

**UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département des Sciences Biologique**



**Mémoire**

**MASTER ACADEMIQUE**

**Domaine** : Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière** : Sciences Biologiques

**Spécialité** : Biochimie Appliquée

*Présenté par :*

DJEDIAI El ghalia

*Thème*

**Statut biochimique maternel et risque de prématurité  
et d'avortements chez les femmes enceintes**

*Soutenu publiquement Le : 29/ 09 /2019*

*Devant le jury:*

<b>Présidente</b>	ANNOU Ghania	M.C.B	U.K.M. Ouargla
<b>Examineur</b>	BAYOUCEF Zahia	M.C.B	U.K.M. Ouargla
<b>Encadreur</b>	ABBAS Amel	M.C.B	U.K. M. Ouargla

*Année universitaire 2018 / 2019*



# Remerciements

Avant tout, je remercie **Dieu** le tout puissant, le Miséricordieux, de m'avoir donné la force, la santé et la persistance pour mener à terme ce travail, ainsi que le courage pour dépasser toutes les difficultés.

Je remercie infiniment mon encadreur **Dr ABBAS Amel**,

**Maître de conférences « B » à l'université Kasdi Merbah-Ouargla** pour son aide et ses conseils tout au long de l'élaboration de ce travail. Je vous remercie grandement car vous étiez toujours à ma disposition pour répondre à mes questions et je suis très reconnaissants des grands efforts que vous m'avez fournis en dirigeant ce travail.

Je présente mes remerciements les plus chaleureux à l'ensemble du personnel de **la maternité de Ouargla, de l'administration, des services gynécologie, S/C et du laboratoire** pour leur patience, leurs conseils, le suivi et l'intérêt qu'ils ont porté pour notre travail.

Je tiens à remercier le **Directeur du Laboratoire de génétique et de biologie moléculaire au CHU de Constantine Pr. ABADI N**, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire où j'ai effectué une partie importante et déterminante de mon travail de recherche.

Je remercie également **Pr. HANACHI S, Pr. SIFI K, Pr. BENMEBAREK K**, et je ne manque pas de remercier les gynécologues **Dr. BOCHTAWI et Dr. ZEGHARE** pour leur aide.

Nous remercions très sincèrement **Massouda et Yasmina**, pour le temps et l'énergie consacrés à l'évaluation de ce travail.

Je remercie **Dr. ANNOU G**, Maître de conférences « B » à l'Université Kasdi Merbah-Ouargla qui m'a fait l'honneur de présider le jury de ce travail.

Je remercie **Dr. BAYOSSEF Z**, Maître de conférences « B » à l'Université Kasdi Merbah-Ouargla d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Un remerciement chaleureux à tous mes collègues de la promotion de **master II biochimie appliquée 2018-2019** pour tous les bons moments partagés ensemble, pour leur soutien et pour leur sincère amitié.

Un spécial clin d'œil à ma chère amie **NAWAL B**, pour son soutien sans faille, sa compréhension et ses encouragements.

En guise de reconnaissance, je tiens à témoigner mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de mon stage de fin d'étude et à l'élaboration de ce modeste travail.



# *Dédicace*

*J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail à*

*Mon père Mr. Abd Elkarim, tu es un pilier solide et incontournable  
pour ma personne et mon parcours.*

*Que Dieu te donne la santé et une longue vie*

*Ma mère, Que ce travail soit pour toi le témoignage de mon infinie  
reconnaissance pour ton aide précieuse et toutes ces années de  
compréhension.*

*Je vous aime.*

*A mes sœurs **LINDA** et **ISMAHAN***

*A mes frères **FOUAD** et **BOUBAKRE***

*A mes chères amies*

***Madjda, Oum elkhiz, Achora, Selma, Nawal, Hnan.***

*∞ **El Ghalia** ∞*

## Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Programme de PCR	41
02	Teneurs plasmatiques en vitamines B9 et B12 et en homocystéine chez les mères ayant fait des AS, des ASR et leurs témoins.	54
03	Teneurs plasmatiques en vitamines B9 et B12 et en homocystéine chez les mères à accouchement prématuré et chez les témoins.	54
04	Fréquences génotypiques de la mutation A2756G du gène de la méthionine synthase, chez les mères faisant des ASR et chez les témoins.	61

## Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Structure chimique de l'acide folique (ou acide ptéroylglutamique)	3
02	Absorption, distribution, stockage et excrétion des folates	7
03	Voies biochimiques du métabolisme des folates	9
04	Structure chimique de la vitamine B12	12
05	Absorption, distribution, excrétion et voies métaboliques de la vitamine B12	14
06	Structure de l'homocystéine	16
07	Formes circulantes de l'homocystéine plasmatique	16
08	Métabolisme intracellulaire de l'homocystéine	19
09	Localisation cytogénétique du gène <i>MTR</i>	23
10	Automate Immulite 2000	34
11	Pelote d'ADN.	38
12	Thermocycleur.	41
13	Profil d'électrophorèse des fragments amplifiés du gène de la MS (198pb) sur gel d'agarose 1,5 %.	42
14	Profil d'électrophorèse des fragments présentant différents génotypes issus par clivage de HaeIII sur gel d'agarose 3 %.	43
15	Moyenne d'âge chez les mères à AS et à ASR et leurs témoins.	45
16	Moyenne d'âge chez les mères à accouchement prématuré et leurs témoins.	45
17	<b>a</b> : Moyenne d'IMC chez les mères à AS et à ASR et leurs témoins. <b>b</b> : Répartition des mères à AS et à ASR et leurs témoins selon l'IMC.	47
18	<b>a</b> : Moyenne d'IMC chez les mères à accouchement prématuré et leurs témoins. <b>b</b> : Répartition les mères à accouchement prématuré et leurs témoins selon IMC.	47
19	Niveau de stress chez les mères à AS et à ASR et leurs témoins.	49
20	Niveau de stress chez les mères à accouchement prématuré et leurs témoins.	50

21	Consommation forte des dattes par les mères à AS, à ASR et à accouchement prématuré et aussi par les témoins.	51
22	Consommation excessive du thé et du café par les mères à AS et à ASR et par leurs témoins.	52
23	Consommation excessive du thé et du café par les mères à accouchement prématuré et par les témoins.	53
24	Prise multi vitaminique par les mères ayant fait des AS et des ASR et par leurs témoins.	58
25	Prise d'acide folique par les mères ayant fait des AS et des ASR et par leurs témoins.	58
26	Prise multi vitaminique par les mères à accouchement prématuré et par les témoins.	59
27	Prise d'acide folique par les mères à accouchement prématuré et par les témoins.	59

## Liste des abréviations

<b>5,10-CH<sub>2</sub>THF</b>	5,10-méthylène-THF
<b>5-MTHF</b>	5-méthyl-tetrahydrofolate
<b>Ado-Cbl</b>	Adénosyl cobalamine
<b>AS</b>	Avortement spontané
<b>ASR</b>	Avortement spontané à répétition
<b>BHMT</b>	bétaïne-homocystéine méthyle transférase
<b>CBS</b>	Cystathionine- $\beta$ -Synthase
<b>DHF</b>	dihydrofolate
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EDTA</b>	Ethylène Diamine Tétra-Acétique
<b>EPSP</b>	Etablissement public de santé et de proximité
<b>GSH</b>	glutathion
<b>Hcy</b>	homocystéine
<b>HHcy</b>	hyperhomocystéinémie
<b>KCN</b>	Cyanure de potassium
<b>MeCbl</b>	méthylcobalamine
<b>Met</b>	méthionine
<b>MS</b>	Méthionine synthase
<b>MTHFR</b>	N <sup>5</sup> , 10 méthylène-tétrahydrofolate réductase
<b>MTR</b>	5-méthyl-tétrahydrofolate-homocystéine méthyl-transférase
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>SA</b>	Semaine d'aménorrhé
<b>SAH</b>	S-adénosyl-L-homocystéine
<b>SAM</b>	S-adénosyl-méthionine
<b>TC</b>	transcobalamine
<b>THF</b>	tétrahydrofolate

# Table des matières

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Table des matières	
Introduction .....	1

## **Partie 01: Revue bibliographique**

### **Chapitre I: Vitamines**

I.1. Folates ou vitamine B9.....	3
I.1.1. Définition et structure .....	3
I.1.2. Métabolisme .....	4
I.1.2.1. Absorption intestinale .....	4
I.1.2.2. Transport sanguin.....	5
I.1.2.3. Distribution tissulaire .....	5
I.1.2.4. Excrétion .....	6
I.1.3. Rôle physiologique des folates.....	8
I.1.4. Apports et besoins nutritionnels .....	9
I.1.5. Carence en vitamine B9 .....	10
I.2. Vitamine B12 .....	11
I.2.1. Définition et Structure .....	11
I.2.2. Métabolisme .....	12
I.2.2.1. Absorption intestinale .....	12
I.2.2.2. Transport sanguin.....	13
I.2.2.3. Distribution tissulaire .....	13
I.2.2.4. Excrétion .....	13
I.2.3. Rôle physiologique de la vitamine B12 .....	14
I.2.4. Apports et besoins nutritionnels .....	15
I.2.5. Carence en vitamine B12 .....	15

### **Chapitre II: Homocystéine**

II.1. Homocystéine .....	16
II.1.1. Généralités .....	16
II.1.2. Voies métaboliques de l'homocystéine .....	17
II.1.2.1. Voie de biosynthèse .....	17
II.1.2.2. Voies de dégradation.....	17

II.1.2.2.1. Voie de rémethylation.....	17
II.1.2.2.2. Voie de trans-sulfuration.....	18
II.1.3. Régulation du taux plasmatique de l'homocystéine .....	19
II.2. Hyperhomocystéinémie .....	20
II.2.1. Définition .....	20
II.2.2. Facteurs Favorisant l'hyperhomocystéinémie.....	20
II.2.2.1. Facteurs génétiques.....	21
II.2.2.2. Facteurs nutritionnels.....	21
II.2.2.3. Facteurs environnementaux .....	22
II.2.3. Méthionine Synthase et polymorphisme A2756G.....	23
II.2.3.1. Protéine .....	23
II.2.3.2. Gène .....	23
II.2.3.3. Polymorphisme A2756G .....	24

### **Chapitre III: Avortements et prématurité**

III.1. Généralités sur la grossesse et ses complications.....	25
III.2. Avortements .....	25
III.2.1. Avortements spontanés.....	26
III.2.2. Avortements spontanés à répétition.....	27
III.2.3. Facteurs de risque .....	27
III.3. Prématurité.....	28
III.3.1. Définition.....	28
III.3.2. Facteurs de risque .....	29
III.4. Physiopathologie des AS, des ASR et de la prématurité liée à la perturbation du métabolisme de l'Hcy.....	30

### **Partie 02: Etude expérimentale**

#### **Chapitre I: Sujets, matériels et méthodes**

I.1. Présentation de l'étude .....	31
I.1.1. Répartition et caractéristiques des populations de l'étude .....	31
I.1.2. Recueil de l'information.....	32
I.1.3. Paramètres étudiés.....	32
I.1.4. Types et critères de comparaison entre les populations .....	32
I.2. Prélèvements et analyse des échantillons.....	33
I.2.1. Prélèvements sanguins .....	33
I.2.2. Analyses biochimiques :.....	33
I.2.2.1. Dosage du folate (vitamine B9) : .....	34
I.2.2.2. Dosage de la vitamine B12 : .....	35
I.2.2.3. Dosage de l'homocystéine .....	36
I.2.3. Analyse génétique .....	37

I.2.3.1. Extraction et dosage de l'ADN .....	37
I.2.3.2. Recherche de la mutation A2756G du gène de la MS par la technique PCR /RFLP .....	39
I.2.4. Analyse statistique .....	44

## **Chapitre II: Résultats et discussion**

II.1. Etude de quelques facteurs de risque pour les avortements spontanés (AS et ASR) et pour la prématurité.....	45
II.1.1. Age.....	45
II.1.2. Obésité .....	47
II.1.3. Stress .....	49
II.1.4. Consommation des dattes .....	51
II.1.5. Consommation du café et du thé.....	52
II.2. Analyse biochimique .....	54
II.2.1. Statut biochimique : folate, vitamine B12 et homocystéine des femmes ayant fait des AS, des ASR ou ayant accouché avant terme.....	54
II.2.2. Prise de suppléments multi vitaminiques et d'acide folique par les mères ayant fait des avortements spontanés ou ont accouché avant terme.....	58
II.3. Analyse génétique.....	61
Conclusion et perspectives .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Références bibliographiques.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Annexes .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Résumés.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>

# **Introduction**

### **Introduction**

La grossesse bien qu'étant un phénomène physiologique, elle peut fortement engager le pronostic vital de la mère et /ou du nouveau-né, lorsqu'elle est associée à certaines complications (**Meyer *et al.*, 2013**).

L'avortement spontané (AS), communément appelé fausse couche, est un accident fréquent de la pathologie obstétricale et constitue, de nos jours, un problème réel de santé publique. Environ 15 % à 20% des grossesses cliniques évoluent vers un avortement spontané, la plupart sont sporadiques, et 1% sont des avortements spontanés à répétition (ASR,) dont 50% restent de cause inexplicée (**Oliver et Overton, 2014**).

La prématurité ou les accouchements avant terme est une des situations obstétricales les plus fréquentes et les plus anciennement reconnues, elle est responsable de 35% des décès néonataux dans le monde (**Goldenberg *et al.*, 2009**).

Les facteurs favorisant les avortements ou les accouchements prématurés (AP) chez les femmes enceintes sont multiples et mal compris. Un complexe impliquant des facteurs physiologiques, nutritionnels, ou aussi génétiques, semblent contribuer à leur étiologie.

Récemment, le statut vitaminique marginal, a été impliqué dans la survenue des résultats défavorables de grossesses. L'effet d'une carence en certaines vitamines du groupe B et l'hyperhomocystéinémie qui en résulte, ont été pointées du doigt dans la survenue des avortements et des naissances avant terme (**Simpson *et al.*, 2010 ; Havdenak *et al.*, 2012 ; Samii *et al.*, 2019**).

Les déficiences en folates (vitamine B9) et en vitamine B12, sont parmi les carences vitaminiques les plus fréquentes et sont très néfastes. La prise diététique ne satisfait pas toujours les besoins augmentés au cours de la grossesse. Raison pour laquelle, une supplémentation périconceptionnelle en ces vitamines est recommandée (**Société des obstétriciens et gynécologues du Canada, 2010 ; Sebastiani *et al.*, 2019**).

En effet, les vitamines B9 et B12 interviennent dans plusieurs processus métaboliques importants : cofacteurs de la biosynthèse de l'ADN et de l'ARN, de la synthèse des protéines et des donneurs universel de groupements méthyles régulant l'expression des gènes. Une dérégulation dans l'une de ces voies métaboliques peut perturber, De ce fait, le déroulement normal de la grossesse. (**Serraj *et al.*, 2010**).

Une carence en ces vitamines est aussi la cause la plus importante d'une augmentation du taux de l'acide aminé homocystéine, causant une hyperhomocystéinémie (HHcy), cette dernière qui représente un facteur de risque majeur pour les avortements et aussi pour la prématurité (**Nelen *et al.*, 2001**).

En effet, la carence en folates est responsable d'un déficit en méthyl THF qui est le donneur de méthyle lors de la reméthylation de l'Hcy, provoquant, ainsi, une HHcy sévère (**Clarke, 2005 ; Lonn *et al.*, 2006 ; Séné *et al.*, 2013**).

La vitamine B12, quand à elle, est le principal déterminant nutritionnel de l'Hcy. Sa carence a pour conséquence une baisse de la trans-méthylation du méthyl THF sur l'homocystéine durant la voie de reméthylation (**Chanarin *et al.*, 1989 ; Guéant *et al.*, 1993**).

L'interdépendance des métabolismes, folates, vitamine B12 et de l'homocystéine laissent, aussi, supposer que les gènes régulant ces voies métaboliques peuvent être cause de la survenue de ces complications. Parmi les plus importantes on distingue : la mutation A2756G du gène codant la MS, qui provoquent une HHcy modérée (**Chen *et al.*, 1997**).

L'ensemble de ces données nous a conduit à tracer comme objectifs:

- L'étude de quelques facteurs de risque, pouvant influencer le statut biochimique maternel, à savoir : l'âge, le poids, le stress et aussi la consommation excessive de certains nutriments : dattes, café et thé. Ceci pour voir leur impact sur la survenue des AS, ASR et AP dans notre population
- L'évaluation du statut vitaminique et du métabolisme de l'homocystéine chez les femmes à risque. Elle consiste à mesurer les concentrations plasmatiques du folate, de la vitamine B12 et de l'homocystéine, afin de voir leur contribution dans l'étiologie des avortements et de la prématurité chez les femmes de notre population.
- L'étude de la mutation génétique A2756G du gène codant la méthionine synthase (MS) chez les mères faisant des avortements spontanés à répétition .

**Partie 01.**

---

**Revue bibliographique**

**Chapitre I.**

**Vitamines**

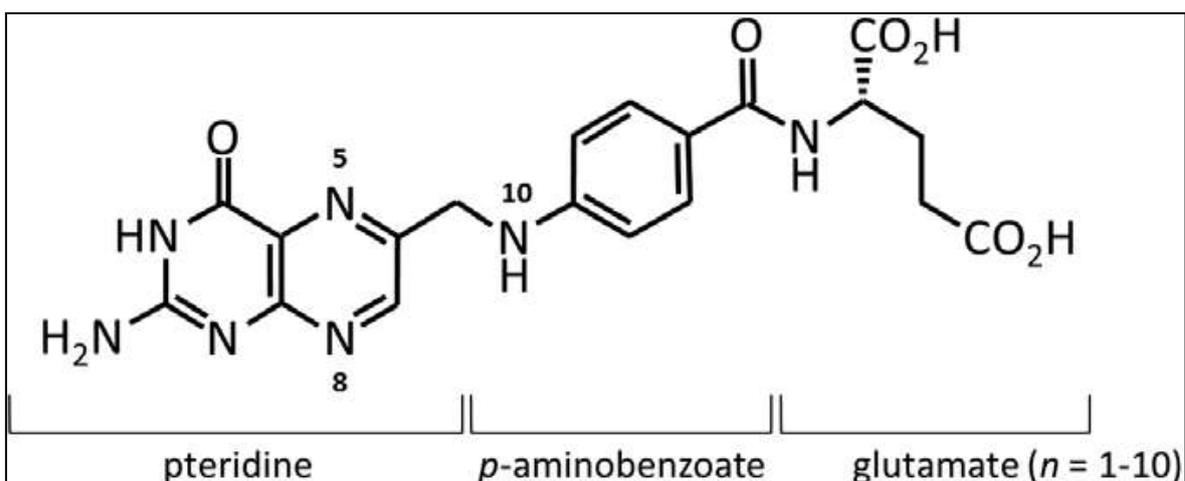
---

## I.1. Folates ou vitamine B9

### I.1.1. Définition et structure

La vitamine B9 ou folacine, est aussi appelée acide folique pour la forme synthétisée servant de supplément, et folate pour celle présente naturellement dans les aliments. Elle a été isolée pour la première fois en 1941 à partir des feuilles d'épinards. La vitamine B9, comme toutes les vitamines du groupe B, est hydrosoluble (Davis et Nicol, 1988 ; Cossins, 2000).

C'est une molécule relativement simple de poids moléculaire égal à 441 KDa (Sober et al, 1973), formé par trois unités : ptéridine, acide para-amino-benzoïque (PABA) et acide glutamique. Le noyau ptéridine est lié via un pont méthylène au PABA pour former l'acide ptéroïque, lui-même lié par une liaison amide à l'acide glutamique, d'où son nom chimique d'acide ptéroyl mono glutamique (PteGlu1) (Scott, 1994) (figure 01).



**Figure 01.** Structure chimique de l'acide folique (ou acide ptéroylglutamique) (Lucock, 2000).

Dans les aliments, les folates se trouvent majoritairement sous forme de polyglutamates (portant entre 1 et 7 résidus glutamates reliés en chaîne au glutamyl constitutif) (Abdelmoutaleb *et al.*, 2000; Bollander-Gouaille, 2002).

Le noyau ptéridine des folates peut exister sous 3 états d'oxydation : totalement oxydé ou sous les formes réduites 7,8-dihydro (DHF) ou 5,6,7,8-tétrahydrofolate (THF). Les tétrahydrofolates, sous leurs formes polyglutamates sont biologiquement actifs, et

présents dans la cellule essentiellement sous la forme de pentaglutamate (**Bollheimer et al., 2005**).

L'unique fonction biochimique des folates, chez les mammifères, est d'accepter puis de libérer des unités monocarbonées. Donc, au niveau cellulaire, ils peuvent être différentes selon le type d'unité à un carbone qu'ils transportent sur les atomes d'azote numérotés 5 et 10 : 5-formyl-THF, 10-formyl-THF, 5,10-méthényl-THF, 5-méthyl-THF (principale forme circulante) ou 5,10-méthylène-THF. Ainsi, les différentes fonctions physiologiques des folates vont découler de cette diversité (**Smulders et Stehouwer, 2005**).

Les folates alimentaires sont sensibles à la lumière, facilement oxydables et thermolabiles (**Lucock, 2000 ; Mebart, 2006**). La cuisson détruira jusqu'à 80 % des folates présents (**Joubert et al., 2002**). De ce fait, l'acide folique stable chimiquement est largement utilisé dans l'enrichissement des aliments ainsi que dans la supplémentation médicamenteuse (**Clarke et al., 2004**).

### **I.1.2. Métabolisme**

#### **I.1.2.1. Absorption intestinale**

Les folates alimentaires sous forme de polyglutamates, doivent être hydrolysés en leurs formes monoglutamates avant leur absorption par la muqueuse intestinale (**McDowell, 2000 ; Smulders et Stehouwer, 2005**).

Cette hydrolyse peut être catalysée par 2 types de conjugases, l'une issue des sécrétions pancréatiques,  $\gamma$ -glutamyl hydrolase ( $\gamma$ GH) et l'autre associée à la membrane de la bordure en brosse jéjunale, glutamate carboxypeptidase IV (GCPIV) (**Gregory, 2001**) (figure 02).

L'absorption des folates monoglutamates se produit dans le jéjunum (**Girard et Remond, 2003**) par deux processus distincts : l'un actif et saturable à un pH optimum acide (**Gregory, 2001**) et l'autre par diffusion passive lorsque les concentrations en acide folique deviennent supérieures à 10  $\mu$ M (**Bills et al., 1992**).

Une fois absorbés dans la cellule intestinale et avant d'être libérés dans la veine porte, les folates monoglutamates sont réduits grâce à la dihydrofolate réductase (DHFR) en THF, et subissent une méthylation ou une formylation (**Le Grusse et Watier, 1993; Smulders et Stehouwer, 2005**) (figure 02).

### **I.1.2.2. Transport sanguin**

90 % de l'activité folique est localisée dans les hématies alors qu'uniquement 10 % résident dans le plasma (**Searcy, 1969**). Le 5-MTHF monoglutamate est la forme plasmatique circulante de la vitamine chez l'homme (**Zittoun, 1994**).

Les folates plasmatiques peuvent être liés à des protéines de faible affinité, principalement l'albumine, ou à une protéine à affinité élevée, la Folate Binding Protein (**Herbert et Biagaouette, 1997**).

Les folates sont, par la suite, amenés au foie, puis redistribués aux tissus périphériques sous la forme de 5-MTHF monoglutamates, ou encore recyclés en suivant le cycle entérohépatique (**Stanger, 2002**) (figure 02).

Il importe de savoir, les folates se retrouvent majoritairement dans le foie et les globules rouges sous leurs formes polyglutamates, synthétisées à partir des formes monoglutamates grâce à la folylpolyglutamate synthétase (**Smulders et Stehouwer, 2005**) (figure 02).

### **I.1.2.3. Distribution tissulaire**

Les folates sous leur forme monoglutamates sont transportés à travers les membranes cellulaires.

Plusieurs systèmes sont impliqués; parmi les mieux caractérisés, il y a :

Le transporteur des folates réduits (RFC, Reduced Folate Carrier) qui assure un transport facilité et bidirectionnel des folates.

Les récepteurs des folates qui permettent l'entrée des folates dans la cellule par endocytose (**Matherly et Goldman, 2003**).

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

Le THF monoglutamate est reconverti en polyglutamate, H4PteGlu<sub>n</sub>, par l'enzyme folylpolyglutamate synthétase (FPGS) (**Lavoie et al., 1974 ; Shane, 1989**). Cette polyglutamation permet d'une part la rétention des folates à l'intérieur de la cellule et

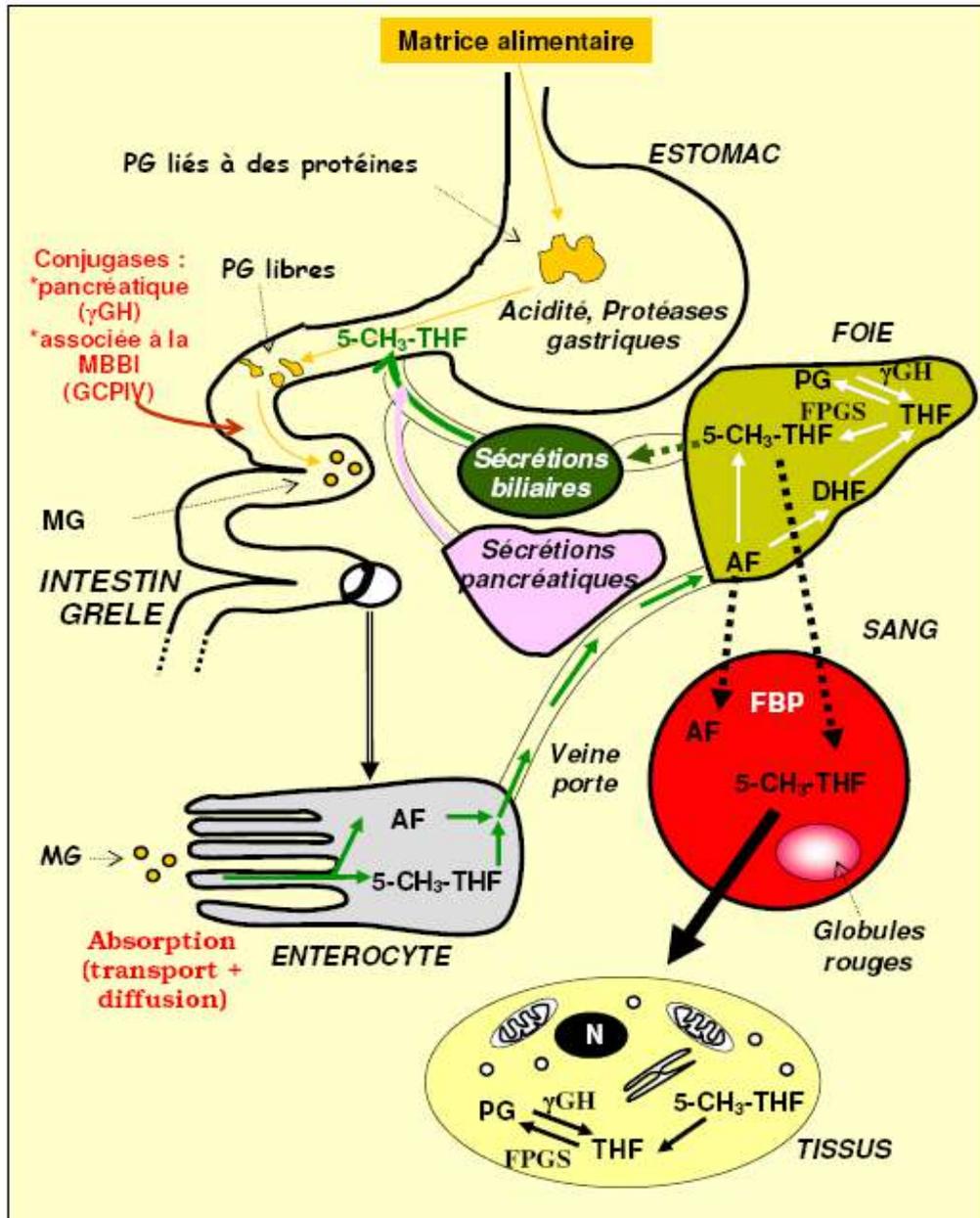
d'autre part les polyglutamates sont de meilleurs substrats pour les enzymes folates dépendantes que les monoglutamates (**Lucock, 2000**).

#### **I.1.2.4. Excrétion**

Le fait que seulement 1 à 2% des folates alimentaires soient excrétés sous forme intacte dans les urines suggère que la majorité des folates sont catabolisés avant leur excrétion urinaire (**Hillman et al., 1982**).

Chez la femme, le catabolisme des folates est augmenté pendant la grossesse (**Caudill et al., 1998**).

L'excrétion biliaire de folates est très importante mais la plupart de ces folates seront réabsorbés au niveau de l'intestin grêle (cycle entérohépatique), une faible proportion seulement se retrouve dans les fèces (**Mc Dowell, 2000**) (figure 02).



**Figure 02.** Absorption, distribution, stockage et excrétion des folates (Voutilainen *et al.*, 2001)(FBP, Folate Binding Protein ; MBBI, Membrane de la Bordure en Brosse Intestinale ; MG, Mono Glutamate ; PG, Poly Glutamate ; FPGS, Folyl Poly Glutamate Synthétase ;  $\gamma$ -GH,  $\gamma$ -Glutamyl Hydrolase ; GCPIV, Glutamate Carboxy Peptidase IV ; AF, Acide Folique ; DHF, DiHydroFolate ; THF, TétrahydroFolate ; 5-CH<sub>3</sub>-THF, 5-méthyl-THF ; pABG, p-Amino Benzoyl Glutamate ; RFC, Reduced Folate Carrier ; FR, Folate Recepteur).

### **I.1.3. Rôle physiologique des folates**

Dans la cellule, les folates sont des cofacteurs importants de plusieurs voies métaboliques (Bässler, 1997).

- Synthèse des bases puriques

Les folates interviennent sous forme de formyl THF dans la synthèse des noyaux puriques (C2 et C8 du noyau purine), et donc dans la synthèse des acides nucléiques (ARN et ADN) (Wagner, 1995) (figure 03).

- Synthèse du thymidilate

la thymidylate synthétase, qui utilise surtout les THF comme coenzymes, intervient dans la réaction qui correspond à une méthylation et la possible synthèse de thymidylate, puis de thymidine triphosphate (précurseur indispensable de la synthèse d'ADN) (Banerjee *et al.*, 1990) (figure 03).

- Synthèse de la méthionine

Il s'agit d'une réaction de reméthylation de l'homocystéine (Hcy). L' Hcy génère la méthionine (Met) et par l'intervention conjointe de la méthionine synthase (MS) et de la vitamine B12 comme cofacteur. Cette réaction n'est possible qu'après réduction du 5,10 MTHF en 5 MTHF, donneur de méthyle de par une enzyme, la méthylène tétra hydrofolate réductase (MTHFR) (Green *et al.*, 1988) (figure 03).

- Catabolisme de l'histidine

La conversion de l'histidine en acide glutamique passe par un intermédiaire métabolique, l'acide formiminoglutamique (FIGLU) dont la transformation en acide glutamique nécessite l'intervention du THF comme accepteur du radical formimine, réaction catalysée par la formiminotransférase qui se déroule uniquement dans le foie et le rein (Van der put *et al.*, 2001) (figure 03).

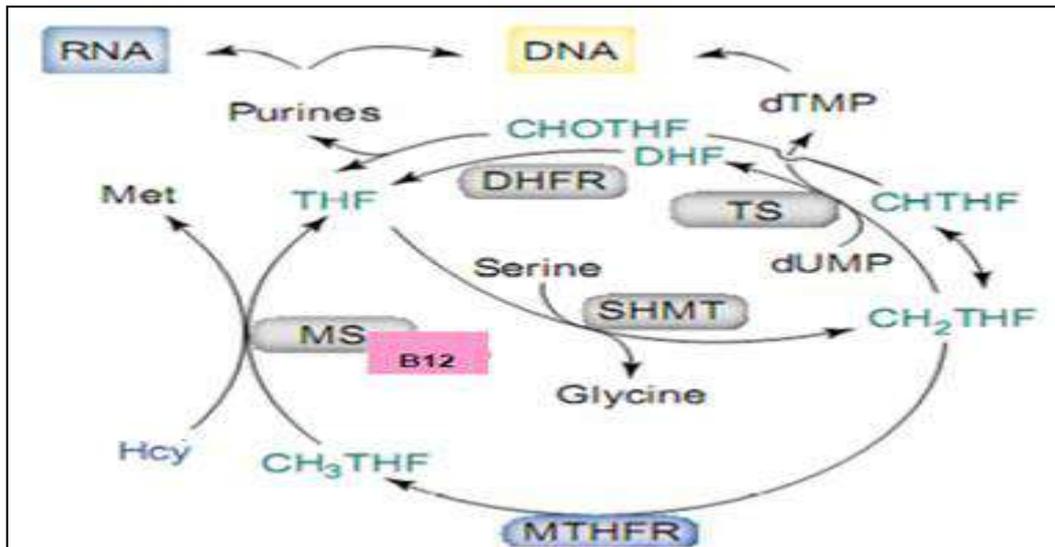


Figure 03. Voies biochimiques du métabolisme des folates (Ueland *et al.*, 2001).

