nutrients* 2016; 8:741.
- Li W.X., Dai S.X., Zheng J.J., Liu J.Q., Huang J.F.** Homocysteine Metabolism Gene Polymorphisms (MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G) Jointly Elevate the Risk of Folate Deficiency. *Nutrients* 2015; 7(8): 6670-6687.
- Li Y.N., Gulati S., Baker P.J., Brody L.C., Banerjee R., Kruger W.D.** Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1851-1858.
- Lipton S.A., Kim W.K., Choi Y.B., Kumar S., D'Emilia D.M., Rayudu P.V.** Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5923-5928.
- Liu D.Y., Li X.** Association of amniotic fluid homocysteine, folate and cobalamin levels with birth defects. *J Med* 2011; 32: 1893–1894.
- Liu J., Qi J., Yu X., Zhu J., Zhang L., Ning Q., et al.** Investigations of single nucleotide polymorphisms in folate pathway genes in Chinese families with neural tube defects. *J Neuro Sci* 2014; 337:61-66.
- Liu J., Ward R.L.** Folate and one-carbon metabolism and its impact on aberrant DNA methylation in cancer. *Adv Genet* 2010; 71: 80–121
- Lorenzo D., Botto M.D., Cynthia A., Moore M.D., Muin J., Khoury M.D., et al.** Neural-Tube Defects. *N Engl J Med* 1999; 341:1509-1519.

Lucock M., Daskalakis I., Briggs D., Yates Z., Levene M. Altered folate metabolism and disposition in mothers affected by a spina bifida pregnancy: influence of 677C>T methylenetetrahydrofolate reductase and 2756A>G methionine synthase genotypes. *Mol Genet Metab* 2000; 70: 27-44.

Lucock M., Daskalakis I., Hinkins M., Yates Z. An examination of polymorphic genes and folate metabolism in mothers affected by a spina bifida pregnancy. *Mol Genet Metab* 2001; 73: 322-332.

Lucock M.D., Hartley R., Smithells R.W. A rapid and specific HPLC-electrochemical method for the determination of endogenous 5-Methyltetrahydrofolic acid in plasma using solid phase sample preparation with internal standardization. *Biomed Chromatogr* 1989; 3:58-64.

Lynn B.B., Jesse F.G. Folate metabolism and Requirements. *J Nutr* 1999; 129:779-782.

Marieb E.N., Hoehn K. Human anatomy and physiology. 9th edition Pearson, ISBN 9780321743268. 2013.

Massaro E.J., Rogers J.M. Folate and human development. Springer Science and Business, Media New York. ISBN 0-89603-936-6. 2002.

Masuda M., Pizuka Y., Yamazaki M., Nishigaki R., Kato Y., Ni'inuma K., et al. Methotrexate is excreted into the bile by canalicular multispecific organic anion transporter in rats. *Cancer Res* 1997; 57:3506–10.

Matherly L.H., Goldman D.I. Membrane transport of folates. *Vitam Horm* 2003; 66: 403–456.

McKeever M.P., Weir D.G., Molloy A., Scott J.M. Betaine-homocysteine methyltransferase: Organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in rat. *Clin Sci* 1991; 81:551–556.

McNulty B., Pentieva K., Marshall B., Ward M., Molloy A.M., Scott J.M., et al. Women's compliance with current folic acid recommendations and achievement of optimal vitamin status for preventing neural tube defects. *Human Reproduction* 2011; 26 : 1530–1536.

McPartlin J.M., Halligan A., Scott J.M., Darling M., Weir D.G. Accelerated folate breakdown in pregnancy. *Lancet* 1993; 341:148–149.

Medical research council (MRC) Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: Results of the medical research council vitamin study. *Lancet* 1991 ; 338: 131–137.

Miles E.W., Kraus J.P. Cystathionine β -Synthase: Structure, Function, Regulation, and Location of Homocystinuria-causing Mutations. *J Biol Chem* 2004; 279:29871-29874.

Mills J.L., Conley M.R. Folic acid to prevent neural tube defects: scientific advances and public health issues. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1996; 8(6):394-397.

Mills J.L., McPartlin J.M., Kirke P.N., Lee Y.J., Conley M.R., Weir D.G., et al.

Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural tube defects. *Lancet* 1995; 345:149-151.

