

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE KASDI MERBAH, OUARGLA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES



MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Spécialité : Biochimie appliquée

Présenté par : BOUZIANE Ghania

Thème

Perturbation du métabolisme de l'homocystéine et son impact sur les complications de grossesse

Soutenu publiquement le: 01/06/2017

Devant le jury:

| | | |
|---|-------|---------------|
| Présidente : M ^{elle} HAMMOUDI Roukia | M.C.B | U.K.M.Ouargla |
| Examinatrice : M ^{elle} DAOUDJI Soumia | M.A.A | U.K.M.Ouargla |
| Encadreur : M ^{me} ABBAS Amel | M.A.A | U.K.M.Ouargla |

Année universitaire : 2016/2017



Dédicace

À la source de tendresse, de patience et de générosité,
À Celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir,
Que Dieu te garde dans son vaste paradis, à toi **mon père**.

À la lumière de mes jours,
La source de mes efforts,
La flamme de mon cœur,

Ma vie et mon bonheur ; **maman** que j'adore.

Aux personnes les plus chers, et les plus proches de mon cœur mes frères et mes sœurs:

Abdelghani Rami Siham Fatima Samah et la fleur de la maison **Ilham**.

Aux personnes qui m'ont toujours aidée et encouragée,
mes amies :

Fatima, Ome elkhire, Yasmine, Aicha, Abir, Sabrina,
Sara, Bouthiena, Rayane.

A toute ma promotion de Master II en Biochimie.

À mon encadreur Mme **Abbas Amel**,
Pour sa disponibilité, son aide et ses recommandations

Et à toute personne qui m'est chère et qui m'a soutenu
durant la réalisation de ce mémoire.

Remerciements

Je souhaite avant tout remercier ALLAH tout puissant et miséricordieux, qui a donné l'inspiration et la patience pour accomplir cette étude.

Qu'il me soit permis tout d'abord, d'adresser mes vifs remerciements à Mademoiselle : HAMMOUDI Roukïa, pour avoir accepté de présider ce jury et de considérer ce travail.

J'exprime mon estime et mes vifs remerciements à l'examinatrice Mademoiselle DAOUDJI Soumia pour avoir accepté d'examiner et de juger ce modeste travail.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à ma Directrice de mémoire Madame ABBAS Amel. Je la remercie de m'avoir encadré, orienté, aidé et conseillé.

Mes remerciements à Monsieur ABADI Nouredine, responsable du laboratoire de biologie moléculaire au CHU de Constantine pour avoir accepté que je réalise mon stage dans son laboratoire et aussi pour sa confiance.

Mes remerciements vont également à tous le personnel du laboratoire de la maternité de Ouargla et à Dr LOUZI pour son aide et son support pour que je puisse travailler à la maternité.

Je voudrai aussi, exprimer mes sincères remerciements et ma gratitude à toute personne qui m'a apporté l'aide et l'assistance nécessaire à l'élaboration de ce travail et qui a contribué de près ou de loin à son accomplissement.

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Valeurs normales et pathologiques d'Hcy (KANG et <i>al.</i> , 1992)..... | 7 |
| Tableau 2 : Les apports nutritionnels conseillés (ANC) de la vitamine B12. | 15 |
| Tableau 3 : Principaux facteurs de risque pouvant mener a une déficience en B12 (Dali-YOUCCEF et ANDRES, 2009) (OH et BROWN, 2003)..... | 20 |
| Tableau 4 : Répartition des malades et des témoins par tranches d'âge..... | 46 |
| Tableau 5 : Répartition des malades selon le type de complication et les tranches d'âge. | 48 |
| Tableau 6 : Représentation de moyenne de poids chez les malades et les témoins. | 51 |
| Tableau 7 : moyennes et médianes du taux de vitamine B12 pour les malades et les témoins | 53 |
| Tableau 8: Fréquence de l'allèle G dans les populations générales à travers le monde..... | 54 |
| Tableau 9: Fréquences génotypiques et alléliques de A2756G du gène MS pour malades et témoins. | 55 |
| Tableau 10 : Fréquences génotypiques des malades avec ASR. | 56 |
| Tableau 11 : Fréquences génotypiques des malades avec HTA/PE. | 56 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1: Structure d'homocystéine et de la méthionine | 3 |
| Figure 2 : Voies biochimiques du métabolisme de l'homocystéine | 6 |
| Figure 3 : Structures chimiques des différentes cobalamines..... | 13 |
| Figure 4 : Mécanisme d'absorption de la vitamine B12..... | 17 |
| Figure 5: Localisation cytogénétique du gène <i>MTR</i> | 21 |
| Figure 6 : Schéma représente la physiopathologie de pré-éclampsie..... | 29 |
| Figure 7 : Principe de l'immunos dosage de la vitamine B12 sur l'Immulite 2000 | 38 |
| Figure 8: Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % des fragments amplifiés par PCR du gène de la MS. | 43 |
| Figure 9 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 3% des fragments issus de digestion par Hae III présentant différents génotypes de la MTHFR. | 45 |
| Figure 10 : Représentation graphique de moyenne d'âge des deux populations d'étude. | 46 |
| Figure 11: Présentation graphique de la répartition de nombre de grossesse et d'avortement selon tranches d'âge pour les malades..... | 49 |
| Figure 12 : Présentation graphique de la répartition de nombre de grossesse et d'avortement selon tranches d'âge pour les témoins. | 50 |

Liste des abréviations :

5,10-CH₂THF : 5, 10 méthylène-tétrahydrofolate

5-CH₃THF : 5-méthyltétrahydrofolate

AdoCbl : adénosylcobalamine

AS : avortement spontané

ASR : avortement spontané a répétition

BBP : Bleu de Bromophénol

BET : Bromure d'éthidium

BHMT : bétaine-homocystéine méthyle transférase

Cbl : cobalamine

CBS : cystathionine-β-synthase

Co : cobalt

dTMP : désoxythymidylate

dUMP : désoxyuridylate

EDTA : éthylène diamine tétra-acétique

eNOS : NO synthase

FCS : fausse couche spontané

FI : facteur intrinsèque

GSH : glutathion

Hcy : homocystéine

HHcy : hyperhomocystéinémie

HRP : hématome rétro-placentaire

HTA : hypertension artériel

MAT : méthionine adénosyl transférase

MeCbl : méthylcobalamine

MFIU : mort fœtale in utero

MS : méthionine synthase

MTHFR : N5,10 méthylène-tétrahydrofolate réductase

MTR : 5-méthyl-tétrahydrofolate-homocystéine méthyl-transférase

PAD : pression artérielle diastolique

PAS : pression artérielle systolique

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

PE : pré-éclampsie

PLP : pyridoxal 5'phosphate

RCIU : retard de croissance intra-utérin

RFLP : polymorphisme de longueur des fragments de restriction

SA : semaine d'aménorrhée

SAH : S-adénosyl-homocystéine

SAM : S-adénosyl- méthionine

SHMT : sérine-hydroxy-méthyltransferase

TCN : transcobalamine

THF : tétrahydrofolate

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale- α

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction 1

Etude bibliographiques

1- Homocystéine..... 3

1-1- Généralités 3

1-2- Métabolisme..... 3

1-2-1- Voie de reméthylation: 4

1-2-2- Voie de trans-sulfuration 5

2- Hyperhomocystéinémie..... 7

2-1- Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie 7

2-1-1 Facteurs génétiques 7

2-1-2 Facteurs nutritionnels..... 8

2-1-3 Facteurs environnementaux 10

3- Vitamine B12 13

3-1- Définition et structure 13

3-2- Données nutritionnelles 14

3-2-1- Sources alimentaires 14

3-2-2- Besoins et apports nutritionnels conseillés..... 15

3-3- Métabolisme..... 15

3-3-1- Absorption intestinale..... 15

3-3-2- Transport sanguin 17

3-3-3- Entrée et distribution tissulaire 18

| | |
|--|----|
| 3-3-4- Excrétion..... | 18 |
| 3-4- Rôles physiologiques de la vitamine B12..... | 19 |
| 3-5- Carence en vitamine B12..... | 19 |
| 3-6- Principales causes de carence en vitamine B12..... | 20 |
| 4- MS et polymorphisme génétique A2756G..... | 21 |
| 4-1-Protéine | 21 |
| 4-2-Gène | 21 |
| 4-3-Polymorphisme A2756G du gène de la MS | 22 |
| 5- Perturbation du métabolisme de l'homocystéine, hyperhomocystéinémie et Complications de grossesse | 23 |
| 5-1- Hypertension artérielle..... | 24 |
| 5-1-1- Définition..... | 24 |
| 5-1-2- Incidence..... | 24 |
| 5-1-3- Différents types d'HTA | 24 |
| 5-1-4- Pré-éclampsie..... | 26 |
| 5-1-4-1- Facteurs de risque..... | 26 |
| 5-1-4-2- Complications maternelles et fœtales de pré-éclampsie | 27 |
| 5-1-4-3- Physiopathologie | 27 |
| 5-2- Avortement spontané | 30 |
| 5-2-1- Définitions | 30 |
| 5-2-2- Facteurs de risque | 31 |
| 5-2-3- Physiopathologie | 32 |

Etude expérimentale

A- Sujets, matériels et méthodes

| | |
|------------------------------|----|
| 1- Populations d'étude | 35 |
| 1-1- Population malade..... | 35 |
| 1-2- Population témoin | 35 |

| | |
|--|----|
| 2- Méthodes de dosage | 37 |
| 3- Etude moléculaire..... | 39 |
| 3-1- Extraction d'ADN..... | 39 |
| 3-2- Recherche de la mutation A2756G du gène MS..... | 41 |
| 3-2-1- Amplification par PCR..... | 41 |
| 3-2-2- Digestion des produits de PCR..... | 43 |
| 3-2-3-Electrophorèse des produits de la digestion | 44 |
| 4- Analyses statistiques : | 45 |
| B- Résultats et discussion | |
| I- Etude descriptive des malades et des témoins | 46 |
| I-1- Moyenne d'âge | 46 |
| I-2- Répartition par tranches d'âge..... | 46 |
| I-3- Comparaison entre ASR et HTA/PE selon les tranches d'âge | 48 |
| I-4- Nombre de grossesse et d'avortement des malades et des témoins..... | 49 |
| I-5- Obésité | 51 |
| II- Analyse biochimique | 53 |
| III- Etude génétique | 54 |
| Conclusion..... | 58 |
| Références bibliographiques..... | 59 |
| Annexe..... | 82 |

A decorative border composed of numerous small, overlapping purple and grey rectangular shapes arranged in a frame around the central text.

Introduction

Introduction

La grossesse est une période de transformations physiques et physiologiques intenses (MEYER *et al.*, 2013) qui s'accompagne de certaines modifications de l'organisme maternel, de la fécondation jusqu'à l'accouchement et durant lesquels l'embryon, puis le fœtus se développe dans l'utérus maternel (LEVALLOIS, 2003).

Elle est caractérisée par des changements physiologiques liés au développement et la croissance du fœtus, l'adaptation de la mère à l'état gravidique, la préparation de la mère à l'accouchement, au maintien de l'homéostasie maternelle et à la préparation à l'allaitement (PERRIN et SIMON, 2002). Cet événement s'accompagne de sérieux risques pour la santé, même pour des femmes n'ayant pas de problèmes de santé antérieurs (LEBANE *et al.*, 2009).

En Algérie, environ 40% des femmes enceintes connaissent des problèmes de santé liés à la grossesse et 15% de toutes les femmes enceintes souffrent de complications permanentes qui mettent leurs vies en danger (YAHIA *et al.*, 2014).

Parmi les complications qui peuvent survenir, l'hypertension artérielle (HTA), la pré-éclampsie (PE) et l'avortement spontané à répétitions (ASR).

A travers le monde, ces complications restent des causes majeures de mortalité et de morbidité maternelle et fœtale; la pré-éclampsie demeure la deuxième cause de mortalité maternelle dans les pays développés (GIFFORD *et al.*, 2000 ; ACOG, 2002).

Les facteurs de risque de ces complications regroupent différentes causes: métaboliques, alimentaires, médicamenteuses, psychologiques en plus du mode de vie.

Des perturbations du métabolisme d'homocystéine ont été fréquemment étudiées en association avec ces complications de grossesse (AUBARD *et al.*, 2000 ; NELEN, 2001).

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

synthase MS) dont le cofacteur est la méthyl-cobalamine (dérivé de la vitamine B12), et la 5,10- méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) dont le cosubstrat est le folate (vitamine B9).

Tout déficit portant sur l'une de ces trois enzymes clés ou sur l'un de leurs cofacteurs et co-substrats induira une diminution du catabolisme de l'homocystéine qui se traduira par une hyperhomocystéinémie (HHcyt) plus ou moins importante (HOUCHER, 2012).

L'HHcy est donc une condition multifactorielle (TRABETTI, 2008), qui peut avoir pour causes des facteurs génétiques, nutritionnels ou environnementaux (BOTTIGLIERI, 2005 ; MOUCHABAC, 2008).

Parmi ces facteurs, la carence en vitamine B12 qui est une cause fréquente de l'HHcy modérée à sévère (UELAND et *al.*, 2000). En effet, la carence en vitamine B12 qu'elle 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 le processus de reméthylation méthionine synthase dépendant.

Par ailleurs, un polymorphisme le plus souvent rencontré dans le gène de la MS (ou MTR) se traduit par une diminution de l'activité enzymatique (ROZEN, 2001) et par conséquence l'augmentation de taux plasmatique d'homocystéine (HARMON et *al.*, 1999 ; YATES et *al.*, 2003 ; Laraqui et *al.*, 2007). Cette mutation est une substitution d'une adénosine (A) par une guanosine (G) en position 2756 (MTR A2756G) (LECLERC et *al.*, 1996 ; CHEN et *al.*, 1997).

L'objectif de notre travail consiste à :

- L'étude de certaines complications de grossesse à savoir l'hypertension artérielle (HTA), la pré-éclampsie (PE), et l'avortement spontané à répétitions (ASR) chez les femmes de la population de Ouargla.
- Rechercher une éventuelle perturbation dans le métabolisme de l'homocystéine chez les femmes à risque dans notre population. Pour cela un dosage de la vitamine B12 et une recherche de la mutation A2756G du gène de la méthionine synthase (MS) ont été menés.

A decorative border composed of numerous small, overlapping rectangles in shades of purple and grey, arranged in a rectangular frame around the central text.

Etude

bibliographique

1- Homocystéine

1-1- Généralités

L'homocystéine (Hcy) $C_4H_9NO_2S$ (acide 2-amino-4-mercaptopbutyrique) est un acide aminé soufré porteur de groupement thiol réducteur (**HS-CH₂-CH₂-CH(NH₂)-COOH**), découvert en 1932 par Du Vigneaud lors de son étude sur la chimie des acides aminés soufrés (BUTZ *et al.*, 1932 ; MC CULLY, 2007) (Figure 1).

Elle est formée au niveau intracellulaire à partir de la méthionine (acide aminé essentiel apporté par l'alimentation et présent dans les protéines d'origine animale). L'Hcy n'est pas codée génétiquement et est absente des protéines. Elle est synthétisée par toutes les cellules de l'organisme (LAWRENCE DE KONING *et al.*, 2003).

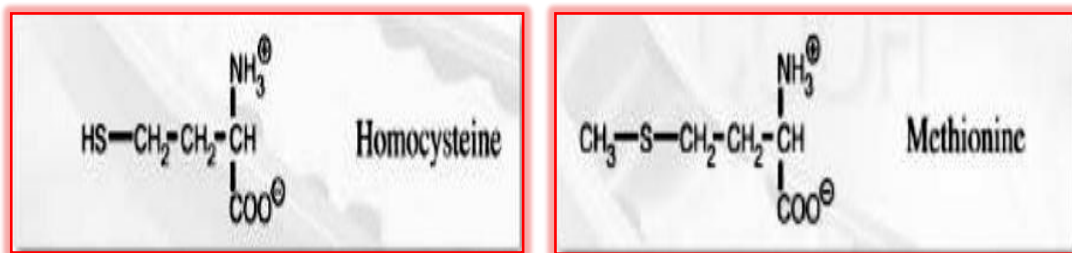


Figure 1: Structure d'homocystéine et de la méthionine (JACOBSEN, 2001).

1-2- Métabolisme

L'Hcy provient de la déméthylation de la méthionine alimentaire (Figure 2). En effet, la méthionine adénosyl transférase (MAT) catalyse la synthèse de la S-adénosyl- méthionine (SAM) à partir de l'ATP et de la méthionine (GUILLAND *et* LEQUEU, 1992 ; CHAMBERLIN *et al.*, 2000).

La SAM est le principal donneur de groupement méthyle dans l'organisme lors de nombreuses réactions biochimiques telles que la méthylation d'ADN, d'ARN, d'hormones, de lipides et des neurotransmetteurs (VESIN *et al.*, 2007 ; TRABETTI, 2008). Une fois la SAM cède son groupement méthyle, la S-adénosyl-homocystéine (SAH) se forme et sera ensuite hydrolysé par la S-adénosyl-L-homocystéine-hydrolase en adénosine et en homocystéine (DEMUTH *et al.*, 2000).

Une fois synthétisée, l'Hcy est métabolisée selon deux voies : la voie de la reméthylation en méthionine et la voie de la trans-sulfuration en cystathionine puis en cystéine (UELAND *et al.*, 1989) (Figure 2).

1-2-1- Voie de reméthylation:

Cette voie assure la reméthylation de l'Hcy en méthionine selon deux réactions enzymatiques distinctes (Figure 2) :

La principale réaction est catalysée par une enzyme ubiquitaire: la méthionine synthase (MS) ou 5-méthyl-tétrahydrofolate-homocystéine méthyl-transférase (MTR) qui requiert le 5-méthyl-tétrahydrofolate (5-CH₃THF) comme donneur de méthyle et la cobalamine (vitamine B12) comme cofacteur pour son activité enzymatique. Le complexe cobalamine-MS lie le groupe méthyle du 5-CH₃THF pour former le méthyl-cobalamine (la forme active de la vitamine B12), lors du transfert du groupement méthyle à l'Hcy la méthionine se forme. La formation du 5-CH₃THF dépend d'une enzyme qui est la N5,10 méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR) qui catalyse la réduction du 5,10 méthylène-tétrahydrofolate (5,10-CH₂THF) formé à partir du tétrahydrofolate (THF) (FAEH *et al.*, 2006).