**MTHFR** : Méthylène tétrahydrofolate réductase. **MS** : Méthionine synthase.

**CH2THF** : Méthyl tétrahydrofolate.

**DHF**: dihydrofolate.

**CHOTHF** : Formyl tétrahydrofolate .

**THF** : Tétrahydrofolate.

**DHFR** : Dihydrofolate reductase

**TS** : Thymidylate synthase.

**SHMT** : Sérine hydroxyméthyltransférase

**CHTHF** : Méthelyne tétrahydrofolate.

#### I.1.4. Apports et besoins nutritionnels

Le corps humain ne peut pas synthétiser l'acide folique de novo. Ce composé doit être fourni par l'alimentation, se trouvant principalement dans les végétaux (épinards, salades, luzerne, grains de maïs et ses dérivés), les fruits (orange), dans le foie des animaux et dans certaines préparations de levures ou de bactéries (Mc Dowell, 2000 ).

La flore intestinale est une source secondaire des folates (Joubert *et al.*, 2002). Par ailleurs, la supplémentation par l'acide folique (forme synthétique) et/ou la fortification des aliments par ce composé représente une source d'apport importante en cette vitamine (Castellanos-Sinco *et al.*, 2015).

Le contenu du corps en acide folique est estimé entre 15 et 30 mg (Diamond, 2008).

Les apports nutritionnels journaliers conseillés en acide folique sont environ de 400 µg/jour chez l'adulte. Cette valeur augmente jusqu'à 600 µg/jour chez les femmes qui planifient une grossesse et chez les femmes enceintes. En effet, chez cette dernières les

besoins en folates augmentent, et cela peut représenter une réponse physiologique à la grossesse à cause de la formation du placenta, du développement du fœtus, de l'augmentation de l'élimination urinaire et de l'influence hormonale sur le métabolisme des folates (**Stover, 2008**).

#### **I.1.5. Carence en vitamine B9**

De nos jours, la déficience en folate est une des carences vitaminiques les plus fréquentes dans le monde et pose un problème de santé publique aussi bien dans les pays en voie de développement que dans les pays industrialisés (**Shiliang, 2003**). Elle est souvent le résultat d'une malnutrition, d'une malabsorption, ou encore d'utilisation de certains médicaments (**Refsum et al., 2004**).

Les besoins en folates augmentent dans certaines situations. Ils sont accrus pendant la grossesse et mènent dans certains cas à l'insuffisance folique manifeste. La prise folique diététique ne satisfait pas toujours les besoins augmentés au cours de cette période, pouvant, ainsi, causer des problèmes chez la femme enceinte.

L'objectif des organisations de santé mondiales est d'améliorer les apports alimentaires notamment le statut en folates des femmes en âge de procréer. Cependant, et malgré les recommandations, peu de femmes 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 survenue des résultats défavorables de grossesse. La prévention, peut être obtenue en atteignant un taux élevé de folate maternel (**Li et al., 2003**).

Une carence en folates est aussi la cause la plus importante d'une augmentation du taux de l'acide aminé homocystéine. 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, causant une hyperhomocystéinémie (HHcy) (**De Bree et al., 2001**), cette dernière qui représente un

facteur de risque majeur dans la survenue des complications au cours de la grossesse (Nelen *et al.*, 2001).

Il a été trouvé qu'un supplément de 0,5 à 5,0 mg/jour d'acide folique diminue de presque 25 % le taux d'Hcy dans le plasma (Clarke *et al.*, 1998).

Par ailleurs, les normes physiologiques décrites pour les taux des folates ne reflètent pas un taux de folate suffisant pour la prévention, 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 (Cridler *et al.*, 2014).

## **I.2. Vitamine B12**

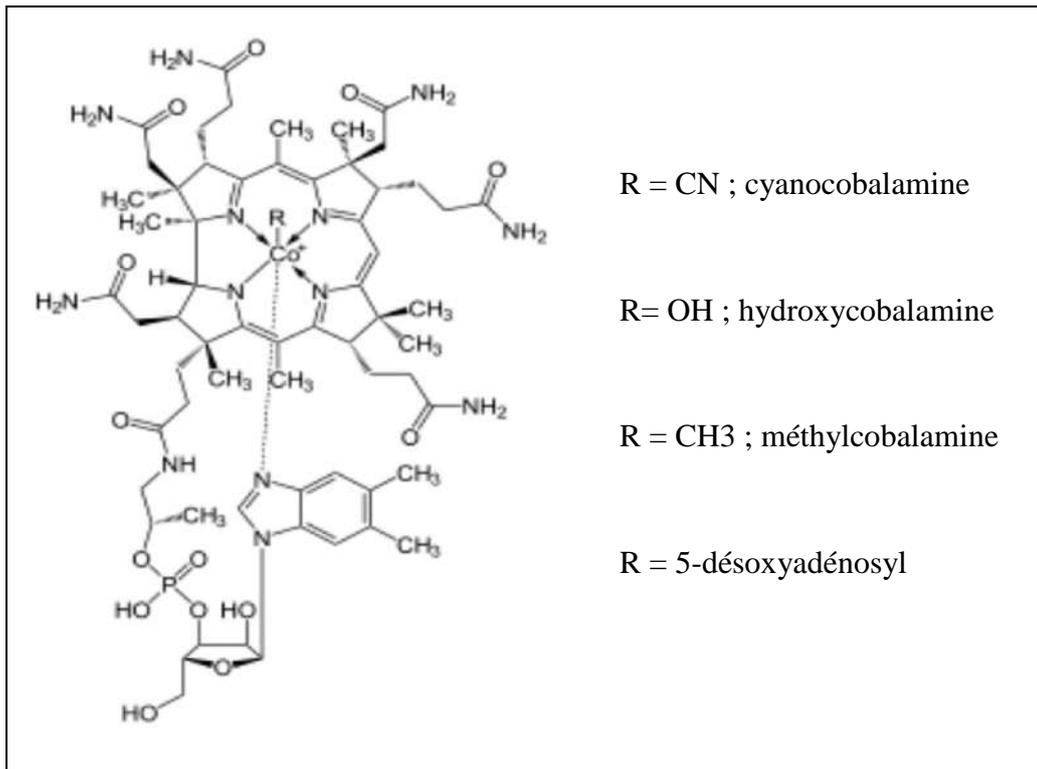
### **I.2.1. Définition et Structure**

La vitamine B12 également connue sous le nom de cobalamine (Cbl), est une vitamine hydrosoluble qui a une structure chimique proche de celle de l'hème avec un atome central constitué par du cobalt, d'où le nom de cobalamine (Brown, 2005).

C'est une macromolécule de masse moléculaire de 1356 g/mol. Elle est composée d'un noyau tétrapyrrolique qui renferme en son centre un atome de cobalt auquel sont reliés différents groupements permettant de répertorier quatre formes de la vitamine: cyanocobalamine, hydroxocobalamine qui sont les formes oxydées stables, et méthylcobalamine (Me-Cbl) et 5- adénosyl cobalamine (Ado-Cbl) qui représentent les deux coenzymes réduits et actifs chez l'homme (Le Grusse et Watier, 1993 ; Thakkar et Billa, 2015) (figure 04).

Cette structure comprend également un nucléotide : le 5,6-diméthylbenzimidazole dont le groupe imidazole est relié au cobalt et le phosphate à l'un des noyaux pyrrolo (Gueant *et al.*, 1993 ; Peterson *et al.*, 1998).

La nature et la fonction physiologique de la vitamine B12 est déterminée par les ligands occupant la position axiale supérieure de la molécule (Coudray et Cuivre, 2001).



**Figure 04.** Structure chimique de la vitamine B12 (Angelica *et al.*, 2011).

## I.2.2. Métabolisme

### I.2.2.1. Absorption intestinale

La vitamine B12 ingérée est liée à des protéines alimentaires (Andrès *et al.*, 2004). Elle est dissociée sous l'influence du suc gastrique, essentiellement par l'acide chlorhydrique et par la pepsine (Klee, 2000). Par la suite, la vitamine se lie aux haptocorrines, glycoprotéines porteuses présentes dans les sécrétions salivaires et gastriques (Kuzminski *et al.*, 1998) (figure 05).

Dans le duodénum, ces protéines sont progressivement digérées, et la vitamine B12 libre se lie au facteur intrinsèque (FI) sécrété par les cellules de la muqueuse gastrique, la protégeant, ainsi, du catabolisme bactérien iléal (Pautas *et al.*, 1999 ; Nicolas et Guéant, 1994) (figure 05).

Deux systèmes distincts contribuent à son absorption intestinale.

Le premier, spécifique et dépendant du FI, est saturable. Une succession de transports intra lumineux aboutit, dans l'iléon terminal, à la liaison du complexe vitamine B12-FI avec un récepteur cellulaire, la cubuline (Quadros et Advances, 2009).

Après endocytose, la vitamine B12, dissociée du FI, se lie surtout à la transcobalamine II. Ce nouveau complexe, ou holotranscobalamine, passe dans le sang et transporte la vitamine B12 jusqu'aux cellules (**Serraj et al., 2009**) (figure 05).

Le second système d'absorption est indépendant du FI : 1 % à 5 % de la dose de la vitamine B12 ingérée est absorbée par simple diffusion (**Rufenacht et al., 2008**).

Il existe un cycle entéro-hépatique qui favorise le stockage de la vitamine B12 dans le foie. Chez l'adulte, la réserve hépatique varie entre 2 et 5 mg, ce qui est suffisant pour 3 à 5 ans (**Leary et Samman, 2010**).

Par ailleurs, dans le rein, la mégaline, un récepteur du tubule rénal proximal, permet la réabsorption de la vitamine B12 excrétée dans l'urine primitive. De ce fait, les réserves physiologiques en vitamine B12 sont abondantes (**Zittoun, 2000 ; Wolters et al., 2004**).

#### **I.2.2.2. Transport sanguin**

Cette phase sanguine, est assurée par des transporteurs spécifiques : les transcobalamines I, II et III, la transcobalamine II est la plus importante car elle fixe plus de 80% de la vitamine B12 absorbée, elle délivre la vitamine B12 aux cellules utilisatrices par un mécanisme d'endocytose récepteur-dépendant (**Murray et Granner, 1995 ; Oltean et Banerjee, 2004**) (figure 05).

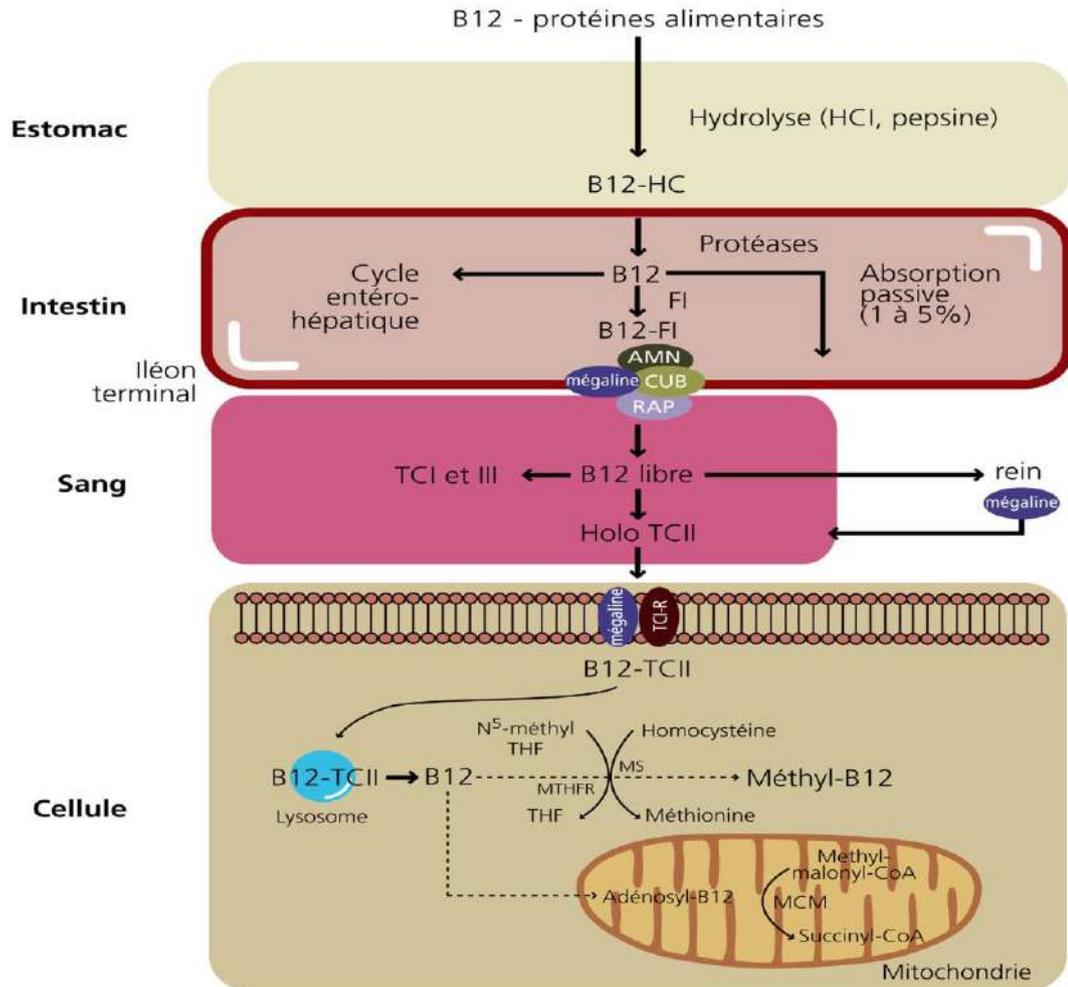
#### **I.2.2.3. Distribution tissulaire**

Le complexe Cbl-TC II est capté par les cellules hépatiques et aussi les cellules des autres organes par le récepteur d'endocytose CD320, protéine transmembranaire présente à la surface cellulaire de tous les tissus (**Quadros et al., 2009**).

La libération de la cobalamine dans le cytoplasme suite à la dégradation lysosomale de la TC II est une étape obligatoire pour le métabolisme intracellulaire de la cobalamine (**Le Grusse et Watier, 1993**).

#### **I.2.2.4. Excrétion**

L'élimination se fait par voie biliaire et par voie urinaire en faible quantité puisque les pertes en vitamine B12 sont limitées par l'existence d'un cycle entéro-hépatique intense et par un phénomène de réabsorption tubulaire de vitamine B12 (**Krautler, 2005 ; Moreno-Garcia et al., 2013**) (figure 05).



**Figure 05.** Absorption, distribution, excréation et voies métaboliques de la vitamine B12 (Serraj *et al.*, 2010).

### I.2.3. Rôle physiologique de la vitamine B12

Dans le cytoplasme, Plus de 95% de la cobalamine intracellulaire est liée à deux enzymes intracellulaires : la méthylmalonyl- CoA mutase (MUT) et la méthionine synthase (MS) (Michael, 2006).

La cobalamine sous sa forme méthylée, Me-Cbl, est le cofacteur de la MS. Cette dernière catalyse le transfert d'un groupe méthyl à partir du N5-MeTHF, un métabolite de l'acide folique, vers l'homocystéine pour former la méthionine et pour la régénération du THF (Costa *et al.* , 1996) (figure 05).

L'adénosylcobalamine(AdCbl) intervient dans une réaction d'isomérisation, par la méthylmalonyl- CoA mutase qui permet la conversion du méthylmalonyl-CoA en

succinyl-CoA qui pourra entrer dans le cycle de Krebs et participer à la néoglucogenèse (Krautler, 2005) (figure 05).

#### **I.2.4. Apports et besoins nutritionnels**

Les aliments d'origine animale sont une bonne source de la vitamine B12 notamment le foie, le lait, la viande, les abats, la volaille, le poisson, les crustacés, les fruits de mer, et les œufs (Watanabe, 2007).

Plusieurs espèces bactériennes présentes dans le tractus digestif sont capables de synthétiser la vitamine B12 (Roth *et al.*, 1996).

Les besoins sont variables selon l'âge. Les valeurs suivantes indiquent les apports quotidiens conseillés pour les différents groupes de la population (Martin, 2001):

- De 1-3 ans, 4-6 ans, 7-9 ans, 10-12 ans et 13 à 15 ans: 0,8 ; 1,1 ; 1,4 ; 1,9 et 2,3 µg/j.
- À partir de 16 ans, y compris personnes âgées: 2,4 µg/j.
- Femmes enceintes: 2,6 µg/j.

Les besoins augmentés en cette vitamine pendant la grossesse sont essentiels à la croissance du fœtus.

#### **I.2.5. Carence en vitamine B12**

Les étiologies principales de la carence en vitamine B12 sont : un apport nutritionnel insuffisant, le syndrome de malabsorption intestinale et les interventions médicales (Andrés *et al.*, 2005 ; Stabler, 2013).

Une carence en vitamine B12 pendant la grossesse peut entraîner des complications pour l'enfant. Dans les cas les plus sévères une fausse couche, une anémie pernicieuse et des dommages neurologiques (Langan et Zawistoski, 2011).

Par ailleurs, une carence en vitamine B12 conduit à une diminution du niveau des cobalamines plasmatiques disponibles pour la synthèse des Méthyles Cobalamines et par conséquent, une réduction de l'activité enzymatique de la MS, causant ainsi une augmentation anormale du taux d'homocystéine (Orozco-Barrios *et al.*, 2009).

Un apport suffisant de vitamine B12 (0,5 mg/jour) a été décrit comme nécessaire pour garder un taux normal d'Hcy sanguin au sein d'une population (Malinow *et al.*, 1999; Ducros *et al.*, 2002).

# **Chapter II.**

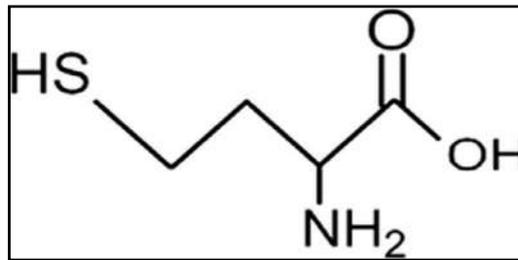
## **Homocystéine**

---

## II.1. Homocystéine

### II.1.1. Généralités

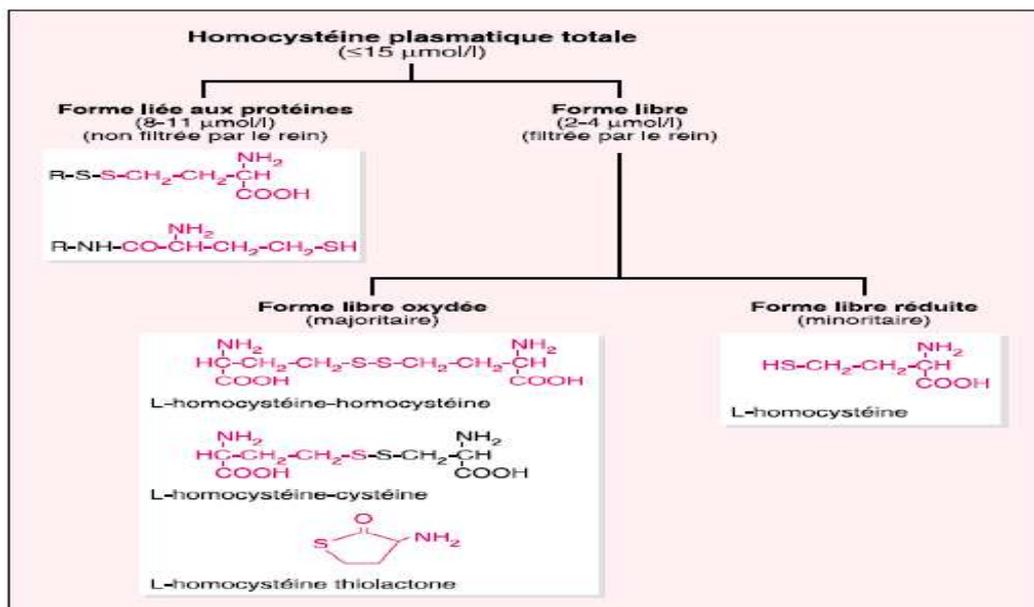
L'homocystéine  $C_4H_9NO_2S$  (acide 2-amino-4-mercaptopbutyrique) est un acide aminé soufré, dont les propriétés chimiques montraient une similitude avec la cystéine, d'où le nom d'homocystéine ( **Paul et Sreyoshi , 2015**) (figure 06).



**Figure 06.** Structure de l'homocystéine ( **Paul et Sreyoshi, 2015**).

L'Hcy est produite au cours du métabolisme de la méthionine (acide aminé essentiel) apporté par l'alimentation. Elle n'est pas codée génétiquement et n'est pas contenue dans les protéines. Elle est synthétisée par toutes les cellules de l'organisme. ( **Mattson et Shea ,2003 ; Antoniades, 2009 ; Skovby et al., 2010**).

Dans le plasma humain, elle existe soit sous forme libre (30 %), majoritairement oxydée et en faible proportion réduite, soit liée aux protéines (70 %) principalement l'albumine. ( **Mouchabac , 2008 ; Dominguez-Salas et al., 2012** ) (figure 07).



**Figure 07.** Formes circulantes de l'homocystéine plasmatique ( **Karine et al., 2000**).

## II.1.2. Voies métaboliques de l'homocytéine

Dans les cellules des mammifères, le métabolisme de l'Hcy implique une voie de biosynthèse et deux voies de dégradation (figure 08).

### II.1.2.1. Voie de biosynthèse

La déméthylation de l'acide aminé essentiel alimentaire la méthionine représente la seule réaction à travers la quelle l'Hcy est synthétisée chez l'homme.

La plupart des méthionines alimentaires sont converties en S-adenosyl-méthionine (SAM) par la méthionine adénosyl-transférase (MAT, EC 2.5.1.6) en présence de l'ATP (Finkelstein,1990).

La SAM est le principal donneur de groupe méthyle par la S-adenosyl-L-méthionine méthyl-transférases (SMMT) dans la majorité des événements de méthylation biologique. Le groupe méthyle attaché au soufre tertiaire de la SAM peut être transféré et peut donc provoquer une méthylation d'autres substances .Après le transfert du groupe méthyle, la SAM est convertie en S-adenosyl-homocystéine (SAH). La S-adenosyl-L-homocystéine hydrolase (SAH hydrolase (SAHH) est une enzyme hautement conservée qui catalyse l'hydrolyse réversible de la SAH en L-homocystéine (Hcy) et en adénosine (ADO) (Brosnan *et al.*, 2007; Williams et Schallinske , 2007).

Par la suite, l'Hcy peut être métabolisée selon deux voies décrites dans la figure 3 : la voie de la reméthylation où elle est dégradée en méthionine et la voie de la transulfuration pour former, avec la cystathionine, la cystéine. (Mills *et al.*,1995) (figure 08).

### II.1.2.2. Voies de dégradation

#### II.1.2.2.1. Voie de reméthylation

L'Hcy est reméthylée en méthionine *via* deux réactions enzymatiques distinctes :

la première catalysée par une enzyme ubiquitaire : 5-méthyl-tétrahydrofolate-homocystéine méthyl-transférase cytosolique (MTR, EC 2.1.1.13), appelée aussi Méthionine synthase qui requiert pour son activité un cofacteur enzymatique, la méthylcobalamine (MeCbl), forme active de la vitamine B12. Cette enzyme synthétise la méthionine en fixant sur l'homocystéine un groupement méthyle fourni par la vitamine B9 ou 5-méthyl-tétrahydrofolate (5-CH3-THF) (Chen, 1997 ; Bogdan, 2010). Cette voie métabolique nécessite, donc, une synergie d'action entre la vitamine B9 et la vitamine B12. ( Stipanuk, 2004) (figure 08).

Le tétrahydrofolate (THF) libéré au cours de cette réaction est au centre d'un cycle de réactions passant par le 5,10-méthylène-THF(5,10-CH<sub>2</sub>THF), puis le 5-méthyl-THF. Ce dernier est recyclé en permanence sous l'action de l'enzyme méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR, EC 1.7.99.5), qui exerce donc une action indirecte mais déterminante dans la reméthylation de l'homocystéine (**Giller, 1999 ; Lan, 2018**) (figure 08).

La deuxième réaction de reméthylation, se déroule en grande partie au niveau du foie. Elle est de faible activité et indépendante des folates et du méthyl-cobalamine, elle fait intervenir une enzyme hépatique, la bêtaïne-homocystéine méthyltransférase (BHMT, EC 2.1.1.5) zinc dépendante. la réaction utilise la bêtaïne comme donneur de méthyle et libère la N,Ndimethylglycine ( la bêtaïne provient de la nourriture, ou l'oxydation de la choline) (**Selhub, 1999 ; Sunden, 1997 ; Melse-Boonstra et al., 2005**).

L'importance relative de ces deux voies de reméthylation varie en fonction du tissu considéré et du statut protéique (**Mudd et Levy, 1995 ; Zhu, 2008**).

#### II.1.2.2.2. Voie de trans-sulfuration

Lorsque la méthionine est en excès, l' Hcy est dirigé vers la voie de transsulfuration qui convertit de manière irréversible l'Hcy en cystéine. En effet, sous l'influence de la Cystathionine-β -Synthase (CBS , EC 4.2.1.22), l'Hcy se condense avec la sérine pour former la cystathionine, elle même clivée et désaminée en cystéine et en acétobutyrate (par la Cystéine γ Lyase (CGL, EC 4.4.1.1).Ces deux réactions nécessitent la présence d'un cofacteur enzymatique, le phosphate de pyridoxal (vitamine B6) (**Ueland et al., 1993 ; Refsum ,1998**) (figure 08).

La voie de transsulfuration permet, d'une part, de diminuer les concentrations toxiques de l'homocystéine. Et d'autre part, d'alimenter l'organisme en cystéine importante pour diverses réactions (**Stipanuk et Ueki, 2011**).

En effet, la cystéine formée à partir de l'Hcy est à l'origine d'un acide aminé soufré ayant un rôle antioxydant majeur, le glutathion (GSH), et d'autres acides aminés tel que la taurine qui intervient dans le métabolisme des sels biliaires, impliqués dans le stockage du cholestérol et l'absorption des graisses au niveau intestinal (**Li et al ., 1996 ; Trabetti, 2008** ).

L'homocystéine se retrouve, donc, à l'intersection de deux voies métaboliques : la reméthylation et la transsulfuration, En cas d'apport protéique excessif la voie de la transsulfuration est favorisée, à l'inverse en cas de déficit protéique, la voie de la

reméthylation est favorisée afin de maintenir un pool cellulaire suffisant en méthionine (Blacher, 2005).

En revanche, tout déficit portant sur l'un des systèmes enzymatiques (enzymes et/ou cofacteurs) impliqués dans le métabolisme de l'Hcy, entraîne une augmentation de ses concentrations cellulaires, plasmatique et urinaire. Par ailleurs un déficit enzymatique portant initialement sur l'une de ces deux voies métaboliques entraîne indirectement une dérégulation de l'autre voie, ce qui a pour conséquence, aussi l'accumulation d'Hcy.

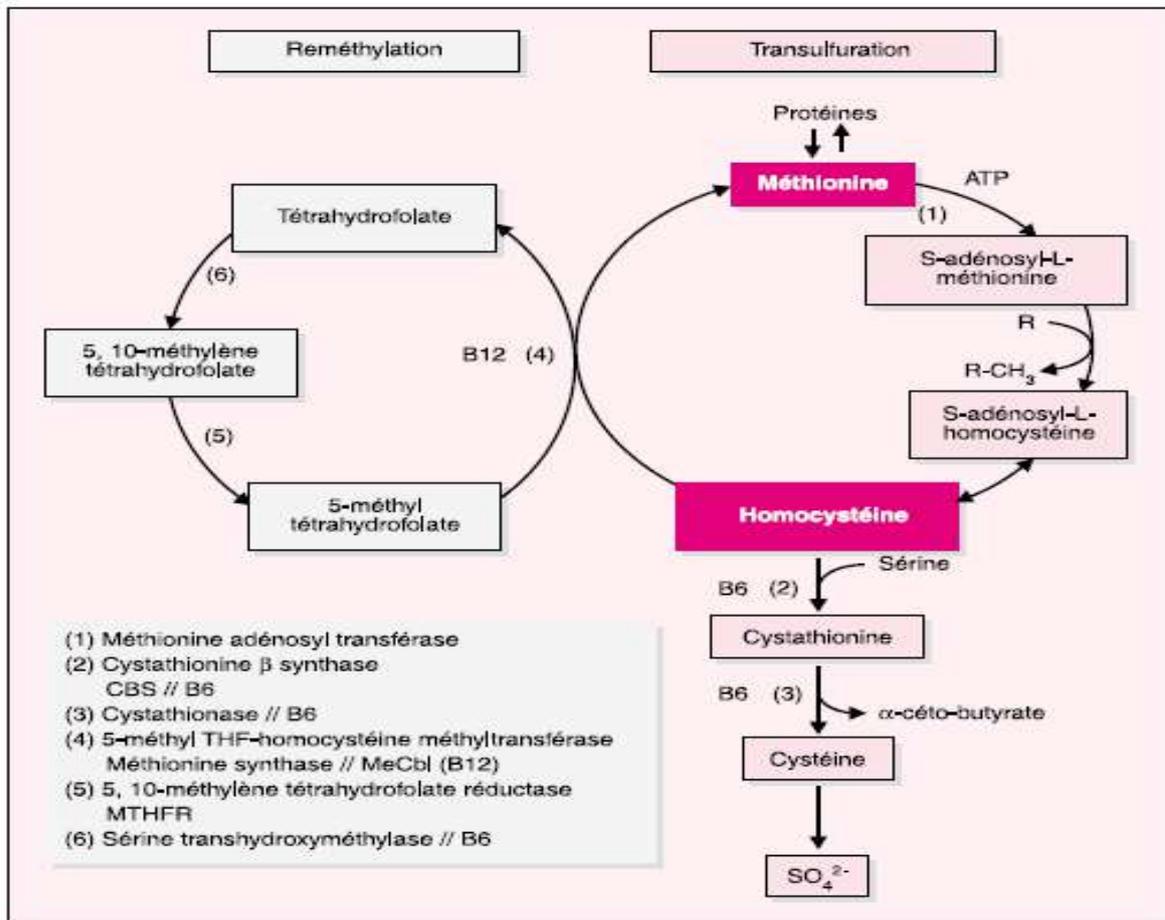


Figure 08. Métabolisme intracellulaire de l'homocystéine (Karine, 2000).

### II.1.3. Régulation du taux plasmatique de l'homocystéine

Les activités de reméthylation et de transulfuration sont coordonnées. Lors d'une alimentation normale, le métabolisme de l'homocystéine chez des sujets sains se divise entre la transulfuration et la reméthylation (Chango et Perrin, 1997).

Lorsque l'apport en méthionine est normal, la molécule d'homocystéine est recyclée environ deux fois par la voie de reméthylation avant d'être catabolisée par la voie de la transulfuration. (Aubard *et al.*, 2000 ; Levasseur, 2009).

La capacité de l'organisme à adapter l'utilisation de l'homocystéine en fonction de l'apport en méthionine implique l'existence d'une régulation commune aux deux voies (**Roblin et al., 2007**). Cette régulation se fait par le régulateur allostérique la SAM, qui en fonction de sa concentration, peut activer ou inhiber la MTHFR, orientant ainsi l'homocystéine vers la voie de la transsulfuration ou de la reméthylation (**Miller, 2013**).

Lorsque l'apport en méthionine est élevé, il en résulte une augmentation de la concentration intracellulaire de la SAM : rétrocontrôle négatif de la MTHFR, rétrocontrôle positif de la CBS pour permettre la dégradation de l'homocystéine (**Ho, 2002 ; Dziegielewska et al., 2016**).

Inversement, lorsque l'apport en méthionine est faible, la concentration en SAM est insuffisante pour l'inhibition de la MTHFR. La voie de reméthylation est alors favorisée et la CBS n'est pas stimulée (**Petras et al., 2014**).