- Miner S.E., Evroski J., Cole D.E.** Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. *Clin Biochem* 1997; 30: 189-201.
- Mitchell H.K., Snell E.E., Williams R.J.** The concentration of “folic acid”. *J Am Chem Soc* 1941; 63:2284.
- Moephuli S.R., Klein N.W., Baldwin M.T., Krider H.M.** Effects of methionine on the cytoplasmatic distribution of actin and tubulin during neural tube closure in rat embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 543-548.
- Molloy A.M.** Is impaired folate absorption a factor in neural tube defects? *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 3-4.
- Molloy A.M., Daly S., Mills J.L. Kirke P.N., Whitehead A.S., Ramsbottom D., et al.** Thermolabile variant of 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: implications for folate intake recommendations. *Lancet* 1997; 349:1591-1593.
- Molloy A.M., Kirke P., Hillary I., Weir D.G., Scott J.M.** Maternal serum folate and vitamin B12 concentrations in pregnancies associated with neural tube defects. *Arch Dis Child* 1985; 60:660–665.
- Morales de Machin A., Mendez K., Solis E., Borjas de Borjas L., Bracho A., Hernandez M.L., et al.** C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in mothers of children affected with neural tube defects. *Investig Clin* 2015; 56: 284–295.
- Mukhopadhyay I., Rao P.S., Biswas M.** Hyperhomocysteinemia in recurrent pregnancy loss and the effect of folic acid and vitamin B12 on homocysteine levels: a prospective analysis. *Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol* 2017; 6(6): 2258-2261
- Gos M., Szpecht-Potocka A.** Genetic basis of neural tube defects. II. Genes correlated with folate and methionine metabolism. *J Appl Genet* 2002; 43(4) : 511-524.
- Morin I., Devlin A.M., Leclerc D., Sabbaghian N., Halsted C.H., Finnell R., et al.** Evaluation of genetic variants in the reduced folate carrier and in glutamate carboxypeptidase II for spina bifida risk. *Mol Genet Metab* 2003; 79 (3): 197-200.
- Moriyama Y., Okamura T., Kajinami K., Izo H., Inazu A., Kawachiri M et al.** Effects of serum B vitamins on elevated plasma homocysteine levels associated with the mutation of methylenetetrahydrofolate reductase gene in Japanese. *Atherosclerosis* 2002; 164(2):321-328
- Morrison K., Edwards Y.H., Lynch S.A., Burn J., Hoi F., Mariman E.** Methionine synthase and neural tube defects . *J Med Genet* 1997; 34: 958.
- Morrison K., Papapetrou C., Hol F.A., Mariman E.C., Lynch S.A., Burn J., et al.** Susceptibility to spina bifida; an association study of five candidate genes. *Ann Hum Genet* 1998; 62: 379-396.
- Munoz J.B., Lacasana M., Cavazos R.G., Borja-Aburto V.H., GalavazHernandez C., Garduao C.A.** Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and the risk of anencephaly in Mexico. *Mol Hum Reprod* 2007; 13(6):419-424

- Nancy S., Green.** Folic Acid Supplementation and Prevention of Birth Defects. The American society for nutritional sciences. *J Nutr* 2002; 132: 2356S-2360S.
- Narisawa A., Komatsuzaki S., Kikuchi A., Niihori T., Aoki Y., Fujiwara K., et al.** Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects in mice and humans. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 1496–1503.
- Naushad S.M., Devi A.R.** Role of parental folate pathway single nucleotide polymorphisms in altering the susceptibility to neural tube defects in South India. *J Perinat Med* 2010; 38: 63-69.
- Nguyen T.T., Dyer D.L., Dunning D.D., Rubin S.A., Grant K.E., Said H.M.** Human intestinal folate transport: Cloning, expression, and distribution of complementary RNA. *Gastroenterology* 1997; 112:783–791.
- Nienaber-Rousseau C., Ellis S.M., Moss S.J., Melse-Boonstra A.** Towers GWGene-environment and gene-gene interactions of specific MTHFR, MTR and CBS gene variants in relation to homocysteine in black South Africans. *Gene* 2013; 530(1):113-118.
- Okano M., Bell D.W., Haber D.A., Li E.** DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99: 247-257.
- O'Leary D.L., Murray S., Conley M., Mayne P., Kirke O.P.N., Mills J.L., et al.** Impact of the MTHFR C677T polymorphism on risk of neural tube defects: case-control study. *BMJ* 2004; 328 : 1535-1536.
- O'Leary V.B., Pangilinan F., Cox C., Parle-McDermott A., Conley M., Molloy A.M., et al.** Reduced folate carrier polymorphisms and neural tube defect risk. *Mol Genet Metab* 2006 ; 87 (4) : 364-369.
- O'Leary V.B., Mills J.L., Pangilinan F., Kirke P.N., Cox C., Conley M., et al.** Analysis of methionine synthase reductase polymorphisms for neural tube defects risk association, *Mol Genet Metab* 2005; 85: 220-227.
- Olteanu H., Munson T., Banerjee R.** Differences in the efficiency of reductive activation of methionine synthase and exogenous electron acceptors between the common polymorphic variants of human methionine synthase reductase, *Biochemistry* 2002; 41: 13378-13385.
- Ouyang S., Li Y., Liu Z., Chang H., Wu J.** Association between MTR A2756G and MTRR A66G polymorphisms and maternal risk for neural tube defects: A meta-analysis, *Gene* 2013a ; 515: 308-312.
- Ouyang S., Liu Z., LiY., Wu J.** Meta-analyses on the association of MTR A2756G and MTRR A66G polymorphisms with neural tube defect risks in Caucasian children. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013b; 26(12): 1166-1170.
- Parle-McDermott A., Mills J.L., Kirke P.N., O'Leary V.B., Swanson D.A., Pangilinan F., et al.** Analysis of the MTHFR 1298AC and 677T polymorphisms as risk factors for neural tube defects. *J Hum Genet* 2003; 48: 190-193.
- Patterson D., Graham C., Cherian C., Matherly L.H.** A Humanized mouse model for the reduced folate carrier. *Mol Gen Metabol* 2008; 93:95-103