De ce fait, ce transfert du groupe méthyle, qui permet la synthèse de la méthionine, nécessite des apports alimentaires suffisants en folate (vitamine B9) (FINKELSTEIN, 1998), ainsi qu'en vitamine B12 (méthyl-cobalamine) comme cofacteurs; d'où la synergie d'action entre la vitamine B9 et la vitamine B12 (DEMUTH *et al.*, 2000 ; BUYSSCHAERT et HERMANS, 2003 ; ELIZABETH *et al.*, 2005).

La deuxième réaction est de faible activité et indépendante des folates et de la méthyl-cobalamine (SUNDEN *et al.*, 1997). Elle utilise la conversion de la bétaine comme donneur de méthyle (la bétaine provient de la nourriture, ou l'oxydation de la choline) en N,N-diméthylglycine sous l'action d'une enzyme hépatique la bétaine-homocystéine méthyle transférase (BHMT) (WILCKEN *et al.*, 1983) .

La BHMT est moins importante que la MS car la BHMT n'est exprimée chez l'homme qu'au niveau du foie et du rein (SUNDEN *et al.*, 1997). En effet, en fonction du

tissu considéré et du statut protéique, l'importance est relative pour ces deux voies (BOLANDER-GOUIALLE, 2005).

1-2-2- Voie de trans-sulfuration

Dans la voie de trans-sulfuration, l'homocystéine se condense avec la sérine pour donner la L-cystathionine sous l'action de la cystathionine- β -synthase (CBS). La L-cystathionine est ensuite hydrolysée en cystéine et α -cétybutyrate par la γ -cystathionase (BLACHER et *al.*, 2005). Ces deux réactions nécessitent la présence d'un cofacteur enzymatique, le pyridoxal 5' phosphate (vitamine B6) (SELHUB, 1999 ; STIPANUK, 2004).

Enfin, la cystéine formée 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 les mécanismes de digestion des lipides. L'excès de cystéine peut être excrété dans les urines sous forme de sulfates organiques (SO_4^{-2}) (TRABETTI, 2008) (Figure 2).

Cette dernière voie ne se déroule qu'au niveau du foie, du rein, du pancréas et de l'intestin (BROSNAN et *al.*, 2004). Elle est irréversible, contrairement aux autres voies métaboliques, ce qui a pour conséquence que la cystéine ne peut être un précurseur pour la synthèse de méthionine. Ce fait revêt surtout une importance dans le cadre de recommandations diététiques (MCCULLY et WILSON, 1975 ; DE BREE et *al.*, 2001).

Les deux voies de reméthylation et de trans-sulfuration sont finement régulées. En cas d'apport protéique excessif de méthionine ou lorsqu'il existe un besoin accru en cystéine, la voie de la trans-sulfuration est favorisée. A l'inverse en cas de déficit protéique, la voie de la reméthylation est favorisée afin de maintenir un pool cellulaire suffisant en méthionine (SELHUB, 1999 ; STIPANUK, 2004).

Tout déficit (génétique ou acquis) portant sur les enzymes clés de ces voies ou sur l'un de leurs cofacteurs et co-substrats induira une diminution du catabolisme de l'Hcy qui se traduira par une hyperhomocystéinémie (HHcy) plus ou moins importante.

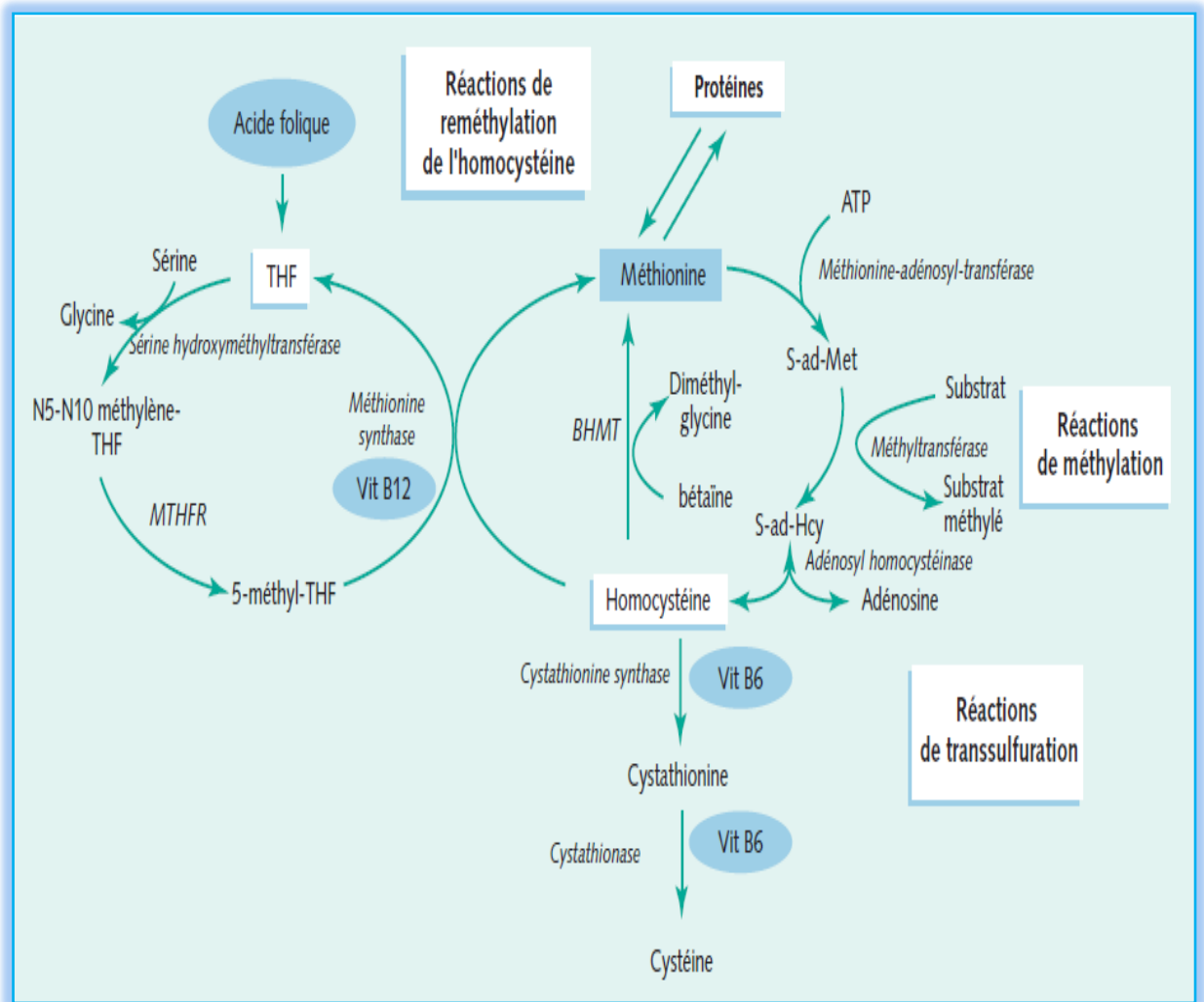


Figure 2 : Voies biochimiques du métabolisme de l'homocystéine (GILLERY, 1999).

2- Hyperhomocystéinémie

Sur la base des travaux menés, la gamme de la concentration totale en Hcy dans le plasma « des adultes à jeun en bonne santé » est 5–15 $\mu\text{mol/L}$ (UELAND *et al.*, 1993).

Une hyperhomocystéinémie (HHcy) est caractérisée par une concentration d'Hcy à jeun supérieure à 15 $\mu\text{mol/L}$, elle est habituellement considérée comme pathologique (ELIZABETH *et al.*, 2005) ; et classée en trois catégories (Tableau 1).

Tableau 1 : Valeurs normales et pathologiques d'Hcy (KANG *et al.*, 1992).

| | Homocystéine $\mu\text{mol/L}$ |
|----------------------|--------------------------------|
| Normal | 5 – 15 |
| Hyperhomocystéinémie | |
| Modérée | 16 – 30 |
| Intermédiaire | 31 – 100 |
| Sévère | > 100 |

2-1- Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie

La première cause d'HHcy rapportée était liée à un déficit homozygote en cystathionine- β -synthase. Par la suite, il est apparu que les causes sont très nombreuses (KANG *et al.*, 1988 ; CHANGO *et al.*, 2000).

L'HHcy est une condition multifactorielle (TRABETTI, 2008), qui peut avoir pour causes des facteurs génétiques, nutritionnels ou environnementaux (BOTTIGLIERI, 2005 ; MOUCHABAC, 2008).

2-1-1- Facteurs génétiques

Tout défaut affectant l'expression des gènes codant les enzymes clés du métabolisme de l'Hcy peut générer une HHcy.

Les différences quantitatives et qualitatives de ces enzymes notamment la MTHFR, la MS et la CBS ; ainsi que leurs gènes codants ont été étudiés et font encore l'objet de plusieurs

études. Près de 70 déterminants génétiques ont été identifiés (SHARMA *et al.*, 2006 ; KULLO *et al.*, 2006).

Parmi les plus importants on distingue : deux mutations 677C/T et 1298A/T du gène codant pour la MTHFR (WEISBERG *et al.*, 1998), la mutation au niveau du gène codant pour la CBS et dont la forme homozygote conduit à un cas d'HHcy sévère (UBBINK *et al.*, 1995 ; VESIN *et al.*, 2007), et la mutation du gène codant la MS ou le polymorphisme 2756A/G qui provoque une HHcy modérée (CHANGO *et al.*, 1999).

De plus, un polymorphisme portant sur une protéine de transport de vitamine B12, la transcobalamine (TCN 776 C/G), a été rapporté et peut également s'associer à une HHcy relative (LI *et al.*, 1996 ; CHEN *et al.*, 1997 ; GOYETTE *et al.*, 1998 ; CHRISTENSEN *et al.*, 1999).

2-1-2- Facteurs nutritionnels

Plusieurs études ont montré qu'il existe une HHcy chez les sujets déficients en vitamine B9, vitamine B12 et vitamine B6 (RASMUSSEN *et al.*, 2000 ; DE BREE *et al.*, 2001 ; JACQUES *et al.*, 2001 ; LEE *et al.*, 2003 ; VAN *et al.*, 2005 ; HAO *et al.*, 2007). Ces molécules sont toutes impliquées dans le métabolisme de l'Hcy.

Il existe 3 types de carences en vitamines du groupe B (B9, B12 et B6) associées à une accumulation d'Hcy (STABLER *et al.*, 1988) :

- *Interruption de la voie de trans-sulfuration par une déficience en coenzyme dérivés de la vitamine B6:*

La vitamine B6 est nécessaire pour la formation du pyridoxal 5'phosphate (PLP) (LAMERS *et al.*, 2011), qui sert de coenzyme dans la voie de trans-sulfuration.

Des études sur l'homme et les rats montrent que, les niveaux moyens à jeun de l'Hcy n'ont pas différé de manière significative entre les sujets exposés à un apport déficient en vitamine B6 et ceux avec un apport riche en cette vitamine (EL MABCHOUR, 2010) ; l'insuffisance en vitamine B6 ne semble pas avoir un effet sur les niveaux d'homocystéine dans le plasma.

Cependant, si un individu déficient en vitamine B6 prend une charge de méthionine, le niveau d'Hcy mesuré sera nettement élevé (JAY BLANK, 2009).

La carence en vitamine B6 peut changer le métabolisme d'Hcy en réduisant l'activité de la sérine-hydroxy-méthyltransferase (SHMT) et en supprimant le catabolisme d'Hcy (CUSKELLY et *al.*, 2001).

- *Carence en folates responsable d'un déficit en méthyl THF qui est donneur de méthyle lors de la reméthylation de l'Hcy :*

Parmi les trois vitamines, qui sont nécessaires pour le métabolisme normal de Hcy, l'acide folique (vitamine B9) est le plus fréquemment rapporté (RACEK et *al.*, 2005).

L'organisme humain ne peut pas synthétiser le folate donc, il doit l'obtenir par l'alimentation. Les sources principales du folate sont les légumes verts, citron, fruits, foie et grains entiers (GOK et *al.*, 2004).

Une prise alimentaire plus élevée en acide folique est associée à un niveau plus bas d'Hcy pour les adultes (DE BREE et *al.*, 2002).

L'étape cruciale et primaire du métabolisme des folates est la transformation de la sérine, en glycine par la SHMT, qui aboutit à la conversion du THF en 5,10-CH₂THF (LYNN et *al.*, 1999 ; BENDER, 2002).

La vitamine B9 est employée comme substrat ; elle donne le groupe méthyl pour la conversion de l'Hcy à la méthionine. L'insuffisance en acide folique peut provoquer une HHcy sévère (JAY BLANK, 2009).

- *Carence en vitamine B12 :*

La carence en vitamine B12 qu'elle soit due à un défaut d'apport, d'absorption ou de transport sanguin (NAMOUR 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 reméthylation.

Donc, en cas de déficience en B12, et cela même en présence d'un apport adéquat en folates, il y a une réduction de la voie de reméthylation de l'Hcy allant même jusqu'à une hypométhylation et à une déficience fonctionnelle en folates et c'est ce qui s'appelle "le piège à folates" (HERRMANN et *al.*, 2003), c'est-à-dire provoquant une trappe métabolique des folates dans la forme méthyl THF, les rendant ainsi inutilisables pour d'autres réactions métaboliques (CHANARIN et *al.*, 1989).

La carence en vitamine B12 est une cause fréquente d'une HHcy à jeun modérée à sévère (UELAND et *al.*, 2000).

La relation entre l'apport de vitamine B12 et la concentration de l'Hcy est à peine étudiée et les faibles associations inverses trouvées pourraient bien être dues à une correction inadéquate pour l'apport d'autres composants alimentaires comme la méthionine et l'alcool (DE BREE et *al.*, 2002).

2-1-3- Facteurs environnementaux

Ces facteurs peuvent avoir des effets additifs ou potentialisés chez certains sujets qui sont porteurs de mutations génétiques des voies de reméthylation et de trans-sulfuration (MOUCHABAC, 2008).

➤ *Âge et sexe*

L'Hcy augmente avec l'âge et chez le sexe masculin comparativement au sexe féminin après l'âge de 10 ans et continue d'augmenter graduellement tout au long de la vie sans nécessairement atteindre des taux anormalement élevés, ceci pourrait être lié au déclin de la fonction rénale avec l'âge et également à la baisse du statut en vitamine B chez les personnes âgées (NORLUND et *al.*, 1998).

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

➤ *Médicaments*

Plusieurs médicaments tels que les antifoliques (methotrexate et anticonvulsants tels que la carbamazépine et la phénytoïne), anti B6 (isoniazide, cyclosérine, azaurinidine, procarbazine), anti B12 (oxyde nitreux) interfèrent avec l'absorption du folate et des vitamines B6 et B12 et provoquent une augmentation modérée de l'Hcy (GUILLAND *et al.*, 2003 ; KOTHEKAR, 2007).

➤ *Pathologies*

Certaines affections pathologiques sont responsables d'une augmentation de l'Hcy :

L'insuffisance rénale est une étiologie fréquente qui peut multiplier jusqu'à 3 ou 4 fois les valeurs normales de l'Hcy (BOSTOM *et al.*, 1997), l'arthrite rhumatoïde (GUILLAND *et al.*, 2003), l'hypothyroïde, les maladies inflammatoires chroniques (notamment intestinales) et certaines cancers (ROUBENOFF *et al.*, 1997 ; DE BREE *et al.*, 2002 ; WIDNER *et al.*, 2002).

➤ *Mode de vie*

La consommation de café est positivement associée à la concentration de l'Hcy (DE BREE *et al.*, 2002), car la caféine peut inhiber la conversion de l'Hcy en cystéine en agissant comme antagoniste de la vitamine B6 (DE BREE *et al.*, 2001).

Le tabagisme est positivement associé au taux total d'Hcy plasmatique (JAY BLANK, 2009). Le mécanisme exact derrière l'augmentation de la concentration de l'Hcy n'est pas identifié, mais le tabagisme peut induire des effets locaux dans les cellules exposées à la fumée de cigarette, influencer la concentration de l'Hcy en modifiant le statut de thiol redox plasmatique ou inhiber des enzymes telles que la MS (DE BREE *et al.*, 2002).

L'alcool semble avoir un effet similaire à celui du café sur les niveaux plasmatiques d'Hcy (JAY BLANK, 2009).

L'alcool est un antagoniste du métabolisme des folates (HILLMAN *et al.*, 1982), d'autant plus qu'il pourrait entraver l'absorption intestinale et le métabolisme de la vitamine B12 (LAUFER *et al.*, 2004).

La relation entre l'Hcy plasmatique et l'activité physique n'est pas claire et nécessite plus de recherche (PREROST, 1997) mais n'est probablement pas ou faiblement inversement associée à la concentration de l'Hcy, car un mode de vie actif est généralement associé à un mode de vie plus sain et à un mode de vie plus sain avec une concentration baisse d'Hcy (DE BREE et *al.*, 2002)

3- Vitamine B12

3-1- Définition et structure

La vitamine B12 ou cobalamine (Cbl) a été la dernière vitamine à être découverte en 1948 (CHEN *et al.*, 1999). C'est une vitamine hydrosoluble appartient à la famille des corrinoides, présentant une structure chimique proche de l'hème ; mais l'atome central de fer est remplacé par un cobalt (Co), d'où leur nom de cobalamine (ZITTOUN, 2002 ; GUEANT et NAMOUR, 2003).

Elle est constituée d'un noyau corrine et d'un ribonucléotide reliés entre eux par un pont amino 2-propanol (CHEN *et al.*, 1999) (Figure 3).