## **II.2. Hyperhomocystéinémie**

### **II.2.1. Définition**

Les valeurs normales de l'homocystéine varient légèrement entre les différents laboratoires et suivant les techniques utilisées. Sur la base des travaux menés, les taux plasmatique d'Hcy chez les adultes à jeun en bonne santé se situent entre 5–15  $\mu\text{mol/L}$  (**Kang et al., 1992 ; Guiland et al., 2003**).

L'hyperhomocystéinémie (HHcy) est définie par un taux plasmatique supérieur à 15  $\mu\text{mol / L}$ . Elle est classée en trois catégories : **Modérée** (16 – 30  $\mu\text{mol / L}$ ), **Intermédiaire** (31-100  $\mu\text{mol / L}$ ) et **Sévère** ( $>100 \mu\text{mol / L}$ ) (**Ravaglia et al., 2006**).

Il importe de savoir, que le taux normal de l'Hcy chez les femmes en gestation reste significativement bas par rapport à celui des femmes non enceintes (**Malinow et al., 1998**). De plus, il change selon le stade de la grossesse, le niveau a tendance à diminuer pendant le deuxième et le troisième trimestre (**Wallace et al., 2008**).

### **II.2.2. Facteurs Favorisants l'hyperhomocystéinémie**

L'HHcy peut être primitive, suite à une anomalie au niveau de l'une des enzymes de son métabolisme, ou acquise suite à des facteurs nutritionnels ou environnementaux (**Guiland et al., 2003 ; Stalder et al., 2007**).

### II.2.2.1. Facteurs génétiques

Tout défaut affectant l'expression des gènes codants les enzymes clés du métabolisme de l'Hcy peut entraîner une augmentation de ses concentrations plasmatiques. Il s'agit principalement des variants génétiques des enzymes MTHFR, MS et CBS (**Li et al., 1996 ; Goyette et al., 1998 ; Barbaux et al., 2000**).

Parmi les plus importants on distingue : la mutation A2756G du gène codant la MS, et les deux mutations du gène de la MTHFR à savoir C677T et A1298C (**Frosst et al., 1995**) qui provoquent une HHcy modérée (**Chen et al., 1997**). Aussi, une mutation courante au niveau du gène codant pour la CBS et dont la forme homozygote conduit à une HHcy sévère (**Monika et al., 2002 ; Girs et Giet, 2006**).

### II.2.2.2. Facteurs nutritionnels

Les déterminants nutritionnels de l'homocystéine les plus couramment cités sont : la vitamine B6, la vitamine B9 et la vitamine B12, qui sont les cofacteurs de son métabolisme (**Peterson et al., 1998**).

Plusieurs études ont confirmé la relation inverse entre les apports des vitamines B et l'HHcy. (**Mamm et al., 1999 ; Hustad et al., 2000 ; De Bree et al., 2001 ; Coen et Stehour, 2001 ; Cooper et al., 2002 ; Pfeiffer et al., 2005 ; Mouchabac, 2008**).

➤ **Carence en vitamine B6**

La carence en vitamine B6 peut perturber la voie de trans-sulfuration de l'Hcy en réduisant l'activité de la sérine-hydroxy-méthyltransférase (SHMT) et en supprimant le catabolisme d'Hcy (**Cuskelly et al., 2001 ; Allen, 2004 ; Pfeiffer et al., 2005 ; Stea et al., 2008**).

➤ **Carence en vitamine B9**

Une carence en folates est probablement la cause la plus importante et la plus étudiée d'une HHcy. Elle provoque le déficit de la voie de reméthylation de l'Hcy (**Lucock, 2000 ; Joubert et al., 2002 ; Lee et al., 2003 ; Mebart, 2006**).

Contrairement aux autres vitamines qui jouent un rôle de cofacteurs pour des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'Hcy, les folates sont utilisés comme substrat. Ce sont des donneurs de méthyle dans la réaction de conversion de l'Hcy en méthionine. La carence en folates est responsable, donc, d'un déficit en méthyl THF (**Clarke, 2005 ; Lonn et al., 2006 ; Séne et al., 2013**).

➤ *Carence en vitamine B12*

La vitamine B12 est le principal déterminant nutritionnel de l'Hcy. La carence en vitamine B12 qu'elle que soit due à un défaut d'apport, d'absorption ou de transport sanguin (Narnour *et al.*, 2003) se répercute au niveau cellulaire et a pour conséquence une baisse de la trans-méthylation du méthyl THF sur l'homocystéine durant la voie de reméthylation (Chanarin *et al.*, 1989 ; Guéant *et al.*, 1993) .

Il a été déjà rapporté qu'une carence en vitamine B12 est souvent liée à une absorption intestinale inadéquate est une cause fréquente d'une HHcy modérée à sévère (Ueland *et al.*, 2000 ; Mc Kully, 2007 ; Serraj *et al.*, 2010).

### II.2.2.3. Facteurs environnementaux

Ces facteurs peuvent avoir des effets additifs ou potentialisés chez certains sujets qui sont porteurs de mutations génétiques des voies de la reméthylation et de la transsulfuration (Mouchabac, 2008).

➤ *Age et sexe*

L'Hcy augmente avec l'âge, ceci pourrait être lié au déclin de la fonction rénale et également à la baisse du statut en vitamine B avec l'âge (Norlund *et al.*, 1998 ; Herman *et al.*, 1999).

➤ *Médicaments*

L'HHcy peut être liée à la prise de certains médicaments comme les antifoliques (methotrexate et anticonvulsants tels que la carbamazépine et la phénytoïne), les anti B6 (isoniazide, cyclosérine, azaurinidine, procarbazine) et les anti B12 (oxyde nitreux) qui interfèrent avec l'absorption des vitamines B9, B6 et B12 (Guilland *et al.*, 2003; Kothekar, 2007). Par ailleurs, il ya certains médicaments qui influence les activités enzymatiques, tel que l'azaribine qui empêche l'activité de la CBS. ( De Bree *et al.*, 2002).

➤ *Pathologies*

Certains états pathologiques tels que l'hypothyroïde, l'insuffisance rénale (Bostom *et al.*, 1997; Guilland *et al.*, 2003), la polyarthrite rhumatoïde (Cattaneo, 1999), les affections inflammatoires (notamment intestinales), le psoriasis, le diabète de type II, les maladies lymphoprolifératives et certaines cancers (Roubenoff *et al.*, 1997 ; De Bree *et*

*al.*, 2002, Widner *et al.*, 2002 ; Singal *et al.*, 2004) contribuent à l'augmentation du taux de l'Hcy ( Kothekar, 2007).

➤ *Habitudes de la vie*

Certaines habitudes peuvent augmenter le taux de l'homocystéine incluant l'usage du tabac, du café, de l'alcool et l'activité physique (Grubben *et al.*, 200).

### II.2.3. Méthionine Synthase et polymorphisme A2756G

#### II.2.3.1. Protéine

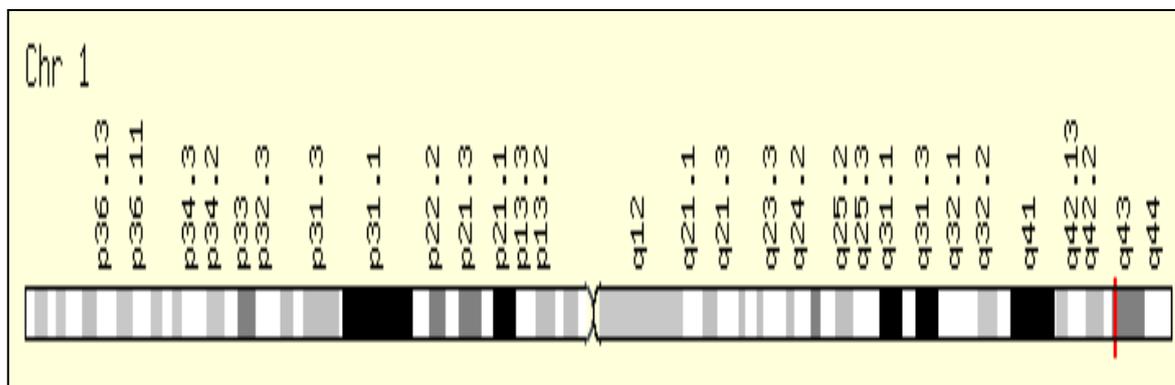
La reméthylation de l'homocystéine en méthionine nécessite une enzyme, la MTR, mieux connue sur le nom de méthionine synthase MS (Monika et Agnieszka, 2002). Le substrat de cette enzyme est le 5-CH<sub>3</sub>THF et la Cbl est son cofacteur (Roblin *et al.*, 2007).

La MS humaine est une enzyme de 1265 acides aminés avec une masse moléculaire de 136 kDa (Goulding *et al.*, 1997).

Elle se compose de plusieurs régions fonctionnelles. Les acides aminés 2 à 353 correspondent au domaine de liaison à l'Hcy. De 354 à 649 sont les acides aminés qui correspondent à la région liant le 5-CH<sub>3</sub> THF, et du 650 à 896 à la région liant la Cbl et les acides aminés 897 à 1227 correspondant au domaine de liaison de la SAM (Goulding *et al.*, 1997).

#### II.2.3.2. Gène

En 1996, Li *et al.* ont isolé et caractérisé le gène humain de la MS, il se trouve sur chromosome 1(1q43) et comprend 33 exons (figure 09).



**Figure 09.** Localisation cytogénétique du gène *MTR*.

<http://cdn.genecards.org/images/v4/genomic-location/MTR-gene.png> (05-08-2015)

**II.2.3.3. Polymorphisme A2756G**

Le polymorphisme le plus courant dans le gène de la MS est la substitution d'une adénosine par une guanosine en position 2756 (MTR A2756G) sur l'exon 8, qui mène au changement de l'acide aspartique en glycine au niveau protéique (**VanderPut *et al.*, 1997**).

Des études menées sur des enzymes bactériennes suggèrent que la mutation touche un acide aminé appartenant au domaine catalytique de la protéine. Ce domaine qui porte le site de fixation à la cobalamine (**Matthews *et al.*, 1998 ; Ueland et Rozen, 2005**), pouvant produire une diminution de l'activité de l'enzyme et par conséquent une élévation du taux de l'Hcy ( **Chen, 1997 ; Harmon *et al.*,1999 ; Chango *et al.*,1999 ; Kullo *et al.*, 2006 ; Vesin *et al.*, 2007**).

Par ailleurs, il a été démontré qu'à travers son effet sur le taux d'Hcy, le polymorphisme est considéré comme un facteur de risque pour la survenue des problèmes au cours de la grossesse, notamment les AS, les ASR et la prématurité (**Wen *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2013**).

## **Chapitre III**

# **Avortements et prématurité**

---

### **III.1. Généralités sur la grossesse et ses complications**

La naissance d'un enfant est un événement attendu et heureux, qui est précédée par la grossesse. Cependant, cette dernière bien qu'étant un phénomène physiologique peut fortement engager le pronostic vital de la mère et /ou du nouveau-né lorsqu'elle est associée à certaines pathologies. En effet, il existe beaucoup de complication dont les menaces peuvent rythmer ses neuf mois de gestation ( **Dickute et al., 2004 ; Meyer et al., 2013**).

Les problèmes de grossesse qui peuvent affecter la santé de la femme et celle du nouveau-né sont : l'anémie, le diabète gestationnel, l'hypertention artériel (HTA), la pré-éclampsie(PE), l'avortement spontané(AS) (**Bernabe et al.,2004** ), l'accouchement avant terme (**Luke et brown, 2007**), l'hématome rétro-placentaire(HRP), le retard de croissance intra-utérin (RCIU) et la mort fœtale in utero(MFIU) ( **Gueant et al., 2003 ; Steegers-theunissen et al., 2004**).

Ces complications sont à leur tour associées à une augmentation du risque de mortalité et de morbidités périnatales et maternelles (**Hassold et Chiu, 1985 ; Luke et brown, 2007**).

Dans notre étude, on va s'intéresser aux avortements ainsi qu'à la prématurité.

### **III.2. Avortements**

Le terme avortement provient de la racine latine « abortis » qui signifie expulsion d'un produit de conception avant qu'il ne soit viable. C'est l'interruption de la grossesse, avec expulsion spontanée ou provoquée du produit de conception avant le 180 ème jour (soit 28 semaines d'aménorrhée). Date à partir de laquelle l'enfant né vivant est présumé pouvoir se développer et vivre jusqu'à un âge avancé (**Merger, 2003**).

### **III.2.1. Avortements spontanés**

L'avortement spontané (AS) est un accident fréquent de la pathologie obstétricale, c'est la complication la plus courante de la grossesse. Environ 15 % à 20% de grossesses cliniques évoluent vers un avortement spontané (**Merviel *et al.*, 2005 ; Oliver et Overton, 2014**).

En 1976, l'Organisation Mondiale de Santé (OMS) a défini l'avortement spontané ou plus communément appelé « fausse-couche », comme l'expulsion de l'organisme maternel d'un embryon ou d'un fœtus avant 22 semaines d'aménorrhées SA (soit 20 semaines de grossesse) ou pesant un poids inférieur à 500g.

Selon l'âge gestationnel, les avortements spontanés se distinguent en :

- Avortements précoces: est l'expulsion spontanée d'une grossesse de moins de 14 SA, communément appelé « interruption du premier trimestre de la grossesse » ( **Lejeune , 2010**).
- Avortements tardives: l'expulsion spontanée au deuxième trimestre de la grossesse d'un fœtus avant 22 SA ( $\geq 14$  et  $< 22$  SA) (**Capmas *et al.* , 2014**).

En fait ce type de complication constitue, de nos jours, un problème réel de santé publique. En effet, il a été estimé qu'ils sont à l'origine de 14% de la mortalité maternelle dans le monde, avec 70000 décès chaque année (OMS), dont 99% dans les pays en voie de développement (**Nice , 2016**).

En Afrique, chaque année 5 millions d'Africaines subissent des avortements à risque et 34 000 d'entre elles décèdent ( **Hassoun, 2016**).

Les avortements sont relativement fréquents en Algérie (une grossesse sur dix se terminerait par une fausse couche), c'est un événement difficile à vivre, voire, traumatisant, pour la femme comme pour le couple (**Sennaoui , 2014/2015**).

### **III.2.2. Avortements spontanés à répétition**

L'avortement spontané à répétition (ASR), également connue sous le nom avortement spontané récurrent (RAS) se réfère à la survenue de deux ou plus d'avortements spontanés consécutifs (**Vasudha et al., 2013 ; Liu et al ., 2015**).

Le risque de répétition après un avortement est de 20 %. Après deux, trois ou quatre avortements, le taux atteint 28 % , 30 % et 45 % respectivement (**Regan et al., 1989**).

L'avortement spontané à répétition peut, aussi, être classé en deux catégories :

- Avortement spontané précoce à répétition ( Maladie abortive) :trois avortements spontanés successifs survenant avant 10 SA correctement documentés et sans grossesse intercalaire menée à terme.
- Avortement spontané tardif à répétition : trois avortements spontanés tardifs successifs survenant avant 22 SA et sans grossesse intercalaire menée à terme ( **Yan et al., 2012**).

### **III.2. 3. Facteurs de risque**

La pathogénèse des avortements reste mal comprise, un complexe impliquant des facteurs environnementaux, nutritionnels et génétiques semble contribuer à leur forte incidence.

Nous citerons quelques exemples qui ont été associés à la survenue de ces complications chez la femme dans certaines populations :

- L'âge ( $\geq 35$  ans ) (**Rochebrochard et Thonneau, 2002 ; San et al ., 2018**).
- Les anomalies chromosomiques (**Kaptan et al.,2008**).
- Les anomalies utérines (**Ogasawara et al.,2000**), les thrombophilies (**Séjourné et al., 2011**).
- Les maladie : auto-immunes (**Stirtzinger, 1999**) , endocriniennes (l'hypothyroïde, l'insuffisance lutéale) (**Roubenoff et al., 1997**), rénales (**Swanson et al.,2003**), cardiaques (**Ford et Schust, 2009**) , l'infection (**Lanir et al.,2003**) et les maladies hypertensives (**Lejeune,2010**).

- Le stress et l'anxiété maternelle ont, également, une influence sur la survenue des fausses couches spontanées (**Glover et al., 2009**).
- La consommation excessive des dattes (**Ketta, 2008**).
- La consommation de fortes doses de café et/ou du thé ( $\geq 6$  tasses/j) (**Grubben et al., 2000**).
- La malnutrition, les carences vitaminiques (**Jie et al., 2018**) ainsi que l'hyperhomocystéinémie (**Ray et Laskin, 1999 ; Chakraborty et al., 2013**). En fait, les métabolismes des vitamines B et celui de l'homocystéine qui sont interdépendants sont incriminés, directement ou indirectement, dans l'étiologie de ce type de complication. Ils semblent être des modificateurs du risque. Nous les aborderons en détails dans le présent travail.

### III.3. Prématurité

#### III.3.1. Définition

La prématurité est une naissance avant terme, elle se définit par la naissance d'un enfant vivant entre 22 et 37 SA (**Lacaze et al., 2000**). Les nouveau-nés prématurés sont très fragiles du fait de l'immaturité de leurs fonctions vitales. Le risque encouru est d'autant plus important que l'âge gestationnel est faible (**Liu et al., 2012**).

En effet, pendant le dernier trimestre de la grossesse la plupart des organes acquièrent une fonctionnalité, permettant à l'enfant de s'adapter à la vie extra-utérine ; toute naissance prématurée comporte, donc, le risque qu'une série de fonctions, contrôlant l'homéostasie et les adaptations nécessaires au nouvel environnement, ne soient pas effectives (**Faessel-Pochard, 2001**).

Le risque d'une prématurité est différent en fonction du terme de naissance (l'âge gestationnel), on distingue plusieurs types:

- Très grande prématurité ou prématurité extrême : qui correspond à une naissance survenant entre 22 à 27 SA.
- Grande prématurité : qui correspond à une naissance survenant entre 28 et 31 SA.
- Prématurité moyenne ou modérée : correspondant à une naissance survenant entre la 32<sup>ème</sup> et la 33<sup>ème</sup> SA.

- Prématurité tardive : qui correspond à une naissance survenant entre la 34<sup>ème</sup> et la 36<sup>ème</sup> SA ( **Berardi, 1992 ; Besinger, 1997 ; Salle et sureau, 2006**).

La prématurité est une des situations obstétricales les plus fréquentes, et les plus anciennement reconnues. Dans le monde, il est estimé qu'environ 15 millions de nouveau-nés naissent chaque année prématurément, et ce chiffre demeure en constante augmentation (OMS, 2013).

C'est la première cause de mortalité chez le nouveau-né et la seconde chez les enfants de moins de 5 ans. Cette tendance est liée à l'augmentation de l'incidence des grossesses multiples (Grebille et Benifla, 2002).

La mortalité néonatale est de 11 pour 1000 en Europe, 12 pour 1000 en Amérique, 38 pour 1000 en Asie du Sud, 44 pour 1000 en Afrique (Goldenberg *et al.*, 2008).

### III.3.2. Facteurs de risque

Sur le plan étiologique, l'accouchement prématuré est un problème multifactoriel, Il réunit un certain nombre des facteurs comme :

- ✓ L'Age < 17 ans ou > 35 ans ( **Eure *et al.*, 2002 ; Kristin *et al.* ,2017**).
- ✓ Le stress physique et psychologique ( **Berkowitz et Papiernik , 1993**).
- ✓ L'appartenance ethnique ( **Junia *et al.*,2019**).
- ✓ Les maladies telle que , le diabète , l'obésité ( **Saurel-Cubizolles *et al.*,2004** ), les infections ( **Leitich *et al.* ,2003** ), les insuffisances cardiaques ou rénales ( **Goldenberg , 2005**).
- ✓ Les grossesse multiples (gémellaire et triplet) ( **Goldenberg *et al.* ,2009**).
- ✓ Les maladies chroniques : HTA( **Lawn *et al.*,2006** ) , hyperthyroïdie ( **Tekesin *et al.* , 2005**).
- ✓ Les contractions utérines (CU)( **Iams,2002**).
- ✓ Les antécédents d'accouchement prématuré ou de fausse couche tardive ( **Liem *et al.*, 2013**).
- ✓ Les carences vitaminiques ( **Samin et Wafa, 2006** ) et l'hyperhomocystéinémie ( **Tiwari *et al.*,2017 ; Sonne *et al.*,2013**).

#### **III.4. Physiopathologie des AS, des ASR et de la prématurité liée à la perturbation du métabolisme de l'Hcy**

Parmi les causes suspectés des avortements spontanés ou de la prématurité, chez la femme enceinte, on retrouve la carence en certaines vitamines du groupe B et l'hyperhomocystéinémie qui en résulte (**Aubard *et al.*, 200** ; **Nelen , 2001**).

Cette corrélation épidémiologique a entraîné beaucoup de recherches à travers le monde. Jusqu'à maintenant c'est le sujet de nombreuses études.

Des taux anormalement élevés de l'homocystéine dans le sang et dans les cellules du placenta pourraient exercer un effet haussier sur le déroulement de la grossesse due à sa cyto-toxicité. Elle est considérée comme un facteur de risque pour la survenue des problèmes au cours de la gestation (**Nelen *et al.*, 2000**).

En effet, le bon déroulement de la grossesse dépend de la qualité de l'endomètre et de la nidation qui conditionnent la capacité à concevoir et mener une grossesse à terme.

La principale hypothèse de la physiopathologie des avortements et de la prématurité est celle d'un dommage précoce des vaisseaux déciduaux ou chorioniques , perturbant l'implantation du conceptus (**wouters *et al.*, 1993** ; **Aubard *et al.* , 2000**).

Une augmentation du taux de l'homocystéine a été observée chez les mères à risque. **Nelen et al (2000)** ont étudié les femmes avec des ASR et ont trouvé une relation directe entre les niveaux élevés d'Hcy et les alteration de la vascularisation des villosités chorioniques , qui présentaient des zones vasculaires, des périmètres et des diamètres réduits.

En outre, il a été observé qu'au cours de la grossesse, un taux élevé d'homocystéine favorise chez la mère des anomalies du placenta (**Vollste *et al.*,2000**) et augment le risque d'accouchement pré-terme chez la femme enceinte (**Faessel-Pochard, 2001** ; **Grebille et Benifla, 2002**).

## **Partie 02.**

---

### **Etude expérimentale**

# **Chapitre I**

## **Sujets, matériels et méthodes**

---

|

## **I.1. Présentation de l'étude**

L'étude est transversale de type cas-témoin, elle s'est effectuée durant une période de presque quatre mois, allant du 04 février 2019 au 26 mai 2019.

L'étude a porté sur des populations de femmes, comportant un nombre total de 62, admises au niveau de la maternité et des l'établissement publiques de santé de proximité(EPSP)-(polyclinique Beni Thour et Rouissat) de Ouargla. Pour l'ensemble de ces femmes un recueil de données, par un questionnaire, a été fait dans le but de collecter les informations nécessaires à notre étude. Aussi, des prélèvements de sang ont été effectués afin de procéder à des analyses biochimiques et génétiques. Ces dernières qui ont été réalisées au niveau des laboratoires de biochimie et de génétique et biologie moléculaire du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Benbadis de Constantine.

### **I.1.1. Répartition et caractéristiques des populations de l'étude**

Les populations de femmes à risque et des témoins sont représentées comme suit :

- Une population comportant 33 femmes à risque ayant fait une complication de grossesse de type « avortement » admises au niveau du service « gynécologie » de la maternité d'Ouargla. Elles sont âgées entre 20 et 46 ans et ont un âge de grossesse qui varie entre 03 SA et 21SA. Parmi ces 33 femmes, 15 ayant fait un avortement spontané à cause inconnue pour la première fois, et 18 femmes ayant fait un avortement spontané à répétitions (deux avortements ou plus) et dont la cause n'est pas toujours connue.
- Une population de 10 femmes à risque ayant fait un accouchement prématuré. Les femmes sont âgées entre 22 et 38 ans et ayant un âge de grossesse variant entre 29 et 35 SA , elles sont recrutées au niveau des services « gynécologie » et « suite de couche » de la maternité de Ouargla.

Les critères d'exclusions pour les femmes à risque sont :

- ✓ Femmes ayant fait un avortement provoqué et/ ou à cause connue telle que les avortements à cause des infections.
- ✓ Femmes ayant subi d'autres complications de grossesse : HTA gestationnel, grossesse extra utérine, grossesse molaire, diabète gestationnel...
- ✓ Femmes ayant des maladies chroniques ou prenant des traitements médicamenteux pouvant gêner l'interprétation des résultats biochimiques.

- Une population témoin représenté par 19 femmes enceintes en bonne santé n'ayant jamais présenté un problème au cours de leurs grossesses. Elles ont le même âge gestationnel que les femmes ayant des complications, permettant ainsi de faire une comparaison fiable des taux des paramètres biochimiques. L'ensemble des témoins a été recruté au niveau de l'Etablissement Publique de Santé et de Proximité (EPSP)-polyclinique Beni Thour et Rouissat –Ouargla.

### **I.1.2. Recueil de l'information**

Pour les trois populations, un recueil de données a été effectué, il consiste en la consultation du dossier médical et en un questionnaire auprès des femmes (**Annexe 1**). Les informations recueillies nous ont servi pour l'étude des facteurs de risque qui peuvent perturber le statut biochimique maternel et contribuer à l'étiologie des avortements et des accouchements prématurés, à savoir : l'âge, l'IMC, le stress, la forte consommation des dattes, du café, du thé ainsi que la prise des suppléments vitaminiques et d'acide folique.

Un consentement a été fait par toutes les femmes prélevées, aussi bien les femmes à risque que les femmes témoins.

### **I.1.3. Paramètres étudiés**

Des prélèvements sanguins pour les femmes des différentes populations ont été effectué afin de réaliser des analyses biochimiques qui consistent aux dosages de la vitamine B9, la vitamine B12 et de l'homocystéine ainsi que des analyses génétiques représentées par la recherche d'une mutation importante pouvant toucher le gène de la méthionine synthase, cette dernière qui est l'enzyme clé dans le métabolisme de l'homocystéine. Une comparaison entre les mères à complications et les témoins a été effectuée pour ces différents paramètres, raison pour laquelle, l'âge, le niveau socioéconomique et les critères d'exclusions pour les témoins sont les même que ceux des mères à risque.

### **I.1.4. Types et critères de comparaison entre les populations**

Plusieurs types de comparaison ont été réalisés

- 1- Une comparaison des taux des différents paramètres biochimiques entre les mères à risque ayant fait un avortement spontané et les témoins.

- 2- Une comparaison entre les mères à risque qui ont fait un avortement spontané à répétition et les témoins a concernée non seulement les paramètres biochimiques mais aussi génétiques.
- 3- Une comparaison, entre les témoins et les mères qui ont fait un accouchement prématuré, des taux des paramètres biochimiques, sujets de ce travail.

## **I.2. Prélèvements et analyse des échantillons**

### **I.2.1 Prélèvements sanguins**

Les prélèvements de sang ont été recueillis le matin à jeun :

**Pour le dosage des vitamines B9 et B12:** les prélèvements ont été réalisés sur des tubes héparines centrifugés à 4000 rpm pendant 10 minutes, le plasma récupéré est congelés à -20°C jusqu' à l'analyse. Les tubes sont recouverts par du papier aluminium, car les vitamines sont sensibles à lumière.

**Pour le dosage de l'homocystéine :** les prélèvements se font sur tubes EDTA (EDTA≡ Ethylène Diamine Tétra-Acétique), placés immédiatement dans la glace, acheminés au laboratoire et centrifugés à 4500 tour/min pendant 5 min. le plasma obtenu est congelé à -20 ° C jusqu'à l'analyse. 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 l'étude génétique :** du sang total frais est recueilli sur tubes EDTA est conservé à +4°C pour l'extraction de l'ADN et l'analyse génétique.

### **I.2.2. Analyses biochimiques :**

Dans notre travail le dosage des différents paramètres biochimiques ; Vitamine B9 , vitamine B12 et homocysteinea été réalisé automatiquement par un dosage *in vitro* avec l'analyseur Immulite 2000 (figure 10).



**Figure 10 .** Automate Immulite 2000(Laboratoire de biochimie CHU Constantine).

#### **I.2.2.1. Dosage du folate (vitamine B9) :**

##### **- 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 rentre 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.

##### **- Méthode**

##### **✓ Préparation de la solution de travail**

Pour le dosage quantitatif de l'acide folique dans le plasma, les échantillons 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.

<b>Solution</b>	<b>µl/ test</b>
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, 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.

✓ **Valeurs de références**

Acide folique plasmatique **3-17 ng/ml (6-39 nmol/l)(Cooper,1984).**

**I.2.2.2. Dosage de la vitamine B12 :**

- **Principe**

C'est un immunodosage en phase solide par compétition utilisant une technologie de chimiluminescence enzymatique et comprenant une procédure automatisée de dénaturation alcaline.

- **Méthode**

L' IMMULITE 2000 réalise un seul cycle de traitement de l'échantillon clinique du sérum ou du plasma additionné de dithiothréitol (DTT) et d'une solution de soude( NaOH), dans un tube à essai ne contenant aucune bille . Au terme de 30 minutes d'incubation, l'échantillon traité est transféré dans un second tube de réaction contenant une bille de polystyrène revêtue de vitamine B12 et un facteur intrinsèque de porc (FI). Lors des 30 mn d'incubation suivantes , la vitamine B12 libérée par les protéines porteuses endogènes pendant le pré-traitement de l'échantillon entre en compétition avec le vitamine B12 immobilisée aux fins de fixation au FI. L'anticorps anti FI marqué à la phosphatase alcaline est ensuite introduit et se lie à n'importe quel FI qui est immobilisé sur la bille revêtue de vitamine B12 , au cours des 30 dernières minutes d'incubation le conjugué enzymatique non lié est éliminé par un lavage accompagné de centrifugation.

✓ **Valeurs de références**

Les résultats sont donnés en pg/ ml dont la plage normale est de 174-878 pg/ml(Allen, 1981).

**I.2.2.3. Dosage de l'homocystéine****- Principe**

C'est un immuno-dosage 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 dithiothreitol (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.

**- Méthode****✓ Préparation de la solution de travail**

Solution préparée quotidiennement. Elle doit être utilisée dans les 2 heures suivant la préparation.

-un volume suffisant de 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(diluée) sont mélangé à volume égal.

Les quantités doivent être suffisantes pour le nombre de tests à réaliser, par exemple :

Nb d'éch	Soltravail ml	H <sub>2</sub> O ml	Pré-B ul	Pré-A ml	Total ml
5	1,5	0,90	100	1	2

**✓ 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(**Guilland et al.,2003**). Pour les femmes enceintes le taux est <11µmol/l(**Malinow et al.,1998**).

### **I.2.3. Analyse génétique**

Notre étude génétique consiste en la recherche de la mutation A2756G du gène de la MS. Pour atteindre cet objectif nous avons procéder à une extraction d'ADN, suivit de la technique PCR/RFLP permettant la détection de la mutation.

#### **I.2.3.1. Extraction et dosage de l'ADN**

- **Principe**

L'ADN de chaque patient est extrait à partir des leucocytes du sang, 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 , dans le but de dégrader tout ce qui est protéines et l' ADN nucléaire est libéré dans le milieu.

Une précipitation au NaCl va éliminer les protéines. Le surnageant ainsi récupéré est traité par l'éthanol dans lequel une pelote d'ADN se forme par précipitation.

- **Technique**

• *Lyse des globules rouges et 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. Il est homogénéisé puis centrifugé pendant 10 min à 3900tour|min.

- Le surnageant est ensuite déversé.

- Le TE 20 :5 est ajouté jusqu'à 30 mL 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.
- *Extraction de l'ADN*
- les leucocytes sont décongelés puis centrifugés pendant 10 minutes à 4000 rpm 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, ensuite 200 µL de SDS puis 100 µL de protéinase K.
- 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 1 ml de 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. En tournant le tube plusieurs fois, la pelote d'ADN se forme. Si cela n'advient éventuellement 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% (figure 11).



**Figure 11.** pelote d'ADN.

- **Détermination de la concentration et de la pureté de l'ADN**

La concentration des ADN extraits est estimée par la mesure de l'absorbance à 260nm. Sachant qu'une unité de DO à 260nm 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 évalué par un rapport de DO 260/DO 280. En effet, l'ADN absorbe à 260 nm alors que les protéines (témoins de contamination) absorbent à 280 nm ; un ADN de bonne qualité, dépourvue de contamination protéique ou par l'ARN doit présenter un rapport compris entre 1,6 et 2.

- L'ADN est contaminé par les protéines si :  $DO_{260}/DO_{280} < 1,6$ .