Pei L., Liu J., Zhang Y., Zhu H., Ren A. Association of reduced folate carrier gene polymorphism and maternal folic acid use with neural tube defects. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr. Genet* 2009; 150B (6): 874-878.

Pepe G., Vanegas O.C., Rickards O., Giusti B., Comeglio P., Brunelli T., et al. World distribution of the T833C/844INS68 CBS in cis double mutation: a reliable anthropological marker. *Hum Genet* 1999; 104:126–129

Perez A.B., D'Almeida V., Vergani N., de Oliveira A.C., de Lima F.T., Brunoni D. Methylene-tetrahydrofolate reductase (MTHFR): incidence of mutations C677T and A1298C in Brazilian population and its correlation with plasma homocysteine levels in spina bifida. *Am J Med Genet* 2003; 119A(1):20-25.

Pietrzyk J.J., Bik-Multanowski M., Sanak M., Twardowska M. Polymorphisms of the 5,10-methylene-tetrahydrofolate and the methionine synthase reductase genes as independent risk factors for spina bifida. *J Appl Genet* 2003; 44: 111-113.

Pilon F. Epilepsie, antiépileptiques et grossesse. *Actual Pharm* 2010 ; 497 :43-45.
Stothard K.J., Tennant P.W., Bell R., Pankin J. Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2009; 301:636-650.

Pitkin RM . Folate and neural tube defects. *Am J Clin Nutr* 2007; 85(1):285S-288S.

Pogribny I.P., Karpf A.R., James S.R., Melnyk S., Han T., Tryndyak V.P. Epigenetic alterations in the brains of Fisher 344 rats induced by long-term administration of folate/methyl-deficient diet. *Brain research* 2008; 1237: 25-34.

Prasad P.D., Ramamoorthy S., Leibach F.H., Ganapathy V. Molecular cloning of the human placental folate transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 206: 681-687.

Preynat A. Interactions acide folique-vitamine B₁₂-méthionine : effets sur le métabolisme hépatique et la productivité des vaches laitières. Université Laval. 2009.

Qiu A., Jansen M., Sakaris A., Hee Min S., Chattopadhyay S., Tsai E., et al. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell* 2006; 127: 917-928

Quere I., Paul V., Rouillac C., Janbon C., London J., Demaille J., et al. Spatial and temporal expression of the cystathionine beta-synthase gene during early human development. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254:127-137.

Quinlivan E.P., Davis S.R., Shelnut K.P., Henderson G.N., Ghandour H., Shane B., et al. Methylene-tetrahydrofolate reductase 677C->T polymorphism and folate status affect one-carbon incorporation into human DNA deoxynucleosides. *J Nutr* 2005; 135:389–96.

Radouani M .A., Chahid N., Benmiloud L., El Ammari L., Kharbach A., Rjimati L., et al. Prevalence of Neural Tube Defects: Moroccan Study 2008-2011. *OJPed* 2015; 5: 248- 255.