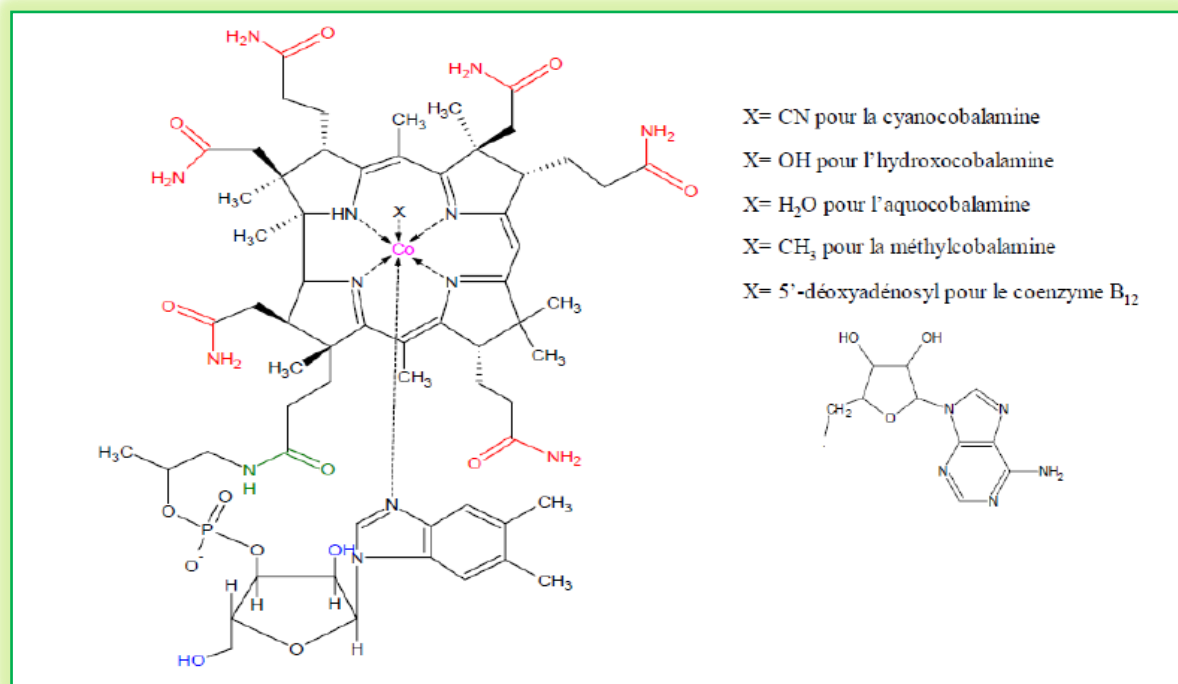


Figure 3 : Structures chimiques des différentes cobalamines (CHEN *et al.*, 1999).

Le noyau corrine (Figure 3) est formé d'un atome de Co central relié à 4 noyaux pyrrole (une structure tétrapyrrolique) ; ainsi qu'à un radical anionique (-X) variable qui détermine le nom du composé vitaminique: la cyanocobalamine (-X=-CN), l'hydroxocobalamine (-X=-OH) (formes oxydées et stables), la méthylcobalamine (-X=-CH₃) et la 5'-déoxyadényl cobalamine (-X=-5'd Ad) (LE GRUSSE et WATIER, 1993).

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

Seules deux formes de Cbl sont des coenzymes intervenant dans le métabolisme chez l'homme: la 5'-désoxyadénosyl-cobalamine ou adénosylcobalamine (AdoCbl) et la méthylcobalamine (MeCbl) (GRASBECK et GUEANT, 1990).

Les réactions où intervient l'AdoCbl semblent être diverses de part de leur nature. En fait, elles sont toutes régies par un mécanisme de transfert d'hydrogène, l'AdoCbl se comportant comme un donneur ou un accepteur d'hydrogène. (GUEANT et *al.*, 1993).

La principale réaction qui met en jeu la MeCbl comme coenzyme est la méthylation de l'Hcy en méthionine. Cette réaction permet la régénération du THF à partir du 5-CH₃THF. Le blocage de cette réaction a deux conséquences (GUEANT et *al.*, 1993):

- Le blocage de la régénération de la méthionine perturbe le métabolisme des acides aminés soufrés et explique l'excrétion urinaire augmentée d'Hcy;
- L'absence de régénération du THF empêche la régénération de 5-CH₃THF, qui est un coenzyme de la thymidylate synthétase. Il y a donc blocage de la conversion de dUMP (désoxyuridylate) en dTMP (désoxythymidylate) et par voie de conséquence blocage de la synthèse de l'ADN.

3-2- Données nutritionnelles

3-2-1- Sources alimentaires

La vitamine B12 est présente naturellement dans les aliments d'origine animale, incluant la viande, la volaille, les abats, le poisson, les fruits de mer, les œufs et les produits laitiers (OH et BROWN, 2003).

Les micro-organismes qui synthétisent la vitamine B12 sont des bactéries, des levures ou des algues. Un certain nombre d'entre eux sont présents dans la flore digestive des

herbivores, notamment chez les ruminants (GUEANT *et al.*, 1993). Les teneurs en vitamine B12 dans les aliments sont par ailleurs très nettement plus faibles que celles des autres vitamines du groupe B (SOUCI *et al.*, 1994).

3-2-2- Besoins et apports nutritionnels conseillés

L'apport nutritionnel recommandé pour la vitamine B12 varie en fonction de l'âge (Tableau 2).

Une partie de l'excédent en vitamine B12, environ 50 %, est stockée dans le foie. La réserve hépatique varie entre 2 et 5 mg, ce qui représente environ 1000 jours d'apport (RUFENACHT *et al.*, 2008).

Tableau 2 : Les apports nutritionnels conseillés (ANC) de la vitamine B12.

| Catégories | ANC (µg/j) |
|--|------------|
| Nourrissons | 0,3 à 0,5 |
| Enfants de 1 à 12 ans | 0,7 à 3,0 |
| Adolescents et adultes | 3,0 |
| Femmes enceintes ou allaitantes et personnes âgées | 4,0 |

D'après l'Agence Nationale de sécurité sanitaire (ANSES), 2012

<http://www.anses.fr/index.htm>

3-3- Métabolisme

3-3-1- Absorption intestinale

Tout d'abord, il est important de savoir que la vitamine B12, présente naturellement dans les aliments de source animale, est liée à des protéines (DALI-YOUCHEF et ANDRES, 2009 ; SCHRIER, 2011). La vitamine B12 ingérée est libérée des protéines alimentaires dans l'estomac sous l'effet de l'acidité gastrique et de la pepsine (SCHADE et SCHILLING, 1967).

La vitamine B12 libres (non liée a les protéines alimentaires) va alors préférentiellement se lier à une protéine anciennement appelée « protéine R », l'haptocorrine, d'origine salivaire et gastrique, jusqu'à ce que les enzymes pancréatiques la détruisent (RUSSELL-JONES et ALPERS, 1999) (Figure 4).

De nouveau libre dans un environnement plus alcalin, la vitamine B12 va pouvoir se complexer au facteur intrinsèque (FI) (NICOLAS et GUEANT, 1994). Ce dernier est une glycoprotéine sécrétée par les cellules pariétales de l'estomac, qui va permettre à la cobalamine de franchir la barrière intestinale au niveau iléal (GANESAN et *al.*, 2002).

En se liant à la vitamine B12, le FI se dimérise ce qui lui confère une meilleure résistance à la protéolyse et en même temps protège la vitamine B12 du catabolisme par les bactéries intestinales (COMBS, 1998). Le complexe facteur intrinsèque-vitamine B12 se fixe sur un récepteur spécifique de la bordure en brosse des cellules épithéliales de l'iléon: la cubiline. Ce récepteur possède deux sites de liaison: l'un est spécifique à la partie protéique du facteur intrinsèque et l'autre spécifique à la vitamine B12 (NICOLAS et GUEANT, 1994) (Figure 4).

Une fois fixée au récepteur, le complexe va traverser la paroi du tube digestif par endocytose et le facteur intrinsèque est dégradé dans l'entérocyte libérant ainsi la vitamine B12 qui va se lier à une autre protéine: la transcobalamine II (SEETHARAM et *al.*, 1999 ; SEETHARAM et LI, 2000). Elle peut être également métabolisée dans les entérocytes en MeCbl dans le cytosol ou en AdoCbl dans les mitochondries (PETRUS et *al.*, 2009) (Figure 4).

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

Vu la complexité des mécanismes d'absorption de la vitamine B12, cette dernière est lente et limitée (pic de concentration sanguine entre 6 et 8 heures après ingestion) (COMBS, 1998).

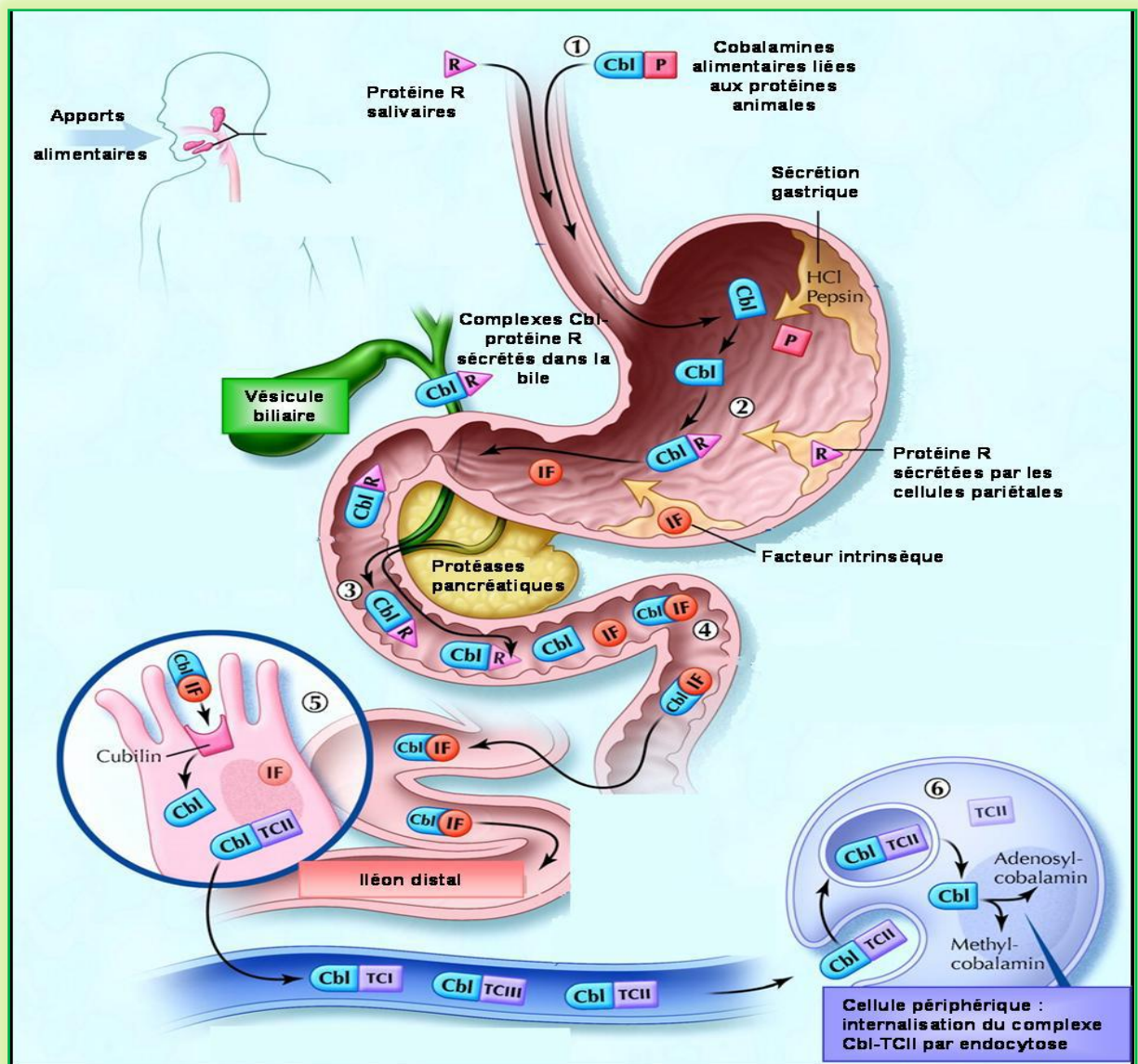


Figure 4 : Mécanisme d'absorption de la vitamine B12 (Modifié d'après ANDRES *et al.*, 2004).

3-3-2- Transport sanguin

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

Il existe trois types de transcobalamines: la transcobalamine I est impliquée dans le stockage de la cobalamine, la transcobalamine II a un rôle dans le transport intracellulaire de

la cobalamine et enfin la transcobalamine III, dont les fonctions encore inconnues, semblerait participer à la captation de la vitamine B12 par les hépatocytes (MC DOWELL, 2000).

La transcobalamine de type II est la plus étudiée car elle facilite le transfert dans le sang portal de la cobalamine (QUADROS et *al.*, 1999) ; et que le dosage de cette protéine plasmatique saturée en cobalamine serait un marqueur sensible d'une carence en cette vitamine (NEXO et *al.*, 2000 ; HERRMANN et GEISEL, 2002).

3-3-3- Entrée et distribution tissulaire

Le complexe vitamine B12-transcobalamine II, présent dans le sang portal, se combine aux récepteurs spécifiques présents dans les membranes cellulaires de nombreux tissus. Ce type de récepteur existe sous deux configurations: monomérique, forme minoritaire et inactive, ou dimérique qui prédomine et permettrait d'assurer sa fonction d'importation de la vitamine B12 dans la cellule (BOSE et SEETHARAM, 1997).

L'entrée de la vitamine B12 dans la cellule se fait par endocytose, les vésicules d'endocytose fusionnent avec des lysosomes. Après la dégradation lysosomale de la protéine de transport, la cobalamine libre est essentielle soit pour sa rétention intracellulaire ou son utilisation en tant que coenzyme (SEETHARAM et *al.*, 1999).

La vitamine B12 est stockée en quantité significative dans les différents organes, approximativement 60 % dans le foie humain (LE GRUSSE et WATIER, 1993).

3-3-4- Excrétion

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

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

3-4- Rôles physiologiques de la vitamine B12

La vitamine B12 est une coenzyme ubiquitaire impliquée dans de nombreuses réactions enzymatiques intracellulaires (FEDERICI *et al.*, 2007). Parmi ces réactions:

- Cofacteur, avec la vitamine B6 et l'acide folique, pour la transformation de l'Hcy en méthionine (FEDERICI *et al.*, 2007) ;
- Participation essentielle à la synthèse de l'ADN, et à la multiplication cellulaire, plus particulièrement pour les cellules à renouvellement rapide comme les cellules hématopoïétiques (à l'origine de toutes les cellules sanguines) (KOURY et PONKA, 2004 ; SERRAJ *et al.*, 2010) ;
- Assure l'intégrité structurelle et fonctionnelle de la myéline nerveuse (CHILDS et ARMSTRONG, 2002 ; ANDRES *et al.*, 2009) ;
- Cofacteur dans la régulation de la synthèse et de l'activité de certaines cytokines (SCALABRINO et PERACCHI, 2006 ; SOLOMON, 2007 ; SCALABRINO *et al.*, 2008).

3-5- Carence en vitamine B12

La carence en vitamine B12 est un phénomène fréquent et potentiellement grave. Les manifestations cliniques sont souvent initialement frustes et s'installent de façon insidieuse (CARMEL, 2000).

Plusieurs définitions de la carence en vitamine B12 sont proposées dans la littérature :

1. taux sérique $< 200 \text{ pg.mL}^{-1}$ (150 pmol.L^{-1}) sur 2 prélèvements (ANDRES *et al.*, 2000);
2. taux sérique $< 160 \text{ pg.mL}^{-1}$ (ZITTOUN, 1999) ;
3. taux sérique $< 200 \text{ pg.mL}^{-1}$ et taux sérique de l'homocystéine totale $> 13 \text{ pmol.L}^{-1}$ ou taux de l'acide méthylmalonique $> 0,4 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ en l'absence d'une insuffisance rénale, d'un déficit en folates ou en vitamine B6 (HANOUNE LOUKILI et ANDRES, 2003);
4. taux sérique $< 200 \text{ pg.mL}^{-1}$ avec des signes cliniques neurologiques et/ou des anomalies hématologiques (SNOW, 1999).

La 3^{ème} définition est la plus utilisée pour confirmer une carence en vitamine B12 (ANDRES *et al.*, 2005).

3-6- Principales causes de carence en vitamine B12

Une carence en vitamine B12 peut donc se rencontrer dans les pays en voie de développement en raison d'une malnutrition mais également dans les pays industrialisés pour des raisons diverses (Tableau 3) :

Tableau 3 : Principaux facteurs de risque pouvant mener a une déficience en B12 (DALI-YOUCHEF et ANDRES, 2009 ; OH et BROWN, 2003).

| Facteur de risque | Cause |
|-----------------------------|---|
| Déficience nutritionnelle | <ul style="list-style-type: none"> • Régime végétarien • Régime peu varié • Consommation d'alcool excessive pendant plus de deux semaines |
| Malabsorption | <ul style="list-style-type: none"> • Utilisation de médicaments réduisant l'acidité de l'estomac • Diminution du facteur intrinsèque ou du fonctionnement des cellules pariétales (anémie pernicieuse, gastrite atrophique chronique, après une gastrectomie, etc.) |
| Facteurs gastro-intestinaux | <ul style="list-style-type: none"> • Malabsorption au niveau de l'iléon (résection de l'iléon, maladie de Crohn, etc.) • Présence d'un trop grand nombre de bactéries utilisant la B12 dans l'intestin • Insuffisance pancréatique affectant la fonction exocrine • Déficience en transcobalamine II (rare) • VIH (causes multiples) |

Dans notre étude on s'intéresse au rôle de la vitamine B12 comme coenzyme de la méthylation de l'homocystéine en méthionine, la perturbation de ce métabolisme et son impact sur les issues de la grossesse (avortement spontané à répétition, hypertension artérielles et pré-éclampsie).

4- MS et polymorphisme génétique A2756G

4-1- Protéine

La méthionine synthase (MS) est une enzyme catalyse la conversion de l'homocystéine en méthionine, en utilisant un groupe méthyle dérivé du 5-CH₃THF (forme circulante d'acide folique) et la Cbl (forme active de la vitamine B12) comme cofacteur pour son activité enzymatique (DATTA *et al.*, 2008).

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

Elle se compose d'au moins trois régions fonctionnelles différentes. Les acides aminés 2 à 353 correspondent au domaine de liaison à l'Hcy, 354 à 649 à la région liant le 5-CH₃THF, 650 à 896 à la région liant la Cbl et les acides aminés 897 à 1227 au domaine de liaison de la SAM (GOULDING *et al.*, 1997).

4-2- Gène

La séquence ADNc de la méthionine synthase a été caractérisée indépendamment par LI *et al.* (1996) et LECLERC *et al.* (1996).