- L'ADN est contaminé par les ARN si :  $DO_{260}/DO_{280} > 2$ .

### **I.2.3.2. Recherche de la mutation A2756G du gène de la MS par la technique PCR /RFLP**

- **Principe**

La PCR ou réaction en chaîne par polymérase est l'abréviation de l'expression anglaise Polymerase Chain Reaction. C'est une technique de répllication ciblée in vitro.

Le principe de la PCR est la synthèse de multiples copies d'une séquence d'ADN spécifique, elle 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 cible que l'on veut amplifier (**mullis et al.,1987**), la réaction de PCR se décompose en trois étapes: dénaturation , hybridation ,élongation (synthèse d'un nouveau brin à partir des amorces par la Tq polymérase).

#### **RFLP (Restriction fragment leng polymorphism) : c'est l'étude du polymorphisme de longueur de fragments de restriction**

l'ADN cible amplifié est analysé par RFLP, ce dernier, 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. Les fragments sont révélés par l'utilisation du bromure d'éthidium (BET) fluorescent aux rayons ultraviolets.

- **Technique**

➤ **Amplification de l'ADN cible par PCR**

L'ADN cible du gène MS est de 189 pb, il est amplifié dans un milieu réactionnel (ou mix) de PCR. Pour chaque tube de réaction sont mélangés : des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP 25Mm), une enzyme d'amplification *in vitro* (Taq polymérase), un environnement réactionnel (Tampons, MgCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O) et deux amorces oligonucléotidiques.

Les amorces utilisées sont :

Sens MS1 = 5'CATGGAAGAATATGAAGATATTAGAC3'

Antisens MS2 = 5'GAACTAGAAGACAGAAATTCTCTA3'

Mix de PCR	μl/test
Tampon 10X	5
DNTP	10
H <sub>2</sub> O	27,76
MgCl <sub>2</sub>	3
Oligo F (Forward)	1
Oligo R (reverse)	1
Taq polymérase	0,24

La quantité de chaque composant est multipliée par le nombre de tubes voulu plus un autre. C'est le tube témoin négatif dans lequel on met uniquement le mélange sans ADN (blanc). Pour les autres tubes, 2 μL d'ADN sont mélangés à 48 μL du mix (Abbas *et al.*, 2016).

Les tubes de PCR préparés sont déposés dans le thermocycleur (Figure 12) programmé au préalable. Les conditions pour le déroulement des cycles d'amplification par PCR sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 01).

Tableau 01 . Programme de PCR.

Nombre de cycles	Étape	Température (°C)	Durée
35	Dénaturation initiale	95	2 min
	Dénaturation	94	40 sec
	Hybridation	50	40 sec
	Élongation	72	1 min
	Élongation finale	72	10 min



**Figure 12.** Le thermocycleur (Labratoire génétique et biologie moléculaire CHU Constantine).

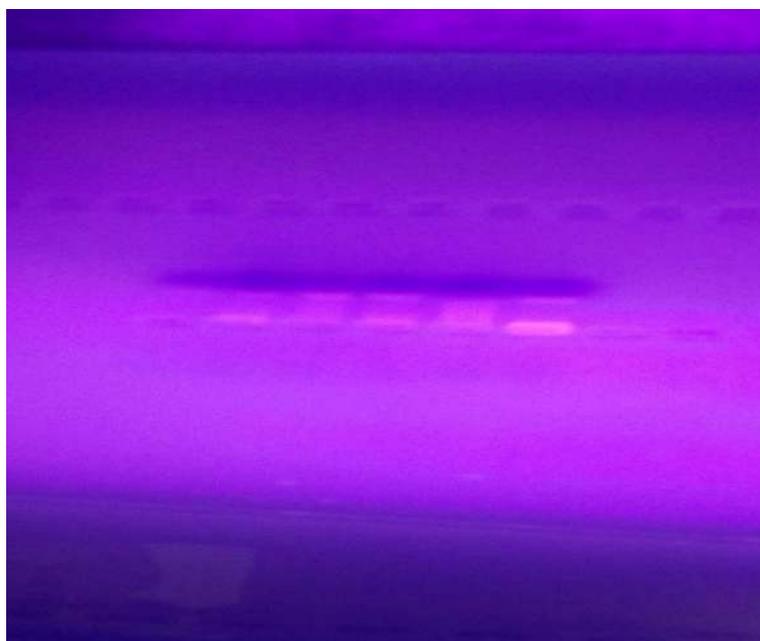
➤ **Electrophorèse des produits de PCR**

Le contrôle de la taille des fragments amplifiés s'effectue par une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5 % (1,5 g d'agarose et 100ml du TBE 1X ) additionné de 10 µl de BET (Bromure d'éthidium) et coulé sur plaque de cuve horizontale.

Dans chaque puits du gel, il est déposé : 10 µl de produit d'amplification + 3 µl du colorant Bleu de Bromophénol (BBP) qui permet de suivre le front de migration .

Les dépôts se font du coté cathode (-). Le système soumis à une migration sous un courant de 90 à 120 volts pendant 45 min .

Après la migration, le gel est soumis au rayons ultra-violet (UV). Les molécules de bromure d'éthidium fixées aux ADN émettent une lumière visible et permettent de visualiser les fragments amplifiés sous forme de bandes fluorescentes (figure 13).



**Figure 13.** Profil d'électrophorèse des fragments amplifié du gène de la MS (198pb) sur gel d'agarose 1,5 %.

### Digestion des produits de PCR

La mutation A2756G du gène MS crée un site de restriction reconnu par l'enzyme de restriction *Hae III* (source : *Bacillus subtilis* R), dans la séquence de 189pb amplifiée.

Pour digérer notre fragment cible, un mix de réaction contenant un tampon, l'enzyme de restriction, et l'eau est utilisé.

Mix de la digestion	µl/test
Tampon 10X	2
Hae III	1
H <sub>2</sub> O	4

Le mix de la digestion est préparé selon le nombre des amplifiants à digérés plus un. Dans chaque tube sont mélangés 7 µl du mix avec 8 µl de produit de PCR. La digestion enzymatique est réalisée dans une étuve à 37°C durant 4 heures (Abbas *et al.*, 2016).

La digestion enzymatique donne des fragments : 159 pb, 189 pb et 30 pb, le premier apparaît sur le profil électrophorétique sous forme d'une seule bande qui

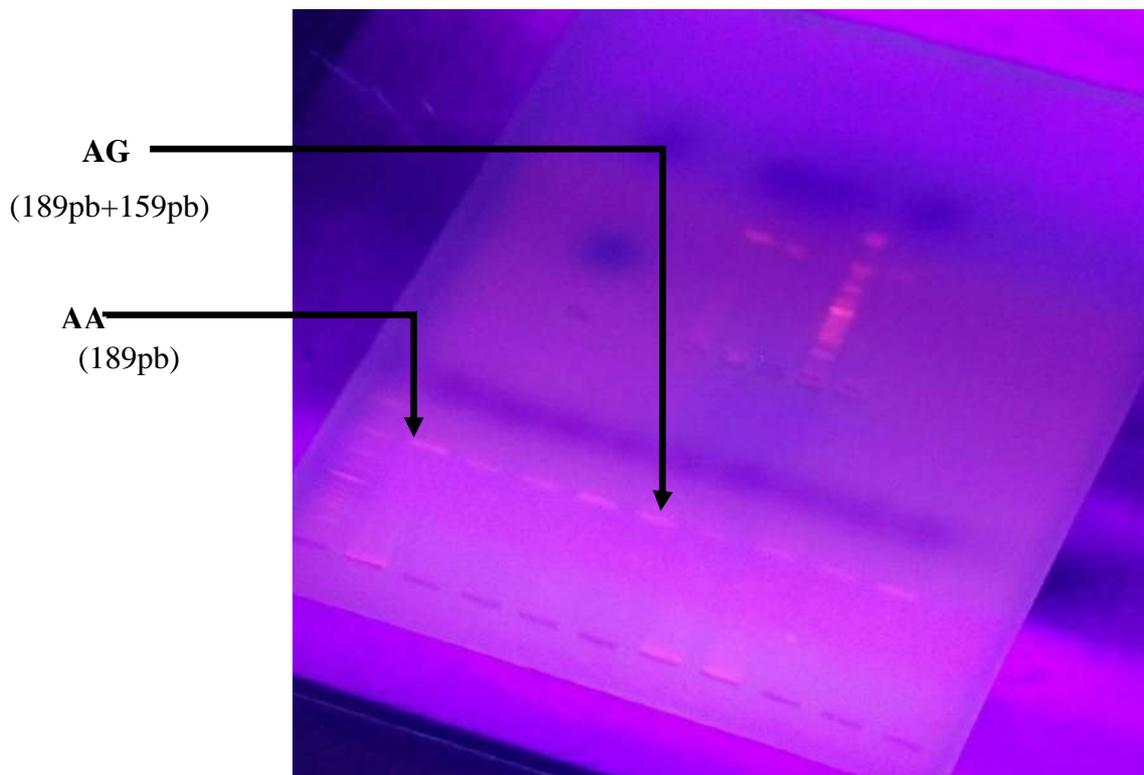
correspond au individus homozygotes mutés (génotype GG). Le deuxième apparaît aussi sous forme d'une seule bande, il s'agit des individus homozygotes sauvages (génotype normal AA).

Les deux bandes ensemble, correspondent aux individus hétérozygotes (génotype AG). Le troisième n'est pas visible à cause de son intensité trop faible (figure 14).

➤ **Electrophorèse des produits de la digestion**

Les fragments d'ADN digérés par l'enzyme de restriction sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 3 % (3g d'agarose + 100ml du TBE1X), 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, déposés dans des puits creusés dans le gel du côté de la cathode qui vont migrer vers l'anode dans le champ électrique et leurs vitesses dépendent de leurs tailles. Dans chaque gel on dépose également un marqueur de taille. La migration est réalisée de 80 à 100 volts pendant une heure dans un tampon 1X.



**Figure 14 .** Profil d'électrophorèse des fragments présentant différents génotypes issus par clivage de HaeIII sur gel d'agarose 3 %.

**I.2.4. Analyse statistique**

Les variables continues sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type . Pour comparer les concentrations moyennes des différents paramètres entre les différents groupes, et les variables qualitatifs par des pourcentages. Pour l'étude de la significativité et le risque lié aux différents facteurs un test t a été utilisé. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide des statistiques IBM SPSS (version 20).

# **Chapitre II**

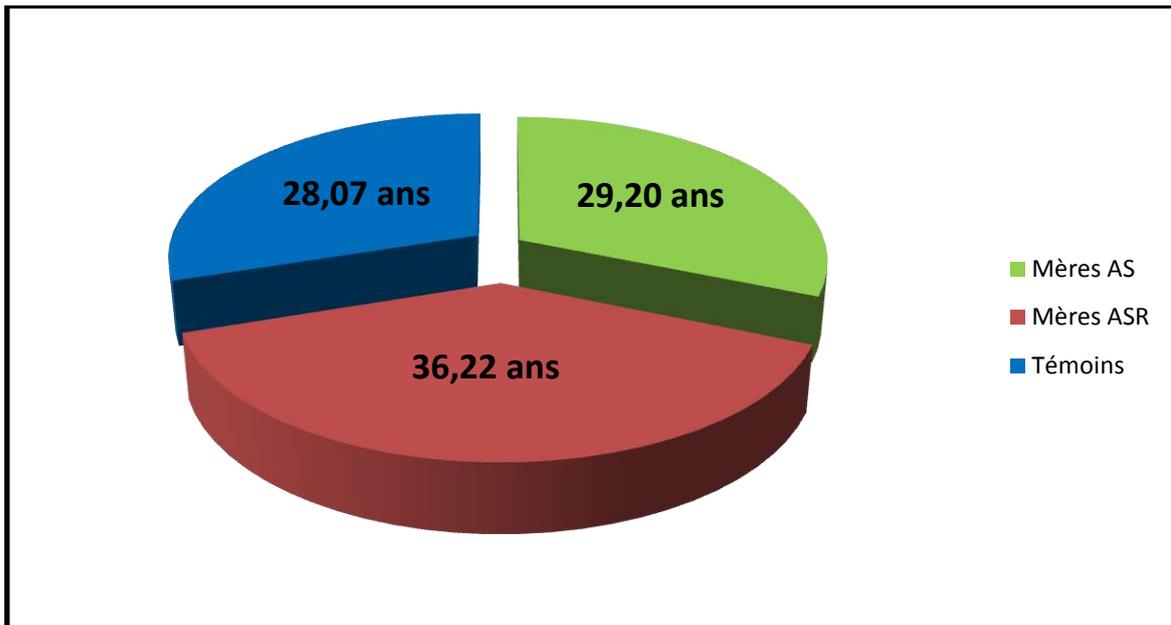
## **Résultats et discussion**

---

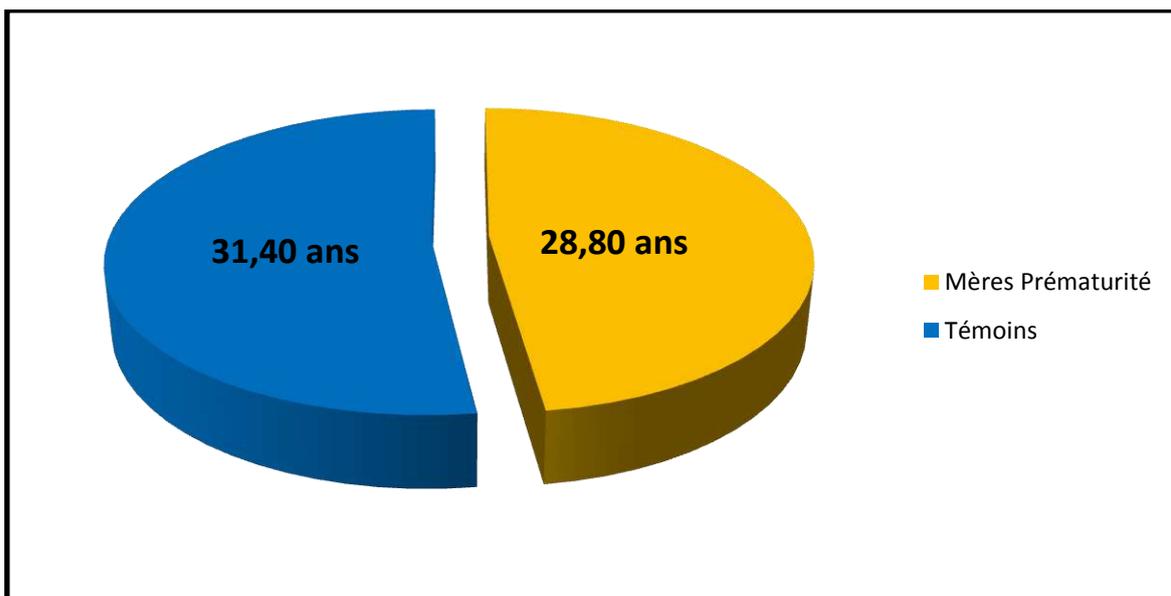
**II.1. Etude de quelques facteurs de risque pour les avortements spontanés (AS et ASR) et pour la prématurité**

Notre but, à travers cette partie de l'étude, est de voir l'effet de quelques facteurs physiologiques et nutritionnels, pouvant influencer le statut biochimique des femmes, dans la survenue des AS, ASR et de la prématurité dans notre population.

**II.1.1. Age**



**Figure 15.** Moyenne d'âge chez les mères à AS et à ASR et leurs témoins.



**Figure 16.** Moyenne d'âge chez les mères à accouchement prématuré et leurs témoins.

La moyenne d'âge chez les mères ayant fait un ASR, dans notre population, est de  $36,22 \pm 5,98$ , elle est de  $29,20 \pm 5,94$  chez les mères faisant un AS, nous avons trouvé qu'elles sont différentes significativement de celle des témoins qui est de  $28,07 \pm 4,81$  (Figure 15). Notre étude montre que le risque de fausses couches augmente avec l'âge maternel. C'est un facteur de risque pour les avortements et plus particulièrement pour les ASR.

Notre constatation est en bon accord avec ce qui a été trouvé par plusieurs études (Nybo Andersen *et al.*, 2000 ; Schimmel *et al.*, 2015 ; Li *et al.*, 2014 ; Sauer, 2015).

Selon (George *et al.*, 2006 et Carolan et Wright, 2017), le risque de fausses couches répétées était accru chez les femmes âgées de 35 ans ou plus.

En effet, un taux élevé de perte fœtal chez les femmes a été lié à une diminution intrinsèque de la fécondité avec l'âge, expliquée par le vieillissement biologique de l'axe hypothalamus-hypophyso-ovarien (Gindoff et Jewelewicz, 1986 ; Liu et Case, 2011).

Par ailleurs, l'élévation du taux d'aberrations chromosomiques avec l'âge est bien connue et peut être une explication des ASR. Le risque de survenue d'anomalies chromosomiques est estimé à 1,6 % à 38 ans, 2,21 % à 40 ans et 4 % à 42 ans (Belaisch-Allart *et al.*, 2008).

Un résultat inverse a été observé pour la prématurité, la moyenne d'âge est de  $28,80 \pm 5,59$  chez les mères qui ont fait un accouchement prématuré et de  $31,40 \pm 6,14$  chez les témoins (figure 16). Ceci dit que le risque d'accouchement prématuré est associé à l'âge maternel précoce dans notre population.

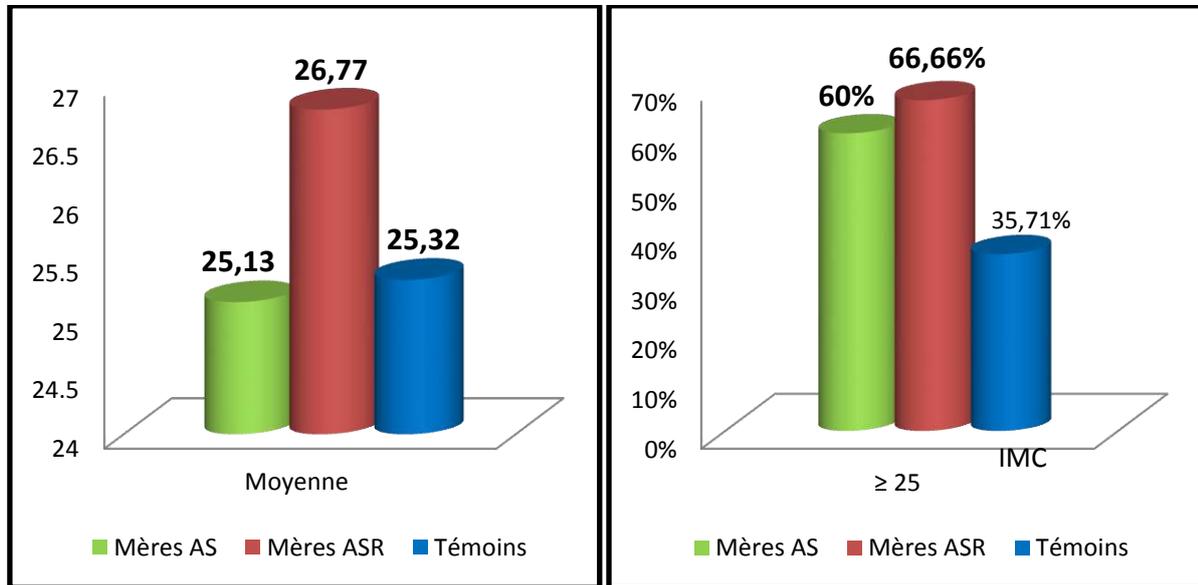
En effet, la majorité des études examinées ont révélé que l'âge maternel précoce est un facteur augmentant le risque de la prématurité (Offenbacher *et al.*, 2001 ; Newburn-Cook et Onyskiw, 2005 ; Goldenberg *et al.*, 2008 ; Kahveci *et al.*, 2018 ).

L'explication proposée pour cette observation, est l'efficacité des fonctions placentaires (Shah, 2010 ; Prosper-Kakudji *et al.*, 2015), une femme de jeune âge se retrouve en compétition pour les nutriments avec le fœtus en développement (Kabore *et al.*, 2007).

En outre, ce sont des femmes qui manquent d'expérience pour ce qui concerne la nécessité d'avoir des réserves vitaminiques et de la supplémentation en ces derniers. Elles

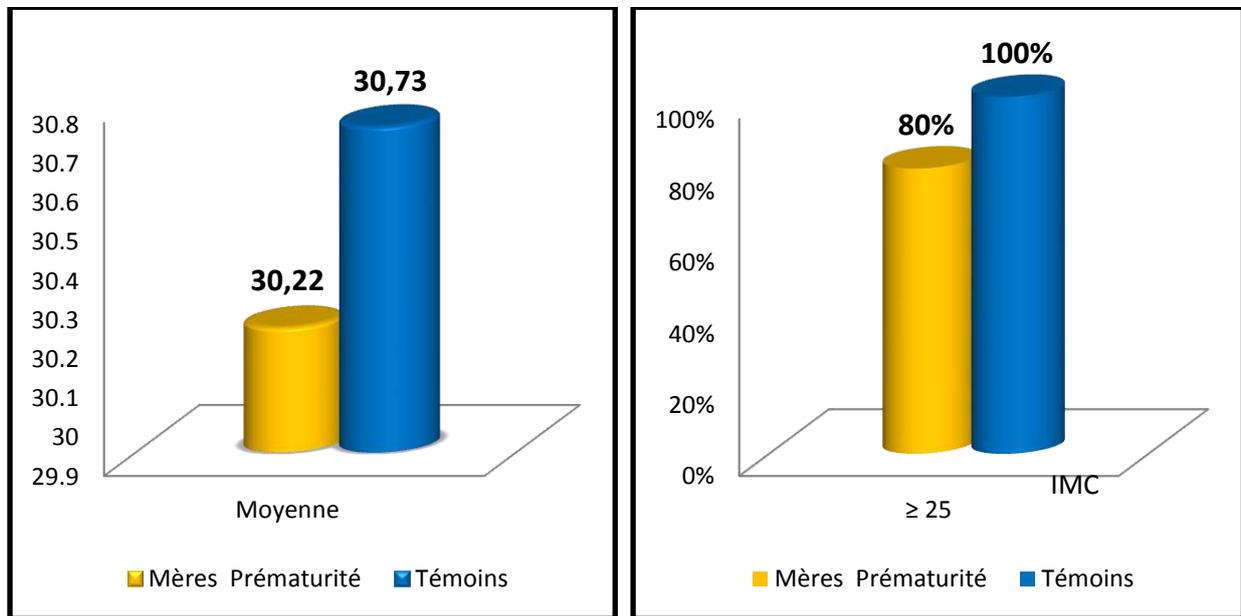
sont généralement sous-scolarisées et vivent dans des zones à accès limité aux services de soins de santé (Nancy et Deanna, 1997 ; Aras *et al.*, 2013 ).

II.1.2. Obésité



**Figure 17.** a : Moyenne d'IMC chez les mères à AS et à ASR et leurs témoins.

b : Répartition des mères à AS et à ASR et leurs témoins selon l'IMC



**Figure 18.** a : Moyenne d'IMC chez les mères prématurité et leurs témoins.

b : Répartition des mères à accouchement prématuré et leurs témoins selon IMC.

L'obésité est évaluée par l'indice de masse corporelle (IMC) qui correspond au poids (en Kilogrammes) divisé par le carré de la taille (en mètre). L'IMC est considéré

normal quand il est égal ou inférieur à 25, il y a un surpoids lorsque l'IMC est égal ou supérieur à 25, un IMC égal ou supérieur à 30 correspond à une obésité (OMS, 2013).

En tenant compte de la faible taille de l'échantillon après répartition en plusieurs classes, nous avons choisi d'assembler les IMC supérieur à 25 et supérieur à 30 dans un même groupe.

Nous avons observé un pourcentage très élevé des mères à AS et à ASR (60% et 66,66% respectivement) qui ont un  $IMC \geq 25$  par rapport au pourcentage des témoins qui est de 35,71% (figure 17), concluant, ainsi, que le surpoids et /ou l'obésité sont considéré comme un facteur de risque significatif pour ce type de complications dans notre population.

Dans leurs études concernant les fausses couches spontanées, **Benammar et al., 2012 ; Tanviq, 2014** et aussi **Poston et ses collaborateurs en 2016** ont pu tirer la même conclusion que la notre. En fait, le surpoids joue un rôle non seulement sur la qualité ovocytaire et embryonnaire (**Vinturache et al., 2014**), mais également sur la réceptivité endométriale (**Davies et al., 2010**).

Chez les femmes en surpoids, il peut y avoir une phase lutéale courte (**Helm et al., 2009**), avec un cycle de troubles de l'endomètre (**Jain et al., 2007**), ce qui peut expliquer en partie l'échec de l'implantation d'embryon et l'apparition d'AS (**Benammar et al., 2012**).

Sur le plan biochimique, ceci peut être expliqué par la résistance à l'insuline qui augmente physiologiquement pendant la grossesse, ce qui permet une augmentation du glucose circulant (**Hamon et al., 2005 ; Sathyapalant et al., 2010**).

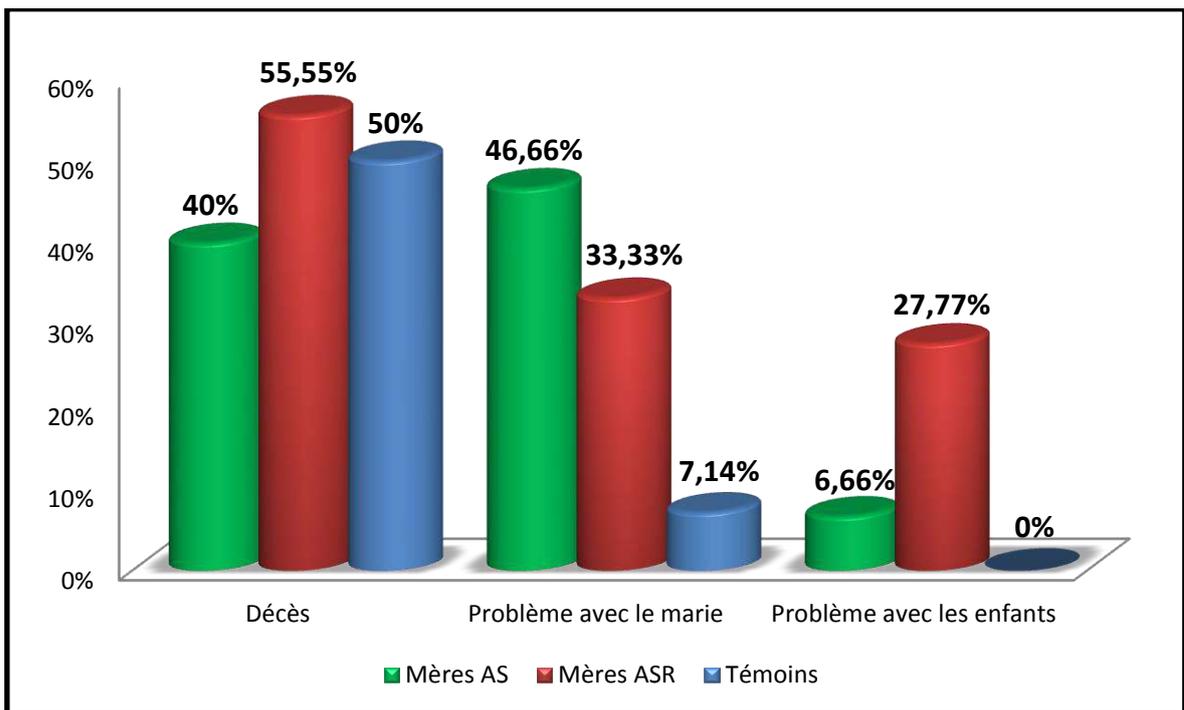
Les mères obèses sont plus résistantes à l'insuline que les femmes à IMC normal, car leur métabolisme glucidique est perturbé, et donc il ya une grande disponibilité du glucose pour le fœtus, dont les effets sont potentiellement néfastes pour son développement (**Jarvie et al., 2010**).

Concernant la prématurité, nous n'avons pas remarqué des différences significatives de la moyenne est des intervalles des IMC entre les mères à risque et les témoins (figure 18).

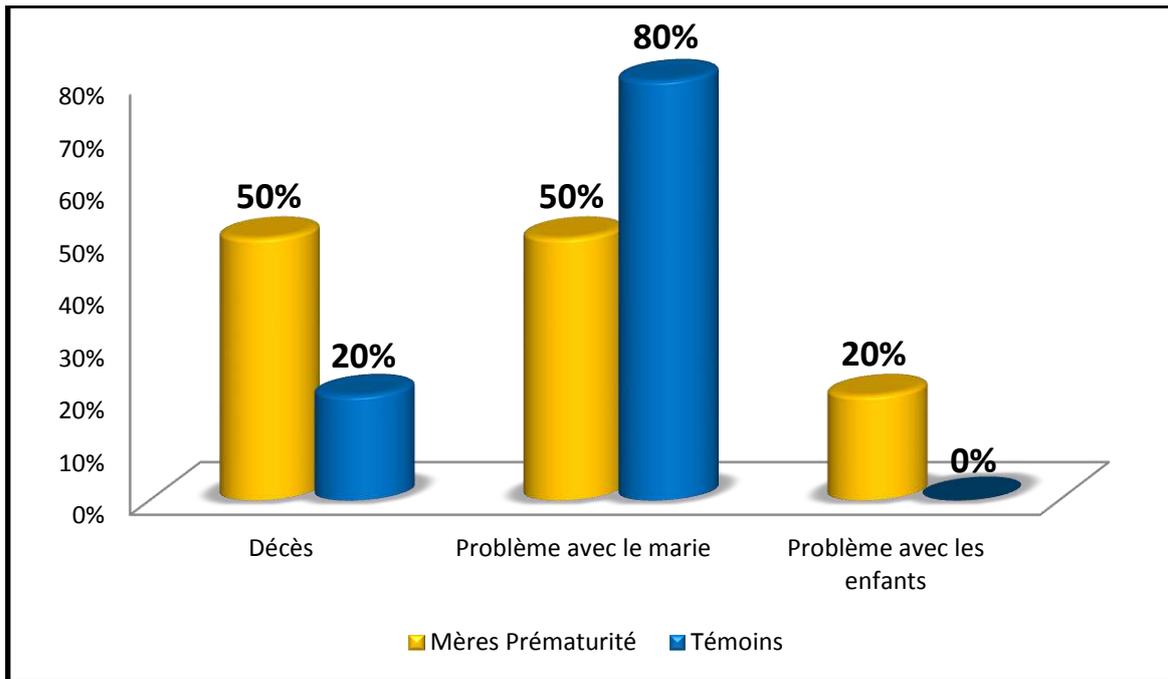
Les données de la littérature, par contre rapporte que les femmes enceintes obèses sont plus susceptibles à la prématurité spontanée (Cresswell *et al.*, 2012 ; Wang *et al.* 2019).

De leurs parts, Manzanares *et al* (2012); Goldstein *et al* (2017) et Liu *et al* (2019) , ont rapporté que l'obésité maternelle et le surpoids pendant la grossesse, entraînent un risque accru d'accouchements prématurés

### II.1.3. Stress



**Figure 19.** Niveau de stress chez les mères à AS et à ASR et leurs témoins.



**Figure 20.** Niveau de stress chez les mères à accouchement prématuré et leurs témoins.

Au vue de la figures 19, le niveau du stress est significativement élevé chez les mères ayant fait des avortements dans notre population. 80% des mères faisant des AS et 88,88% des mères faisant des ASR ont vécu des problèmes, des situations dépressives et stressantes avant ou pendant le premier trimestre de leur grossesse (soit à cause d'un décès, de problèmes avec leurs maries ou aussi des problèmes liés à leurs enfants).

Nos résultats concordent avec ceux de (**Broen et al (2004)**, **Belliemi et Buonocore (2013)** et **Wong et al (2018)**) et confirment que le stress représente un facteur de risque important pour la survenue des avortements.

Selon **Zeindler (2013)**, le type de stress, sa durée, son intensité et le moment d'exposition du fœtus par rapport à l'âge gestationnel sont des facteurs pouvant influencer son développement. Les deux premiers trimestres sont les périodes les plus sensibles (**Suzanne King, 1998**).

En effet, le stress stimule l'axe, que l'on appelle corticotrope, qui aboutit à la libération de glucocorticoïdes (cortisol) par la corticosurrénale. La sécrétion du corticotropin releasing factor (CRF) stimule le complexe hypothalamohypophysaire, libérant l'Adrenocorticotropin hormone (ACTH) qui agit sur la corticosurrénale, laquelle sécrète elle-même le cortisol (**Raynor, 2014**).