- Ramsbottom D., Scott J.M., Molloy A., Weir D.G., Kirke P.N., Mills J.L., et al.** Are common mutations of cystathionine beta-synthase involved in the aetiology of neural tube defects? *Clin Genet* 1997; 51: 39-42.
- Ratan S.K., Rattan K.N., Pandey R.M., Singhal S., Kharab S., Bala M., et al.** Evaluation of the levels of folate, vitamin B₁₂, homocysteine and fluoride in the parents and the affected neonates with neural tube defect and their matched controls. *Pediatr Surg Int* 2008; 24: 803–808.
- Rankin J., Glinianaia S., Brown R., Renwick M.** The changing prevalence of neural tube defects: a population –based study in the north of England, 1984-96. Northern Congenital Abnormality Survey Steering Group. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2000; 14:104-110
- Ratanasthien K., Blair J.A., Leeming R.J., Cooke W.T., Melikian V.** Serum folates in man. *J Clin Path* 1977; 30: 438–448.
- Reik W., Dean W., Walter J.** Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001; 293:1089-1093.
- Relton C.L., Wilding C.S., Jonas P.A., Lynch S.A., Tawn E.J., Burn J.** Genetic susceptibility to Neural tube defect pregnancy varies with offspring phenotype. *Clin Genet* 2003; 64: 424–428.
- Relton C.L., Wilding C.S., Laffling A.J., Jonas P.A., Burgess T., Binks K., et al.** Low erythrocyte folate status and polymorphic variation in folate-related genes are associated with risk of neural tube defect pregnancy. *Mol Genet Metab* 2004a; 81:273–281.
- Relton C.L., Wilding C.S., Pearce M.S., Laffling A.J., Jonas P.A., Lynch S.A., et al.** Gene-gene interaction in folate-related genes and risk of neural tube defects in a UK population. *J Med Genet* 2004b; 41: 256-260.
- Rosenquist T.H., Ratashak S.A., Selhub J.** Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 227-232.
- Rosenquist T.H., Schneider A.M., Monaghan D.T.** N-methylD-aspartate receptor agonists modulate homocysteine-induced developmental abnormalities. *FASEB J* 1999; 13: 1523-1531.
- Rost D., Mahner S., Sugiyama Y., Stremmel W.** Expression and localization of the multidrug resistance-associated protein 3 in rat small and large intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282:G720–726.
- Rozen R.** Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thromb Haemost* 1997; 78:523-526.
- Ryan B.M., Weir D.G.** Relevance of folate metabolism in the pathogenesis of colorectal cancer. *J Lab Clin Med* 2001; 138: 164–176.
- Sadlish H., Williams F.M., Elintoff W.F.** Cytoplasmic domains of the reduced folate carrier are essential for trafficking, but not function. *Biochem J* 2002; 364(3): 777-786.
- Safdar O.Y., Al-Dabbagh A.A., Abuelieneen W.A., Kari J.A.** Decline in the incidence of neural tube defects after the national fortification of flour (1997-2005). *Saudi Med J* 2007;

28:1227–1229.

Safi J., Joyeux L., Chalouhi G.E. Periconceptional Folate Deficiency and Implications in Neural Tube Defects. *J Pregnancy* 2012; 2012: 295083-9.

Said H.M., Chatterjee N., Haq R.U., Subramanian V.S., Ortiz A., Matherly L.H., et al. Adaptive regulation of intestinal folate uptake: effect of dietary folate deficiency. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279(6): C1889-1895.

Salih M.A., Murshid M.R., Mohamed A.G., Lena C., Ignacio L.C., de Jesus J.E., et al. Risk factors for neural tube defects in Riyadh City, Saudi Arabia: Case-control study. *Sudan J Paediatr* 2014; 14(2):49 - 60.

Santos L.M., Lecca R.C., Cortez-Escalante J.J., Sanchez M.N., Rodrigues H.G. Prevention of neural tube defects by the fortification of flour with folic acid: A population-based retrospective study in Brazil. *Bull World Health Organ* 2016; 94:22–29.

Saxena A.K., Gupta J., Pandey S., Gangopadhaya A.N., Pandey L.K. Prévalence de cystathionine beta mutation du gène synthase 852Ins68 comme un risque possible pour les anomalies du tube neural dans l'est de l'Inde. *Genet Res Mol* 2011; 10(4): 2424-2429.

Schalinske K.L., Smazal A.L. Homocysteine imbalance: a pathological metabolic marker. *Adv Nutr* 2012; 3:755-762.

Schwahn B.C., Laryea M.D., Chen Z., Melnyk S., Pogribny I., Garrow T., et al. Betaine rescue of an animal model with methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Biochem J* 2004; 382:831–340.

Scott J.M. Folate and vitamin B12. *Proc Nutr Soc* 1999; 58:441-448.

Sebastio G., Sperandio M.P., Panico M., de Franchis R., Kraus J.P., Andria G. The molecular basis of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in Italian families, and report of four novel mutations. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 1324–1333.

Seyoum E., Selhoub J. Properties of food folates determined by stability and susceptibility to intestinal pteroylpolyglutamate hydrolase action. *J Nutr* 1998; 128:1956-1960.