Le gène humain de la MS (MTR dans la nomenclature des gènes) se trouve dans le chromosome 1q43 et comprend 33 exons (Figure 5).

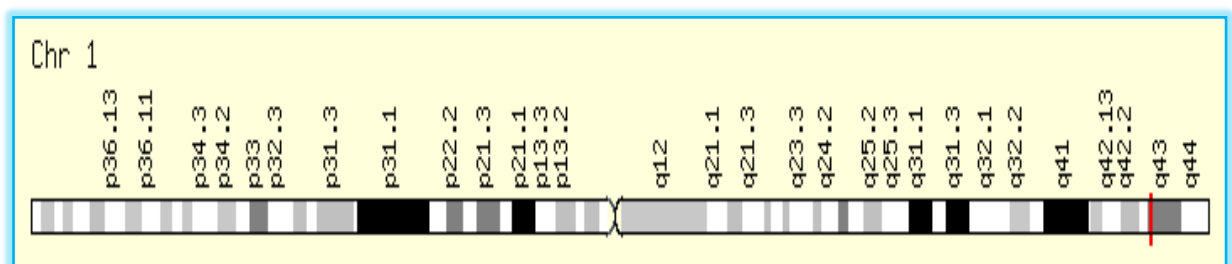


Figure 5: Localisation cytogénétique du gène MTR

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

4-3- Polymorphisme A2756G du gène de la MS

L'étude de CHEN et al. (1997) a mis en évidence l'existence de plusieurs polymorphismes dans le gène de la MS.

Le polymorphisme le plus souvent rencontré est la substitution d'une adénosine par une guanosine en position 2756 (*MTR A2756G*) sur l'exon 8 entraînant au niveau traductionnel la conversion d'un acide aspartique en glycine.

Des études menées sur des enzymes bactériennes suggèrent que la mutation se traduit par une diminution de l'activité enzymatique (ROZEN, 2001) et touche un acide aminé appartenant au domaine catalytique. Ce domaine porte le site de fixation de la cobalamine (vitamine B12) (MATTHEWS et al., 1998).

En effet, plusieurs études montrent l'association entre cette mutation et les taux plasmatique élevés d'Hcy (HARMON et al., 1999 ; YATES et al., 2003 ; LARAQUI et al., 2007).

Le polymorphisme MS 2756A→G étant potentiellement responsable d'une hyperhomocystéinémie, pouvant être un facteur de risque pour les complications de grossesse (ASR, HTA et PE).

5- Perturbation du métabolisme de l'homocystéine, hyperhomocystéinémie et Complications de grossesse

Généralités

La grossesse est une période de transformations physiques et physiologiques intenses (MEYER *et al.*, 2013). Les changements physiologiques sont liés au développement et à la croissance du fœtus, l'adaptation de la mère à l'état gravidique, la préparation de la mère à l'accouchement, au maintien de l'homéostasie maternelle et à la préparation à l'allaitement (PERRIN et SIMON, 2002).

Durant cette période, la femme enceinte est exposée à des risques importants de complications qui peuvent affecter sa santé et celle de son nouveau-né. Les complications qui peuvent survenir sont l'anémie, le diabète gestationnel, l'hypertension artérielle (HTA), la pré-éclampsie (PE), l'avortement spontané (AS) (BERNABE *et al.*, 2004 ; DICKUTE *et al.*, 2004), 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 d'accouchement pré-terme et de mortalité et de morbidités périnatales et maternelles (HASSOLD et CHIU, 1985 ; LUKE et BROWN, 2007).

Des perturbations du métabolisme d'homocystéine ont été fréquemment étudiées en association avec les complications de grossesse (AUBARD *et al.*, 2000 ; NELEN, 2001). L'HHcy a été associée à un plus grand risque de la pré-éclampsie (HOGG *et al.*, 2000 ; MURAKAMI *et al.*, 2001), de retard de croissance intra-utérine (VOLLSET *et al.*, 2000 ; ONALAN *et al.*, 2006), d'hématome rétro-placentaire (VOLLSET *et al.*, 2000), de mortinaissance (VOLLSET *et al.*, 2000 ; MURAKAMI *et al.*, 2001) et de fausses couches (NELEN *et al.*, 2000).

Dans notre étude, on va s'intéresser aux avortements spontanés à répétition, à l'hypertension artérielle et à la pré-éclampsie.

5-1- Hypertension artérielle

5-1-1- Définition

L'HTA touche environ 8% de toutes les grossesses et est ainsi une des causes majeures de mortalité et de morbidité maternelles et fœtales dans le monde entier (GIFFORD et *al.*, 2000).

Elle est définie comme une pression artérielle systolique (PAS) = 140 mm Hg et/ou une pression diastolique (PAD) = 90 mm Hg à deux reprises, à au moins 6 heures d'intervalle (GIFFORD et *al.*, 2000).

5-1-2- Incidence

La fréquence de l'association HTA et grossesse est diversement estimée dans la littérature. Elle est de 5 à 10 % aux Etats-Unis (NHBPEP, 2000), 10 à 15% en France (SENTILHES et *al.*, 2008) et 9% en Chine (XIONG XU et *al.*, 1999).

En Afrique sub-saharienne, BAH et *al.*(2000) rapportent une fréquence de 17, 05% en Guinée Conakry. TOURE et *al.* (1997) ont trouvé une fréquence de 8,9% au Niger alors que ATTOLOU et *al.* (1998) trouvent une fréquence de 7,65% au Bénin.

Selon l'Organisation des Nations Unies, elle représente 16 % de la mortalité maternelle dans les pays développés (KHAN et *al.*, 2006 ; MAGEE et *al.*, 2014).

5-1-3- Différents types d'HTA

Le groupe de travail national américain de programme d'éducation d'hypertension (NHBPEP) a suggéré des critères diagnostiques pour distinguer les différents types d'hypertension dans la grossesse (NHBPEP, 2000 ; ROBERTS et *al.*, 2003).

Selon les critères de NHBPEP, l'HTA est classifiée comme suite :

- Hypertension chronique ;
- Hypertension gestationnelle (gravidique) ;
- Pré-éclampsie ;

- Pré-éclampsie surajoutée à une hypertension chronique.

A- Hypertension chronique

Elle est définie par une PAS = 140 mmHg et/ou une PAD = 90 mmHg, documentée avant la grossesse ou avant la 20^{ème} semaine d'aménorrhée (SA). Environ 3% des femmes enceintes sont concernées par ce diagnostic (SIBAI, 2003).

Les femmes ayant une HTA chronique ont un risque plus élevé de développer une pré-éclampsie (17 à 25 % vs 3 à 5 % dans la population générale) (REY et COUTURIER, 1994 ; MC COWAN et *al.*, 1996).

B- Hypertension gestationnelle = gravidique

L'hypertension artérielle gestationnelle est définie par une PAS = 140 mm Hg ou une PAD = 90 mm Hg survenant pendant ou après la 20^{ème} SA (MAGEE et *al.*, 2014).

Par définition, la protéinurie n'est pas significative au cours d'une HTA gestationnelle. Une HTA gestationnelle sans protéinurie complique 5 à 6 % des grossesses (SIBAI, 2002 ; ACOG, 2013 ; MAGEE et *al.*, 2014).

C- Pré-éclampsie

La pré-éclampsie était définie par une PAS \geq 140 mm Hg et/ou une PAD \geq 90 mmHg, associée à une protéinurie $>$ 0,3 g/24 h, apparaissant après 20^{ème} SA (BROWN et *al.*, 2001).

D- Pré-éclampsie surajoutée à une hypertension chronique

Une protéinurie survenant après la 20^{ème} SA, chez une femme ayant une HTA chronique, définie comme HTA chronique avec pré-éclampsie surajoutée (FEIHL et *al.*, 2009).

L'entité qui se démarque immédiatement lorsque l'on parle d'hypertension dans le cadre de la grossesse est la pré-éclampsie. Elle demeure, dans ce contexte, l'une des maladies hypertensives les plus complexes et est responsable de la plupart des complications observées chez les patientes enceintes hypertendues.

5-1-4- Pré-éclampsie

La pré-éclampsie est classiquement définie par l'association d'une hypertension artérielle et d'une protéinurie (SIBAI *et al.*, 2005).

C'est une pathologie présente partout dans le monde et plus fréquente pendant la grossesse, dont l'incidence se situe entre 3 et 5 % (SIBAI *et al.*, 2005). Potentiellement sévère, elle intéresse la femme au deuxième et troisième trimestre de la grossesse. Cette pathologie demeure la deuxième cause de mortalité maternelle dans les pays développés (ACOG, 2002).

Par ailleurs, de nombreuses preuves indiquent que les femmes souffrant de PE durant la grossesse présentent un risque accru de développer ultérieurement une maladie cardiovasculaire (FOREST *et al.*, 2005 ; MC DONALD *et al.*, 2008). L'Organisation Mondiale de Santé (OMS) a reconnu l'importance de la PE en lançant un programme spécifique à l'étude et au traitement de ce syndrome (WHO/OMS, 2003).

5-1-4-1- Facteurs de risque

Le développement de pré-éclampsie est relié à plusieurs facteurs de risque comme :

- ✓ La primiparité et la multiparité (ESKENAZI *et al.*, 1991 ; SKJAERVEN *et al.*, 2002).
- ✓ Antécédents de pré-éclampsie personnel et familial (SAFTLAS *et al.*, 1990 ; NILSSON *et al.*, 2004). Des antécédents de pré-éclampsie chez la mère ou la sœur font augmenter l'incidence d'un facteur de 3 à 5 (EDOUARD, 2003).
- ✓ Grossesses multiples (jumeler, triplet) (COONROD *et al.*, 1995 ; MASTROBATTISTA *et al.*, 1997).
- ✓ Age < 18 ans ou > 40 ans (EDOUARD, 2003).
- ✓ Stress physique et psychologique (KLONOFF *et al.*, 1996).
- ✓ Des maladies telle que l'hypertension (SIBAI *et al.*, 1995), la maladie rénale (REY et COUTURIER, 1994), le diabète (NILSSON *et al.*, 2004), l'obésité, les thrombophilies, et les affections auto-immune (EDOUARD, 2003).

En plus, plusieurs études ont suggéré les niveaux élevés d'Hcy comme facteur de risque approprié pour la pré-éclampsie.

5-1-4-2- Complications maternelles et fœtales de pré-éclampsie

Les complications maternelles qui s'associent à la pré-éclampsie (WEINSTEIN, 1982):

- ✓ Eclampsie ;
- ✓ Hématome rétro placentaire (HRP) ;
- ✓ Insuffisance rénale aiguë ;
- ✓ HELLP syndrome (Hemolysis Elevated Liver enzymes Low Platelets = hémolyse intravasculaire, cytolyse hépatique et thrombopénie).

Les complications fœtales sont la conséquence directe de la baisse du débit sanguin utéro-placentaire. Elles associent le RCIU, la MFIU et la prématurité. La mort fœtale survient dans 2 à 5 % de ces grossesses à risque. Les signes d'alarmes doivent être recherchés associent une stagnation de la croissance fœtale et/ou une baisse du liquide amniotique, une altération du rythme cardiaque du fœtal, une diminution des mouvements actifs du fœtus, et une vasodilatation des artères cérébrales au Doppler cérébral. La prématurité est la cause principale de la morbidité néonatale (RAY et *al.*, 2005 ; MANCIA et *al.*, 2007).

Le devenir maternel et néonatal dépend du temps de survenue de cette pathologie, de sa sévérité, de la qualité de prise en charge et de la présence ou non de maladies chroniques sous-jacentes (ROBERTS et COOPER, 2001 ; TSATSARIS et *al.*, 2008).

5-1-4-3- Physiopathologie

Les mécanismes physiopathologiques exacts de la pré-éclampsie ne sont pas entièrement élucidés malgré les nombreux travaux de recherche.

On gardera toutefois à l'esprit que cette pathologie semble être d'origine placentaire et qu'elle implique également les vaisseaux sanguins et les capillaires maternels par une action directe sur leur endothélium (GILBERT et *al.*, 2008).

La grossesse normale résulte d'un état de tolérance physiologique de l'endothélium maternel vis-à-vis du trophoblaste. Lors de la nidation, le trophoblaste colonise l'endomètre (invasion trophoblastique) puis l'endothélium vasculaire maternel. La colonisation

trophoblastique des artères spiralées du myomètre entraîne de profondes modifications de la structure histologique des artères : désendothélialisation, disparition du tissu élastique et perte des récepteurs hormonaux puis ré-endothélialisation (pseudovasculogénèse). Les artères utérines de type « musculaire » acquièrent des caractéristiques d'artères élastiques (ZHOU et *al.*, 1997 ; PARHAM, 2004).

Ces modifications induisent une résistance physiologique aux hormones vasopressives avec une vasodilatation majeure et une augmentation considérable du débit artériel. (MOUNIER-VEHIER et DELSART, 2009).

Tous ces mécanismes étant modulés par des paramètres génétiques et environnementaux (SIBAI et *al.*, 2005 ; ILEKIS et *al.*, 2007 ; VON DADELSZEN et MAGEE, 2008).

Le schéma physiopathologique classique (Figure 6) comporte ces éléments :

- Un défaut de remodelage vasculaire utérin (en grande partie lié à un défaut d'invasion trophoblastique) responsable d'une hypoperfusion de la chambre intervillieuse ;
- Une hypoxie placentaire et un stress oxydant induisant un dysfonctionnement généralisé du syncytiotrophoblaste ;
- Un dysfonctionnement de l'endothélium maternel lié à diverses substances libérées par le placenta dans la circulation maternelle (radicaux libres, lipides oxydés, cytokines,..) et conduisant aux signes cliniques de la maladie (TSATSARIS et *al.*, 2008).

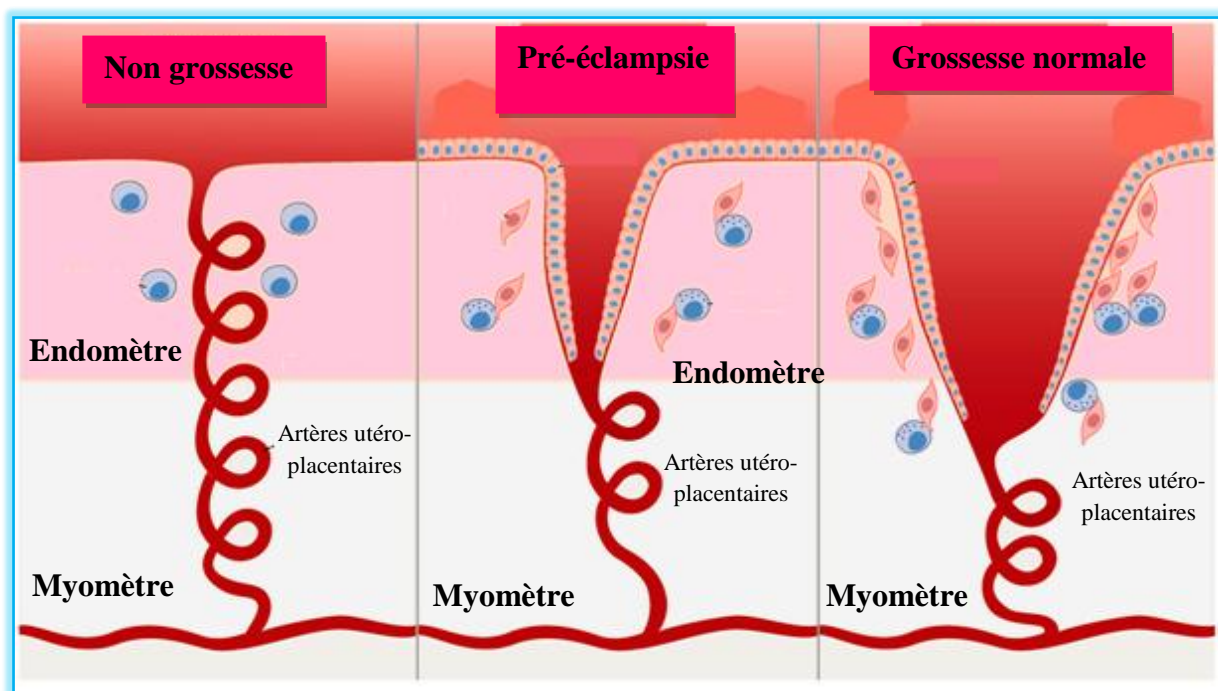


Figure 6 : Schéma représente la physiopathologie de pré-éclampsie (MOFFETT-KING, 2002).

L'HHcy a été étroitement liée à la pré-éclampsie, puisque le dysfonctionnement endothélial est une complication majeure de cette maladie (ROBERTS et *al.*, 1989 ; POWERS et *al.*, 2001).

Il affecte négativement les vaisseaux causant un dysfonctionnement endothélial et des dommages vasculaires (STANGER et *al.*, 2001 ; HERRMANN et KNAPP, 2002 ; GEISEL et *al.*, 2003).

Le stress oxydatif par lequel l'Hcy peut produire un endommagement des cellules endothéliales a également été considéré comme un mécanisme dans la physiopathologie de la pré-éclampsie (ROBERTS et HUBEL, 1999).

L'HHcy médie la dysfonction endothéliale par plusieurs mécanismes :

- HHcy peut réduire la bioactivité de l'oxyde nitrique dérivé de l'endothélium (NO):

Pendant l'HHcy, la réaction de NO avec le superoxyde produit du peroxynitrite (ONOO^-), qui est un oxydant puissant (MUJUMDAR et *al.*, 2001). Plus que cela, HHcy

inhibe l'activité de la NO synthase (eNOS) en augmentant les niveaux de diméthylarginine asymétrique (ADMA), qui est un inhibiteur endogène de eNOS, conduisant à réduire la bioavabilité de No (BOGER *et al.*, 2000 ; STUHLINGER *et al.*, 2001).

- Hcy augmente le stress oxydatif et les niveaux d'espèces réactives d'oxygène (ROS):

Des niveaux élevés d'Hcy inhibent l'expression ou la fonction des enzymes anti-oxydantes (YAMAMOTO *et al.*, 2000). De plus, Hcy augmente l'activité des sources vasculaires d'O₂^{•-} (MOHAZZAB *et al.*, 1994 ; BAGI *et al.*, 2002 ; HANNA *et al.*, 2002).