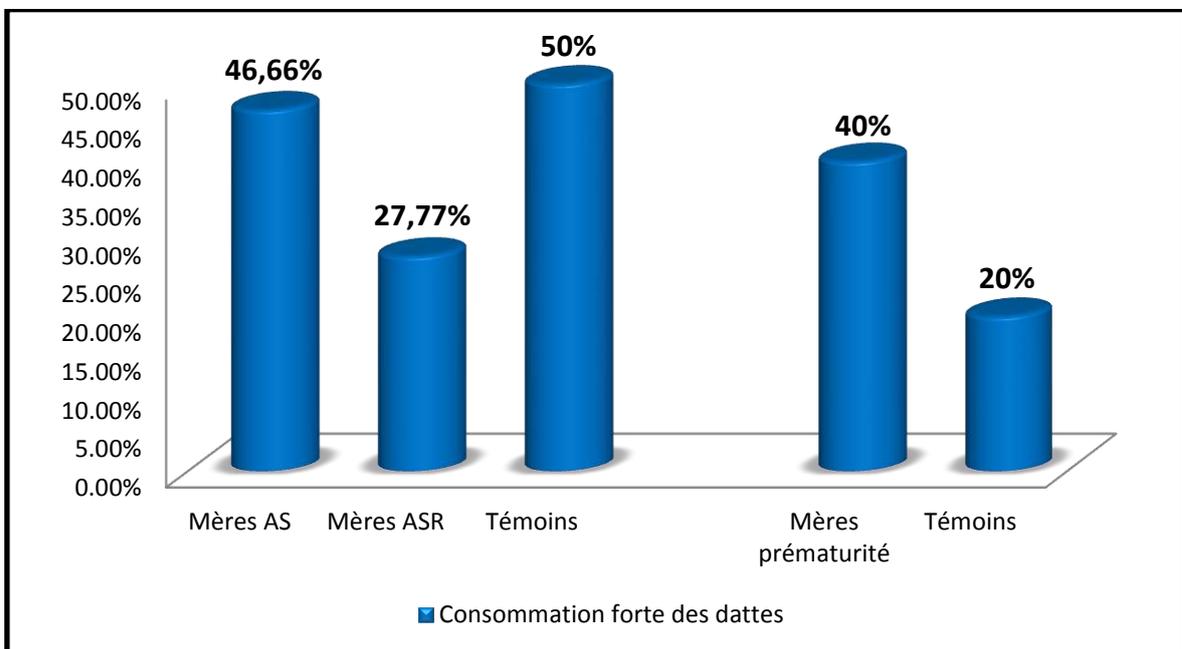
Certes, le taux de cortisol augmente durant la grossesse de manière physiologique (Molénat et Roegiers, 2011). Cependant, un taux anormalement élevé de cortisol pourrait passer à travers la barrière placentaire et altérer le développement de l'axe hypothalamo-hypophysio-cortico-surrénalien (HPA) (Gennari-Moser *et al.*, 2010).

Pour ce qui est de l'accouchement prématuré, bien que le stress était impliqué comme facteur de risque selon certaines recherches (Medsker *et al.*, 2015), notre étude (figure 20), ainsi que d'autres n'ont pas observé cette association (Straub *et al.*, 2014 ; Erckson *et al.*, 2019).

Selon une revue de synthèse de la littérature, le stress ressenti dans les trois derniers mois pourrait induire une mise en travail prématurée (Romero *et al.*, 2006).

Ceci peut être interprété par le fait que, la CRH (corticotropin releasing hormone), stimule la production de prostaglandines et d'ocytocine qui agissent sur l'utérus, provoquant la survenue des contractions. Lors de stress, le taux plasmatique de celle-ci est accru et le risque d'accouchement prématuré serait alors augmenté de 3 à 4 fois (Mulder *et al.*, 2002).

#### II.1.4. Consommation des dattes



**Figure 21.** Consommation forte des dattes par les mères à AS, à ASR et à accouchement prématuré et aussi par les témoins.

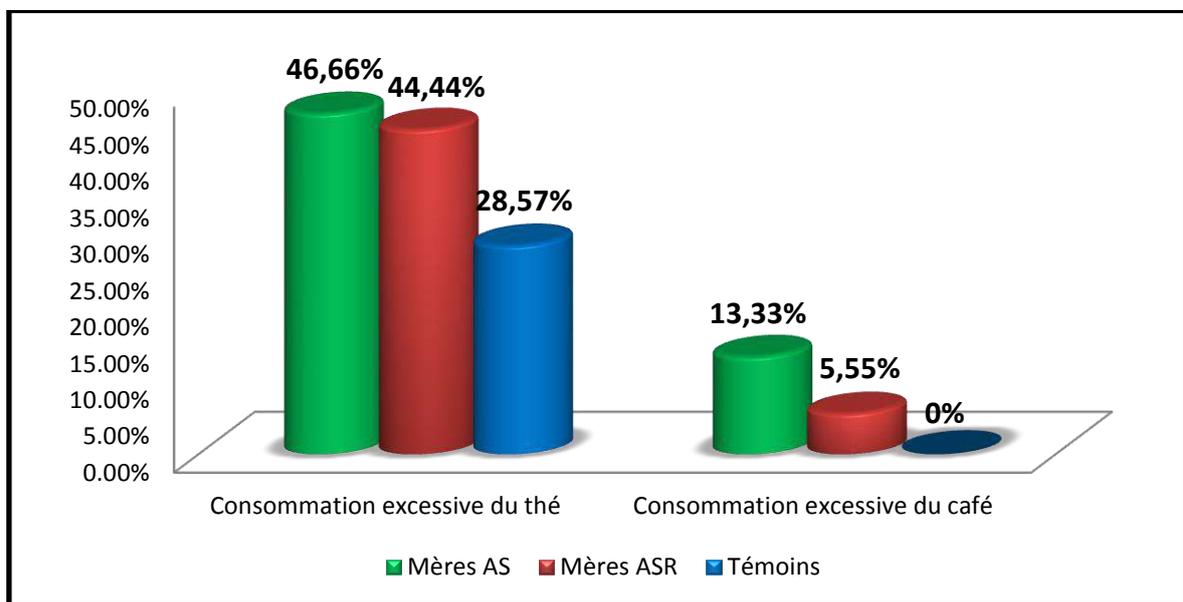
Le risque de survenue des avortements (AS ou ASR) lié à la forte consommation des dattes, n'a pas été observé dans notre population d'étude. En revanche, un risque faible a été constaté pour la survenue d'un accouchement prématuré chez les femmes.

En fait, les dattes contiennent l'hormone ocytocine produite naturellement par le corps qui aide à stimuler les contractions utérines. Par ailleurs, la sérotonine, le tanin et le calcium qui contiennent les dattes contribuent aussi à la contraction des muscles lisses de l'utérus (Ketta, 2008). Raison pour la quelle les médecins conseillent pour sa consommation pendant le dernier mois de la grossesse.

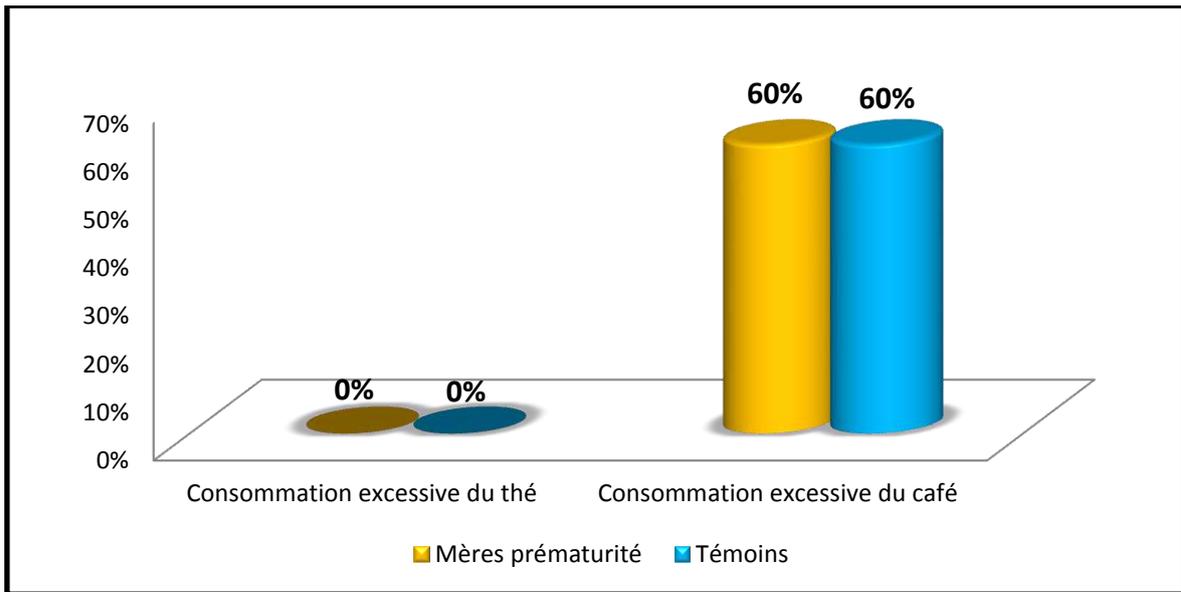
Il a été démontré que la consommation six dattes par jour au cours des quatre dernières semaines de leur grossesse influence positivement le résultat du travail et de l'accouchement sans effet négatif sur la mère et l'enfant (Al-Kuran *et al.*, 2011).

Cependant, la consommation excessive des dattes au cours de la grossesse peut avoir des résultats néfastes, causant, ainsi, des contractions avant terme, voir la survenue des avortements (Ketta, 2008).

#### II.1.5. Consommation du café et du thé



**Figure 22.** Consommation excessive du thé et du café par les mères à AS et à ASR et par leurs témoins.



**Figure 23.** Consommation excessive du thé et du café par les mères à accouchement prématuré et par les témoins.

La consommation des boissons, café ou thé, pendant la grossesse s'avère un facteur de risque pour les avortements et les accouchement prématurés dans certaines études (**Hahn et al., 2015 ; Huang et al., 2016**). En effet, la caféine, ainsi que l'acide chlorogénique, un polyphénol présent dans le café pourraient être des facteurs qui augmente la concentration de l'homocystéine. Cette dernière, qui à son tour augmente le risque de ces complications (**Stein Emil et al., 2000**).

Les analyses menées lors de ce travail, conformément à ceux de **Savitz et al. (2008)** et **Levitio et al. (2018)**, n'ont pas conclu à une association positive significative. Ce constat est valable pour les AS comme pour les ASR. Certes, les pourcentages des femmes à risque (AS ou ASR) qui ont une forte consommation du thé ou du café sont supérieurs à ceux des témoins, cependant, le risque trouvé reste non significatif.

Pour ce qui est de la consommation de ces boissons et le risque d'accouchement prématuré, nous avons constaté qu'une minorité de femmes les a pris et avec des doses très faibles. Nous concluons, ainsi, l'absence de l'effet significatif de la consommation occasionnelle du thé et du café sur le risque de la prématurité. Résultat trouvé également par **Tollânes et al en (2016)** et **Lu et al en (2017)**.

## II.2. Analyse biochimique

### II.2.1. Statut biochimique : folate, vitamine B12 et homocystéine des femmes ayant fait des AS, des ASR ou ayant accouché avant terme

Cette partie de notre étude, menée sur les mères à risque de notre population, a permis de fournir des données sur leur statut biochimique. Elle vise à évaluer l'ampleur de l'abaissement des taux des vitamines B9 et B12 et/ou l'augmentation du taux de l'homocystéine. Une analyse comparative de ces paramètres biochimiques a été réalisée entre ces mères à risque et les témoins.

**Tableau 02.** Teneurs plasmatiques en vitamines B9 et B12 et en homocystéine chez les mères ayant fait des AS, des ASR et leurs témoins.

	Mères à AS	Mères à ASR	Témoins
<b>Vitamine B9 (ng/ml)</b>	<b>9,76 ± 6,52</b>	10,93 ± 7,71	<b>15,53 ± 7,81</b>
<b>Vitamine B12(pg/ml)</b>	268,00 ± 107,54	271,19 ± 110,64	204,93 ± 69,58
<b>Homocysteine(umol/l)</b>	<b>17,07 ± 6,14</b>	15,80 ± 4,16	<b>15,87 ± 2,82</b>

**Tableau 03.** Teneurs plasmatiques en vitamines B9 et B12 et en homocystéine chez les mères à accouchement prématuré et chez les témoins.

	Mères prématurité	Témoins
<b>Vitamine B9 (ng/ml)</b>	10,93 ± 6,51	6,05 ± 5,69
<b>Vitamine B12 (pg/ml)</b>	337,50 ± 188,98	163,00 ± 18,58
<b>Homocysteine (umol/l)</b>	<b>20,02 ± 6,93</b>	<b>15,44 ± 1,97</b>

Les tableaux 02 et 03 présentent une comparaison des concentrations moyennes des vitamines B9, B12 et Hcy entre les mères à risque et leurs témoins.

➤ **Vitamine B9**

Le niveau moyen de la vitamine B9 est de 9,76 ng/ml chez les mères faisant un AS, 10,93 ng/ml pour les mères à ASR et 15,53 ng/ml pour les témoins.

Nous avons observé une différence significative de la concentration moyenne du folate entre les mères faisant des AS et les témoins, le taux du folate était significativement faible chez les mères à risque. Pour les mères ayant fait des ASR, le taux moyen du folate reste aussi inférieur à celui des mères normales.

Nos résultats concordent avec plusieurs études, telle que celle de **Sikora et al (2007)**, celle de **Megahed et Taher (2004)** et aussi celle de **Ahmadi et al (2017)**, qui avaient trouvé une diminution significative du folate sérique chez les femmes faisant des AS par rapport à leur témoins.

De leur part, **Nelen et ses collaborateurs**, ont trouvé que les femmes ayant fait des ASR présentaient des concentrations en folate nettement inférieures à celles des témoins. Les chercheurs ont établi une relation dose-réponse continue entre les folates et le risque de survenue des avortements, Le risque pour les mères s'élève en passant des valeurs supérieures aux valeurs inférieures. (**Nelen et al., 2000**).

Par ailleurs, il existe, d'après la littérature, une corrélation négative significative entre le nombre d'avortements et la concentration en folate. **Sutterlin et al (1997)**, ont montré que les patientes ayant eu au moins quatre fausses couches avaient des valeurs sériques d'acide folique significativement inférieures à celles des femmes ayant fait trois avortements.

En effet, Le folate joue un rôle primordial dans la synthèse, la réparation et la méthylation de l'ADN, favorisant, ainsi, la multiplication cellulaire de l'embryon et l'augmentation de la masse sanguine (**Schlienger, 2011**). Les déficiences en acide folique peuvent, donc, avoir des effets néfastes sur la santé de la mère, sur la grossesse et sur le développement du fœtus (**Kleind et al., 2009**).

Des concentrations optimales des folates sanguin sont, donc, nécessaires. 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 pour la prévention de la survenue des résultats défavorables de grossesse. Les femmes de notre population, cependant, ont peu de connaissances sur cet

élément nutritionnel. Peu de femmes savent que l'acide folique joue un rôle préventif important, qu'elles doivent commencer leur supplémentation avant la grossesse.

Pour ce qui est de l'accouchement avant terme, le taux de folate retrouvé chez les mères à risque ne diffère pas de celui des témoins et demeure dans les normes physiologiques. De ce fait une déficience en folate ne peut être considérée comme génératrice d'une prématurité de grossesse dans notre population. Des études ultérieures avec un échantillon plus important sont nécessaires pour confirmer nos résultats.

#### ➤ **Vitamine B12**

Concernant le taux de la vitamine B12 chez les mères sujettes d'avortements, nous avons enregistré des valeurs qui se situent dans la limites de la normale 174 - 878 pg /ml (268,00 pg /ml pour les mères à AS, 271,19 pour les mères à ASR) et aucune différence significative n'a été observée en comparaison avec les témoins (204,93 ± 69,58 pg/ml).

Nos résultats ne permettent pas, donc, de conclure à une association entre la carence en cette vitamine et le risque de faire un AS ou un ASR dans notre population d'étude.

Bien qu'il existe, d'après la littérature, des études qui ont révélé une diminution du taux de la vitamine B12 chez les femmes ayant fait des ASR (**Sikora et al., 2007 ; Hubbner et al., 2013**), nos résultats concordent avec ceux de **Ray et Laskin (1999)** et **Sobczyńska et al (2017)**, pour ce qui concerne les fausses couches spontanées, et de **Serapinas et al (2017)** pour le risque de fausse couche spontanée à répétition .

Il en est de même concernant le taux moyen de la vitamine B12 et le risque d'accouchement prématuré, la carence en cette vitamine n'a pas été observée chez les mères à risque dans notre étude. Des résultats similaires ont été obtenus par **Gomes et al** en (2010), **Bergen et al** en (2012) et **Castano et al** en (2017).

#### ➤ **Homocystéine**

D'après les données des tableaux 02 et 03, une élévation du taux moyen de l'homocystéine , même à risque faible, est observée chez les mères de notre population.

En fait, le niveau moyen d'Hcy pour les mères à AS est de 17,07 umol/l par rapport à celui des témoins qui est de 15,87 umol/l. Pour la prématurité, le niveau moyen de l'Hcy plasmatique est de 20,02 umol/ l pour les mères qui ont accouché avant terme et de 15,44 umol/ l pour leurs témoins.

Plusieurs études épidémiologiques ont associé l'augmentation de la concentration plasmatique d'Hcy avec le risque de survenue des AS (**Quere et al .,1998 ; Nelen et al., 2000 ; Zetterberg et al ., 2004 ; Chaudhry et al .,2019** ).

En outre, l'hyperhomocystéinémie est considéré comme un facteur de risque indépendant pour l'accouchement prématuré (**Wen et al., 2004 ; Heather et al., 2016**). Il a été déduit que les taux élevés de l' Hcy chez les mères, pourraient , même, servir de bio marqueur pour la prévision des naissances prématurées (**Mayan et al., 2013 ; Torchin et AnceI, 2016**).

En effet, l'HHcy est un facteur de dégâts vasculaires qui agit en favorisant la thermogénèse au niveau des vaisseaux placentaires (artères et veines), entraînant un décollement placentaire, une réduction de l'approvisionnement en sang fœtal et une implantation défectueuse de l'embryon (**De la Calle et al., 2003 ; Gaiday et al .,2018**).

D'autre part, il a été, également, suggéré que l'HHcy maternelle pourrait produire des effets toxiques directs sur le fœtus, car les expériences in vitro ont montré que l'Hcy a une toxicité embryonnaire spécifique et lorsqu'elle est produite trop tôt entraîne une fausse couche (**De la calle et al., 2003**).

Par ailleurs, l'augmentation de l'homocystéine peut refléter une dérégulation de son métabolisme. Ce dernier qui est responsable de la production des groupements et des molécules indispensables à la synthèse et à la régulation de l'ADN (**De la calle et al., 2003**)

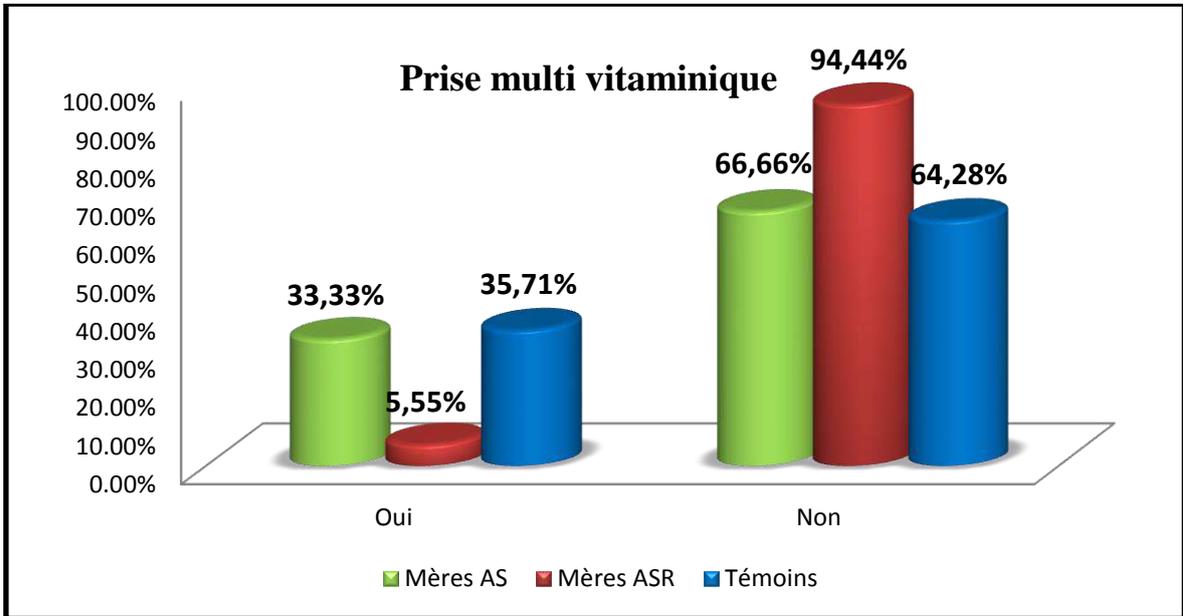
➤ **Corrélation entre les taux des métabolites B9, B12 et homocystéine**

La corrélation inverse entre les taux des folates et les niveaux de l'homocystéine plasmatique a été observée dans de nombreuses études, elle reflète la relation étroite existante entre les vitamines du groupe B et le métabolisme de l'homocystéine. L'apport alimentaire en ces vitamines ainsi que l'activité des enzymes de leurs voies métaboliques déterminent le déroulement du métabolisme de l'homocystéine.

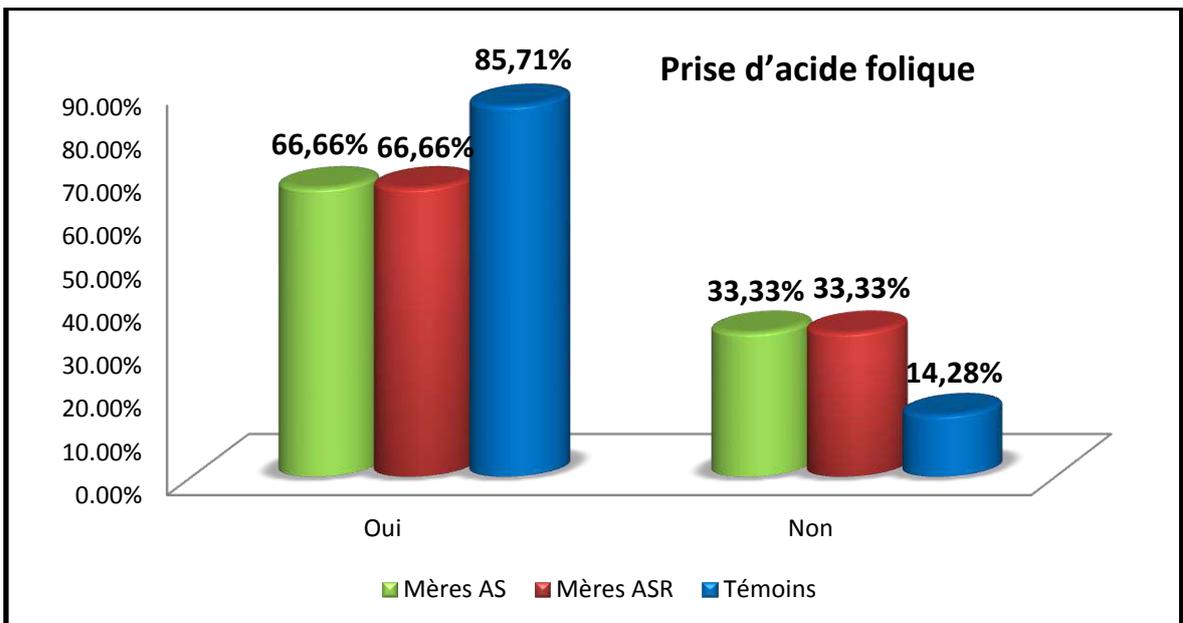
En effet, au niveau plasmatique, les taux d'homocystéine varient de manière opposée aux concentrations en , acide folique (**De Bree et al., 2001; Jacques et al., 2001**), des taux des folates faibles, même normaux peuvent aussi augmenter le taux d'Hcy. De même, conformément à la littérature, une corrélation a été notée entre l'Hcy et la vitamine B12 (**Puri et al .,2013 ; Serapinas et al ., 2017** ).

Il est actuellement largement démontré que la supplémentation en acide folique et autres vitamines du groupe B permet d'abaisser le niveau d'homocystéine de manière significative (> 25%) (Clark *et al.*, 1998).

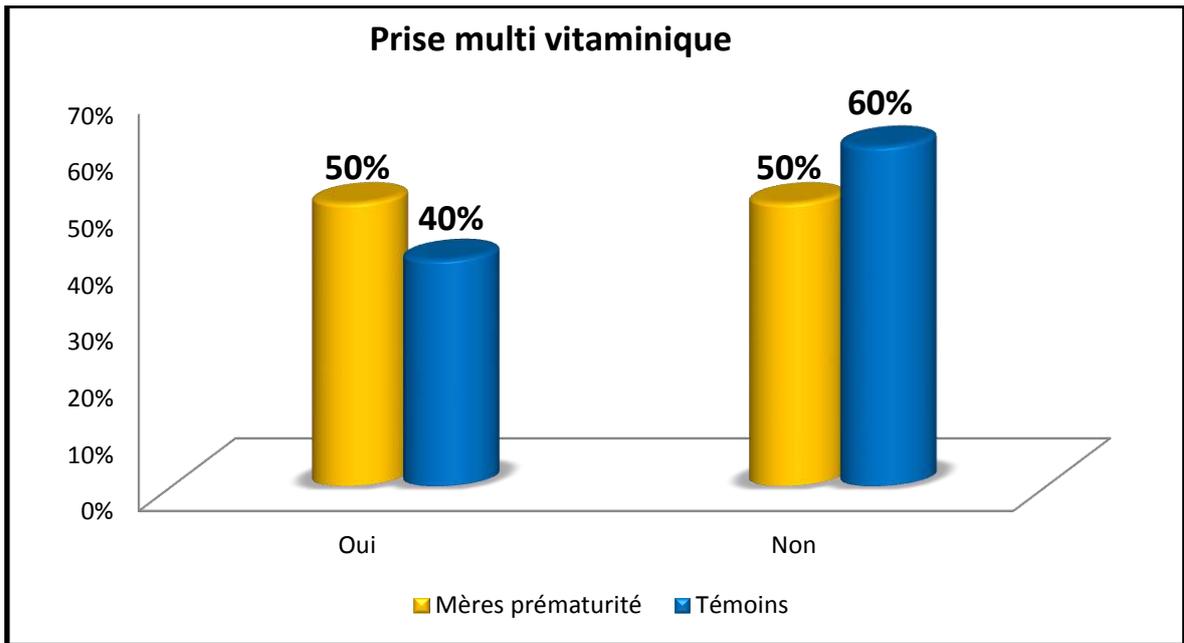
**II.2.2. Prise de suppléments multi vitaminiques et d'acide folique par les mères ayant fait des avortements spontanés ou ont accouché avant terme.**



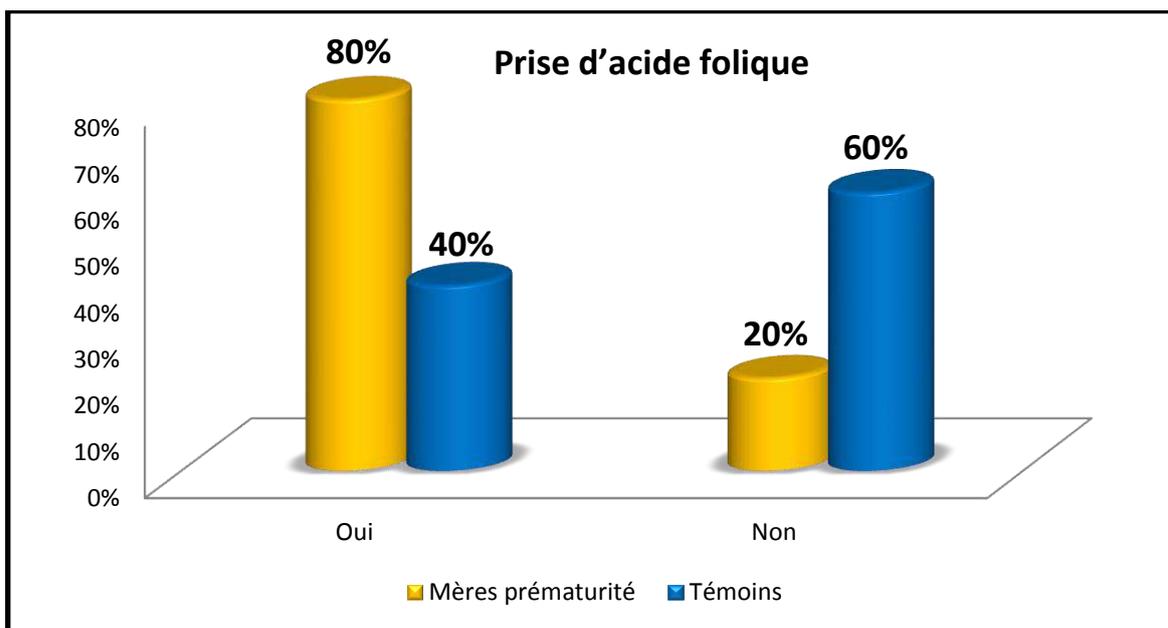
**Figure 24.** Prise multi vitaminique par les mères ayant fait des AS et des ASR et par leurs témoins.



**Figure 25.** Prise d'acide folique par les mères ayant fait des AS et des ASR et par leurs témoins.



**Figure 26.** Prise multi vitaminique par les mères à accouchement prématuré et par les témoins.



**Figure 27.** Prise d'acide folique par les mères à accouchement prématuré et par les témoins.

Les données présentées dans la figure 24, nous ont permis d'observer que la majorité des mères ayant fait des avortements n'ont pas pris de suppléments multi vitaminiques avant ou pendant leur grossesse. Le pourcentage était de 66,66% pour les mères faisant des AS et de 94,44% pour les mères ayant fait un ASR. De plus, nous avons

signalé une différence significative entre ces pourcentages et celui des mères témoins qui était de 64,28%.

Nous concluons, ainsi, que le manque d'une supplémentation vitaminique augmente le risque des avortements chez les femmes enceintes dans notre population.

Par ailleurs, l'absence de la prise d'acide folique était observée chez 33,33% des mères à AS, chez 33,33% des mères à ASR et chez 14,28% des mères témoins. Le pourcentage est plus élevé chez les mères à risque (figure 25).

Ces données reflètent l'absence de la politique de supplémentation vitaminique et son effet sur l'issue de la grossesse chez les femmes de notre population d'étude.

En effet, la grossesse est associée à des modifications biochimiques qui se traduit par une altération du statut en micronutriments entraînant une augmentation de la demande en apport en vitamines pour le fœtus en développement (**Shanker et al., 2019**).

L'alimentation, cependant, ne fournit pas suffisamment d'éléments nutritifs, et la cuisson détruit une grande partie des vitamines (**Société des obstétriciens et gynécologues du Canada, 2010 ; Sebastion et al., 2019**). Les chercheurs soulignent, de ce fait, la nécessité de prendre des suppléments multi vitaminiques, avant et pendant la grossesse, qui aident à combler les besoins et le manque. Elles procurent des bienfaits pour la femme et son enfant pour toute la vie.

Par ailleurs, et plus particulièrement, la supplémentation périconceptionnelle par l'acide folique est d'une importance majeure, car plusieurs études, ont constaté une corrélation entre les fausses couches spontanées répétées et la carence en vitamine B9 (**Aubard et al., 2000 ; Hague, 2003 ; Del Bianco et al., 2004 ; Daly et al., 2005 ; Candito et al., 2007**).

Pendant la grossesse, les besoins en folates sont augmentés d'un tiers, l'acide folique est utile pour la formation de nouveaux tissus, il contribue à la formation des cellules du sang, du cerveau et du système nerveux de l'embryon (**Jurez et al., 2002 ; Darnton et al., 2015**). De ce fait, l'apport en folates pendant la grossesse est essentiel pour un développement fœtal et placentaire adéquat (**Baker et al., 2018**).

Une supplémentation médicamenteuse en acide folique est systématisée dans plusieurs pays. De plus, et pour bien atteindre les objectifs, il a été mis en œuvre une

politique d'enrichissement des aliments, farine, semoule, maïs et pâtes alimentaires, par l'acide folique (**Castano *et al.*, 2017 ; Dubois *et al.*,2018**).