Shan X., Wang L., Hoffmaster R., Kruger W.D. Functional characterization of human methylenetetrahydrofolate reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1999; 274: 32613-32618.

Shane B. Folate chemistry and metabolism. In: *Folate in health and disease*. Ed: Bailey L.B. 2nd ed: Marcel Dekker, New York, NY, 2010; p23-42.

Shang Y., Zhao H., Niu B., Li W., Zhou R., Zhang Tet al. Correlation of polymorphism of MTHFRs and RFC-1 genes with neural tube defects in China. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2008; 82 (1) : 3-7.

Sharina I.G., Zhao R., Wang Y., Babani S., Goldman D., et al. Role of the C-terminus and the long cytoplasmic loop in reduced folate carrier expression and function. *Biochem Pharmacol* 2002; 63(9): 1717-1724.

Shaw G.M., Lammer E.J., Zhu H., Baker M.W., Neri E., Finnell R.H. Maternal periconceptional vitamin use, genetic variation of infant reduced folate carrier(A80G), and risk of spina bifida. *Am J Med Genet* 2002; 108(1):1-6.

Shelnutt K.P., Kauwell G.P., Gregory J.F., Maneval D.R., Quinlivan E.P., Theriaque D.W., et al. Methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T polymorphism affects DNA methylation in response to controlled folate intake in young women. *J Nutr Biochem* 2004; 15:554–560.

Speer M.C., Nye J., McLone D., Worley G., Melvin E.C., Viles K.D., et al. Possible interaction of genotypes at cystathionine beta-synthase and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in neural tube defects. *Clin Genet* 1999; 56(2):142-144.

Sperandeo M.P., de Franchis R., Andria G., Sebastio G. A 68-bp insertion found in a homocystinuric patient is a common variant and is skipped by alternative splicing of the cystathionine beta-synthase mRNA. *Am J Hum Genet* 1996; 59(6): 1391–1393.

Stanislawska-Sachadyn A., Mitchell L.E., Woodside J.V., Buckley P.T., Kealey C., Young I.S., et al. The reduced folate carrier (SLC19A1) c.80G>A polymorphism is associated with red cell folate concentrations among women. *Ann Hum Genet* 2009; 73(5): 484–491.

Stegers-Theunissen R., Boers G., Trijbels F., Eskes T. Neural tube defects and derangement of homocysteine metabolism. *N Engl J Med* 1991; 324: 199-200.

Stegers-Theunissen R.P.M., Boers G.H.J., Trijbels F.J.M., Finkelstein J.D., Blom H.J., Thomas C.M.G., et al. Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural-tube defects? *Metabolism* 1994; 43:1475-1480.

Stegmann K., Ziegler A., Ngo E.T., Kohlschmidt N., Schröter B., Ermert A., et al. Linkage disequilibrium of MTHFR genotypes 677C/ T-1298A/C in the German population and association studies in probands with neural tube defects (NTD). *Am J Med Genet* 1999; 87:23-29.

Stokstad E.L.R. Historical perspective on key advances in the biochemistry and physiology of folates. In: *Folic Acid Metabolism in Health and Disease*. Ed: Picciano M.F., Stokstad E.L.R. Wiley-Liss, 1990; p1-21.

Stokstad E.L.R., Koch J. Folic acid metabolism. *Physiol Rev* 1967; 47:82–116.

Sukla K.K., Raman R. Association of MTHFR and RFC1 gene polymorphism with hyperhomocysteinemia and its modulation by vitamin B12 and folic acid in an Indian population. *Eur J Clin Nutr* 2012; 66:111–118.

Tilley M.M., Northrup H., Au K.S. Genetic Studies of the Cystathionine Beta-Synthase Gene and Myelomeningocele. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2012; 94:52-56.

Ubbink J.B., Christianson A., Bester M.J., Van Allen M.I., Venter P.A., Delport R., et al. Folate status, homocysteine metabolism, and methylene tetrahydrofolate reductase genotype in rural South African blacks with a history of pregnancy complicated by neural tube defects. *Metabolism* 1999; 48(2): 269-274.

Ueland P.M., Rozen R. MTHFR Polymorphisms and Disease. In: *Landes Bioscience*. Ed: Georgetown, TX. 2005; p54–70.