- HHcy peut augmenter les composants de la cascade inflammatoire:

L'Hcy provoque une surexpression des cytokines (ex : Facteur de nécrose tumorale- α = TNF- α) (HUNT et TYAGI, 2002) conduisant à une inhibition de la vasoconstriction et donc à une altération de la fonction endothéliale. En outre, le TNF- α augmente l'activité de la NADPH oxydase provoquant, par conséquent, des niveaux supérieurs de superoxyde observés dans l'HHcy (FICHTLSCHERE *et al.*, 2001 ; FREY *et al.*, 2002).

5-2- Avortement spontané

5-2-1- Définitions

D'après la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de 1976, l'avortement spontané (AS) ou plus communément appelé « fausse-couche », correspond à l'expulsion de l'organisme maternel d'un embryon ou d'un fœtus avant 22 semaines d'aménorrhées (soit 20 semaines de grossesse) ou pesant un poids inférieur à 500g. Environ 15 % à 20 % des grossesses cliniques évoluent vers un avortement spontané (AS) (Merviel *et al.*, 2005).

Il y a l'avortement spontané précoce qu'est l'expulsion spontanée d'une grossesse de moins de 14 SA (< 14 SA), et l'avortement spontané tardive qu'est l'expulsion spontanée d'une grossesse entre 14 SA et 22 SA (≥ 14 et < 22 SA) (CAPMAS *et al.*, 2014).

Les avortements spontanés à répétition (ASR) sont définis par l'existence de trois avortements consécutifs au moins (QUENBY et FARQUHARSON, 1993).

Cependant, la société américaine de la médecine reproductrice (ASRM) a récemment redéfini ASR en tant que 2 avortements ou plus de grossesse se produisant consécutivement (VASUDHA et *al.*, 2013).

Les avortements spontanés à répétitions (ASR) concernent environ 1 % des femmes (entre 0,5 et 3 %) (GRIEBEL et *al.*, 2005).

ASR affectent 2 % à 5 % des couples sans enfant, touchant de 0,3 à 1 % des grossesses (1 couple sur 200 environ) (QUENBY et FARQUHARSON 1993)

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

L'avortement spontané à répétition du premier trimestre de la grossesse est le plus fréquent : 31,9 % avant 7 SA, 52,3 % entre 8 et 11 SA, 11,1 % entre 12 et 15 SA. Au-delà du premier trimestre, leur fréquence est de 4,7 % (2,5 % entre 16 et 19 SA et 2,2 % de 20 à 23 SA) (QUENBY et FARQUHARSON 1993).

5-2-2- Facteurs de risque

Des études épidémiologiques ont permis d'identifier certains facteurs de risque, tels l'âge maternel (≥ 35 ans) ou paternel (≥ 45 ans), et le risque de survenue d'une FCS augmente en cas de récurrence (MACONOCHIE et *al.*, 2007).

Le bilan d'ASR doit permettre de détecter les situations où un traitement préventif ou curatif peut être proposé.

L'interrogatoire recherchera des antécédents personnels ou familiaux (notamment maladies métaboliques ou auto-immunes, pathologies gynécologiques ou thrombotiques) et évaluera la qualité de l'ovulation et de la phase lutéale et à la recherche d'une cause utérine curable (BENAMMAR et *al.*, 2012).

Le bilan génétique recherchera des anomalies chromosomiques somatiques (caryotype des deux membres du couple) (BARBER *et al.*, 2010).

Les anomalies chromosomiques sont responsables de 60 % des avortements uniques et cette fréquence est d'autant plus grande que l'avortement est précoce (70 % avant 6 SA). Une anomalie chromosomique est présente chez 2 à 6 % des couples présentant des ASR (STEPHENSON, 1996) soit 10 à 20 fois plus que dans la population générale. On estime qu'il existe 6,1 % d'anomalies majeures et 2,5 % d'anomalies mineures (WARBURTON *et al.*, 1987).

Le bilan biologique évaluera la fonction endocrine, l'hémostase, ainsi que l'auto-immunité (FOKA *et al.*, 2000).

Enfin, on procédera à l'étude des paramètres spermatiques quantitatifs, mais aussi qualitatifs (morphologie, fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, FSH) et infectieux (numération des leucocytes et analyse microbiologique) (BENAMMAR *et al.*, 2012).

A l'issue de ce bilan, environ 50 % des ASR resteront inexplicables. Or, récemment, des facteurs nutritionnels ont été impliqués dans la survenue de FCS, en particulier la consommation de café, tabac, alcool, ou la prise de compléments alimentaires (MACONOCHIE *et al.*, 2007). La nutrition semble constituer un paramètre important, sur lequel il est possible d'agir. L'HHcy est également impliquée comme facteur de risque pour les ASR (WOUTERS *et al.*, 1993 ; QUERE *et al.*, 1998).

5-2-3- Physiopathologie

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

Les concentrations élevées d'Hcy ont été associées à des ASR. L'HHcy est un facteur de dégâts vasculaires qui agit en favorisant la thrombogénèse au niveau des vaisseaux placentaires (artères et veines), ce qui réduirait l'approvisionnement en sang fœtal et altérerait le cours normal de la grossesse (DE LA CALLE *et al.*, 2003).

Les AS précoce peuvent être expliqués par les dommages que l'excès d'Hcy peut provoquer sur les vaisseaux décidaux et chorioniques entraînant une implantation défectueuse de l'embryon. MEEGDES *et al.* ont mené des études histologiques qui ont montré un nombre élevé de villosités avasculaires et une réduction de la densité vasculaire des vaisseaux placentaires chez les femmes atteintes des AS précoces par rapport aux témoins (MEEGDES *et al.*, 1988 ; DE LA CALLE *et al.*, 2003).

D'autre part, NELEN *et al.* a étudié les femmes avec des ASR et a trouvé une relation directe entre les niveaux élevés d'Hcy et les altérations de la vascularisation des villosités chorioniques, qui présentaient des zones vasculaires, des périmètres et des diamètres réduits (NELEN *et al.*, 2000).

D'autre part, il a également été 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 (AERTS *et al.*, 1994 ; DE LA CALLE *et al.*, 2003).

Cette embryotoxicité de l'Hcy a été confirmée chez le rat (VANAERTS *et al.*, 1994) et le poulet (ROSENQUIST *et al.*, 1995).



Etude



expérimentale

Afin d'accéder à une analyse fines des échantillons sur le plan biochimique et génétique, un certain nombre de techniques s'imposent. En effet pour notre travail, nous avons d'abord dosé un paramètre biochimique : vitamine B12, ensuite nous avons procédé à l'extraction de l'ADN dans le but de réaliser l'analyse génétique de nos échantillons. Les analyses aussi bien biochimiques que génétiques ont été réalisées au niveau des laboratoires de biochimie et de génétique et biologie moléculaire CHU Benbadis de Constantine.

1- Populations d'étude

Notre étude est de type cas/ témoins, réalisée sur deux types de populations, l'une témoin et l'autre malade, sur un total est de 62 femmes patientes, au niveau de la maternité de Ouargla. Le période de recrutement allant du 15 février 2017 jusqu'au 31 mars 2017.

1-1- Population malade

La population malade comporte des femmes âgées de 21 à 43 ans. Elles sont recrutées du service de « grossesse à haut risque » et service « suite de couche » au niveau de la maternité de Ouargla.

❖ Critères d'inclusion

- Femmes ayant une complication de grossesse : ASR ou HTA ;
- Antécédents personnels ou familiaux à ces 2 complications.

❖ Critères d'exclusion

- Femmes ayant d'autres types de complications : diabète gestationnel, anémié gestationnel ; accouchement prématuré, grossesse extra-utérine..etc ;
- Femmes ont AS de cause connue ou un avortement provoqué ;
- Femmes avec des maladies infectieuses.

1-2- Population témoin

La population témoin est au nombre des femmes, de même catégorie d'âge et du même niveau socioéconomique que les femmes ayant des complications. Elles sont recrutées du service « suite de couche » au niveau de la maternité de Ouargla.

❖ Critères d'inclusion

- Femmes avec une grossesse normale ;
- Femmes avec un mode de vie sain.

❖ Critères d'exclusion

- Femmes ont une des complications de grossesse ;
- Femmes présentent de maladies graves ;
- Antécédentes personnels ou familiaux des complications de grossesse.

➤ Recueil des données

Un questionnaire (Annexe 1) a été réalisé afin d'enregistrer toute les informations nécessaires à notre étude avec la malade elle-même et par la consultation de son dossier médicale.

Les informations nécessaires des témoins ont été également enregistrées sur le questionnaire. Un consentement a été fait par toutes les femmes prélevées, aussi bien à complications que témoins.

Le questionnaire est relié à notre patiente par une numérotation appropriée et les tubes de prélèvement sont étiquetés par la même numérotation.

➤ Prélèvements sanguins

Le prélèvement du sang a été réalisé le matin à jeun. Le sang est recueilli dans 2 tubes :

L'un contenant l'anticoagulant EDTA pour l'extraction de l'ADN et l'étude génétique et l'autre hépariné pour le dosage de la vitamine B12 (l'extraction se fait à partir du sang total prélevé sur EDTA=Ethylène Diamine Tétra-Acétique, car un sang hépariné ne permet pas un bon rendement, l'héparine étant un inhibiteur de la Taq polymérase utilisée pour la PCR).

Ce dernier tube a été placé immédiatement dans la glace, à l'abri de la lumière ; acheminé au laboratoire de la maternité et centrifugé à froid. Les plasmas ont été ensuite

congelés à -20°C jusqu'à analyse. De même, le tube EDTA est placé dans la glace puis conservé à 4°C jusqu'à analyse.

2- Méthodes de dosage

➤ Dosage de la vitamine B12

Le dosage quantitatif de la vitamine B12 dans le plasma hépariné fait par la technique automatisée sur l'analyseur « Immulite 2000 ». Les résultats sont exprimés en (pg/ml) dont les valeurs de référence sont de 174-878 pg/ml.

- Principe

C'est un immunodosage par compétition en phase solide avec une révélation par chimiluminescence. Cette technique se déroule en deux étapes. La première étape consiste à séparer la vitamine B12 de ses protéines acceptrices et à transformer la vitamine B12 en cyanocobalamine par prétraitement de l'échantillon en milieu alcalin. La seconde étape correspond au dosage immunologique par compétition proprement dit (Figure 7) (COLOMBIER et *al.*, 2002).

-Technique

- Première étape :

La vitamine B12 de l'échantillon est séparée des protéines porteuses et transformée en cyanocobalamine au cours d'un cycle automatisé de 60 minutes à 37°C par prétraitement de l'échantillon en milieu alcalin, en présence de dithiothréitol (DTT) et de cyanure de potassium (KCN) (COLOMBIER et *al.*, 2002).

-Seconde étape :

L'échantillon prétraité est transféré dans un godet réactionnel contenant une bille de polystyrène (la phase solide) recouverte de vitamine B12 ; il est alors mis en présence de facteur intrinsèque de porc purifié (HIF) et d'un anticorps monoclonal anti-facteur intrinsèque de porc marqué par la phosphatase alcaline (une enzyme qui amplifie la chimiluminescence pour la détection d'antigène) (phase I) (Figure 7).

La réaction immunologique est réalisée au cours d'un cycle d'incubation de 60 minutes à 37 °C (phase II) pendant lequel la vitamine B12 présente dans l'échantillon entre en compétition avec la vitamine B12 fixée sur la bille pour se lier avec le facteur intrinsèque de porc purifié (HIF) (Figure 7).

L'anticorps anti-facteur intrinsèque marqué par la phosphatase alcaline va se fixer à la fois sur le facteur intrinsèque fixé sur la vitamine B12 présente dans l'échantillon et sur celui lié à la vitamine B12 qui recouvre la bille de polystyrène (COLOMBIER *et al.*, 2002).

Un lavage par centrifugation axiale permet de séparer les formes libres (non fixée sur la bille) et liée (fixée sur la bille). Le substrat chimiluminescent est alors ajouté. La quantité de lumière émise est donc inversement proportionnelle à la concentration de vitamine B12 présente dans l'échantillon (Figure 7) (COLOMBIER *et al.*, 2002).

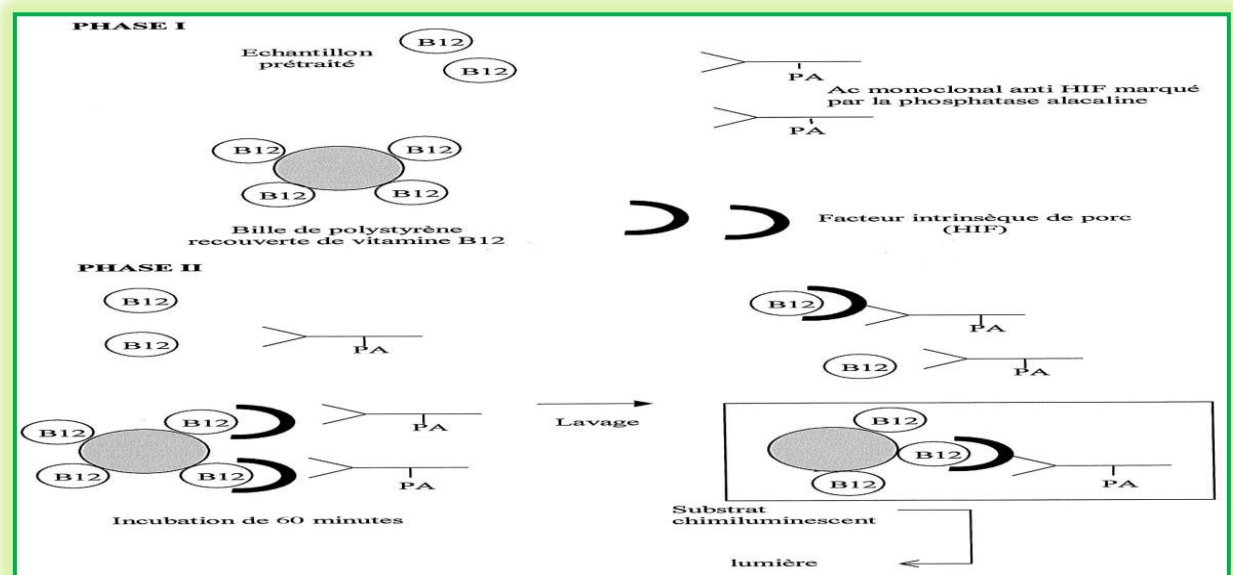


Figure 7 : Principe de l'immunodosage de la vitamine B12 sur l'Immulite 2000 (COLOMBIER *et al.*, 2002).

Phase I : mise en présence de l'ensemble des différents réactifs. *Phase II* : incubation avec formation des complexes antigène-anticorps, séparation par lavage et révélation.

3- Etude moléculaire

Notre étude moléculaire s'est effectuée selon deux étapes : extraction d'ADN suivit d'une recherche de mutation A2756G du gène de la MS.

3-1- Extraction d'ADN

- *Principe*

L'ADN de chaque patient est extrait à partir de leucocytes du sang recueillis sur tube EDTA, suivant la technique au NaCl.

Les leucocytes sont séparés du sang total par lyse hypotonique et traités ensuite par un détergent (SDS) et une protéinase K. L'ADN nucléaire est libéré dans le milieu et les protéines qui lui sont associés sont digérées et éliminées par précipitation au NaCl. La pelote d'ADN est formée dans le surnageant par précipitation avec l'éthanol (Annexe 2).

- *Technique*

Les étapes de l'extraction sont les suivantes :

➤ *Lyse des globules rouges*

Dans un tube Falcon de 50 mL; le sang est complété à 25 mL avec du TE 20 :5 (Annexe2) est mis dans la glace durant 10 min. Il est homogénéisé puis centrifugé pendant 10 min à 3900 tour/min. A l'issue de la centrifugation, le surnageant est déversé.

Le TE 20 :5 est ensuite ajouté au culot, le tout est agité et laissé 10 min dans la glace puis centrifugé dans les mêmes conditions que la première fois. Ensuite le surnageant est encore une fois déversé pour obtenir du « culot de leucocytes ».

➤ *Extraction de l'ADN*

Ajouter 3 ml de tompon de lyse au culot leucocytaire, ensuite 200 µL de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) à 10% puis 100 µL de protéinase K et laisser le tube agiter sur une roue à 37°C une nuit.

Le lendemain, refroidir le tube dans la glace pendant 5min, ajouter 1 ml de NaCl 4M et agiter vigoureusement à la main. Remettre le tube dans la glace pendant 5 min (précipitation des protéines), puis centrifuger 5 min à 3900 tour/min.

Après, récupérer le surnageant dans un tube Falcon de 50ml, et ajouter deux fois son volume d'éthanol absolu préalablement refroidi et agiter en retournant le tube plusieurs fois « la pelote d'ADN » se forme. Enfin, récupérer la pelote d'ADN avec une pipette pasteur et la rincer 2 fois dans l'éthanol à 70 % et mettre la pelote dans un tube Nunc.

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

- **Détermination de la pureté**

Les longueurs d'onde d'absorption des acides nucléiques et des protéines sont respectivement 260 nm et 280 nm

Le rapport DO 260 nm/DO 280 nm est utilisé pour s'assurer de la pureté d'ADN de tout contaminant d'ADN soit protéine ou ARN.

On considère que :

- L'ADN est suffisamment pur lorsque le rapport $R = DO_{260} / DO_{280}$ est compris entre 1,6 et 2 ($1,6 < R \leq 2$).
- L'ADN est contaminé par les protéines si : $DO_{260} / DO_{280} < 1,6$.
- L'ADN est contaminé par les ARN si : $DO_{260} / DO_{280} > 2$.

Si l'ADN est contaminé il faut procéder à la réextraction d'ADN pour un bon usage et un bon résultat dans l'étape suivante de la PCR. Enfin l'ADN pur est conservé à +4°C jusqu'à utilisation.

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

La concentration de l'ADN est déterminée directement par spectrophotométrie. La densité optique à 260 nm permet de calculer la concentration de l'ADN sachant que:

1 unité de DO260 nm = 50 µg/mL d'ADN double brin

La concentration de l'ADN en µg/mL = facteur de dilution x DO 260 x 50 µg / ml.

3-2- Recherche de la mutation A2756G du gène MS

La mutation A2756G du gène de la MS (rs1805087) a été déterminée par la méthode PCR/RFLP. L'exon cible amplifié par PCR (réaction de polymérisation en chaîne) est analysé par RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction).