Malheureusement, nous remarquons l'absence de la politique de supplémentation vitaminique chez nos femmes, de plus, ce programme d'enrichissement n'est pas encore d'application, à ce jour en Algérie.

Pour ce qui est du risque de l'accouchement avant terme, une étude récente a rapporté que la supplémentation en multivitamines le réduit significativement (**Blak et Dewey, 2019**).

Notre résultat conforte celui de **Senqpiel *et al* (2013)**, le risque d'accouchement prématuré n'a pas été associé au manque de la consommation périconceptionnelle de multi vitamines ou d'acide folique. Un pourcentage important des femmes ont été supplémentés (figures 26, 27).

### **II.3. Analyse génétique**

Cette partie de notre étude concerne le groupe de femmes qui ont fait des avortements spontanés à répétition. En effet, la présence d'un risque de récurrence suggère l'implication de la composante génétique dans la survenue de ce type des complications de grossesse.

Du fait que notre étude biochimique a concerné le métabolisme de l'homocystéine et ses cofacteurs B9 et B12 d'une part, et étant donné que l'hyperhomocystéinémie est un des facteurs de risque indépendants pour les ASR d'une autre part, nous sommes intéressés à l'étude de la mutation A2756G du gène de la méthionine synthase dans notre population. Enzyme clé du métabolisme de l'Hcy folate dépendant.

**Tableau 04.** Fréquences génotypiques de la mutation A2756G du gène de la méthionine synthase chez les mères faisant des ASR et chez les témoins.

<b>Génotype</b>	<b>Mères ASR</b>	<b>Témoins</b>
<b>AA</b>	10 (76,92%)	5 (83,33%)
<b>AG</b>	<b>3 (23,07%)</b>	<b>1 (16,66%)</b>

Le tableau 04 montre la comparaison des fréquences génotypiques entre les deux groupes, mères ayant fait des ASR et les témoins.

Nous avons trouvé la mutation chez 3 mères à risque à savoir 23,07% alors qu'un pourcentage de 16,66% a été observé chez les témoins. Suggérant, ainsi, que le polymorphisme A2756G du gène MS peut être impliqué dans la survenue de ce type de complication dans notre population.

Sur la base des données de la littérature, le polymorphisme A2756G du gène MS est associé au risque de survenue des ASR dans certaines populations (**Kim et al., 2013**). **Guo et son équipe en (2012)**, ont rapporté que la distribution du génotype muté était également significativement plus élevée dans le groupe des femmes sujettes des avortements (11,9%) par rapport au groupe témoin( 4,6 %)(P= 0,005).

Selon **Wang et al (2005)**, le risque des ASR était de 3 à 4 fois plus élevé chez les femmes portant la mutation A2756G.

L'implication de la mutation A2756G du gène MS dans l'étiologie des avortements, peut être expliquée la perturbation de la reméthylation de l'homocystéine en méthionine, qui peut entraîner une augmentation de l'homocystéine dans les liquides péri-embryonnaires et donc la survenue des fausses couches par sa toxicité (**Stegers Theunissen et al., 1997**) .

Plusieurs études ont pu démontrer que les taux de l'Hcy étaient plus élevé chez les porteuses du gène muté de la MS (**Holmes ,2003 ; Porter et Scott, 2005. ; Chakraborty et al., 2013**).

Par ailleurs, 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 .

## **Conclusion et perspectives**

---

Notre étude est transversale de type cas témoins. Elle vise à rechercher certains facteurs de risque biochimiques et génétiques pouvant être impliqués dans la survenue des avortements, AS et ASR, et des accouchements avant terme, dans notre population.

Pour ce faire, nous avons tout d'abord étudié quelques caractéristiques physiologiques et nutritionnelles pouvant influencer le statut biochimique chez les femmes à risque.

Les résultats nous ont permis de constater que les situations physiologiques à savoir : L'âge, le surpoids et le niveau de stress ont été significativement liés à la survenue des avortements dans notre population, mais pas à la prématurité.

En outre, nous n'avons pas observé une élévation du risque de la survenue des avortements ou de la prématurité liée à la forte consommation du thé ou du café dans la population étudiée. En revanche, un risque faible a été constaté pour la consommation des dattes et la survenue d'un accouchement prématuré.

L'analyse biochimique réalisée au cours de ce travail a concerné le métabolisme de l'homocystéine des femmes. Nous avons étudié les taux du folate, de la vitamine B12 et de l'homocystéine, ainsi que la fréquence de la mutation A2756G du gène de la MS, enzyme clé intervenant dans cette voie métabolique.

Les résultats viennent nous montrer l'existence d'une perturbation métabolique chez les femmes faisant des avortements spontanés dans notre population. Elle a été marquée par un taux du folate significativement faible et une concentration de l'homocystéine élevée chez les mères à risque par rapport aux témoins.

Nous avons également remarqué l'absence de la politique de supplémentation vitaminique, avant et pendant la grossesse chez les femmes de notre population. Reflétant son effet sur l'issue de la grossesse.

L'étude du polymorphisme génétique A2756G du gène de la MS nous a montré que le variant muté AG présente une fréquence plus élevée chez les mères à ASR par rapport aux témoins. Suggérant, ainsi, qu'il peut contribuer à la survenue de ce type de complication dans notre population.

Par rapport aux taux de la vitamine B12, nos résultats ne permettent pas de conclure à une association entre la carence en cette vitamine et le risque de faire un AS ou un ASR dans notre population d'étude.

Pour ce qui est de l'accouchement avant terme, bien qu'une élévation du taux de l'homocystéine a été observé chez les mères à risque, le taux de folate, de la vitamine B12 ainsi que la prise vitaminique ou celle de l'acide folique ne diffèrent pas de ceux des témoins.

Notre étude supporte l'hypothèse selon laquelle les avortements ou la prématurité est un état multifactoriel complexe dans lequel des facteurs physiologiques, génétiques et nutritionnels sont impliqués.

Un défi majeur reste à traduire les observations d'études à un contexte clinique comme :

- ✓ La mesure de la concentration de l'homocystéine avant la conception car elle pourrait être, un indicateur utile du besoin d'intervention avant la conception.
- ✓ La supplémentation systématique multi vitaminique avant la grossesse et dans les trois premiers mois de la grossesse, qui est d'une extrême importance. Elle permet d'améliorer le statut vitaminique d'une part, d'abaisser le taux de l'Hcy d'une autre part, et même de corriger les effets des mutations génétiques.

Notre travail ouvre de nouvelles perspectives dans le domaine de la santé publique. Des études futures sur un nombre d'échantillon plus grand sont nécessaires, afin d'obtenir des résultats plus significatifs et aussi d'étudier statistiquement d'autres mutations dans d'autres gènes pouvant contribuer dans la survenue des résultats défavorables de la grossesse.

## **Références bibliographiques**

---

**Abbas A, Sifi K, Naimi D, Benmebarek K, Abadi N(2016).** 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.*40(2):238-244.

**Abdelmouttaleb I, Danchin N, Aimone-Gastin I, Namour F, Angioi M, Gelot MA, Bennani N, Lambert D, Jeandel C, Gueant JL(2000).** Homocysteine, vitamins B6, B12, folate, and risk of coronary artery disease in patients undergoing diagnostic coronary angiography. *Amino Acids.*18: 139-46.

**Aguilar B, Rojas J, Coolados M (2004).** Metabolisme of homocystéine and relationship with cardiovascular disease . *Journal of thrombosis and thrombolysis .*18(2): 75-87.

**Ahmadi R, Ziaei S, Parsay S (2017).** Association between Nutritional Status with Spontaneous Abortion. *Int J Fertil Steril.*10(4):337-342.

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

**Aléssio AC, Siqueira LH, Bydlowski SP, Höehr NF, Annichino-Bizzacchi(2008).** Polymorphisms in the CBS gene and homocysteine, folate and vitamin B12 levels: association with polymorphisms in the MTHFR and MTRR genes in Brazilian children. *JM.Am J Med Genet A.*146A(20):2598-602.

**Al-Kuran O, Al-Mehaisen L, Bawadi H, Beitawi S, Amarin Z (2011),** “The effect of late pregnancy consumption of date fruit on labour and delivery”, Jordan University of Science and Technology, Irbid, Jordan.

**Allen RH(1981).** Clinical role and current status of serum cobalamin(Vitamin B12) assays. *Ligand Quarterly.*4(37):37-44.

**Allen CM, Founds SA( 2013 ).** Genetics and preterm birth .*J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.*42(6):730-6.

**Andrès E, Loukili NH, Noël E, Kaltenbach G, Abdelgheni MB, Perrin AE(2004).** Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *J CMA.*171:251-9.

**Andrey N, Gaiday, Akylbek B, Tussupkaliyev, Saule K, Bermagambetova, Sagira S, Zhumagulova, Leyla K, Sarsembayeva, Moldir B, Dossimbetova, Zhanibek Zh Daribay(2018).** Effect of homocysteine on pregnancy: A systematic review .*Chemico-Biological Interactions .* 293: 70–76.

**Antoniades C (2009).** Homocysteine and coronary atherosclerosis: From folate fortification to the recent clinical trials. *European Heart Journal.*30(1):6–15.

**Aras RY(2013).** Is maternal age risk factor for low birth weight? *Arch Med Health Sci.* 1(1):33–37.

**Aubard Y, Darodes N , Cantaloube M( 2000).**Hyperhomocysteinemia and pregnancy-review of our present understanding and therapeutic implications. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 93: 157-65.

**Aubard Y, Darodes N , Cantaloube M , Aubard V , Diallo D, Teissier MP (2000).** Hyperhomocystéinémie et grossesse : une association dangereuse . J Gynecol obstet Biol Reprod . (29) : 363-372.

**Aubard Y, Darodes N, Cantaloube M(2000).** Hyperhomocysteinemia and pregnancy-review of our present understanding and therapeutic implications. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.93: 157-65.

**Aubard Y, Darodes N, Cantaloube M, Aubard V, Diallo D, Teissier MP(2000).** Hyperhomocysteinemia and pregnancy: a dangerous association.J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).29(4):363-72.

**Aubard Y, Darodes N, Cantaloube M, Aubard V, Diallo D, Teissier MP(2000).** Hyperhomocysteinemia and pregnancy: a dangerous association. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).29(4):363-72.

**Baker BC, Hayes DJ, Jones RL( 2018).** Effects of micronutrients on placental function: evidence from clinical studies to animal models. Reproduction.156(3):R69-R82.

**Banhid F, Czeizel AE (2011).** Vitamin supply in pregnancy for prevention of congenital birth defects. 14:291-296.

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

**Barboux S, Kluijtmans L, Whitehead A(2000).** Accurate and rapid multiplex heteroduplexing method for genotyping key enzymes involved in folate / homocystéine metabolism. Clin chim(46): 907-912.

**Barber JC, Cockwell AE, Grant E, Williams S , Dunn R, Ogilvie CM(2010).** Is karyotyping couples experiencing recurrent miscarriage worth the cost?BJOG. 117:885-8.

**Baroni L, Goggi S, Battaglino R, Berveglieri M, Fasan I, Filippin D, Griffith P, Rizzo G, Tomasini C, Tosatti MA, Battino MA(2018).** Vegan Nutrition for Mothers and children: Practical Tools for Healthcare Providers. Nutrients. 20;11(1).

**Belaisch-Allart J, Hamy AS , Mayenga JM , Grefenstette I , Kerneis S .(2008).** A study comparing previous induced abortion rates in populations of newly delivered women and infertile women.Gynecologie obstetrique & Fertilité. 36(4):395-399.

**Belliemi CV, Buonocore G(2013).**Abortion and subsequent mental health: Review of the literature. Psychiatry Clin Neurosci.67(5):301-10.

**Benammar A, Sermondade N , Faure C , Dupont C, Cedrin-Durnerien I , Sifer C, Herberg S, Levy R(2012).** Nutrition et fausse couche spontanées: Une Revue de la Littérature. Gynecol Obstet et fertilité. 40 :162-169.

**Benammar N, Sermondade C, Faure C, Dupont I Cedrin , Durnerin C, Sifer R, Levy (2012).** Nutrition et fausses couches spontanées : une revue de la littérature Nutrition and miscarriages: A literature review Author links open overlay panel. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 162-169.

**Benoît J (2006).** Les avortements spontanés à répétition. *Arthro Action*. 59-61.

**Berardi J C (1992).** La prématurité de décision médicale : analyse d'une étude rétrospective portant sur 18 maternités de la périphérie parisienne. *Jr Gynécol Obstétr Reprod* . 8 (21) :943-946.

**Berkowitz GS , Papiernik E (1993 ).** Epidemiology of preterm birth. *Epidemiol Rev*, 15(2):414 –443.

**Bernabe JV, Soriano T, Albaladejo R, Juarranz M, Calle ME, Martinez D, Dominguez-Rojas V (2004).** Risk factors for low birth weight : a review. *Eur J Obstet Gyneacol Rep Biol*. 116: 3-15.

**Besinger R (1997).** Impact réel de la prématurité. *Journal de gynécologie obstétrique et biologie de la reproduction*. 26 :2.

**Bezold KY, Karjalainen MK, Hallman M, Teramo K, Muglia LJ (2013).** The genomics of preterm birth: from animal models to human studies. *Genome Med*. 5(4):34

**Bigdeli R, Younesi MR, Panahnejad E, Asgary V, Heidarzadeh S, Mazaheri H, Aligoudarzi SL (2018).** Association between thrombophilia gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss risk in the Iranian population. *Syst Biol Reprod Med* .64(4):274-282.

**Bills N, Koury A, Clifford J, Dessypris N (1992).** Ineffective hematopoiesis in folate-deficient mice. *Blood*. 79:2273-2280.

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

**Black RE, Dewey KG (2019).** Benefits of supplementation with multiple micronutrients in pregnancy. *Ann N Y*. 1444 (1):3-5.

**Bloch H, Lequien P, Provasi J (2003).** L'enfant prématuré. Paris, Armand Colin.

**Boas Wv, Gancalvves Roi, Costa OL, Goncalves MS (2015).** Metabolism and gene polymorphisms of the folate pathway in Brazilian women with history of recurrent abortion. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 37(2):71-6.

**Boas WV, Gonçalves RO, Costa OL, Goncalves MS (2015).** Metabolism and gene polymorphisms of the folate pathway in Brazilian women with history of recurrent abortion. *Rev Bras Ginecol Obstet* .37(2):71-6.

**Bogdan N , Eliza Oprea , Ileana C , Mihai Berteanu , Cornelia C(2010).**Homocysteine and vitamin therapy in stroke prevention and treatment. ABP .( 57) :467–477.

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

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

**Boumeau A(1999).**Interruption volontaire de grossesse.Encycl Med Chir .paris . 40 (738) : 15 p.

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

**Broen AN, Moum T, Bodtker AS, Ekeberg O(2004).** Psychological impact on women of miscarriage versus induced abortion: a 2-year follow-up study. Psychosom Med;66(2):265-71.

**Brosnan J, Brosnan E , Bertolo P , Brunton J(2007).** Methionine: a metabolically unique amino acid. Livest. ( 112):2-7.

**Brown KL(2005).** Chemistry and enzymology of vitamin B12. Chemical Reviews.105(6): 2075–2149.

**Bukowski R<sup>1</sup>, Malone FD, Porter FT, Nyberg DA, Comstock CH, Hankins GD, Eddleman K, Gross SJ, Dugoff L, Craigo SD, Timor-Tritsch IE, Carr SR, Wolfe HM, D'Alton ME (2009).** Preconceptional folate supplementation and the risk of spontaneous preterm birth: a cohort study.

**Candito M, Naimi M, Boisson C, Rudigoz JC, Gaucherand P, Guéant JL, Luton D, Van Obberghen E(2007).** Plasma vitamin values and antiepileptic therapy : case reports of pregnancy outcomes affected by a neural tube defect. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol .79(1):62-4.

**Cao Y, Xu J, Zhang Z, Huang X, Zhang A, Wang J, Zheng Q, Fu L, Du J (2013)** .Association study between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. Gene. 10;514(2):105-11.

**Capmas P et al., (2014).**Prise en charge d'un antécédent de fausse couche tardive(14 à 22 SA). J Gynecol Obstet Biol Reprod(Paris).

**Carolan M , Wright RJ (2017).** Miscarriage at advanced maternal age and the search for meaning. Death Stud. 41(3):144-153.

**Castano E, Caveides L, Hirsch S, Lianos M, Iniguez G, Ranco AM(2017).**Folate Transporters in Placentas from Preterm Newborns and Their Relation to Cord Blood Folate and Vitamin B12 Levels.Plos One.19;12(1).

**Castano E, Pinunri R, Hirsh S, Ronco AM (2017).** Folate and Pregnancy, current concepts: It is required folic acid supplementation?. *Rev Chil Pediatr* . 88(2):199-206.

**Castellanos-Sinco HB,et al., (2015).** Megaloblastic anaemia: Folic acid and vitamin B12 metabolism. *Revista Médica Del Hospital General De México*. 78(3) :135– 143.

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

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

**Chakraborty P, Goswami SK, Rajani S, Sharman S, Kabir SN, Chakravarty B, Jana K(2013).** Recurrent pregnancy loss in polycystic ovary syndrome: role of hyperhomocysteinemia and insulin resistance. *PLoS One* .8(5).

**Chakraborty P, Goswami SK, Rajani S, Sharma S, Kabir SN, Chakravarty B, Jana K (2013).**Recurrent pregnancy loss in polycystic ovary syndrome: role of hyperhomocysteinemia and insulin resistance.21;8(5).

**Chango A, Emery N, Barbé F, Pfister M, Nicolas JP (2000).** Les transporteurs des folates : analyse génétique et relation avec l'homocystéine plasmatique chez le sujet sain. *Ann Biol Clin* . 58 : 215.

**Chango A, Perrin M, Jean-Pierre T(1997).**Aspects nutritionnels biochimique et clinique de l'hyperhomocystéinémie. *Nutrition clinique et métabolisme*. 11, 201-211.

**Chaudhari BP, Plunkett J, Ratajczak CK, Shen TT, DeFranco EA, Muglia LJ (2008).** The genetics of birth timing: insights into a fundamental component of human development. *Clin Genet*.74(6):493-501.

**Chaudhari BP, Plunkett J, Ratajczak CK, Shen TT, DeFranco EA, Muglia LJ (2008).** The genetics of birth timing: insights into a fundamental component of human development. *Clin Genet* .74(6):493-501.

**Chaudhry SH, Taljaard M , MacFarlane AJ, Gaud LM, Smith GN, Rodger M, Rennicks White R, Walker MC, Wen SW(2019).**The role of maternal homocysteine concentration in placenta-mediated complications: findings from the Ottawa and Kingston birth cohort.*BMC Pregnancy Childbirth*. 19(1):7.

**Chen L, Liu M, Hwang H, Chen LS, Korenberg J, Shane B(1997).** Human methionine synthase. cDNA cloning, gene localization, and expression. *J Biol Chem* ;(272):3628-34.

**Chen LH, Liu ML, Hwang HY, Chen LS, Korenberg J, Shane (1997).** Human methionine synthase. cDNA cloning, gene localization, and expression . *J Biol Chem*. 272(6):3628-34.

**Christensen B, Frosst P, Lussier-Cacan S ,Selhub J, Goyette P, Rosenblatt DS, Genest J, Rozen R (1999).** Correlation of a common mutation in the methylenetetrahydrofolate

reductase (MTHFR) gene with plasma homocysteine in patients with premature coronary artery disease. *Arter Thromb Vasc Biol.*(17): 569-573.

**Christensen B, Rosenblatt DS (1995).** Effects of folate deficiency on embryonic development. *Clin Haematol.* 8(3):617-37.

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

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

**Cooper BA(1984).**Folic Acid :its metabolism and utilization .*Clin Biochem.*17:95-8.

**Cooper GR, Pfeiffer CM(2002).** Homocysteine and Cardiovascular Disease Risk.(1):31–62.

**Costa De Carvalho MJ, Guiland JC, Moreau D, Boggio V, Fuchs F( 1996).** Vitamin status of healthy subjects in Burgundy (France). *Ann Nutr Metab.*40 : 24-51.

**Coudray C(2001).** Cuivre. In : Apports nutritionnels conseillés. Paris : Tec et Doc. Lavoisier. 158-161

**Cresswell J, Campbell OM, De Sil VA MJ, Filippi V(2012).** Effet del'obésité maternelle sur la mortalité néonatale en Afrique sub-saharienne: une analyse multivariée de 27 ensembles de données nationales. *Lancet.* 380 : 1325-1330.

**Crider S, Devine O, Hao L, Nicole F, Song L, Anne M , Zhu Li, Zhu J , Berry J (2014).**Population red blood cell folate concentrations for prevention of neural tube defects: bayesian mode.*BMJ* .349.

**Cully KS , Wilson RB (1975).** Homocysteine theory of arteriosclerosis.*Atherosclerosis.*(22): 215-27

**Dai R, Pan Y, Fu Y, Liu Q, Han W, Liu R(2018).** Role of male genetic factors in recurrent pregnancy loss in Northeast China. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* .224:6-11.

**Daly S, Cotter A, Molly AE, Scott J( 2005).** Homocysteine and folic acid: implications for pregnancy. *Semin Vasc Med* .5(2):190-200.

**Darnton-Hill I et al.,(2015).** Micronutrients in pregnancy in low-and middle-income countries.

**Davies GAL, Maxwell C, McLeod L (2010).** Obesity in pregnancy. *J Obstet Gynaecol Can.*32(2):165-173.

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

**De Bree A, Verschuren WM, Blom HJ, Kromhout D(2001).** Association between B vitamin intake and plasma homocysteine concentration in the general Dutch population aged 20-65 y. *Am J Clin Nutr.*73: 1027-33.

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

**De la caller R(2003).** Usandizaga, M. Sancha et al. Homocysteine, folic acid and B- group vitamins in obstetrics and gynaecology . *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology.* 107: 125-134.

**Del Bianco A, Maruotti G, Fulgieri AM, Celeste T, Lombardi L, Amato NA, Pietropaolo F(2004).** Recurrent spontaneous miscarriages and hyperhomocysteinemia. *Minerva Ginecol.*56(5):379-83.

**Del Bianco A, Maruotti G, Fulgieri AM, Celeste T, Lombardi L, Amato NA, Pietropaolo F(2004).** Recurrent spontaneous miscarriages and hyperhomocysteinemia. *Minerva Ginecol.*56(5):379-83.

**Delattre J , Ourand G , Jardillier JC (2003).** Biochimie pathologique , aspects moléculaires et cellulaires . Ed Medecine et sciences.Flammarion.317.

**Demuth K ,Drumat S , Paul JL ,Moatti N (2002).** Hyperhomocysteinémie et atherosclérose . *Med\ Sci .* (16): 1081-1083.

**Diamond A(2009).** Normal Development of Prefrontal Cortex from Birth to Young Adulthood: Cognitive Functions, Anatomy, and Biochemistry.

**Dickute J, Padaiga Z, Grabauskas V, Nadisauskiene RJ, Basys V, Gaizauskiene A(2004).** Maternal socio-economic factors and the risk of lowbirth weight in Lithuania. *Medicina(Kaumas).* 40(5): 475-82.

**Dolan SM, Mt Sinai J (2010).** Genetic and environmental contributions to racial disparities in preterm birth. *77(2):*160-5.

**Dominguez-Salas P, Sharon E, Cox, Andrew M, Prentice, Branwen J, Hennig, Sophie E(2012).** Maternal nutritional status ,metabolism and offspring DNA methylation: a review of current evidence in human subjects. *Proceedings of the Nutrition Society.* 71:154–165.

**Dubois L, Diasparra M, Bedard B, Colapinto CK, Fontaine-Bisson B, Tremblay RE, Fraser WD(2018).**Adequacy of nutritional intake during pregnancy in relation to prepregnancy. *Br J Nutr.* 120(3):335-344.

**Ducros V, Candito M , Causse E , Couderc R , Demuth , Diop M , Drai J , Gaclon A , Gerhant M (2001).** Dosage de l'homocystéine plasmatique : étude des facteurs variations preanalytique sur la concentration de l'homocystéine plasmatique totale. *Ann Biol Clin .* 59(1) : 33-39.

**Ducros V, Demuth K, Sauvant MP, Quillard M, Caussé E, Candito M, Read MH, Drai J, Garcia I, Gerhardt MF(2002).** Methods for homocysteine analysis and biological relevance of the results. *Journal of chromatography B*. 781:207-26.

**Dutta GP (1977).** Serum folic level in abortion. *J Indian Med Assoc*. 1;69(7):149-53.

**Dziegielewska M, Holtze S, Vole C, Wachter U, Menzel U, Morhart M, Groth, M, Szafranski, K, Sahn A, Sponholz C, Dammann P, Huse K, Hildebrandt T, Platzer M(2016).** Low sulfide levels and a high degree of cystathionine beta-synthase (CBS) activation by Sadenosylmethionine (SAM) in the long-lived naked mole-rat. *Redox biology*.( 8) : 192-198.

**Erickson SJ, Kubinec N, Vaccaro S, Moss N, Rieger R, Rowland A, Lowe JR(2019).** The association between maternal interaction and infant cortisol stress reactivity among preterm and full term infants at 4 months adjusted age. *Epub ahead of print*. 14;57:101342.

**Eure C R, Lindsay MK , Graves W L(2002).** Risk of adverse pregnancy outcomes in young adolescent parturients in an inner-city hospital . *Am J Obstet Gynecol*. 5(186):918–920.

**Eure R, Lindsay K, Graves L(2002).** “Risk of adverse pregnancy outcomes in young adolescent parturients in an inner-city hospital.” *Am. J. Obstet. Gynecol*. 5 (186): 918–920.

**Faeh D, Chiolero A, Paccaud F(2006).** Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease. *Swiss Med Wkly*.(136):745–56.

**Faessel-Pochard AI (2001).** Prématurité et parentalité. Thèse de médecine. Université de Lille II.

**Fayol V(2001).** Données récentes sur l’homocystéine. *Immuno-analyse et Biologie Spécialisée*.16(2) : 78-86.

**Finkelstein J(1990).** Methionine metabolism in mammals. *J. Nutr. Biochem*. (1) :228-237.

**Foka ZJ, Lambropoulos AF, Saravelos H, Karas GB, Karavida A, Agorastos T et al.,(2000).** Factor V leiden and prothrombin G20210A matation, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum Reprod*.15:485-62.

**Ford HB, Schust DJ(2009).** Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol*.2(2):76-83.

**Ford HB, Schust DJ(2009).** Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol* . (2) 76-83.

**Frost P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews R, Boers G, Heijer M, Kluijtmans L, Heuvel L(1995).** A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*.(10) :111-3.

**Gaiday AN, Tussupkaliyev AB, Bermagambetova SK, Zhumagulova SS, Sarsembayeva LK, Dossimbetova MB, Daribay ZZ(2018).**Effect of homocysteine on pregnancy: A systematic review.Chem Biol Interact.293:70-76.

**Gaskins AJ, Rich-Edwards JW, Hauser R, Williams PL, Gillman MW, Ginsburg ES, Missmer SA, Chavarro JE(2014).**Une consommation accrue de folate provenant de suppléments était associée à une réduction du risque d'avortement spontané. Obstet Gynecol ;124(1):23-31.

**George L, Granath F, Johansson AL, Olander B, Cnattingius S (2006).** Risks of repeated miscarriage.Paediatr Perinat Epidemiol.20(2):119-26.

**George L, Mills JL, Johansson AL, Nordmark A, Olander B, Granath F, Cnattingius S ( 2002 ).** Plasma folate levels and risk of spontaneous abortion288(15):1867-73.

**Gillery Ph(1999).** Métabolisme de l'homocystéine, Laboratoire central de biochimie, hôpital Robert-Debré, Reims, Le Courrier de l'Arco (1) : 2.

**Gindoff PR, Jewelewicz R(1986).** Reproductive potential in the older woman. Fertil Steril. .46(6):989-1001.

**Girs et Giet (2006).**Le dosage de l'homocystéine intéresse-T-il le médecin généraliste.Revue médicale de léige.(61): 352-361.

**Goldenberg RL (2005).** Biochemical markers for the prediction of spontaneous pre-term birth. Int J Gynaecol Obstet . 2 (79): 123–129.

**Goldenberg R L, Culhane JF, Iams J D(2009).** Preterm Birth 1: Epidemiology and Causes of Preterm Birth.Obstet Anesth Dig. 1 ( 29):6–7.

**Goldenberg RL, et al (2008).** Epidemiology and causes of preterm birth.Lancet . 371 (5) : 75-84.

**Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R (2008).** Epidemiology and causes of preterm birth. Lancet .371(9606):75-84.

**Goldenberg, J F, Culhane J,Iams D (2009).**“Preterm Birth 1: Epidemiology and Causes of Preterm Birth. Obstet Anesth Dig.1 ( 29): 6–7.

**Goldstein RF, Abell SK, Ranasinha S, Misso M, Boyle JA, Black MH, Li N, Hu G, Corrado F, Rode L, Kim YJ, Haugen M, Song WO, Kim MH, Bogaerts A, Devlieger R, Chung JH, Teede HJ(2017).** Association of Gestational Weight Gain With Maternal and Infant Outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis. JAMA .317(21):2207-2225.

**Gomes TS, Lindner U, Tennekoon KH, Karandagoda W, Gortner L, Obeid R(2010).** Homocysteine in small –for- gestational age and appropriate-for-gestational age preterm neonates from mothers receiving folic acid supplementation. Clin Chem Lab Med.48(8):1157-61.

**Gray EG(1955).** An Asymmetrical Response of Teleost Melanophores.Nature.175(4458):642–643.

**Grebille AG, Benifla JL(2002).** Prématurité et retard de croissance intra-utérin : facteurs de risques, les causes et la prévention. Revue du Patricien Monographie.2: 18-35.

**Groyette P,Pari A, Milos R , Frosst P , Tron P, Chen M, Rozen R(1998).** Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR) . Mamm Genome.(9): 652-6

**Guan LX, Du XY, Wang JX, Gao L, Wang RL, Li HB, Wang SX (2005).**Association of genetic polymorphisms in plasminogen activator inhibitor-1 gene and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene with recurrent early spontaneous abortion..22(3):330-3.

**Gueant JL, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Bosco P, Brunaud L, Romano C et al., (2003).** Genetic determinantss of folate and vitamin B12 metabolisme : a common pathway in neural tube defect and Down syndrome? Clin Chem Lab Med. 41: 1473-7.

**Guéant JL, Lambert D, Schohn H, Nicolas JP(1993).** Cobalamine (vitamine B12). Editions Techniques, Encycl Med Chir.13(1) :4p.

**Guilland J, Favier A , Poter daCoucy G , Galan P, Herberg S (2003) .** L'hyperhomocystéinémie facteurs de risque cardiovasculaire ou simple marqueure. Pathologie Biologie.51(2) : 101-110.

**Guilland J, Favier A, Potier C (2003).** Hyperhomocysteinemia:an independent risk factor or a simple marker of vascular disease.Pathologie Biologie.( 51): 101-110.

**Gulati S, Baker P, Li YN, Fowler B, Kruger W, Brody LC, Banerjee R(1996).** Defects in human methionine synthase in cblG patients. Hum Mol Genet.5:1859-65.

**Guo QN, Liao SX, Kang B, Zhang JX, Wang RL, Ding XB, Zhang WH (2012).**Association of methionine synthase reductase gene polymorphism with unexplained recurrent spontaneous abortion.47(10):742-6.

**Hachul AC, Boldaring VT, Neto NP, Moreno MF, Ribeiro EB, Nascimento CM, Oyma LM(2018).**Maternal consumption of green tea extract during pregnancy and lactation alters offspring's metabolism in rats. PLoS One. 13(7).

**Hague WM(2003).**Homocysteine and pregnancy. Clin Obstet Gynaecol. 17(3):459-69.

**Hahn KA, Wise LA, Rothman KJ, Mikkelsen EM, Brogly SB, Sorensen HT, Riis AH, Hatch EE(2015).** Caffeine and caffeinated beverage consumption and risk of spontaneous abortion. Hum Reprod.30(5):1246-55.

**Haider BA, Bhutta ZA (2015).** Multiple-micronutrient supplementation for women during pregnancy. Cochrane Database Syst Rev.

**Hamon C, Fanellos, Catala L, Parote(2005).** Conséquences de l'obésité maternelle sur le déroulement du travail et l'accouchement. *Rev Sage- Femme.* 4: 172-177.