- Ueland P.M., Vollset S.E.** Homocysteine and Folate in Pregnancy. *Clinical Chemistry* 2004; 50(8): 1293-1.
- Van der Linden I.J., den Heijer M., Afman L.A., Gellekink H., Vermeulen S.H., Kluijtmans L.A., et al.** The methionine synthase reductase 66A→G polymorphism is a maternal risk factor for spina bifida. *J Mol Med* 2006; 84:1047–1054.
- Van der Put N.M.J., Eskes T.K., Blom H.J.** Is the common 677C→T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A meta-analysis. *QJM* 1997a; 90: 111-115.
- Van der Put N.M.J., Gabreels F., Stevens E.M., Smeitink J.A., Trijbels F.J., Eskes T.K., et al.** A second common mutation in the methylene-tetrahydrofolate reductase gene: An additional risk for neural-tube defects? *Amer J Hum Genet* 1998; 62:1044-1051.
- Van der Put N.M.J., Henny W.M., Van Straaten H.W.M., Trijbels F.J.M., Blom H.J.** Folate, Homocysteine and Neural Tube Defects: An Overview. *Exp Biol Med* 2001; 226:243-270.
- Van der Put N.M.J., Steegers-Theunissen R.P.M., Frosst P., Trijbels F.J.M., Eskes T.K.A.B., Van den Heuvel L.P., et al.** Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995; 34(6): 1070-1071.
- Van der Put N.M.J., Thomas C.M.J., Eskes T.K.A.B., Trijbels F.J.M., Steegers-Theunissen R.P.M., Mariman E.C.M., et al.** Altered folate and vitamin B12 metabolism in families with spina bifida offspring. *Q J Med* 1997b ; 90: 505-510.
- Van der Put N.M.J., Van den Heuvel L.P., Steegers-Theunissen R.P.M., Trijbels F.J.M., Eskes T.K.A.B., Mariman E.C.M., et al.** Decreased methylenetetrahydrofolate reductase activity due to the C677T mutation in families with spina bifida offspring. *J Mol Med* 1996; 74:691-694.
- Van der Put N.M.J., van der Molen E.F., Kluijtmans L.A., Heil S.G., Trijbels J.M., Eskes T.K., et al.** sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease. *Q J Med* 1997c ; 90 : 511-517.
- Vesela K., Pavlikova M., Janosikova B., Andel M., Zvarova J., Hyanek J., et al.** Genetic determinants of folate status in Central Bohemia. *Physiol Res* 2005 ; 54: 295–303.
- Volcik K.A., Shaw G.M., Lammer E.J., Zhu H., Finnell R.H.** Evaluation of infant methylene tetrahydrofolate reductase genotype, maternal vitamin use, and risk of high versus low level spina bifi da defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2003; 67:154–157.
- Wagner C.** Biochemical role of folate in cellular metabolism. In: *Folate in health and disease*. Ed: Bailey L.B. 2nd ed: Marcel Dekker, New York, NY, 2010; p23-42.
- Wald N.J., Hackshaw A.K., Stone R., Sourial N.A.** Blood folic acid and vitamin B12 in relation to neural tube defects . *BJOG* 1996 ; 103 : 319-324.

Wang H.G., Wang J.L., Zhang J., Zhao L.X., Zhai J.X., Xiang Y.Z., et al. Reduced folate carrier A80G polymorphism and susceptibility to neural tube defects: A meta-analysis. *Gene* 2012; 510 :180-184

Wang L., Wang F., Guan J., Le J., Wu L., Zou J., et al. Relation between hypomethylation of long interspersed nucleotide elements and risk of neural tube defects. *Am J Clin Nutr* 2010; 91:1359–1367.

Wang X.W., Luo Y.L., Wang W., Zhang Y., Chen Q., Cheng Y.L. Association between MTHFR A1298C polymorphism and neural tube defect susceptibility: a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 206:251-257.

Wang Y., Liu Y., Ji W., Qin H., Wu H., Xu D., et al. Variants in MTHFR gene and neural tube defects susceptibility in China. *Metab Brain Dis* 2015a; 30(4):1017-1026.

Wang Y., Liu Y., Ji W., Qin H., Wu H., Xu D., et al. Analysis of mtr and mtrr polymorphisms for neural tube defects risk association. *Medicine* 2015b; 94:e1367.

Watkins D., Philip N.S., Ge B., Ru M., Hwang H.Y., Kim W., et al. Hyperhomocysteinemia due to methionine synthase deficiency, cblG: structure of the MTR gene, genotype diversity, and recognition of a common mutation, P1173L. *Am J Hum Genet* 2002; 71:143–153.

Weisberg I., Tran P., Christensen B., Sibani S., Rozen R. A second genetic polymorphism in methylene tetra hydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998; 64:169–172.

Whetstine J.R., Gifford A.J., Witt T., Liu X.Y., Flatley R.M., Norris M., et al. Single nucleotide polymorphisms in the human reduced folate carrier: Characterization of a high-frequency G/A variant at position 80 and transport properties of the His27 and Arg27 carriers. *Clin Cancer Res* 2001; 7:3416–3422.