Trois étapes successives sont effectuées :

- Amplification de l'ADN par PCR et contrôle du produit de PCR sur un gel électrophorétique;
- Digestion du produit de « PCR » par l'enzyme de restriction *Hae III* ;
- Une migration électrophorétique sur gel d'agarose pour la séparation des produits de digestion.

3-2-1- Amplification par PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique de répllication ciblée *in vitro*, mise au point par Karry Mullis en 1985.

-Principe

Le principe de la PCR est la synthèse de multiples copies d'une séquence d'ADN spécifique. Elle consiste à effectuer « n cycles » successifs d'amplification, au cours desquels deux amorces dirigent l'amplification du fragment d'ADN double brin qu'elles encadrent (MULLIS et FALOONA, 1987).

Un cycle d'amplification est composé de trois étapes : dénaturation, hybridation et élongation.

-Technique

Un milieu réactionnel (un mix de PCR) est préparé comprenant : des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP 2.5mM), une enzyme d'amplification *in vitro*

(Taq polymérase), un environnement réactionnel (tampons, MgCl₂, H₂O) et deux amorces oligonucléotidiques. Les amorces utilisées sont:

Sens MS1 = 5'CATGGAAGAATATGAAGATATTAGAC3'

Antisens MS2 = 5'GAACTAGAAGACAGAAATTCTCTA3'

| Mix de PCR | µl/test |
|--------------------------|---------|
| Tampon 10X | 5 |
| MgCl₂ | 3 |
| DNTP | 10 |
| Oligo F(Forward) | 1 |
| Oligo R (reverse) | 1 |
| H₂O | 27.76 |
| 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).

Ensuite, le déroulement des cycles de la PCR a été assuré par le thermocycleur et les conditions d'amplification étaient comme suit : une dénaturation initiale à 95°C pendant 2 min, suivie de 35 cycles de PCR, comprenant chacun une dénaturation à 94 °C pendant 40 s, une hybridation à 50 °C pendant 40s et une élongation à 72 °C pendant 1min et enfin une élongation finale à 72°C pendant 10 minutes.

-Contrôle de PCR

Le contrôle de la PCR s'effectue par une électrophorèse sur un gel d'agarose 1.5 % (Annexe 3) (1.5g d'agarose et 100 ml du TBE 1X (Annexe 2)) additionné de 10 µL du BET (Bromure d'éthidium).

Dans chaque puit du gel, 10 μL de produit d'amplification est déposé en présence de 3 μL du colorant Bleu de Bromophénol (BBP) qui permet de suivre le front de migration. Parallèlement un échantillon sans ADN (blanc), est inclus dans la série à amplifier et sert de control négatif (Figure 8).

Le dépôt se fait du côté cathode (-) et le système est soumis à une migration sous un courant de 90 à 120 volts pendant 45 min.

Après la migration, le gel est soumis au rayon l'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 de même taille (Figure 8).

Ce control permet aussi de vérifier si une éventuelle contamination de l'ADN est survenue au cours de la PCR grâce au puit contenant le blanc.

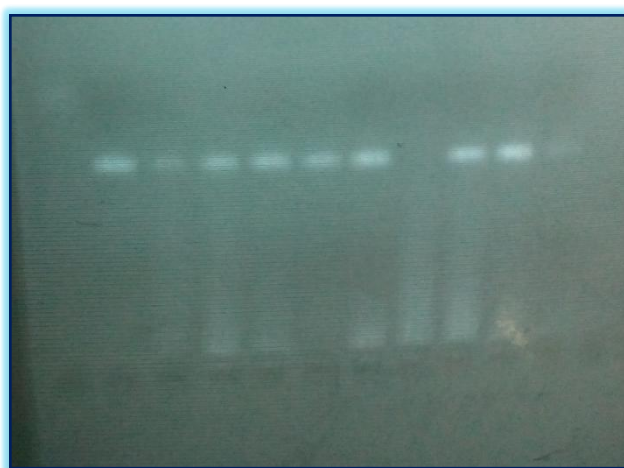


Figure 8: Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % des fragments amplifiés par PCR du gène de la MS.

3-2-2- Digestion des produits de PCR

- Principe

Le RFLP reflète une différence (un polymorphisme) au niveau d'un site particulier de reconnaissance de l'enzyme 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. La variabilité d'un site de restriction se manifeste par la présence ou l'absence de celui-ci, ce qui se traduit par un polymorphisme des longueurs des fragments de restriction.

La mutation A2756G crée un site de restriction reconnu par l'enzyme de restriction HaeIII (source : *Haemophilus aegyptius*), dans une séquence de 189 pb du gène MS amplifiée.

La digestion enzymatique a donné des fragments : 159 pb, 189 pb et 23 pb, le premier apparaît sur le profil électrophorétique sous forme d'une seule bande qui correspond au type homozygote muté (génotype GG). Le deuxième apparaît aussi sous forme d'une seule bande, il s'agit du type homozygote sauvage (normale) (génotype AA).

Les deux bandes ensemble, correspondent au type hétérozygote (génotype AG). La troisième bande n'est pas visible à cause de son intensité trop faible.

-Technique

Les produits de PCR sont soumis à une digestion enzymatique par l'enzyme de restriction Hae III. Le mix de digestion contient un tampon, l'enzyme de restriction, et l'H₂O.

| Mix de la digestion | µl/test |
|---------------------|---------|
| Tampon 10X | 2 |
| Hae III | 1 |
| H ₂ 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)..

3-2-3-Electrophorèse des produits de la digestion

Les fragments d'ADN digérés par l'enzyme de restriction sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 3% (Annexe 3) (3g d'agarose + 100ml du TBE1X) additionné de 10µl du bromure d'éthidium (BET).

10 μ l du produit de la digestion sont mélangés à 3 μ l de BBP, déposés dans les puits creusés dans le gel du côté de la cathode qui vont migrer vers l'anode sous un champ électrique et leurs vitesses dépendent de leurs tailles.

Plus le fragment a une taille élevée, moins la migration électrophorétique par rapport aux puits sera importante. A l'opposé, les fragments de petites tailles auront une distance de migration plus élevée.

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



Figure 9 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 3% des fragments issus de digestion par Hae III présentant différents géotypes de la MTHFR.

4- Analyses statistiques :

Le calcul de la moyenne et de l'écart-type a été réalisé par les deux formules suivantes en utilisant Excel :

La moyenne :

$$X_a = \frac{\sum x}{n_a}$$

L'écart-type :

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x - x_a)^2}{n_a - 1}}$$

I- Etude descriptive des malades et des témoins

L'échantillon de la présente étude regroupe 62 femmes : 31 malades (14 femmes avec ASR, 10 femmes avec HTA et 7 femmes avec PE) et 31 témoins.

I-1- Moyenne d'âge

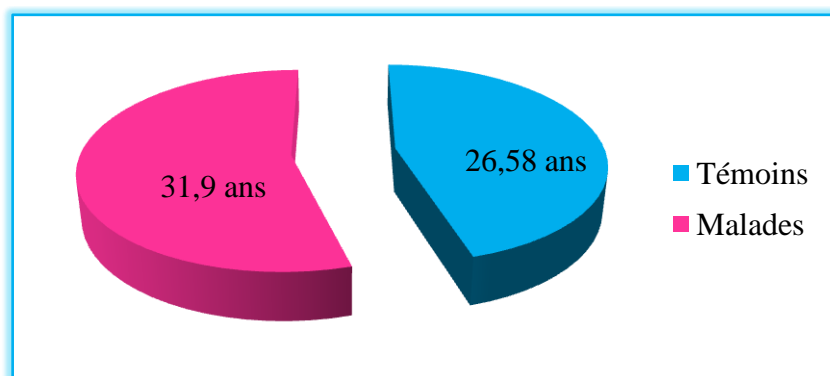


Figure 10 : Représentation graphique de moyenne d'âge des deux populations d'étude.

La figure ci-dessus représente les moyennes d'âge des malades et des témoins.

La moyenne d'âge est de $31,9 \pm 7,02$ ans chez les malades avec des extrêmes de 17 – 43 ans et de $26,58 \pm 4,15$ ans chez les témoins, avec des extrêmes de 19 – 33 ans.

I-2- Répartition par tranches d'âge

Tableau 4 : Répartition des malades et des témoins par tranches d'âge.

| Age (ans) | Malades (n %) | Témoins (n %) |
|---------------|------------------|------------------|
| 16 – 21 | 3 (09,69%) | 5 (16,13%) |
| 22 – 27 | 8 (25,80%) | 14 (45,16%) |
| 28 – 33 | 7 (22,58%) | 11 (35,48%) |
| 34 – 39 | 8 (25,80%) | 1 (03,23%) |
| 40 – 45 | 5 (16,13%) | 0 (00,0%) |
| Totale | 31 (100%) | 31 (100%) |

Le tableau ci-dessus présente la répartition des malades et des témoins par différentes tranches d'âge.

La répartition de nos deux populations d'étude est comme suit :

Chez les témoins, la fréquence des femmes la plus élevée présente dans les tranches d'âge de 22-27 ans et 28-33ans (45,16% et 35,48%, respectivement). Dans les 2 catégories d'âge 34- 39 ans et 40-45, le nombre des femmes est de 1(3,23%) et 0(00,0%).

Chez les malades, la distribution des femmes est de 25,8%, 22,58% et 25,8% femmes pour les tranches d'âge de 22-27 ans, 28-33 ans et 34- 39 ans, respectivement, et 5femmes (16,13%)dans la tranche d'âge de 40-45.

Une augmentation observable du risque des complications : ASR, HTA et PE chez les femmes dans les tranches d'âge de 34-39 ans et 40-45 ans de notre population : 41,93% femmes pour la population malade contre 3,23% femmes pour la population témoins dans ces tranches d'âge. Nos résultats sont en bon accord avec les données de la littérature où l'âge maternel avancé augmente la chance de survenue de ces complications.

En effet, dans la majorité des études, nous observons une augmentation de la morbidité maternelle et fœtale avec l'âge (YOGEV et *al.*, 2010 ; SCHOEN et ROSEN, 2009).

Ces études ont considéré l'âge maternel avancé comme étant un âge supérieur à 35 ans lors de l'accouchement, il constitue l'âge de référence de la plupart des études (BERKOWITZ et *al.*, 1990 ; ZIADEH, 2002 ; FOX et *al.*, 2009 ; ALSHAMI et *al.*, 2010 ; BAYRAMPOUR et HEAMAN, 2010).

Une augmentation de l'apparition de l'HTA pendant la grossesse à partir de 35 ans est notée dans de nombreuses études (BELAÏSCH-ALLART et *al.*, 1991 ; GILBERT et *al.*, 1999 ; BELAÏSCH-ALLART et *al.*, 2008). Celle de BIANCO et al. (1996) et GILBERT et al. (1999) observent une augmentation de l'HTA et de la PE après 40 ans.

L'étude la plus importante en termes d'effectifs, celle de LUKE et BROWN (2007), conclut elle aussi sur une augmentation du risque d'HTA avec l'âge. Une autre étude plus

récente d'ANDRIANTOKY et al. (2014) note aussi cette relation entre l'âge maternel élevée l'HTA et la PE.

Par ailleurs, des études épidémiologiques ont permis d'identifier l'âge maternel (≥ 35 ans) comme facteur de risque pour les ASR (DE LA ROCHEBROCHARD et THONNEAU, 2002 ; SLAMA et al., 2005).

ROZENBAUM (2003) de sa part, a mis en évidence un arrêt très précoce des grossesses dans 92 % des cas à 38 ans contre 48 % à 18 ans.

Selon CLEARY-GOLDMAN et al. (2005) et LAUFER et al. (2004), le taux d'AS augmente avec l'âge maternel et ce risque est multiplié par 2 ou 3. De son côté, MILETIC (2002) note 20 % d'AS à 40 ans et plus dans sa série d'échantillons.

L'élévation du taux d'aberrations chromosomiques avec l'âge est bien connue et peut être une explication des ASR. Les études sont montrées qu'au moins 60 % des avortements sont liés à des anomalies chromosomiques. Le risque de survenue d'anomalie chromosomique est estimé à 1,6 % à 38 ans, 2,21 % à 40 ans et 4 % à 42 ans (BOUE, 1975 ; SIFROI et MOLINA-GOMES, 1991 ; BELAISCH-ALLART et al., 2008). L'association observée pourrait être le résultat de la diminution de la fonction utérine et hormonale avec l'âge (HASSOLD et CHIU, 1985 ; CANO et al., 1995 ; NYBO ANDERSEN et al., 2000 ; KHOSHNOOD et al., 2008).

1-3- Comparaison entre ASR et HTA/PE selon les tranches d'âge

Tableau 5 : Répartition des malades selon le type de complication et les tranches d'âge.

| Tranche d'âge | ASR | HTA/PE |
|---------------|--------------|--------------|
| 16 – 21 | 3 (4,84 %) | 0 (00,0 %) |
| 22 – 27 | 3 (4,84 %) | 5 (8,06 %) |
| 28 – 33 | 3 (4,84 %) | 4 (6,45 %) |
| 34 – 39 | 3 (4,84 %) | 5 (8,06 %) |
| 40 – 45 | 2 (3,23 %) | 3 (4,84 %) |
| Totale | 14 (22,59 %) | 17 (27,41 %) |

Le tableau ci-dessus présente la répartition des malades selon le type de complication et les tranches d'âge par rapport à la population totale de notre étude.

Afin de comparer l'effet de l'âge sur les deux complications, notre étude montre 13 femmes malades (20,97%) parmi la totalité des femmes (malades et témoins) qui ont un âge entre 35 ans comme valeur minimale et 45 ans comme valeur maximale, dont 8 (12,9 %) sont avec HTA/PE et 5 (8,07 %) ont fait des ASR.

Ce constat nous permet de proposer qu'avec l'âge le risque de survenue d'HTA/PE est plus élevé par rapport à l'ASR.

Selon l'étude de GOLDMAN et al. (2005) le risque des ASR est de 1,5% chez des femmes d'âge \geq a 35ans alors que selon PRYSAK et al. (1995) pour des femmes d'âge \geq 35ans le risque d'HTA est de 2,7%. Ces résultats sont cohérents avec les nôtres.

L'âge élevé est un facteur de risque indépendant de complications, si bien que lorsqu'il est associé aux autres facteurs, les femmes sont exposées à des risques significativement plus élevés de complications maternelles et périnatales.

I-4- Nombre de grossesse et d'avortement des malades et des témoins

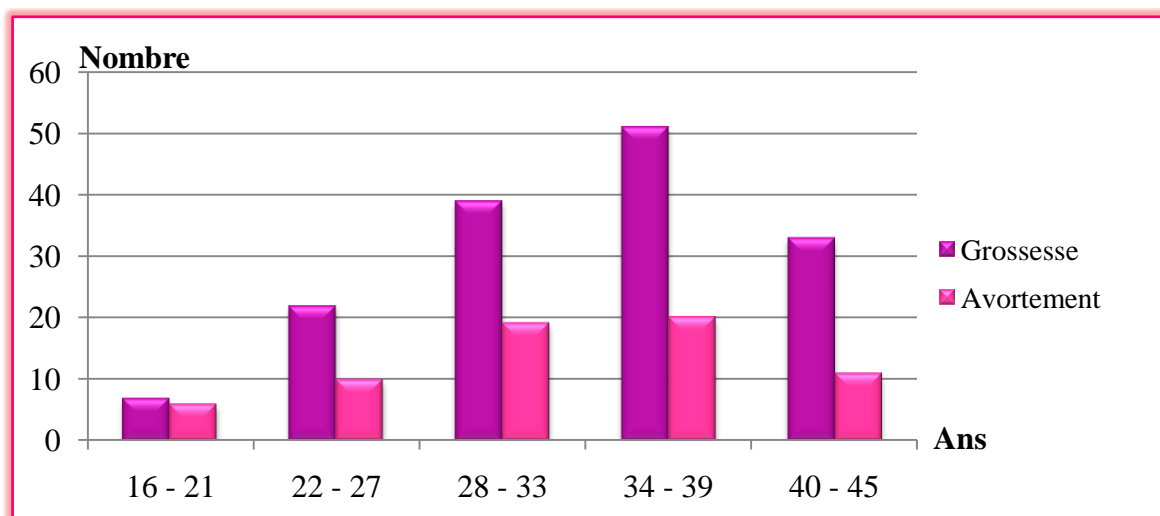


Figure 11: Présentation graphique de la répartition de nombre de grossesse et d'avortement selon tranches d'âge pour les malades.

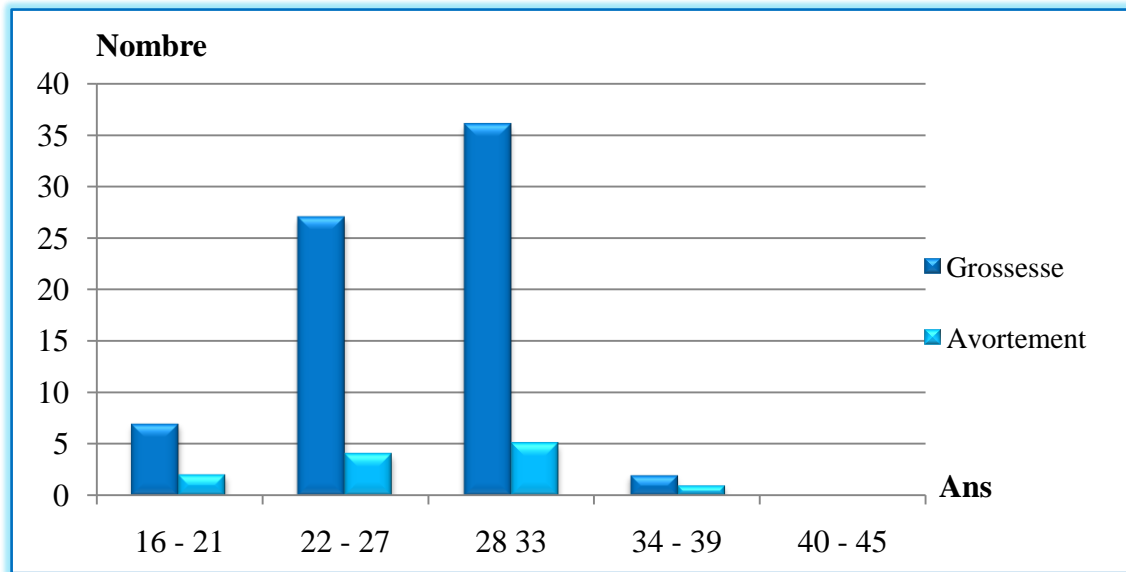


Figure 12 : Présentation graphique de la répartition de nombre de grossesse et d'avortement selon tranches d'âge pour les témoins.