**Hankey GJ, Eikelboom JW (1999).** Homocysteine and vascular disease. *Lancet.* 354:407-13.

**Hassold T et Chiu D (1985).** Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet.* 70: 11-7.

**Hassoun D(2016).** L'interruption volontaire de grossesse en Europe, *Revue française des affaires sociales.*1(1).

**Helm KD, Ness RM, Evans WS(2009).** Physiologic and physiopathologic Alterations of the Neuroendocrine Components of the Reproductive Axis. *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology.* Philadelphia: Saunders.441-88.

**Henderson JJ, McWilliam OA, Newnham JP, Pennell CE(2012).** Preterm birth aetiology 2004-2008. Maternal factors associated with three phenotypes: spontaneous preterm labour, preterm pre-labour rupture of membranes and medically indicated preterm birth. *J Matern Fetal Neonatal Med .*25(6):642-7.

**Herbert V, Biagaouette J (1997).** Call for endorsement of a petition to the Food and Drug Administration to always add vitamin B-12 to any folate fortification or supplement. *Am J Clin Nutr.* 65: 572-3.

**Heuser C, Dalton J, Macpherson C, BranchDW, Porter TF, Silver RM(2010).** Idiopathic recurrent pregnancy loss recurs at similar gestational ages. *Am J Obstet Gynecol.*203(4):343.

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

**Ho PI, Ortiz D, Rogers E, Shea TB(2002).** Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage. *J Neurosci Res.*70(5): 694-702.

**Hoffman ML, Scoccia B, Kurczynski TW, Shulman LP, Gao W(2008).** Abnormal folate metabolism as a risk factor for first-trimester spontaneous abortion. *J Reprod Med.*53(3):207-12.

**Holmes VA(2003).** Changes in haemostasis during normal pregnancy: does homocysteine play a role in maintaining homeostasis? *Proc Nutr Soc.*62(2):479-93.

**Hovdenak N, Haram K(2012).** Influence of mineral and vitamin supplements on pregnancy outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 164(2):127-32.

**Huang L, Lerro C, Yang T, Li J, Qiu J, Qiu W, He X, Cui H, Lv L, Xu R, Xu X, Huang H, Liu Q, Zhang Y(2016).** Maternal tea consumption and the risk of preterm delivery in urban China: a birth cohort study. *BMC Public Health.*16:456.

**Huang Z, Du G, Huang X, Han L, Han X, Xu B, Zhang Y, Yu M, Qin Y, Xia Y, Wang X, Lu C(2018).**The enhancer RNA Inc-SLC4A1-1 epigenetically regulates unexplained recurrent pregnancy loss (URPL) by activating CXCL8 and NF-κB pathway. *EBioMedicine* .38:162-170.

**Hubbner MJ, Samual TM, Duggan C, Thomast, Bosch T, et al.,(2013).***Ann.Nutr Metab.*162(2): 113-22.

**Hübner U, Alwan A, Jouma M, Tabbaa M, Schorr H, Herrmann W (2008) .** Low serum vitamin B12 is associated with recurrent pregnancy loss in Syrian women. *Clin Chem Lab Med* .46(9):1265-9.

**Iams J D(2002).** Frequency of uterine contractions and the risk of spontaneous. *New England Journal of Med.*4( 346) : 250–255.

**Jain A, Polotsky AJ, Rochester D, Berga SL, Loucks T, Zeitlain G et al.,(2007).**Pulsatile Luteinizing Hormone Amplitude and Progesterone Metabolite Excretion are Reduced in Obese Women. *J Clin Endocrinol Metab.*92: 2468-2473.

**Jarvie E, Hauguel-De-Mouzon S, Nelson SM, Sattar N, Catalano PM, Freemant DJ(2010).** Lipotoxicity in obese pregnancy and its potential role in adverse pregnancy outcome and obesity in the offspring.*ClinSci (Lond)*. 119 (3): 123–129.

**Jarvie E, Hauguel-De-Mouzon S, Nelson SM, Sattar N, Catalano PM, Freeman DJ(2010).** Lipotoxicity in obese pregnancy and its potential role in adverse pregnancy outcome and obesity in the offspring.*ClinSci (Lond)*. 119 (3): 123–129.

**Jie F, Bing X, Binghai Ch, Chen Q, Bo Z, Xiaojin L, Jiajia L, Yidan Y, Qianwen Z, Min W, Wanyin Ch, Zeyu H, Cong S, Hong L, Xia Ch, Jun Y(2018).**Biochemical clinical factors associated with missed abortion independent of maternal age ; A retrospective study of 795 cases with missed abortion and 694 cases with normal pregnancy. *Medicine* . 97(50) :1 -6.

**Joubert F, Hammoud C, Chevallier B(2002).** Carences vitaminiques (hormis la carence en vitamine D. *Encyl Méd Chir Elseiver, Paris, Pédiatrie*. 4(56) :p5.

**Juarez-Vazquez J, Bonizzoni E, Scotti A( 2002).**Iron plus folate is more effective than iron alone in the treatment of iron deficiency anaemia in pregnancy: a randomised, double blind clinical trial.*BJOG*. 109(9):1009-14.

**Junia S C , Ana Teresa F S, Ruth G(2019).** Perinatal factors associated with amplitude integrated electroencephalography abnormalities in preterminfants on the first day of lif.*J Pediatría*.809: 1-8.

**Kabore P, Donner P, Dramaix M(2007).** Facteurs de risques obstétricaux du petit poids de naissance à terme en milieu sahélien. *Revue Santé Publique*. 489–97.

**Kahveci B, Melekoglu R, Evruke IC, Cetin C(2018).** The effect of advanced maternal age on perinatal outcomes in nulliparous singleton pregnancies. *BMC Pregnancy Childbirth*.18(1):343.

**Kamkar N, Ramezanali F, Sabbaghian M (2018).** Relationship between sperm DNA fragmentation, free radicals and antioxidant capacity with idiopathic repeated pregnancy loss. *Reprod Biol*.18(4):330-335.

**Kamkar N, Ramezanali F, Sabbaghian M(2018).** The relationship between sperm DNA fragmentation, free radicals and antioxidant capacity with idiopathic repeated pregnancy loss. *Reprod Biol* .18(4):330-335.

**Kang G, Lok H, Yiu A, Hui S, Lai B, Chung T(2013).** Clinical and psychological impact after surgical, medical or expectant management of first-trimester miscarriage-a randomized controlled trial. *J of obstetrics gynaecology.Australian*. 53(2):170-177.

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

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

**Kaptan K, Beyan C, Ifran A, et al., (2008).**Platelet-derived microparticle levels in women with recurrent spontaneous abortion. *Int J Gynecol Obstet*.102(3):271-4.

**Karbulut A, Sevket O, Acun A(2011).** folate and vitamin B12 levels in first trimester pregnancies in the Southwest region of Turkey.*J Turk Ger Gynecol Assoc*. 1;12(3):153-6.

**Karine D ,Séverine D, Jean-Louis, P Nicole M(2000).** Hyperhomocystéinémie et Athérosclérose. *médecine/sciences* .(16) : 1081-90.

**Karine D ,Séverine D ,Jean-Louis P ,Nicole M(2000).**Hyperhomocystéinémie et Athérosclérose . *médecine/sciences* .(16) : 1081-90.

**Karine D, Séverine D, Jean-Louis P, Nicole M (2000)** .Hyperhomocystéinémie et athérosclérose. *médecine/sciences* .16 : 1081-90.

**Ketta N(2008).** Prise en charge des avortements spontanés au centre de santé de référence de la commune V du district de Bamako à Propos de 156 cas Thèse de Médecine, Bamako.

**Khandaker GM, Diabben CR, Jones PB(2012).** Est-ce que l'indice de masse corporelle de la mère pendant la grossesse risque d'influencer la schizophrénie chez les enfants d'âge adulte. *ObesRev*. 13 : 518-527.

**Kim JH, Jeon YJ, Lee BE, Kang H, Shin JE, Choi DH, Lee WS, Kim NK (2013).** Association of methionine synthase and thymidylate synthase genetic polymorphisms with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* .99(6):1674-80.

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

**Klein D, Poilblanc M, et al., (2009).** Prévention primaire des anomalies de fermeture du tube neural par l'acide folique en Maine-et-Loire ;La revue Sage-femme. Elsevier Masson. 66-71.

**Kristin H, Fearghal O, Brien B(2017).**Aaron Gerow level of prematurity a risk/plasticity factor at three years of age?. *Infant Behavior and Development* 47:27–39.

**Kuzminski AM, Del Giacco EJ, Allen RH, Stabler SP(1998).** Oral cobalamin therapy in patients who absorb it normally. *Blood.* 92:4879-80.

**Lacaze MT, Zupan V, Dehan M (2000).**L'entrée dans la vie prématurément.Médecine science .16: 345-353.

**Lan X, Field MS, Stover PJ(2018).** Cell cycle regulation of folate-mediated one-carbon metabolism. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol.*(10):1426.

**Lanir N, Aharon A, Brenner B(2003).** Haemostatic mechanisms in human placenta. *Best Pract Res Clin Haematol.*16(2):183-95.

**Lassi ZS, Salam RA, Haider BA, Bhutta ZA(2013).** Folic acid supplementation during pregnancy for maternal health and pregnancy outcomes. *Cochrane Database Syst Rev.*28(3).

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

**Lawn JE, Zupan J, Begkoyian G, Knippenberg R(2006).** Newborn Survival dans *Disease Control Priorities in Developing Countries*, 2<sup>de</sup> éd. New York: Oxford University Press,P50-531.

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

**Leary F , Samman S (2010).** Vitamin B12 in health and disease. *Nutrients*, 2(3):299– 316.

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

**Leitich H, Bodner-Adler B, Brunbauer M(2003).**Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: A meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol.*1(189): 139–147.

**Lejeune V(2010).** Fausses-couches spontanées répétées : bilan étiologique et prise en charge des grossesses ultérieures. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction.*39: F11-F16.

**Lejeune V(2010).** Fausses-couches spontanées répétées : bilan étiologique et prise en charge des grossesses ultérieures. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction.*39: F11-F16.

**Lepage J, Luton D, Azria E(2015).** Fausse couche spontané à répétition . *EMC de Médecine.* 3-1312.

**Levasseur R (2009).** Tissus osseux et hyperhomocystinémie. *Revue de rhumatisme.*76(5) : 390 – 396.

**Leviton A(2018).** Biases Inherent in Studies of Coffee Consumption in Early Pregnancy and the Risks of Subsequent Events. *Nutrients.* 23;10(9).

**Li Y, Townend J, Rowe R, Knight M, Brocklehurst P, Hollowell J(2014).** The effect of maternal age and planned place of birth on intrapartum outcomes in healthy women with straightforward pregnancies: secondary analysis of the Birthplace national prospective cohort study. *BMJ Open.* 4(1).

**Li YN, Gulati S, Baker P, Brody L, Banerjee R, Kruger W(1996).** Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Hum Molec Genet.*(5): 1851-1858.

**Li YN, Gulati S. Baker PJ, Brody LC Banerjee R. Kruger WD(1996).** Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Hum Mol Genet.*5(12): 185 1-8.

**Liem L S, Mheen V, Bekedam D J(2013).** Cervical length measurement for the prediction of preterm birth in symptomatic women with a twin pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol Int.* 12: 58-97.

**Lim HY,et al., (2007).** Glucocorticoids exert opposing effects on macrophage function dependent on their concentration. *Immunology.*122(1):47–53.

**Liu B, Xu G, Sun Y, Du Y, Gao R, Snetselaar LG, Santillan MK, Bao W.(2019) .** Association between maternal pre-pregnancy obesity and preterm birth according to maternal age and race or ethnicity: a population-based study. *Lancet Diabetes Endocrinol.*7(9):707-714.

**Liu K, Case A(2011).**Advanced reproductive age and fertility. *J Obstet Gynaecol Can.* 33(11):1165-1175.

**Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, et al. (2012).** Global regional and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet.*379: 2151-2161.

**Liu Y, Liu Yi, Zhang Sh, Chen H, Liu M, Zhang J(2015).** Etiology of spontaneous abortion before and after the demonstration of embryonic cardiac activity in women with recurrent spontaneous abortion. *International Journal of Gynecology and Obstetrics.* P5.

**Loup-Leuciuc A, Peirre-Jeen L, Tommaso L, Jacky S(2011).** Carence en vitamine B12 (1re partie) : mise au point .Med Buccale Chir Buccal.17:211-224.

**Lu JH, He JR, Shen SY, Wei XL, Chen NN, Yuan MY, Qiu L, Li WD, Chen QZ, Hu CY, Xia HM, Bartington S, Cheng KK, Lam KBH, Qiu X (2017).** Born in Guangzhou Cohort Study Group. Does tea consumption during early pregnancy have an adverse effect on birth outcomes? 44(3):281-289.

**Lucock M(2000).** Folic Acid: Nutritional Biochemistry, Molecular Biology, and Role in Disease Processes. Molecular Genetics and Metabolism.71: 121–138.

**Luke et Brown MB(2007).** Contemporary risks of maternal morbidity and adverse outcomes with increasing maternal age and plurality.Fertil Steril. 88: 283-93.

**Luo L, Chen Y, Wang L, Zhuo G, Qiu C, Tu Q, Mei J, Zhang W, Qian X, Wang X (2015).** Polymorphisms of Genes Involved in the Folate Metabolic Pathway Impact the Occurrence of Unexplained Recurrent Pregnancy Loss. Reprod Sci.(7):845-51.

**Ma J, Zhang X, He G, Yang C (2017).**Association between TNF, IL1B, IL6, IL10 and IFNG polymorphisms and recurrent miscarriage: a case control study. Reprod Biol Endocrinol ;15(1):83.

**Ma RCW, Schmidt MI, Tam WH, McIntyre HD, Catalano PM (2016).** Clinical management of pregnancy in the obese mother: before conception, during pregnancy, and post partum. Lancet Diabetes Endocrinol .4(12):1037-1049.

**Ma RCW, Schmidt MI, Tam WH, McIntyre HD, Catalano PM(2016).** Clinical management of pregnancy in the obese mother: before conception, during pregnancy, and post partum. Lancet Diabetes Endocrinol.4(12):1037-1049.

**Maayan- Metzger A, Lubtesky A, Kuint J, Rosenberg N, Simchen MJ, Kuperman A, Strauss T, Sela BA, Kenet G(2013).** The impact of genetic and environmental factors on homocysteine levels in preterm neonates. Pediatr Blood Cancer. 60(4):659-62.

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

**MalinowMR, Rajkovic A, Druell PB, et al., (1998).** The relationship between maternal and neonatal umbilical cord plasma homocysteine suggests a potential role for maternal homocysteine in fetal metabolism.Obstet Gynecol. 178: 228–233.

**Manzanares G, Angel6Santalla H , Irene Vico Z, Lopez MS, Alicia Pineda L(2012).** Abnormal maternal body mass index and obstetric and neonatal outcome. J Matern Fetal Neonatal Med. 25 :308-312.

**Marc B, Viala D, Sanlavill E (2006).**Prématurité et retard de croissance intra utérin. Médecine Pédiatrique. Edit Vernazobres- Grego. P 1-13.

**Maria C , Allen J , Nils-Halvdan M, Clarice R, Siri E(2019).** Role of maternal age and pregnancy history in risk of miscarriage:prospective register based study . J BM .1-7.

**Matherly LH ,Goldman DI(2003).** Membrane transport of folates. Vitam Horm.66: 403-456.

**Mattson MP, Shea TB(2003).** Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. Trends Neurosci. 26: 137–146.

**Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K(1996).** Homocysteine and coronary atherosclerosis. J Am Coll Cardiol.(27):517-27.

**Mc Dowell LR(2000).** Vitamins in animal and human nutrition. 2nd edition, Iowa State University Press, Ames.

**McCully KS , Wilson RB (1975).** Homocysteine theory of arteriosclerosis.Atherosclerosis.22: 215-27.

**Medsker B, Forno E, Simhan H, Celedón JC(2015)** .Le stress modifications épigénétiques du gène du récepteur fœtal des glucocorticoïdes (NR3C1)entraînant une altération du métabolisme des glucocorticoïdes. Obstet Gynecol Surv .70(12):773-9.

**Megahed MA, Taher IM (2004).**Folate and homocysteine levels in pregnancy. Br J Biomed Sci. 61(2):84-7.

**Melse-Boonstra A, Holm PM ,Ueland M,Olthof R , Clarke, Verhoef P(2005).** Betaïne concentration as a determinant of fasting total homocysteine concentrations and the effect of folic acid supplementation on betaïne concentrations. Clin Nutr. (81):1378-1382.

**Merger R (2003).** Précis d'obstétrique (6eme éd). France, Paris .

**Merviel P, Lanta S, Allier G et al., (2005).** Avortements spontanés à répétition. EMC-Gynécologie Obstétrique.2 : 278-296.

**Meyer BJ, Stewart FM, Brown EA, Cooney J, Nilsson S, Olivecrona G, Ramsay JE, Griffin BA, Caslake MJ, Freeman DJ(2013).** Maternal obesity is associated With the formation of small dense LDL and hypoadiponectinemia in the third trimester. J clin Endocrinol Metab. 98(2): 643-562.

**Miller JW (2013).** Homocystien encyclopedia of human nutrition . (2): 424-430.

**Mills JL (1995).** Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural tube defects. The Lancet. 345(8943):149–151.

**Moghbeli M (2019).** Genetics of recurrent pregnancy loss among Iranian population. Mol Genet Genomic Med.

**Molloy, Anne M, et al., (2008).**Effects of folate and vitamin B12 deficiencies during pregnancy on fetal, infant, and child development.“ Food & Nutrition Bulletin . 1 :101-111.

- Moloy AM, Kirke PN, Brody LC, Scott JM, Mills jl (2008).** Effects of folate and vitamin B12 deficiencies during pregnancy on fetal, infant, and child development. *Food Nutr Bull*; 29 (2 ):S101-11.
- Monangi NK, Brockway HM, House M, Zhang G, Muglia LJ.(2015).** The genetics of preterm birth: Progress and promise. *Semin Perinatol* .39(8):574-83.
- Monika G, Agnieszka P(2002)** . Genetic basis of neural tube defects. *J. App Gennet* .(43): 511-524.
- Moreno-Garcia MA, Rosenblatt DS ,Jerome-Majewska LA( 2013).** Vitamin B12 metabolism during pregnancy and in embryonic mouse models. *Nutrients*.5(9) :3531–3550.
- Morgan S, Koren G, Bozzo P(2013).** Is caffeine consumption safe during pregnancy? *Can Fam Physician*.59(4):361-2.
- Morgon S, Koren G, Bozzo P(2013).**Is caffeine consumption safe during pregnancy? *Can Fam Physician* .59(4):361-2.
- Mouchabac S ( 2008)** Homocystéine, hyperhomocystéinémie et dépression.*Neuropsychiatrie. Tendances et Débats* .32: 9-18.
- Mudd SH, Levy HL( 1995 )** . The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7<sup>th</sup> ed.. New York .(1):1270-327.
- Mudd SH, Levy HL, Kraus JP: Disorders of transsulfuration, in Scriver CR, Beaudet A, Sly WS, et al (2001):** The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, vol 8. New York, , McGraw- Hill. p 2007-2056.
- Mulder E J, Robles De Medina P, Huizink A, Van Den Bergh B, Buitelaar J, Visser G (2002).** Prenatal maternal stress: Effects on pregnancy and the (unborn) child. *Early human development*.70 : 3-14.
- Müller A, Wagner J, Hodžić A, Maver A, Škrlec I, Heffer M, Zibar L, Peterlin B(2016)** .Genetic variation in leptin and leptin receptor genes is a risk factor for idiopathic recurrentspontaneous abortion. *Croat Med J* .57(6):566-571.
- Murry Y(1995).** Granner Précis de biochimie de Harper. Paris , France : De Boeck & Larcier.918 p.
- Nadir Y<sup>1</sup>, Hoffman R, Brenner B (2007).** Association of homocysteine, vitamin B12, folic acid, and MTHFR C677T in patients with a thrombotic event or recurrent fetal loss. *Ann Hematol*. 86(1):35-40.
- Namour F, Oliver J, Abdelmouttaleb Adjalla C, Debard R, Salvat C, Guent J (2001).**Transcobalamine codon 259 polymorphisme in HT-29 and Caco-2- cells and in caucasians: relation to transcobalamin and homocystéine concentration in boold . *Blood* (15).97(4) : 1092-8.

**Nancy ER, Deanna LP(1997).** Maternal Age and Birth Outcomes: Data from New Jersey. *Fam Plnn Perspect.* 29:268–72.

**Neiger R, Wise C, Contag SA , Tumber MB, Canick JA(1993).** First trimester bleeding and pregnancy outcome in gravidas with normal and low folate. *Am J Perinatol.* 10(6):460-2.

**Nelen WL, Blom HT, Steegers EA, et al.,(2000).** Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta analysis. *Fertil Steril.*74(6):1196-9.

**Nelen WL, Bulten J, Steegers EA, Blom HJ, Hanselaar AG, Eskes TK(2000).** Maternal homocysteine and chorionic vascularization in recurrent early pregnancy loss. *Hum Reprod.*15: 954-60.

**Nelen WL, Bulten J, Steegers EA, Blom HJ, Hanselaar AG, Eskes TK(2000).**Maternal homocysteine and chorionic vascularization in recurrent early pregnancy loss.*Hum Reprod.* 15: 954-60.

**Nelen WL<sup>1</sup>, Blom HJ, Steegers EA, den Heijer M, Thomas CM, Eskes TK (2000).**Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss. *Obstet Gynecol.* 95(4):519-24.

**Nelen WL<sup>1</sup>, Blom HJ, Thomas CM, Steegers EA, Boers GH, Esk (1998).** Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism affects the change in homocysteine and folate concentrations resulting from low dose folic acid supplementation in women with unexplained recurrent miscarriages. *J Nutr.* 128(8):1336-41.

**Nelen Wldm(2000).** Hyperhomocysteinaemia and human reproduction. *Clin Chem Lab Med.* 39: 758-63.

**Newburn-Cook CV, Onyskiw JE(2005).** Is older maternal age a risk factor for preterm birth and fetal growth restriction? A systematic review. *Health Care Women Int* .26(9):852-75.

**Nice F(2016).** Antenatal care for un complicated pregnancies. National institute for realth and Care Excellence, Clinical Guideline.CG62.Document réperé à <https://www.nice.org.uk/guidance/cg62/resources/antenatal-care-foruncomplicated-pregnancies-975564597445>.

**Nicolas JP, Guéant JL(1994).** Absorption, distribution et excréation de la vitamine B12. *Ann Gastroenterol Hepatol.*30:270-6.

**Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M(2000).** Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ* .320(7251):1708-12.

**Offenbacher S, Lief S, Boggess KA, Murtha AP, Madianos PN, Champagne CM, McKaig RG, Jared HL, Mauriello SM, Auten RL Jr, et al.,(2001).**Maternal periodontitis and prematurity. Part I: Obstetric outcome of prematurity and growth restriction.*Ann Periodontol* .6(1):164-74.

**Ogasawara M, Aoki K, Okada S et al.,( 2000).** Embryonic karyotype of abortuse in relation to the n umber of previous miscarriages. *Fertility and sterility.*73(2): 300-304.

**Oliver A,Overton C(2014).** Diagnosis and management of miscarriage. *The Practitioner.*258(1771) :25.

**Oltean S, Banerjee R(2004).** A B12-responsive internal ribosome entry site (IRES) element in human methionine synthase. *J Biol Chem.* 280:32662-32668.

**OMS Organisation Mondiale de la Santé (2013).** Centre des médias. Obésité et surpoids. Aide-mémoire N°311. Mars.

**OMS.** Les naissances prématurée. [Consulté le 23 novembre 2013]. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs363/fr/>.

**Onlan R, Onlan G, Gunenc Z, Karabulut E(2006).** Combining 2<sup>nd</sup>- trimester maternal serum homocysteine concentrations and uterine artery Doppler for prediction of preeclampsia and isolated intrauterine growth restriction. *Gynecol Obstet Invest.* 61: 142-8.

**Paul G, Sreyoshi FA( 2015).** Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease.*Nutrition Journal.*14:6.

**Pautas E, Chérin P, De Jaeger C, Godeau P(1999).** Carence en vitamine B12 chez le sujet âgé. *Presse Med .*28:1767-70.

**Petras M, Tatarkova Z, Kovalska M, Mokra D, Dobrota D, Lehotsky J, Drgova A(2014).** Hyperhomocysteinemia as a risk factor for the neuronal system disorders. *J Physiol Pharmacol.* 65(1):15-23.

**Porter TF, Scott JR(2005).** Evidence-based care of recurrent miscarriage. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 19(1):85-101.

**Poston L, Caleyachetty R, Cnattingius S, Corvalán C, Uauy R, Herring S, Gillman MW (2016)** Preconceptional and maternal obesity: epidemiology and health consequences. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 4(12):1025-1036.

**Prosper -Kakudji L , Olivier Mukuku, Prosper-Kalenga MK(2015).**Study of low birth weight associated with maternal age and parity in a population of mether and children monitored in lubumbash. 20: 246.

**Puri M, Kaur L, Walia GK, Mukhopadhyay R, Sachdeva MP, Trivedi SS, Ghosh PK, Saraswathy KN( 2013)** MTHFR C677T polymorphism, folate, vitamin B12 and homocysteine in recurrent pregnancy losses: a case control study among North Indian women. *J Perinat Med.*141(5):549-54.

**Puri M, Kaur L, Walia GK, Mukhopadhyay R, Sachdeva MP, Trivedi SS, Ghosh PK, Saraswathy KN (2013)** .MTHFR C677T polymorphism, folate, vitamin B12 and homocysteine in recurrent pregnancy losses: a case control study among North Indian women. *J Perinat Med.* 41(5):549-54.

**Puri M, Kaur L, Walia GK, Mukhopadhyay R, Sachdeva MP, Trivedi SS, Ghosh PK, Saraswathy KN (2013).**MTHFR C677T polymorphism, folate, vitamin B12 and homocysteine in recurrent pregnancy losses: a case control study among North Indian women. *J Perinat Med.*1;41(5):549-54.

**Qiu X , Gao F, Qiu Y, Bao J, Gu X, Long Y, Liu F, Cai M, Liu H (2018).**Association of maternal serum homocysteine concentration levels in late stage of pregnancy with preterm births: a nested case-control study. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 31(20):2673-2677.

**Quadros EV(2009).** Advances in the understanding of cobalamin assimilation and metabolism. *Br J Haematol.* 148:195-204.

**Quenby SM et Farquharson RG(1993).**Predicting recurring miscarriage : what is important? *Obstet Gynecol.* 82: 132-138.

**Quere I, Bellet H, Hoffet M, Janbon C, Mares P, Gris JC(1998).** A woman with five consecutive fetal deaths: case report and retrospective analysis of hyperhomocysteinemia prevalence in 100 consecutive women with recurrent miscarriages. *Fertil Steril.* 69: 152-4.

**Ravaglia G, Forti P ,Maioli F, Chiappelli M ,Montesi F, Bianchin M , Licastro, F,Patterson C(2006).** Apolipoprotein E e4 allele affects risk of hyperhomocysteinemia in the elderly.*J Clin. Nutr.* (84):1473–1480.

**Ray JG, Laskin CA(1999).** Folic acid and homocyst(e) ine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: A systematic review.*Placenta.*20 (7):519-29.

**Ray JG, Laskin CA(1999) .**Folic acid and homocyst(e)ine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: A systematic review. *Placenta .*20(7):519-29.

**Refsum H, Smith D, Ueland PM, Nexo E, Clarke R, McPartlin J, Johnston C, Engbaek F, Schneede J, McPartlin C, Scott JM(2004).** Facts and recommendations about total homocysteine determinations: An expert opinion. *Clinical Chemistry.*50: 3-32.

**Refsum H, Ueland MD, Vollset(1998).** Homocystiene and cardiovasculaire disease *Medicine .* (49):31.62.

**Regan ( 2001).** Parameters of grieving in spontaneous abortion. *International Journal of Psychiatry in Medicine;* 29 (2) : 235-249.

**Regan L, Braude PR, Trembath PL(1989).**Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. *BMJ.*299: 541-545.

**Ren A, Wang J ( 2006).**Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and the risk of unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril.* 86(6):1716-22.

**Richter M, Boeing H, Grünewald-Funk D, Heseker H, Kroke A, Leschik-Bonnet E, Oberitter H, Strohm D, Watzl B (2016).** The German Nutrition Society (DGE). Vegan Diet Position of the German Nutrition Society (DGE).4: 92–102.

**Roblin X , Pofleski J, ZarskiJP (2007).** Role de l'homocystiene au cours de la stéatose hépatique et de l'hépatite chronique C .Gastroenterol clin Biol .31 :414 – 420.

**Rochebrochard E, Thonneau P(2002).** Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study. Hum Reprod .17:1649-56.

**Ronnenberg AG, Goldman MB, Chen D, Aitken IW, Willett WC, Selhub J,Xu X (2002).**Preconception folate and vitamin B(6) status and clinical spontaneous abortion in Chinese women.Obstet Gynecol.100(1):107-13.

**Rosenblatt DS, Whitehead VM (1999).** Cobalamin and folate deficiency: acquired and hereditary disorders in children. Semin Hematol. 36(1):19-34.

**Rosenquist TH, Ratashak SA, Selhub J(1995).** Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid. Proc Natl Acad Sci USA.93: 1527-32.

**Rosenquist TH, Ratashak SA, Selhub J(1995).** Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid. Proc Natl Acad Sci USA .93: 1527-32

**Roth JR, Lawrence JG, Bobik TA(1996).** Cobalamin (coenzyme B12): synthesis and biological significance. Annu Rev Microbiol.50:137-181.

**Rufenacht P, Mach-Pascual S, Iten A(2008).** Hypovitaminose B12: challenge diagnostique et thérapeutique. Rev Med Suisse.4:2212-7.

**Saboori S, Noormohammadi Z, Zare-Karizi S(2016).** Genetic variation in vascular endothelial growth factor gene and its association with recurrentspontaneous abortion. Bratisl Lek Listy ;117(2):80-6.

**Saccone G, Berghella V(2016).** Folic acid supplementation in pregnancy to prevent preterm birth: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Eur J Obstet Gynecol Rebrod Biol. 199:76-81.

**Salle B, Sureau C (2006).** Le Prématuré de moins de 28 semaines, sa réanimation et son avenir. Revue Bulletin Acad. Natle Méd.6(190) : 1261-1274.

**Sami AS, Suat E, Alkis I, Karakus Y, Guler S(2019).**The role of trace element, mineral, vitamin and total antioxidant status in women with habitual abortion.J Matern Fetal Neonatal Med. 7:1-8.

**Samin A, Wafa A( 2006).** Risk factor or preterm birth in raq a case conrtal study.BMC pregnancy child birth. (13):6.

**San L, Campillo I, Meaney S, Sheehan J, Rice R, Donoghue K (2018).** University students' awareness of causes and risk factors of miscarriage: a cross-sectional study. *BMC Womens Health*.18(1):188.

**Sanson BJ, Friederich PW, Simioni P , et al., (1996).**The risk of abortion and stillbirth in antithrombin-, protein C-, and protein S-deficient women. *Thromb Haemost* .75 : 387-388.

**Sathy-Palant T, Mellor D, Atkin SL(2010).** Obesity and gestational diabetes. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 15: 89–93.

**Sauer MV (2015).**Reproduction at an advanced maternal age and maternal health. *Fertil Steril* .103(5):1136-43.

**Saurel-Cubizolles M , Zeitlin J, Lelong N(2004).** Employment, working conditions, and preterm birth: results from the Europop case-control survey. *J Epidemiol Community Health* . 5 (58): 395–401.

**Savitz DA, Chan RL, Herring AH, Howards PP, Hartmann KE(2008).**Caffeine and miscarriage risk. *Epidemiology*.19(1):55-62.

**Schimmel MS, Bromiker R, Hammerman C, Chertman L, Ioscovich A, Granovsky-Grisaru S, Samueloff A, Elstein D (2015).**The effects of maternal age and parity on maternal and neonatal outcome. *Arch Gynecol Obstet* .291(4):793-8.

**Schlienger JL(2003).** Homocystéine et consommation d'alcool une relation ambiguë et un nouveau paradoxe. *Presse Med*. 32: 262-7.

**Schlienger JL(2011).** Etat des lieux des compléments alimentaires chez la femme enceinte. - *Médecine des maladies métaboliques*.(5) : 523-525.

**Scott JM, Weir DG(1994).** Folate/vitamin B12 interrelationships. *Essays in Biochemistry*. 28: 63–72.

**Searcy RL(1969).** Diagnostic biochemistry. New York. p223-228.

**Sebastiani G, Herranz Barbero A, Borrás-Novell C, Alsina-Casanova M, Aldecoa-Bilbao V, Andreu-Fernandez V, Pascual-Tutusaus M, Ferrero-Martinez S, Gomez-Roig MD, Garcia-Alger O(2019).** The Effects of Vegetarian and Vegan Diet during Pregnancy on the Health of Mothers and Offspring. *Nutrients*. 6;11(3).