Whetstine J.R., Flatley R.M., Matherly L.H. The human reduced folate carrier gene is ubiquitously and differentially expressed in normal Human tissues: identification of seven non-coding exons and characterization of a novel promoter. *Biochem J* 2002; 367: 629–640.

Wilcken D.E.L., Wilcken B., Dudman N.P.B., Tyrrell P.A . Homocystinuria--the effects of betaine in the treatment of patients not responsive to pyridoxine. *N Engl J Med* 1983; 309: 44853.

Wilson A., Platt R., Wu Q., Leclerc D., Christensen B., Yang H., et al. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab* 1999; 67: 317-323.

Wlodarczyk B.J., Tang L.S., Triplett A., Aleman F., Finnell R.H. Spontaneous neural tube defects in splotch mice supplemented with selected micronutrients. *Toxicol App Pharmacol* 2006; 213: 55–63.

Wong S.C., Proefke S.A., Bhushan A., Matherly L.H. Isolation of human cDNAs that restore methotrexate sensitivity and reduced folate carrier activity in methotrexate transport-defective Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1995; 270:17468-17475.

Worm J., Kirkin A.F., Dzhandzhugazyan K.N., Guldberg P. Methylation-dependent silencing of the reduced folate carrier gene in inherently methotrexate-resistant human breast cancer cells. *J Biol Chem* 2001; 276(43): 39990-40000.

Yadav U., Kumar P., Yadav S.K., Mishra O.P., Rai V. Polymorphisms in folate metabolism genes as maternal risk factor for neural tube defects: an updated meta-analysis. *Metab Brain Dis* 2015; 30(1):7-24.

Yakub M., Moti N., Parveen S., Chaudhry B., Azam I., Iqbal M.P. Polymorphisms in MTHFR, MS and CBS genes and homocysteine levels in a Pakistani population. *PloS ONE* 2012; 7:e33222.

Yamada K., Chen Z., Rozen R., Matthews R.G. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:14853-14858.

Yan L., Zhao L., Long Y., Zou P., Ji G., Gu A., et al. Association of the maternal MTHFR C677T polymorphism with susceptibility to neural tube defects in offsprings: evidence from 25case-control studies. *PLoS One* 2012; 7(10): e41689.

Yang Q.H., Botto L.D., Gallagher M., Friedman J.M., Sanders C.L., Koontz D., et al. Prevalence and effects of gene-gene and gene-nutrient interactions on serum folate and serum total homocysteine concentrations in the United States: Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey DNA Bank. *Am J Clin Nutr* 2008; 88:232-246.

Yang Y., Chen J., Wang B., Ding C., Liu H. Association between MTHFR C677T polymorphism and neural tube defect risks: A comprehensive evaluation in three groups of NTD patients, mothers, and fathers. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2015; 103(6):488-500.

Yetley E.A., Pfeiffer C.M., Phinney K.W., Fazili Z., Lacher D.A., Bailey R.L., et al. Biomarkers of folate status in NHANES: a roundtable summary. *Am J Clin Nutr* 2011; 94(1):303S-312S.

Yang-Feng T.L., Ma Y.Y., Liang R., Prasad P.D., Leibach F.H., Ganapathy V. Assignment of the human folate transporter gene to chromosome 21q22.3 by somatic cell hybrid analysis and in situ hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 210: 874-879.

Yazdy M.M., Liu S., Mitchell A.A., Werler M.M. Maternal dietary glyceemic intake and the risk of neural tube defects. *Am J Epidemiol* 2010; 171: 407-414

Yu Y., Wang F., Bao Y., Lu X., Quan L., Lu P. Association between MTHFR gene polymorphism and NTDs in Chinese Han population. *Int J Clin Exp Med* 2014; 7(9):2901-2906.

Zaganjor I., Sekkarie A., Tsang B.L., Williams J., Razzaghi H., Mulinare J., et al. Describing the Prevalence of Neural Tube Defects Worldwide: A Systematic Literature Review. *PLoS ONE* 2016; 11(4):e0151586.

Zaoui S., Biemont C. Frequency of consanguineous unions in the Tlemcen area (West Algeria). *Santé* 2002; 12: 289-295.

Zappacosta B., Graziano M., Persichilli S., Di Castelnuovo A., Mastroiacovo P., Iacoviello L. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms: genotype frequency and association with homocysteine and folate levels in middle-southern Italian adults. *Cell Biochem Funct* 2014; 32:1-4.