Les deux figures représentent la répartition de nombre de grossesse et d'avortement selon les tranches d'âge des malades et des témoins.

Nous observons que, dans notre étude, le nombre de grossesses chez les malades est de 152 grossesses dont 66 (43,42%) sont avortées (Figure 9). Chez les témoins le nombre de grossesses est de 72 grossesses dont 12 (16,66%) sont avortées (Figure 10).

Nous constatons que plus le nombre de grossesse est élevé, plus le risque d'avortement augmente, et plus la femme a fait des avortements antérieurs, le risque de répétition augmente aussi. L'augmentation du risque d'AS avec le nombre d'accidents antérieurs est un argument en faveur de la réalité d'ASR.

De même, plusieurs études ont constaté que le taux des AS augmente avec le nombre d'avortements antérieurs (REGAN et al., 1989 ; STIRRAT, 1990 ; MACONOCHIE et al., 2007 ; BENAMMAR et al., 2012).

Selon l'étude de GUPTA et al. (2007) chez une patiente ayant eu deux AS, la possibilité que cela se reproduise est de 23 % à 30 %. Après trois avortements spontanés, le taux est de 29 % à 33 % et après quatre, de 30 % à 40 %.

Selon TESSAROLO et al. (1997), la fréquence élevée des avortements avec le nombre élevé de grossesses s'explique par des modifications structurales de l'utérus. L'étude de LEJEUNE (2003) indique aussi que l'existence d'antécédents d'ASR, représente un facteur de risque de pathologie placentaire pendant les grossesses ultérieures.

Avec la multiplication du nombre de grossesses, les fibres musculaires utérines dégèrent et sont remplacées plus ou moins rapidement par des fibres conjonctives. Cette transformation conjonctive détermine une « élasticité » des parois utérines aboutissant à une facile accommodation de celle-ci aux diverses présentations. Par ailleurs, elle est responsable lors de la parturition, de troubles de la dynamique utérine (à type d'hypocinésie) (SACKO, 2010).

D'autres auteurs décrivent des modifications du tissu inter fasciculaire qui se développerait après chaque accouchement comme la cicatrice fibreuse de « micro- ruptures musculaires » (LEWIN et al., 1985). D'une façon générale, chez les multipares (femme ayant eu deux ou plusieurs accouchements), l'appareil génital se transforme et « vieillit » plus vite que le reste de l'organisme. Ainsi la musculature de l'utérus est modifiée par la fibrose, avec parfois même des zones de dégénérescence vasculaire (SACKO, 2010).

1-5- Obésité

Tableau 6 : Représentation de moyenne de poids chez les malades et les témoins.

| Poids | Malades | Témoins |
|------------------------|---------------|---------------|
| Moyenne | 71,62 ± 13,05 | 66,32 ± 11,05 |
| Femmes à poids ≥ 80 Kg | 09 (29,03%) | 03 (9,67%) |

Le tableau ci-dessus présente les moyennes de poids des deux populations et le nombre des femmes avec un poids supérieur au égale au 80Kg.

La moyenne de poids chez les malades est de 71,62 ± 13,5 dont le poids le plus faible est de 49 Kg alors que le plus élevée il est de 104 Kg. Chez les témoins, elle est de 66,32 ± 11,05 avec un poids faible de 46 Kg et un poids élevée de 96 Kg (Tableau 6).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la définition de l'obésité repose sur l'indice de masse corporelle (IMC) ou indice de Quetelet, défini par le rapport entre le poids (en kilogrammes) et la taille (en mètre) élevé au carré. Un IMC compris entre 26 et 29 traduit un surpoids, un IMC supérieur à 30 correspond à une obésité et un IMC supérieur à 39 traduit une obésité morbide (OMS, 1997).

Dans notre étude, le manque des informations nécessaires (les valeurs des tailles) pour le calcul de cet indice nous empêche de déterminer les femmes obèses mais en se basant sur le poids, nous remarquons que presque un tiers des femmes à risque possèdent un poids ≥ 80 Kg pouvant ainsi représenter un facteur de risque dans notre population.

En effet, ODEGÅRD et al. (2000) en comparant à un poids inférieur à 60 kg, le risque était représenté par un OR de 1,9 [1,2 - 3,0] pour un poids entre 70-79 kg et un OR 3,0 [1,7 - 5,3] pour un poids ≥ 80 kg.

L'obésité a des conséquences néfastes sur la fonction reproductive et c'est l'une des facteurs de risque des complications de grossesse. Selon BELLVER et al. (2003) le surpoids est un facteur de risque indépendant pour l'AS dans le premier trimestre de la grossesse.

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).

Aussi bien, selon plusieurs études, l'association d'un surpoids maternel, d'une HTA chronique et d'une augmentation du risque de pré-éclampsie est décrite de longue date. (CEDERGREN, 2004 ; WEISS et al., 2004 ; VILLAR et al., 2006 ; DUCARME et al., 2007). Un poids élevé avant la grossesse augmentait le risque de PE (ODEGÅRD et al., 2000).

L'augmentation du risque de PE et d'HTA chez les femmes pourrait être une conséquence de l'augmentation de la réabsorption hydrosodée et de l'effet sympathomimétique dû à l'hyper insulinémie. L'existence de phénomènes inflammatoires ainsi que des taux élevés de triglycérides pourraient également jouer un rôle (BODNAR et al., 2005).

II- Analyse biochimique

➤ Vitamine B12

Tableau 7 : moyennes et médianes du taux de vitamine B12 pour les malades et les témoins.

| Valeur (pg/ml) | Malades | Témoins |
|----------------|-----------------|----------------|
| Moyenne | 438,87 ± 182,48 | 343,97 ± 62,63 |
| Médiane | 377 | 335 |

Le tableau ci-dessus représente la moyenne de taux de vitamine B12 chez les malades et les témoins.

Les analyses statistiques de nos résultats ont permis d'enregistrer des valeurs de la vitamine B12 qui se situent dans les limites de la normale 174 - 878 pg /ml (438,87 pg /ml pour les malades et 343,97 pg/ml pour les témoins) (Tableau 7).

D'après nos résultats, nous n'avons pas révélé une carence plasmatique en vitamine B12 ni chez les malades ni chez les témoins.

De même, deux études sur la vitamine B12 chez les femmes pré-éclamptiques n'ont pas observé d'association entre le risque de cette complication et la faible concentration en vitamine B12 dans le sérum (RAJKOVIC et al., 1997 ; POWERS et al., 1998).

LACHMEIJER et al. (2001) et MAKEDOS et al. (2007) de leur part, ont montré que les niveaux de vitamines B12 et d'acide folique n'étaient pas significativement différents entre les groupes pré-éclamptiques et les témoins.

Dans une revue systématique de MIGNINI et al. (2005) les concentrations de folate et de B12, certes, étaient plus faibles chez les femmes pré-éclamptiques que chez les femmes normales, mais la différence n'était pas significative.

Concernant les ASR, Nos résultats concordent avec ceux de SUTTERLIN et al. (1997) et NELEN et al. (2000) qui n'ont pas trouvé d'association entre ce type de complication et une

carence en cette vitamine. Cependant, plusieurs études ont révélé une diminution du taux de la vitamine B12 chez les femmes ayant fait des ASR (WOUTERS *et al.*, 1993 ; BENNETT, 2001 ; SIKORA *et al.*, 2007).

Dans une étude récente de HUBBNER *et al.* (2013) menée sur des femmes syriennes qui ont fait des ASR, les chercheurs ont confirmé la présence de faibles taux de vitamine B12. Ils ont trouvé une prévalence de carence en vitamine B12 autour de 38,4%.

Dans la présente étude, une déficience en folate ne peut être considérée comme responsable de ces complications chez les femmes à risque de notre échantillon.

III- Etude génétique

➤ Répartition de la fréquence de l'allèle G muté de la mutation A2756G du gène de la MS à travers le monde.

Le tableau montre la distribution de l'allèle muté G dans notre population de référence comparée à celles d'autres groupes ethniques.

Tableau 8: Fréquence de l'allèle G dans les populations générales à travers le monde.

| Auteur | Année | Pays | Fréquence de l'allèle G |
|--------------------------|-------|------------|-------------------------|
| PRÉSENTE ÉTUDE | 2017 | Algérie | 0,00 |
| JOHANNING et al | 2000 | Etats-Unis | 0,09 |
| AL FARRA et al | 2010 | Jordan | 0,10 |
| DE MARCO et al | 2002 | Italien | 0,15 |
| VAN DER PUT et al | 1997 | Pays-Bas | 0,16 |
| CHRISTENSEN et al | 1999 | Canada | 0,20 |
| O'LEARY et al | 2005 | Irlande | 0,20 |
| CANDITO et al | 2008 | Français | 0,20 |
| GOS et al | 2004 | Pologne | 0,22 |

Nous observons que la fréquence de l'allèle muté G est variable selon les ethnies, mais reste rare. Elle est nulle dans notre population d'étude et très faible dans les différentes populations du monde (Tableau 8).

➤ **Répartition des fréquences génotypiques et alléliques de la mutation A2756G du gène de la MS chez les malades et les témoins**

Tableau 9: Fréquences génotypiques et alléliques de A2756G du gène MS pour malades et témoins.

| Génotype/allèle | Malades n (%) | Témoins n (%) |
|------------------|------------------|------------------|
| Génotypes | | |
| AA | 25 (80,65 %) | 23 (100 %) |
| AG | 4 (12,9 %) | 0 (00,0%) |
| GG | 2 (6,45 %) | 0 (00,0%) |
| Allèles | | |
| A | 0,87 (87%) | 100 % |
| G | 0,12 (12 %) | 0 % |

La distribution des génotypes de la mutation A2756G du gène de la MS est statistiquement différente chez les deux groupes d'étude (témoins et malades) :

Chez les témoins, l'analyse génétique a révélé que les fréquences génotypiques étaient 100% pour homozygote sauvage (normal) (AA) et 0% pour hétérozygote mutés (AG) et homozygote mutés (GG) (Tableau 9).

Chez les malades, la mutation du gène A2756G de la MS est trouvée chez 6 femmes, les génotypes AG et GG mutés incluent respectivement 4 (26.4%) et 2 (14.28%) malades (Tableau 9).

En ce qui concerne les fréquences alléliques, chez les malades, la fréquence de l'allèle A est égale à 87 % alors que pour l'allèle G, elle est de 12%. Par ailleurs, chez les témoins, la fréquence de l'allèle A est égale à 100%, l'allèle G étant totalement absent (Tableau 9).

Tableau 10 : Fréquences génotypiques des malades avec ASR.

| | AA | AG | GG |
|---------|------------|-----------|------------|
| Malades | 9 (64,28%) | 3 (21,4%) | 2 (14,28%) |

Tableau 11 : Fréquences génotypiques des malades avec HTA/PE.

| | AA | AG | GG |
|---------|------------|-----------|-----------|
| Malades | 16 (94,1%) | 1 (5,88%) | 0 (00,0%) |

Les 2 tableaux ci-dessus montrent que parmi les femmes possédant la mutation, 5 femmes ont fait des ASR (83.3 %) et une femme avec PE (16.66%).

Dans la présente étude, on a évalué l'association du polymorphisme MS A2756G avec le risque des complications de grossesses à savoir l'ASR et l'HTA/PE dans une population Algérienne.

Sur base de nos résultats, on suggère que la mutation A2756G de la MS et un facteur de risque pour l'apparition des ASR et de PE dans notre population. Le risque est plus élevé chez les femmes ayant des ASR par rapport aux femmes avec PE. Notre résultat réplique celui trouvé récemment par JI HYANG KIM et al. (2013).

La MS est une enzyme dépendante de la vitamine B12, elle joue un rôle clé dans le maintien de la valeur normale d'Hcy (MA et al., 1999).

Les mutations de la MS peuvent produire une diminution de l'activité de l'enzyme et par conséquent une élévation de taux d'Hcy et donc l'apparition d'une HHcy (ROZEN, 2001).

Plusieurs études ont établi la relation entre les HHcy comme un facteur de risque pour les ASR (NELEN et al., 2000 ; DEL BIANCO et al., 2004 ; D'UVA et al., 2007 ; DODDS et al., 2008).

Egalement, VUKOVIC BOBIC et al. (2016) citent les différentes études en relation avec la PE et l'HHcy :

Dans l'étude de POWERS et al. (1998) les taux moyens d'Hcy étaient significativement élevés ($p < 0,04$) chez les femmes ayant une pré-éclampsie par rapport au groupe témoin ($9,7 \mu\text{mol} / \text{L}$ contre $7,0 \mu\text{mol} / \text{L}$). Des résultats similaires ($6,7 \mu\text{mol} / \text{L}$ contre $3,8 \mu\text{mol} / \text{L}$; $p < 0,01$) ont également été rapportés par LAVIOURI et al. (1999).

RAJKOVIC et al. (1999) a mené une étude sur les femmes africaines et a constaté que le risque de développer la pré-éclampsie était 4 fois plus élevé chez les femmes ayant des niveaux d'Hcy plus élevés, tandis que SORENSEN et al. (1999) a démontré que le risque respectif était de 3,2 fois plus élevé.

MAKEDOS et al. (2007) a comparé les taux d'Hcy chez un groupe de femmes enceintes pré-éclampsies et des témoins indemnes. Ils ont constaté que le taux moyen d'Hcy augmentait significativement dans le premier cas ($11,11 \mu\text{mol} / \text{L}$ contre $6,40 \mu\text{mol} / \text{L}$, $p < 0,001$).

La régulation du métabolisme de l'homocystéine est complexe. Nous n'avons observé aucune déficience en vitamine B12 , cependant, l'étude du polymorphisme A2756G nous a permis d'estimer que 19.35% de femmes possédant des complications portent la mutation. Nous envisageons la possibilité d'une perturbation dans le métabolisme de l'homocystéine chez les femmes à risque dans notre population.



Conclusion

Conclusion

De nombreux facteurs favorisent la survenue des ASR et d'HTA/PE chez les femmes au cours de la grossesse.

Dans notre étude cas-témoin, nous nous sommes intéressés à l'effet d'un facteur biochimique qui est la carence en vitamine B12 ainsi que l'effet d'un facteur génétique, à savoir la mutation A2756G du gène de la MS sur la survenue de ces complications.

Nos résultats montrent que le taux de la vitamine B12 chez les femmes à complications n'est pas déficient et demeure dans les normes physiologiques. Ce qui nous permet de suggérer que la carence en cette vitamine ne présente pas un facteur de risque important pour les ASR et l'HTA/PE dans notre population d'étude

Par ailleurs, une association entre le polymorphisme MS A2756G et le risque des complications de grossesse notamment les ASR est observée dans notre population. Nous suggérons, ainsi, une perturbation de la voie de reméthylation de l'homocystéine chez les femmes à risque.

Enfin, il est nécessaire de connaître les facteurs de risque et d'identifier les patients à risque pour ces complications afin de limiter l'incidence, la morbidité et la mortalité.

Dans la continuité de ce travail de recherche, il serait intéressant :

- D'augmenter le nombre d'échantillons (malades et témoins).
- De doser les autres paramètres biochimiques qui interviennent dans le métabolisme de l'Hcy : folate, vitamine B6, transcobalamine..etc.
- D'étudier les autres polymorphismes du gène MS, la mutation de protéine de transport de vitamine B12 « la transcobalamine » (TCN C776G) et aussi les polymorphismes des autres gènes d'enzymes de métabolisme d'Hcy (MTHFR et CBS).



Références



bibliographiques

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.

ACOG PRACTICE BULLETIN (2002). Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet.* 77(1):67-75.

AERTS LAGJM, VAN KLAASBOER HH, POSTMA NS, PERTIJS JCLM, COPIUS PEERBOOM JHJ, ESKEES TKAB (1994). Stereospecific in vitro embryotoxicity of L-homocysteine in pre and post-implantation rodent embryos. *Toxicol In Vitro.* 56:154–7.

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

ALSHAMI HA, KADASNE AR, KHALFAN M, IQBAL SZ, MIRGHANI HM (2010). Pregnancy outcome in late maternal age in a high-income developing country. *Arch Gynecol Obstet* 2011. 284:1113-6.

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS (ACOG) (2013). Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obst et Gynecol.* 122: 1122–31.

ANDRÈS E, AFFENBERGER S, VINZIO S, NOËL E, KALTENBACH G, SCHLIENGER JL (2005). Carences en vitamine B12 chez l'adulte : étiologies, manifestations cliniques et traitement. *Rev Med Interne.* 26:938-46.

ANDRES E, DALI-YOUCHEF N, VOGEL T et al., (2009). Oral cobalamin (vitamin B12) treatment. An update. *Int J Lab Hematol.* 31 (1) : 1-8.

ANDRES E, GOICHOT B, SCHLIENGER JL (2000). Food cobalamin malabsorption: a usual cause of vitamin B12 deficiency. *Arch Intern Med.* 160:2061-2.

ANDRES E, LOUKILI NH et al., (2004). Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *Cmaj.* 171(3): 251-9.

ANDRIANTOKY VB, JOHANNES RF, VOLOLONARIVELO BEE, RAKOTOVAO AH (2014). Late pregnancies outcome: assessment of the obstetrical risks at the university hospital of gynaecology and obstetrics, Befelatanana, Madagascar. *Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol.* 3:310-6.

ATTOLOU V, TAKPARA I, AKVAVIT J et al., (1998). Les différents types d'hypertension artérielle chez les femmes enceintes Béninoises admises au CNHU de Cotonou. Cahiers d'études et de recherches francophones/ Santé. 8 (5) : 353-356.

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.

BAGI Z, UNGVARI Z, KOLLER A (2002). Xanthine oxidase-derived reactive oxygen species convert flow-induced arteriolar dilation to constriction in hyperhomocysteinemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 22: 28–33.

BAH AO, DIALLO MH, DIALLO AAS, KEÏTA N, DIALLO MS (2000). Hypertension artérielle et grossesse : aspects épidémiologiques et facteurs de risques. Médecine d'Afrique Noire. 47(10) :422-425.

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.