**Séjourné N, Callahan S, Chabrol H. Avortement spontané et culpabilité : une étude qualitative(2011).** *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*. 40(5): 430-436.

**Selhub J(1999).** Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr*.19:217-46.

**Sengpiel V, Bacelis J, Myhre R, Myking S, Pay AD, Haugen M, Brantsæter AL, Meltzer HM, Nilsen RM, Magnus P, Vollset SE, Nilsson S, Jacobsson B (2013).** Folic acid supplementation, dietary folate intake during pregnancy and risk for

spontaneous preterm delivery: a prospective observational cohort study. *BMC Pregnancy Childbirth*. 12;13:160.

**Sennaoui Khalid. (2014/2015).** Fausses-couches spontanées. Algérie, Tlemcen :université Aboubakr Belkaid.

**Serapinas D, Boreikaite E, Bartkeviciute A, Bandzeviciene R, Silkunas M, Bartkeviciene D (2017).** The importance of folate, vitamins B6 and B12 for the lowering of homocysteine concentrations for patients with recurrent pregnancy loss and MTHFR mutations. *Reprod Toxicol*.72:159-163.

**Serapinas D, Boreikaite E, Bartkeviciute A, Bandzeviciene R, Silkunas M, Bartkeviciene D (2017).**The importance of folate, vitamins B6 and B12 for the lowering of homocysteine concentrations for patients with recurrent pregnancy loss and MTHF5R mutations.*Reprod Toxicol*. 72:159-163.

**Serraj K, Mecili M, Andrès E(2010).** Signes et symptômes de la carence en vitamine B12: revue critique de la littérature. *Med Thérap*. 16:13-20.

**Serraj K. Mecili M. Andrès E(2010).** Signes et symptômes de la carence en vitamine B12 : revue critique de la littérature. (16) : 13-20.

**Shah PS(2010).** Parity and low birth weight and preterm birth: a systematic review and meta-analyses. *Acta obstetrician et gynecologica Scandinavica*. 89(7):862–875.

**Shane B(1989).** Folypolyglutamate synthesis and role in the regulation of one carbon metabolism. *Vitamins and Hormones*. 45: 263-335.

**Shane B, Stokstad ELR (1984).** Folates in the synthesis and catabolism of histidine. In: Blakley RL, Benkovic SJ, Eds. *Folates and Pterins*, Vol 1. New York: Wiley & Sons. 433–456.

**Shankar H, Kumar N, Sandhir R, Singh MP, Mittal S, Adhikari T, Tarique M, Kaur P, Radhika MS, Kumar A, Rao DN(2019).** Association of dietary intake below recommendations and micronutrient deficiencies during pregnancy and low birthweight. *J Perinat Med*.

**Sikora J, Magnucki J, Zietek J, Kobielska L, Partyka R, Kokocinska D et al.,(2007).**Homocysteine, folic acid and vitamin B12 concentration in patients with recurrent miscarriages. *Neuroendocrinol Lett*.28: 507-12.

**Sikora J<sup>1</sup>, Magnucki J, Zietek J, Kobielska L, Partyka R, Kokocinska D, Bialas A(2007).**Homocysteine, folic acid and vitamin B12 concentration in patients with recurrent miscarriages. *Neuro Endocrinol Lett*. 28(4):507-12.

**Simpson JL, Bailey LB, Pietrzik K, Shan B, Halzgreve W(2010).** Micronutrients and women of reproductive potential: required dietary intake and consequences of dietary deficiency or excess. Part I--Folate, Vitamin B12, Vitamin B6. *J Matern Fetal Neonatal Med* .23(12):1323-43.

**Skovby F, Gaustadnes M(2010).**A revisit to the natural history of homocystinuria due to cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency. *Am j Hum Gentet.*37:1-31.

**Smulders YM , Stehouwer DA(2005).** Folate metabolism and cardiovascular disease. *Semin Vasc Med.* 5(2): 87-97.

**Sobczyńska-Malefora A, Ramachandran R, Cregeen D, Green E, Bennett P, Harrington DJ, Lemonde HA.( 2017).**An infant and mother with severe B<sub>12</sub> deficiency: vitamin B<sub>12</sub> status assessment should be determined in pregnant women with anaemia. *Eur J Clin Nutr.* 71(8):1013-1015.

**Societe des Obstetriciens et Gynecologues du Canada(2010).**Partir du bon pied. Mississauga,éditions Wiley. 235 p .

Sonne SR, Bhalla VK, Barman SA, Whithe RE, Zhu S , **Newman TM, Prasad PD, Smith SB, Offermanns S, Ganapathy V(2013).** Hyperhomocysteinemia is detrimental to pregnancy in mice and associated with preterm birth.*Biochim Biophys Acta.* 1832(8):1149-58.

**Srisupandit S, Pootrakul P, Areekul S, Neugton S, Mokkaes J, Kiriwat O, Kanokpongskudi S(1983).**A prophylactic supplementation of iron and folate in pregnancy.*Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 14(3):317-23.

**Stalder M , Lovy P , Dayer E(2007).** Homocystéine et maladie thromboembolique. *Institut central des Hôpitaux valaisns.* 9(3).

**Stanger O(2002).** Physiology of folic acid in health and disease. *Curr Drug Metabol.*3: 211-223.

**Stegers-theunissen RP, Van iersel CA, Peer PG, Nelen WL, Steegers EA(2004).** Hyperhomocysteinemia, pregnancy complications, and the timing of investigation. *Obstet Gynecol.* 104: 336-43.

**Stein-Emil et al., (2000).** Coffee and homocysteine. *Am J Clin Nutr.*71:403-4.

**Stipanuk MH( 2004).** Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu Rev Nutr.*(24):539-77.

**Stipanuk MH, Ueki I(2011).** Dealing with methionine/homocysteine sulfur: cysteine metabolism to taurine and inorganic sulfur. *J Inherit Metab Dis.*34(1):17-32.

**Stirtzinger RM, Robinson GE, Stewart DE et al.,(1999).** Parameters of grieving in spontaneous abortion. *The International Journal of Psychiatry in Medicine.* 29(2): 235-249.

**Stover B (2008).** Folate and vitamin B12 deficiencies. *Proceedings of a WHO technical consultation held in Geneva, Switzerland.* Food and nutrition bulletin.29

**Straub H, Qadir S, Miller G, Borders A(2014) .**Stress and stress reduction. *Clin Obstet Gynecol .*57(3):579-606.

Study of low birth weight associated with maternal age and parity in a population of mother and children monitored in Lubumbashi

**Sunden SL, Renduchintala MS, Park EL, Miklazez SO, Garrow TA (1997).** Betaine homocystiene méthyltransferase exprzssion in porine and human tissues and chromosomal localization of the human gene .Arch Biochem Biophys.1;345(1):171-4.

**Sütterlin M, Bussen S, Ruppert D, Steck T. Sutterlin et al ., (1997).** Serum levels of folate and cobalamin in women with recurrent spontaneous abortion. Abstrait. Hum Reprod .12(10):2292-6.

**Swaggart KA, Pavlicev M, Muglia LJ (2015).** Genomics of preterm birth. Cold Spring Harb Perspect Med .5(2).

**Swanson KM, Karmali ZA, Powell SH et al.,(2003).** Miscarriage effects on couples' interpersonal and sexual relationships during the first year after loss: women's perceptions. Psychosomatic Medicine. 65(5): 902-910.

**Tanvig M (2014).** Offspring body size and metabolic profile - effects of lifestyle intervention in obese pregnant women. Dan Med J.61(7):B4893.

**Tekesin LH, Eberhart J, Schaefer V(2005)** .Evaluation and validation of a new risk score (CLEOPATRA score) to predict the probability of premature delivery for patients with threatened preterm labor. Ultrasound Obstet Gynecol .7(26): 699–706.

**Thakkar K, Billa G( 2015).** Treatment of vitamin B12 deficiency Methylcobalamine, Cyancobalamine, Hydroxocobalamin clearing the confusion. Eur J Clin Nutr, 69(1):1–2.

**Tiwari D, Das CR , Bose PD, Bose S(2017).** Associative role of TYMS6bpdel polymorphism and resulting hyperhomocysteinemia in the pathogenesis of preterm delivery and associated complications: A study from Northeast India. Gene. 5(627):129-136.

**Tollånes MC, Strandberg-Larsen K, Eichelberger KY, Moster D, Lie RT, Brantsæter AL, Meltzer HM, Stoltenberg C, Wilcox AJ (2016).** Intake of Caffeinated Soft Drinks before and during Pregnancy, but Not Total Caffeine Intake, Is Associated with Increased Cerebral Palsy Risk in the Norwegian Mother and Child Cohort Study. J Nutr.146(9):1701-6.

**Torchin H, Ancel PY(2016).** Epidemiology and risk factors of preterm birth. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) .45(10):1213-1230.

**Trabetti E(2008).** Homocysteine, MTHFR gene polymorphisms, and cardiocerebrovascular risk . J App Genet .49:267-82.

**Tu N, King JC, Dirren H, Thu HN, Ngoc QP, Diep AN (2014).** Effect of animal- source food supplement prior to and during pregnancy on birthweight and prematurity in rural Vietnam: a brief study description. Food Nitr Bull. 35(4 ):S205-8.

**Ueland PM, Refsum H, Schneede J(2000).** Clinical Pharmacology Unit Central Laboratory Haukeland Hospital, University of Bergen, Bergen, Norway. Determinants of plasma homocysteine. *Developments in Cardiovascular Medicine*.230: 59-84.

**Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH(1993).** Total homocysteine in plasma or serum. *Clin Chem*.(39):1764-79.

**Van Beynum IM, den Heijer M, Thomas CM, Afman L, Oppenraay-van Emmerzaal D, Blom HJ(2005).** Total homocysteine and its predictors in Dutch children. *Am J Clin Nutr*. 81: 1110-6.

**Vanaerts L, Blom HJ, Beabreu RA, Trijbels FMJ, Eskes TKAB, Copius Peereboom-Stegeman JHJ, et al.,(1994).** Prevention of neural tube defects and toxicity of L-homocysteine in cultured postimplantation rat embryos. *Teratology* . 50: 348-60.

**Vanaerts LA, Blom HJ, Deabreu RA, Trijbels FJ, Eskes TK, Copius JH , et al .,(1994).** Prevention of neural tube defects by and toxicity of L homocysteine in cultured post- implantation rat embryos. *Teratology*. 50: 348-60.

**Vasudha S, Ajit P, Shweta P(2013).** The role of Serum Vitamin B12 and Homocysteine in Recurrent Pregnancy Loss. *International Journal of Science and Research(IJSR)*.4: 1980-1983.

**Verhoef P, de Groot LC(2005).** Dietary determinants of plasma homocysteine concentrations. *Semin Vasc Med*.5:110-23.

**Vinturache A, Moledina N, McDonald S, Slater D, Tough S(2014).** Pre-pregnancy Body Mass Index (BMI) and delivery outcomes in a Canadian population. *BMC Pregnancy Childbirth*.14: 422.

**Voutilainen S, Rissanen TH, Virtanene J, Lakka T, Salonen JT(2001).** Low dietary folate intake is associated with an excess incidence of acute coronary events. The Kuopio ischemic disease risk factor study. *Circulation* . 103 .

**Wallace JM, et al., (2008).** Homocysteine concentration, related B vitamins, and betaine in pregnant women recruited to the Seychelles Child Development . *Am. J Clin Nutr*. 87 (2): 391–397.

**Wang G, Sun Q, Liang L, Clash C, Zhang C, Hong X, Ji Y, Radovick S, Pearson C, Bartell TR, Zuckerman B, Cheng TL, Hu FB, Wang X(2019).** Inter-generational link of obesity in term and preterm births: role of maternal plasma acylcarnitines. *Int J Obes* .

**Wang X, Lin Q, Ma Z, Hong Y, Zhao A, Di W, Lu P (2005).** Association of the A/G polymorphism at position 49 in exon 1 of CTLA-4 with the susceptibility to unexplained recurrent spontaneous abortion in the Chinese population. *Am J Reprod Immunol*;53(2):100-5.

**Wang YX, Mao BH, Li J, Li YM, Dai ZR, Zhang CH, Chen LN, Liu Q(2018).** Effect of occupational stress on recurrent spontaneous abortion in women of childbearing age. Chinese from the publisher. 36(11):840-843.

- Welch GN, Loscalzo J(1998).** Mechanisms of disease: homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* . 338: 1042–50.
- Wen SW, Smith G, Yang Q, Walker M(2004).** Epidemiology of preterm birth and neonatal outcome. *Semin Fetal Neonatal Med.*9(6):429-35.
- Williams K, Schalinske K( 2007).** New insights into the regulation of methyl group and homocysteine metabolism. *J. Nutr.*( 137):311-314.
- Wolters M, Strohle A, Hahn A(2004).** Cobalamin: a critical vitamin in the elderly. *Prev Med.*39:1256-66.
- Worthington-White DA, Behnke M, Gross S (1994).** Premature infants require additional folate and vitamin B12 to reduce the severity of the anemia of prematurity.*Am J Clin Nut.*60(6):930-5.
- Wouters MG, Boers GH, Blom HJ, Trijbels FJ, Thomas CM, Borm GF et al.,(1993).** Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. *Fertil Steril.* 60: 820-5.
- Wouters MG, Boers GH, Blom HJ, Trijbels FJ, Thomas CM, Borm GF, et al(1993).** Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexpected recurrent early pregnancy loss. *Fertil Steril* .60: 820-5.
- Xu Z, Zhang Y, Liu W, Liu Y, Su Y, Xing Q, He X, Wei Z, Cao Y, Xiang H(2018).** Polymorphisms of F2, PROC, PROZ, and F13A1 Genes are Associated With Recurrent Spontaneous Abortion in Chinese Han Women. *Clin Appl Thromb Hemost* ;24(6):894-900.
- Yamada T, Morikawa M, Yamada T, kishi R, Sengoku K, Endo T, Saito T, Cho K, Minakami H(2013).** First-trimester serum folate levels and subsequent risk of abortion and preterm birth among Japanese women with singleton pregnancies. *Rch Gynecol Obstet.* 287(1):9-14.
- Yan J, Saravelos SH, Ma N, Ma C, Chen ZJ, Li TC(2012).** Consecutive repeat miscarriages are likely to occur in the same gestational period. *Reprod Biomed Online* .24(6): 634–8.
- Yang J, Chen MJ, Wang XX, Sun X, Wang X, Wang XR, Xia YK(2018).** Association between maternal tea consumption in pregnancy and birth outcomes. *Article in Chinese.* 52(10):1013-1017.
- Zetterberg H et al., (2004).** Methylene tetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. *Reprod Biol Endocrinol.*
- Zhang Q, Wang Y, Xin X, Zhang Y, Liu D, Peng Z, He Y, Xu J, Ma X(2017).** Effect of folic acid supplementation on preterm delivery and small for gestational age births: A systematic review and meta-analysis. *Reprod Toxicol.*67:35-41.

**Zhu A, Song J, Mar MH, Edwards LJ, Zeisel SH(2003).** Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) knockout mice have hepatic steatosis and abnormal hepatic choline metabolite concentrations despite ingesting a recommended dietary intake of choline. *Biochem J.* 15(370):987-93.

**Zhu L(2015).** Polymorphisms in the methylene tetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase genes and their correlation with unexplained recurrent spontaneous abortion susceptibility. *Genet Mol Res.*14(3):8500-8.

**Zittoun J( 1998).** Homocystéine et pathologie vasculaire. *Revue Hématologie.* 4: 7-16.

**Zittoun J(2000).** Découverte de la vitamine B12. *Rev Prat.*50:473-5.

**Zittoun J, Najman A, Verdy E, Proton G, Isnard-Grivaux F(1994).** Folates et cobalamines eds. *Hématologie: Précis des maladies du sang . Tom I.* Paris: Marketing. p 79-87.

**Zsigrai S, Kalmar A, Valcz G, Szigeti KA, Bartak BK, Nagy ZB, Igaz P, Tulassay Z, Molnar B(2019).** Physiological and pathophysiological significance of vitamin B<sub>9</sub>. Summary on the occasion of the 30-year introduction of folic acid as a dietary supplement. *Orv Hetil.*160(28):1087-1096.

# **Annexe**

---

## Questionnaire

Informations personnels

-Nom et prénom:

-Age :

-Poids :

-taille :

-Situation familiale : mariée / divorcée / veuve

-Niveau d'étude : primaire / Moyen / secondaire / universitaire / aucun

-Adresse / téléphone :

-Origine ethnique :

-Nombre de grossesses :

-Nombre d'avortements :

-cause :

-A quelle semaine l'avortement a lieu :

└─> Semaine de l'avortement 1 :

└─> Semaine de l'avortement 2 :

└─> Semaine de l'avortement 3 :

-Intervalle entre les avortements :

-Intervalle avec la dernière grossesse :

-Antécédents familiaux des avortements :

-Antécédents personnels d'autres complications de grossesse :

Non	Oui	Type

-Antécédents familiaux d'autres complications de grossesse :

Non	Oui	Type

Informations sur les habitudes de vie

	Oui	Non
Tabagisme	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Alcoolisme	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Drogue	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pilule	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Utilisation des suppléments vitaminiques :**

Période	Oui/Non	avant la grossesse	Pendant la grossesse			Dose de la prise
			1ère trimestre	2ème trimestre	3ème trimestre (cas de prématurité)	
Vitamines						
Multi vitamines (gestarelle)						
Acide folique (B9) (Zanitra)						

## Maladies

Maladies	Oui	Non	Si oui				Prise de médicaments/type
			Avant la grossesse	1 <sup>er</sup> trimestre	2 <sup>ème</sup> trimestre	3 <sup>ème</sup> trimestre (en cas de prématurité)	
Anémie							
Maladies infectieuse							
Diabète							
Malformation utérine							
Maladies thyroïdiennes							
Thrombose veineuse							
HTA							

## Habitudes alimentaires

	Oui	Non	Si oui			
			Avant la grossesse	1 <sup>er</sup> trimestre	2 <sup>ème</sup> trimestre	3 <sup>ème</sup> trimestre (cas de prématurité)
Dattes			/j	/j	/j	
Thé			Tasse/j	Tasse/j	Tasse/j	
Café			Tasse/j	Tasse/j	Tasse/j	
Plants médicinales						
Fenugrec						
Romarin						
Armoise						
Gingembre						
Autres						

Stresse	oui	Non	Si oui			mois
			Avant la Grossesse	1 <sup>er</sup> trimestre	2 <sup>ème</sup> trimestre	
-décès d'un des parents						
-décès d'un membre de la famille						
-décès d'un proche						
- problèmes avec les enfants						
-problèmes avec la famille						
- problèmes avec le mari						
-Problèmes avec les voisins						
-Problèmes de travail						
-des enfants malades						
-accident						
-divorce ou séparation parentale						
Autres						

# Résumés

### Résumé

Plusieurs facteurs de risque peuvent perturber le déroulement de la grossesse, causant ainsi différentes situations défavorables, comme les avortements spontanés (AS), les avortements spontanés à répétition (ASR) et les accouchements prématurés (AP).

Notre travail de recherche a pour objectifs :

-L'étude de quelques facteurs de risque physiologique et nutritionnels pouvant influencer le statut biochimique maternel, et avoir un rôle dans la survenue des AS, ASR et AP dans notre population.

-L'étude du métabolisme des folates et de l'homocystéine afin de voir sa contribution dans l'étiologie des avortements et de la prématurité dans notre population. Pour ce faire nous avons dosé les taux des vitamines B9, B12 et homocystéine, et rechercher la mutation A2756G du gène codant la méthionine synthase, enzyme clé du métabolisme de l'homocystéine.

L'étude a été menée sur 62 femmes, subdivisées en trois populations. Une population comportant 33 femmes ayant fait un avortement (AS ou ASR), une autre comportant 10 femmes qui ont accouché avant terme, et une population témoins comportant 19 femmes. Le dosage des taux des paramètres biochimiques a été réalisé par chimiluminescence et la recherche de la mutation a été effectuée par la technique PCR/RFLP.

Nous n'avons pas trouvé un risque significatif liée à la consommation des dattes du café et du thé et ces complications. Cependant l'âge, le surpoids et le niveau de stress ont significativement influencé la survenue des avortements.

Par ailleurs, nous avons observé l'existence d'une perturbation métabolique chez les femmes faisant des AS, marquée par un taux de folate significativement faible et un taux d'Hcy élevé par rapport à ceux des témoins. De plus, une fréquence plus élevée de la mutation A2756G du gène MS chez les mères à ASR par rapport aux témoins a été observée.

L'élévation du taux de l'Hcy a été également notée chez les mères qui ont accouché avant terme, cependant leur taux des folate et de la vitamine B12 ne diffère pas de ceux des témoins.

Pour conclure, les femmes de notre population doivent être sensibilisées de la nécessité d'une supplémentation vitaminique avant et pendant la grossesse, Elle permet d'améliorer le statut vitaminique, d'abaisser le taux de l'Hcy et même de compenser l'effet de certaines mutations génétiques.

**Mots clés :** facteurs de risque, vitamine B9, vitamine B12, hyperhomocystéinémie, mutation, Avortements spontanés, Avortements spontanés à répétition, prématuré

**Abstract**

Several risk factors can disrupt the course of pregnancy causing various adverse situations, such as spontaneous abortions (SA), repeated spontaneous abortions (RSA) and premature births (PBAs).

Our research work aims to:

-The study of some physiological and nutritional risk factors that can influence the maternal biochemical status, and have an effect on the occurrence of SA, RSA and PBAs in our population.

-The study of the metabolism of folate and homocysteine to investigate its contribution to the etiology of abortions and prematurity in our population. To do this we measured the levels of vitamins B9, B12 and homocysteine. We also researched the A2756G mutation of the gene coding for methionine synthase, the key enzyme of homocysteine metabolism.

The study was conducted on 62 women, subdivided into three populations. A population of 33 women who had an abortion (AS or ASR), another with 10 women who gave birth before term, and a control population of 19 women. The determination of the biochemical parameter levels was performed by chemiluminescence and the search for the mutation was carried out by the PCR / RFLP technique.

Results indicated that there was no significant risk related to the consumption of dates, coffee nor tea regarding these complications. However, the age, the overweight and the stress level significantly influenced the occurrence of abortions.

In addition, we observed the existence of a metabolic disturbance in women with AS, marked by a significantly low folate level and a high Hcy level compared to controls. In addition, a higher frequency of the A2756G mutation of the MS gene in ASR mothers compared to controls was observed.

The elevation of Hcy was also noted in mothers who gave birth before term. However, their folate and vitamin B12 levels did not differ from those of controls.

To conclude, women in our population need to be aware of the need for vitamin supplementation before and during pregnancy, it helps to improve vitamin status, to lower the rate of Hcy and even compensate the effect of certain genetic mutations.

**Key words:** risk factors, vitamin B9, vitamin B12, hyperhomocysteinemia, mutation, spontaneous abortions, repeated spontaneous abortions, prematurity.

### ملخص

هناك العديد من عوامل الخطر التي يمكنها ان تتسبب في تعطيل سير الحمل و الى حدوث العديد من المواقف الضارة مثل: الاجهاض التلقائي (AS) والاجهاض التلقائي المتكرر (ASR) والولادة المبكرة (AP) بهدف بحثنا الى :

- دراسة بعض عوامل الخطر الفيزيولوجية والمتعلقة بالتغذية التي يمكن ان تؤثر على الوضع الكيميائي الحيوي للام وبالتالي قد تلعب دور في حدوث AS , ASR , AP في مجتمعنا.
- دراسة استقلاب حمض الفوليك والهوموستتين لمعرفة مساهمتهم في حدوث الاجهاض والولادة المبكرة . للقيام بذلك قمنا بقياس مستويات الفيتامينات ل Hcy, B9, B12 والبحث عن طفرة A2656G في الترميز الجيني للمثيونين سنناز الانزيم الرئيسي لاستقلاب الهوموستتين.

وقد اجريت الدراسة على 62 امراة تنقسم الى ثلاث مجموعات مجموعة تحتوي على 33 امراة خضعن للاجهاض (AS او ASR) واخرى تتكون من 10 نساء ولدن قبل الاوان و مجموعة اخيرة شاهدة تحتوي على 19 نساء.تم معرفة تركيز المعلمات البيوكيميائية بواسطة التالى الكيميائي وتم البحث عن طفرة بواسطة تقنية PCR/RFLP

لم نجد خطورة كبيرة تتعلق باستهلاك الشاي والقهوة وحدثت هذه مضعفات في حين اثر العمر والوزن الزائد ومستوى التوتر بشكل كبير على الاجهاض

بالاضافة الى ذلك لاحظنا وجود اضطراب ايصي لدى النساء المصابات ب AS و متمثل في انخفاض مستوى حمض فوليك بشكل ملحوظ وارتفاع مستوى Hcy مقارنة بالشواهد بالاضافة الى ذلك لوحظ ارتفاع وتير طفرة A2656G في جين MS في الامهات ASR بمقارنة بالشاهد

لوحظ ارتفاع Hcy ايضا في امهات اللاتي وضعن قبل ولادة لكن مستويات الفوليك والفيتامين ب12 لم تختلف عن تلك الموجودة لدى الشاهد

في الختام يجب ان تدرك النساء في بيئتنا الحاجة الى مكملات الفيتامينات قبل واثناء الحمل فهي تساعد على تحسين حالة الفيتامينات وتخفيض معدل Hcy

**الكلمات المفتاحية:** عوامل الخطر, فيتامين ب9, فيتامين ب12, فرط الهوموستتين في دم, الطفرة, الاجهاض التلقائي, الاجهاض التلقائي المتكرر, الولادة المبكرة

## Résumé

Plusieurs facteurs de risque peuvent perturber le déroulement de la grossesse, causant ainsi différentes situations défavorables, comme les avortements spontanés (AS), les avortements spontanés à répétition (ASR) et les accouchements prématurés (AP).

Notre travail de recherche a pour objectifs :

-L'étude de quelques facteurs de risque physiologique et nutritionnels pouvant influencer le statut biochimique maternel, et avoir un rôle dans la survenue des AS, ASR et AP dans notre population.

-L'étude du métabolisme des folates et de l'homocystéine afin de voir sa contribution dans l'étiologie des avortements et de la prématurité dans notre population. Pour ce faire nous avons dosé les taux des vitamines B9, B12 et homocystéine, et rechercher la mutation A2756G du gène codant la méthionine synthase, enzyme clé du métabolisme de l'homocystéine.

L'étude a été menée sur 62 femmes, subdivisées en trois populations. Une population comportant 33 femmes ayant fait un avortement (AS ou ASR), une autre comportant 10 femmes qui ont accouché avant terme, et une population témoins comportant 19 femmes. Le dosage des taux des paramètres biochimiques a été réalisé par chimiluminescence et la recherche de la mutation a été effectuée par la technique PCR/RFLP.

Nous n'avons pas trouvé un risque significatif liée à la consommation des dattes du café et du thé et ces complications. Cependant l'âge, le surpoids et le niveau de stress ont significativement influencé la survenue des avortements.

Par ailleurs, nous avons observé l'existence d'une perturbation métabolique chez les femmes faisant des AS, marquée par un taux de folate significativement faible et un taux d'Hcy élevé par rapport à ceux des témoins. De plus, une fréquence plus élevée de la mutation A2756G du gène MS chez les mères à ASR par rapport aux témoins a été observée.

L'élévation du taux de l'Hcy a été également notée chez les mères qui ont accouché avant terme, cependant leur taux des folate et de la vitamine B12 ne diffère pas de ceux des témoins.

Pour conclure, les femmes de notre population doivent être sensibilisées de la nécessité d'une supplémentation vitaminique avant et pendant la grossesse, Elle permet d'améliorer le statut vitaminique, d'abaisser le taux de l'Hcy et même de compenser l'effet de certaines mutations génétiques .

**Mots clés :** facteurs de risque, vitamine B9, vitamine B12, hyperhomocystéinémie, mutation, Avortements spontanés, Avortements spontanés à répétition, prématurité

## Abstract

Several risk factors can disrupt the course of pregnancy causing various adverse situations, such as spontaneous abortions (SA), repeated spontaneous abortions (RSA) and premature births (PBAs).

Our research work aims to:

-The study of some physiological and nutritional risk factors that can influence the maternal biochemical status, and have an effect on the occurrence of SA, RSA and PBAs in our population.

-The study of the metabolism of folate and homocysteine to investigate its contribution to the etiology of abortions and prematurity in our population. To do this we measured the levels of vitamins B9, B12 and homocysteine. We also researched the A2756G mutation of the gene coding for methionine synthase, the key enzyme of homocysteine metabolism.

The study was conducted on 62 women, subdivided into three populations. A population of 33 women who had an abortion (AS or ASR), another with 10 women who gave birth before term, and a control population of 19 women. The determination of the biochemical parameter levels was performed by chemiluminescence and the search for the mutation was carried out by the PCR / RFLP technique.

Results indicated that there was no significant risk related to the consumption of dates, coffee nor tea regarding these complications. However, the age, the overweight and the stress level significantly influenced the occurrence of abortions.

In addition, we observed the existence of a metabolic disturbance in women with AS, marked by a significantly low folate level and a high Hcy level compared to controls. In addition, a higher frequency of the A2756G mutation of the MS gene in ASR mothers compared to controls was observed.

The elevation of Hcy was also noted in mothers who gave birth before term. However, their folate and vitamin B12 levels did not differ from those of controls.

To conclude, women in our population need to be aware of the need for vitamin supplementation before and during pregnancy, it helps to improve vitamin status, to lower the rate of Hcy and even compensate the effect of certain genetic mutations.

**Key words:** risk factors, vitamin B9, vitamin B12, hyperhomocysteinemia, mutation, spontaneous abortions, repeated spontaneous abortions, prematurity.

## ملخص

هناك العديد من عوامل الخطر التي يمكنها ان تتسبب في تعطيل سير الحمل و الى حدوث العديد من المواقف الضارة مثل: الاجهاض التلقائي (AS) والاجهاض التلقائي المتكرر (ASR) والولادة المبكرة (AP) يهدف بحثنا الى :

- دراسة بعض عوامل الخطر الفيزيولوجية والمتعلقة بالتغذية التي يمكن ان تؤثر على الوضع الكيميائي الحيوي للام وبالتالي تلعب دور في حدوث AS , ASR , AP في مجتمعنا.

- دراسة استقلاب حمض الفوليك والهوموسستين لمعرفة مساهمتهم في حدوث الاجهاض والولادة المبكرة . للقيام بذلك قمنا بقياس مستويات الفيتامينات ل B9,B12,Hcy,والبحت عن طفرة A2656G في الترميز الجيني للمثيونين سنتاز الانزيم الرئيسي لاستقلاب الهوموسستين.

وقد اجرينا الدراسة على 62 امراة تنقسم الى ثلاث مجموعات تحتوي على 33امراة خضعن للاجهاض (AS او ASR) واخرى تتكون من 10 نساء ولدن قبل الاوان ومجموعة اخيرة شاهدة تحتوي على 19 نساء.تم معرفة تركيز المعلمات البيوكيميائية بواسطة التالى الكيميائي وتم البحت عن طفرة بواسطة تقنية PCR/RFLP

لم نجد خطورة كبيرة تتعلق باستهلاك الشاي والقهوة وحدثت هذه مضعفات في حين اثر العمر والوزن الزائد ومستوى التوتر بشكل كبير على الاجهاض بالاضافة الى ذلك لاحظنا وجود اضطراب ابضى لدى النساء المصابات ب AS وتمثلت في انخفاض مستوى حمض فوليك بشكل ملحوظ وارتفاع مستوى Hcy مقارنة بالشواهد بالاضافة الى ذلك لوحظ ارتفاع ونير طفرة A2656G في جين MS في الامهات ASR بمقارنة بالشاهد

لوحظ ارتفاع Hcy ايضا في امهات اللاتي وضعن قبل ولادة لكن مستويات الفوليك والفيتامين ب12لم تختلف عن تلك الموجودة لدى الشاهد في الختام يجب ان نترك النساء في بيئتنا الحاجة الى مكملات الفيتامينات قبل واثناء الحمل فهي تساعد على تحسين حالة الفيتامينات وتخفيض معدل Hcy

**الكلمات المفتاحية :** عوامل الخطر. فيتامين ب9، فيتامين ب12، فرط الهوموسستين في دم، الطفرة، الاجهاض التلقائي، الاجهاض التلقائي المتكرر، الولادة المبكرة .