Zhang T., Lou J., Zhong R., Wu J., Zou L., et al. Genetic Variants in the Folate Pathway and the Risk of Neural Tube Defects: A Meta-Analysis of the Published Literature. *PLoS ONE* 2013 ; 8(4): e59570.

Zhang T., Xin R., Gu X., Wang F., Pei L., Lin L., et al. Maternal serum vitamin B12, folate and homocysteine and the risk of neural tube defects in the offspring in a high-risk area of China. *Public Health Nutr* 2009; 12: 680–686.

Zhao R., Matherly L.H., Goldman I.D. Membrane transporters and folate homeostasis: Intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert Rev Mol Med* 2009; 11:e4.

Zhao R., Min S.H., Qiu A., Sakaris A., Goldberg G.L., Sandoval C., et al. The spectrum of mutations in the PCFT gene, coding for an intestinal folate transporter, that are the basis for hereditary folate malabsorption. *Blood* 2007; 110:1147–1152.

Zhao W., Mosley B.S., Cleves M.A., Melnyk S., James S.J., Hobbs C.A. Neural tube defects and maternal biomarkers of folate, homocysteine, and glutathione metabolism. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2006; 76:230-236.

Zhu H., Wicker N.J., Shaw G.M., Lammer E.J., Hendricks K., Suarez L., et al. Homocysteine remethylation enzyme polymorphisms and increased risks for neural tube defects, *Mol Genet Metab*, 78, 2003, 216-221.

Zittoun J. Homocystéine et pathologie vasculaire. *Rev Hématol* . 1998. 4:7-16.

Zohn I.E., Sarkar A.A. The visceral yolk sac endoderm provides for absorption of nutrients to the embryo during neurulation. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010; 88 (8): 593-600.

Année universitaire : 2016/2017

Présentée par : Abbas Amel

Etude de certains polymorphismes génétiques dans les métabolismes des folates et de l'homocystéine et anomalies de fermeture du tube neural

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat en sciences

RESUME

Les anomalies de fermeture du tube neural (AFTNs) représentent une cause majeure de mortalité infantile parmi les malformations congénitales, dont la pathogénèse reste mal comprise. Dans la présente étude, réalisée sur une population algérienne de mères et d'enfants atteints, nous avons investigué la fréquence de nombreux polymorphismes intervenant dans les métabolismes des folates / homocystéine, leur possible contribution dans l'étiologie d'AFTNs ainsi que leur influence sur les concentrations des folates et de l'homocystéine.

Les mutations ont été déterminées par la méthode PCR/RFLP alors que le dosage des paramètres biochimiques a été réalisé par chimiluminescence.

L'analyse des polymorphismes génétiques a montré que les variants AG et AA du polymorphisme G80A du gène RFC sont associés avec l'augmentation du risque chez les enfants atteints.

Par ailleurs, nous avons observé que l'effet combiné des deux polymorphismes C677T et A1298C du gène de la MTHFR confère un risque de survenue de ces anomalies dans notre population. L'étude statistique de l'interaction entre les deux polymorphismes a montré que la combinaison des génotypes hétérozygotes (MTHFR 677CT / 1298AC) augmente le risque d'avoir une AFTN chez les enfants ($p < 0,05$).

Ces deux polymorphismes, au niveau du gène MTHFR, affectent le métabolisme de l'homocystéine chez les mères des enfants atteints conduisant à des concentrations de l'homocystéine élevées chez les mères de génotype TT pour le polymorphisme C677T ($p < 0,05$) et celles de génotype AA pour le polymorphisme A1298C ($p < 0,05$).

Quant au polymorphisme A2756G du gène de la MTR, bien que, son association avec le risque d'AFTNs semble être négative, il a été constaté qu'il réduisait le taux de folate érythrocytaire ce qui appuie sa contribution dans l'apparition des AFTNs dans notre population ($p < 0,05$).

Nos données sur l'association entre les polymorphismes A66G du gène de la MTRR et 844ins68 dans le gène de la CBS et les taux des métabolites ainsi que la relation entre ces mutations et le risque d'AFTNs ne sont pas concluantes.

Cette étude originale par sa primauté en Algérie mais aussi en Afrique aussi bien au niveau de la diversité des polymorphismes examinés que la nature de la population (enfants atteints) mérite d'être poursuivie dans le futur via l'élargissement de la taille de l'échantillon. Ceci permettrait de montrer l'effet interactif des mutations sur l'occurrence des AFTNs et sur le taux des métabolites.

Mots clés : Mots clés : MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G, RFC A80G, CBS 844ins68, AFTN, FOLATE, HOMOCYSTEINE

Laboratoire de recherche : Laboratoire de biologie et génétique moléculaire