BAYRAMPOUR H et HEAMAN M (2010). Advanced maternal age and the risk of cesarean birth: a systematic review. Birth. 37: 219-26.

BELAISCH-ALLART J, CASTAING N, GREFENSTETTE I, LAROUSSERIE F, MAYENGA J M, MOKDAD A, MOUMIN H (2008). Désir tardif d'enfant : les risques materno-fœtaux. Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français (CNGOF). 73-91.

BELAÏSCH-ALLART J, LAFAY-PILLET MC, TAURELLE R (1991). Les grossesses après 40 ans. Reproduction Humaine et Hormones. 4:176-180.

BENAMMAR A, SERMONDADE N, FAURE C, DUPONT C, CEDRIN- DURNERIN I, SIFER C, HERCBERG S, LEVY R (2012). Nutrition et Fausses Couches Spontanées: Une Revue de la Littérature. Gynecol Obstet & Fertilité. 40: 162-169.

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

BENNETT M (2001). Vitamin B12 deficiency, infertility and recurrent fetal loss. J Reprod Med. 46:209-12.

BERKOWITZ GS, SKOVRON ML, LAPINSKI RH, BERKOWITZ RL (1990). Delayed childbearing and the outcome of pregnancy. N Engl J Med. 322:659-64.

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 Gynecol Rep Biol. 116: 3-15.

BIANCO A, STONE J, LYNCH L, LAPINSKI R, BERKOWITZ G, BERKOWITZ R (1996). Pregnancy outcome at age 40 and older. *Obstet Gynecol.* 87:917-922.

BLACHER J, CZERNICHOW S, HORELLOU MH, CONARD J, DAVID P, CHADEFAX-VEKEMANS B, ANKRI A, GALAN P, HERCBERG S, DUCIMETIERE P (2005). Homocystéine, acide folique, vitamines du groupe B, et risque cardiovasculaire. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 98: 145-52.

BODNAR L M, NESS RB et al., (2005). The risk of preeclampsia rises with increasing prepregnancy body mass index. *Ann Epidemiol.* 15(7): 475-482.

BOGER RH, BODE-BOGER SM, SYDOW K, HEISTAD DD, LENTZ SR (2000). Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase is elevated in monkeys with HHcy or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20: 1557–1564.

BOLANDER-GOUIALLE C (2005). Homocysteine. *Touch cardiology.*

BOSE S et SEETHARAM B (1997). Purification, membrane expression, and interactions of transcobalamin II receptor. *Methods Enzymol.* 281: 281-289.

BOSTOM AG, SHEMIN D, VERHOEF P, NADEAU MR, JACQUES PF, SELHUB J, DWORKIN L, ROSENBERG IH (1997). Elevated fasting total plasma homocysteine levels and cardiovascular disease outcomes in maintenance dialysis patients: a prospective study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17:2554–8.

BOTTIGLIERI T (2005). Homocysteine and folate metabolism in depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry.* 29:1103-12.

BOUE J, BOUE A, LAZAR P (1975). Retrospective and prospective epidemiological studies of 1 500 karyotypes spontaneous human abortions. *Teratology.* 12,11-260.

BROSNAN JT, JACOBS RL, STEAD LM, BROSNAN ME (2004). Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism. *Acta Biochim Pol.* 51: 405-13.

BROWN MA, LINDHEIMER MD, DE SWIET M, VAN ASSCHE A, MOUTQUIN JM (2001). The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy : statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Hypertens Pregnancy.* 20 : IX-XIV.

BUTZ LW, DU VIGNEAUD V (1932). The formation of a homologue of cystine by the de composition of methionine with sulphuric acid. *J Biol Chem.* 99:135– 42.

BUYSSCHAERT M, HERMANS M (2003). Comment je traite et prends en charge une hyperhomocystéinémie. *Flammarion médecine-science.* 9:229-237.

CANDITO M et al., (2008). Nutritional and genetic determinants of vitamin B and homocysteine metabolisms in neural tube defects: a multicenter case–control study. *Am J Med Genet.* 146A : 1128-1133.

CANO F, SIMON C, REMOHI J, PELLICER A (1995). Effect of ageing on the female reproductive system: evidence for a role of uterine senescence in the decline in female fecundity. *Fertil Steril.* 64:584-9.

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).* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgyn.2014.09.016>.

CARMEL R (2000). Current concepts in cobalamin deficiency. *Ann Rev Med.* (51):357-75.

CEDERGREN MI (2004). Maternal morbid obesity and the risk of adverse pregnancy outcome. *Obstet Gynecol.* 103 : 219-24.

CHAMBERLIN ME, UBAGAI T, MUDD SH, THOMAS J, PAO VY, NGUYEN TK, LEVY HL, GREENE C, FREEHAUF C, CHOU JY (2000). Methionine adenosyltransferase I/III deficiency: novel mutations and clinical variations. *Am J Hum Genet.* 66: 347-55.

CHANARIN I, DEACON R, LUMB M (1989). Cobalamin-folate interrelations. *Blood Rev.* Dec. 3(4):211-5.

CHANGO A, DE POTIER COURCY G, BOISSON F, GUILLAND JC, BARBE F, PERRIN MO, CHRISTIDES JP, RABHI K, PFISTER M, GALAN P, HERCBERG S, NICOLAS JP (2000). 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase common mutations, folate status and plasma homocysteine in healthy French adults of the "supplémentation en vitamines et minéraux antioxydants (SU, VI. MAX)" cohort. *Br J Nutr.* 84: 891-6

CHANGO A, PARROT-ROULAND F, NICOLAS J-P (1999). Génétique moléculaire de la reméthylation de l'homocysteine. *Annales de Biologie Clinique.* 57:37- 42.

CHEN LH, LIU ML, HWANG HY, CHEN LS, KORENBERG J, SHANE B (1997). Human methionine synthase: cDNA cloning, gene localization, and expression. *J Biol Chem.* 272: 3628-34.

CHEN P, PODDAR R, TIPA EV, DIBELLO PM, MORAVEC CD, ROBINSON K, GREEN R, KRUGER WD, GARROW TA, JACOBSEN DW (1999). Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. *Adv Enzyme Regul.* 39: 93-109.

CHILDS A et ARMSTRONG D (2002). La carence en vitamine B12 -Est-ce réellement aussi simple ? Toronto : Société canadienne de nutrition clinique. *Rondes cliniques.* 2 (5).

CHRISTENSEN B et al., (1999). Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. *Am J Med Genet.* 84 : 151-157.

CHRISTENSEN B, WILSON A, PLATT R, WU Q, LECLERC D, YANG H, GRAVEL RA, ROSEN R (1999). A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab.* 67: 317-323.

CLEARY-GOLDMAN J, MALONE F, VIDAVER J, BALL R, NYBERG D, COMSTOCK CH, SAADE G et al., (2005). Impact of Maternal Age on Obstetric Outcome. *Obstet Gynecol.* 105:983-990.

COLOMBIER A, DUFLO-LEROY A, BASUYAU J.P, LAVOINNE A (2002). Évaluation analytique du dosage de la vitamine B12 et des folates sur Immulite 2000. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée.* 1: 40–47.

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

COONROD DV, HICKOK DE, ZHU K, EASTERLING TR (1995). Risk factors for preeclampsia in twin pregnancies: a population-based cohort study. *Obstet Gynecol.* 85: 645-650.

CUSKELLY GJ, STACPOOLE PW, WILLIAMSON J, BAUMGARTNER TG, GREGORY JF(2001). Deficiencies of folate and vitamin B6 exert distinct effects on homocysteine, serine, and methionine kinetics. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 281: E1182–E1190.

D’UVA M, DI MICCO P, STRINA I, ALVIGGI C, IANNUZZO M, RANIERI A, MOLLO A, DE PLACIDO G (2007). Hyperhomocysteinemia in women with unexplained sterility or recurrent early pregnancy loss from Southern Italy : a preliminary report. *Thromb J.* 11 : 5-10.

DALI-YOUCHEF N, ANDRES E (2009). An update on cobalamin deficiency in adults. *Q J Med.*102: 17-28.

DATTA S, KOUTMOS M, PATTRIDGE KA, LUDWIG ML, MATTHEWS RG (2008). A disulfide-stabilized conformer of methionine synthase reveals an unexpected role for the histidine ligand of the cobalamin cofactor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 4115–4120.

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 CALLE 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.

DE LA ROCHEBROCHARD E ET THONNEAU P (2002). Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study. *Hum Reprod.* 17:1649–56.

DE MARCO P et al., (2002). Study of MTHFR and MS polymorphisms as risk factors for NTD in the Italian population. *J Hum Genet.* 47 : 319-324.

DEL BIANCO A, MARUOTTI G, FULGIERI AM, CELESTE T, LOMBARDI L, AMATO NA, PIETROPAOLO F (2004). Recurrent spontaneous miscarriages and hyperhomocysteinemia. *Minerva Ginecol.* 56 : 379-383.

DEMUTH K, DRUNAT S, PAUL J, MOATTI N (2000). Hyperhomocystéinémie et athérosclérose. *MS.* 16 : 1081-90.

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.

DODDS L, FELL DB, DOOLEY KC, ARMSON BA, ALLEN AC, NASSAR BA, PERKINS S, JOSEPH KS (2008). Effect of homocysteine concentration in early pregnancy on gestational hypertensive disorders and other pregnancy outcomes. *Clin Chem.* 54 : 326-334.

DUCARME G, RODRIGUES A, AISSAOUI F et al., (2007). Pregnancy in obese patients: which risks is it necessary to fear?. *Gynecol Obstet Fertil.* 35 :19-24.

EDOUARD D (2003). Pré-éclampsie, éclampsie. *Encycl Méd Chir. Anesthésie Réanimation.* Paris. Editions Scientifiques et Médicales Elsevier. 36980 : A10.

EL MABCHOUR A (2010). Homocystéinémie, apports en vitamines B et facteurs de risque cardiométabolique Au Bénin, Afrique. *Mémoire de Maîtrise en Nutrition.* Univ Montréal : 3-16

ELIZABETH A, VARGA M, AMY C, STURM M, CARON P, MISIT A, PHARF D, STEPHAN M (2005). Homocysteine and MTHFR mutations Relation to thrombosis and coronary artery disease. 111: 289-293.

ESKENAZI B, FENSTER L, SIDNEY S (1991). A multivariate analysis of risk factors for preeclampsia. *JAMA.* 266: 237-241

FAEH D, CHIOLERO A, PACCAUD F (2006). Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: should we (still) worry about it?. *SWISS Med Wkly.* 136:745-56.

FEDERICI L, HENOUN LOUKILI N, ZIMMER J, AFFENBERGER S, MALOISEL F, ANDRES E (2007). Manifestations hématologiques de la carence en vitamine B12 : données personnelles et revue de la littérature. *Rev Med Interne.* 28:225-31.

FEIHL P F, PRADERVAND A, WAEBER B, VIAL Y (2009). Hypertension et grossesse. *Rev Med Suisse.* 5 : 1758-62.

FICHTLSCHERER S, ROSSIG L, BREUER S, VASA M, DIMMELER S, ZEIHNER AM (2001). Tumor necrosis factor antagonism with etanercept improves systemic endothelial vasoreactivity in patients with advanced heart failure. *Circulation.* 104: 3023–3025.

FINKELSTEIN JD (1998). The metabolism of homocysteine : pathways and regulation. *Eur J Pediatr.* 157 : S40-4.

FOKA ZJ, LAMBROPOULOS AF, SARAVELOS H, KARAS GB, KARAVIDA A, AGORASTOS T et al., (2000). Factor V leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum Reprod.* 15:458–62.

FOREST JC, GIROUARD J, MASSE J, MOUTQUIN JM, KHARFI A, NESS RB et al., (2005). Early occurrence of metabolic syndrome after hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 105 : 1373-80.

FOX NS, REBARBER A, DUNHAM SM, SALTZMAN DH (2009). Outcomes of multiple gestations with advanced maternal age. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 22:593-6.

FREY RS, RAHMAN A, KEFER JC, MINSHALL RD, MALIK AB (2002). PKC regulates TNF-induced activation of NADPH oxidase in endothelial cells. *Circ Res.* 90: 1012–1019.

GANESAN T, KHADRA MH, WALLIS J, NEAL DE (2002). Vitamin B12 malabsorption following bladder reconstruction or diversion with bowel segments. *ANZ J Surg.* 72: 479-482.

GEISEL J, JODDEN V, OBEID R, KNAPP JP, BODIS M, HERRMANN W (2003). Stimulatory effect of homocysteine on interleukin-8 expression in human endothelial cells. *Clin Chem Lab Med.* 41: 1045-1048.

GIFFORD RW, AUGUST PA, CUNNINGHAM G et al., (2000). National High Blood Pressure Educ P. Report of the National high blood pressure education program working group on high blood pressure in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 183:S1-S22.

GILBERT JS, RYAN MJ, LA MARCA BB et al., (2008). Pathophysiology of hypertension during preeclampsia : Linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol-Heart Circul Physiol.* 294:H541-H50.

GILBERT W, NESBITT T, DANIELSEN B (1999). Childbearing beyond age 40 pregnancy outcome in 24 032 cases. *Obstet Gynecol.* 93:9-14.

GILLERY PH (1999). Métabolisme de l'homocystéine. *Le Courrier de l'Arcol.* 2 :57-59.

GOK U, HALIFEOGLU I, CANATAN H, YILDIZ M, GURSU MF, GUR B (2004). Comparative analysis of serum homocysteine, folic acid and Vitamin B12 levels in patients with noiseinduced hearing loss. *Auris Nasus Larynx.* 31:19–22.

GOS M, SLIWERSKA E, SZPECHT-POTOCKA A (2004). Mutation incidence in folate metabolism genes and regulatory genes in Polish families with neural tube defects. *J Appl Genet.* 45 : 363-368.

GOULDING CW, POSTIGO D, MATTHEWS RG (1997). Cobalamin-dependent methionine synthase is a modular protein with distinct regions for binding homocysteine, methyltetrahydrofolate, cobalamin, and adenosylmethionine. *Biochemistry*. 36 (26) : 8082-8091.

GOYETTE P, PAI A, MILOS R, FROSST P, TRAN P, CHEN Z, CHAN M, ROZEN R (1998). Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mammalian Genome*. 9: 652-6.

GRANDONE E, MARGAGLIONE M, COLAIZZO D, CAPPUCCI G, PALADINI D, MARTINELLI P, MONTANARO S, PAVONE G, DI MINNO G (1997). Factor V Leiden, C > T MTHFR polymorphism and genetic susceptibility to preeclampsia. *Thromb Haemost*. 77: 1052-1054.

GRASBECK R et GUEANT JL (1990). New data on the porcine and human intrinsic factor receptors. In: *Biomedicine and physiology of vitamin B*, CMC. London. 313-320.

GRIEBEL CP, HALVORSEN J, GOLEMONT TB, DAY AA (2005). Management of spontaneous abortion. *Am Fam Physician*. 72:1243-50.

GUEANT et NAMOUR, (2003). Genetic determinants of folate and vitamin B12 metabolism: a common pathway in neural tube defect and Down syndrome?

GUEANT JL, GUEANT-RODRIGUEZ RM, ANELLO G, BOSCO P, BRUNAUD L, ROMANO C et al., (2003). Genetic determinants of folate and vitamin B12 metabolism: a common pathway in neural tube defect and Down syndrome? *Clin Chem Lab Med*. 41:1473-7.

GUEANT JL, LAMBERT D, SCHOHN H, NICOLAS JP (1993). Cobalamine (vitamine B12). Editions Techniques, *Encycl Med Chir (Paris, France), Hématologie*, 13-001-D-10, 4p.

GUILLAND JC et LEQUEU B (1992). Les vitamines: Du nutriment au médicament. *EM internationales*. Paris. p357.

GUILLAND JC, FAVIER A, POTIER DE COURCY G, GALAN P, HERCBERG S (2003). L'hyperhomocystéinémie : facteur de risque cardiovasculaire ou simple marqueur ? Données fondamentales. *Pathologie Biologie*. 51:101-10.

GUPTA S, AGARWAL A, BANERGEE J et al., (2007). The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review. *Obstet Gynecol Surv*. 62 (5) : 335-47.

HANNA IR, TANIYAMA Y, SZOCS K, ROCIC P, GRIENGLING KK (2002). NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Antioxidants et Redox Signaling*. 4: 899-914.

HAO L, MA J, ZHU J, STAMPFER MJ, TIAN Y, WILLETT WC, LI Z (2007). High prevalence of hyperhomocysteinemia in Chinese adults is associated with low folate, vitamin B12, and vitamin B6 status. *J Nutr*. 137: 407-13.

HARMON DL, SHIELDS DC, WOODSIDE JV, MCMASTER D, YARNELL JW, YOUNG IS, PENG K, SHANE B, EVANS AE, WHITEHEAD AS (1999). Methionine synthase D919G polymorphism is a significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations. *Genet Epidemiol.* 17: 298-309.

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

HELM KD, NESS R M, 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.

HENOUN LOUKILI N ET ANDRES E (2003). Vitamine B12 chez l'adulte : du métabolisme aux carences. *Ann Endocrinol.*64 (5) : 376-382.

HERRMANN W et GEISEL J (2002). Vegetarian lifestyle and monitoring of vitamin B-12 status. *Clin Chim Acta.* 326: 47-59.

HERRMANN W et KNAPP JP (2002). Hyperhomocysteinemia: a new risk factor for degenerative diseases. *Clin Lab* 48: 471-481.

HERRMANN W, SCHORR H, OBEID R, GEISEL J (2003). Vitamin B-12 status, particulary holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations, and hyperhomocysteinemia in vegetarians. *Am J Clin Nutr.* 78:131-6.

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

HOGG BB, TAMURA T, JOHNSTON KE, DUBARD MB, GOLDENBERG RL (2000). Second-trimester plasma homocysteine levels and pregnancy-induced hypertension, preeclampsia, and intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 183:805-9.

HOUCHER Z (2012). Facteurs nutritionnels, homocystéine et polymorphisme C677T du gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase dans la population algérienne. Université Ferhat Abbas Sétif. Doctorat en Biochimie.

HUBBNER U, SAMUAL TM, DUGGAN C, THOMAST, BOSCH T, et al., (2013).Ann. *NutrMetab.* 162 (2) : 113-22.

HUNT MJ et TYAGI SC (2002). Peroxisome proliferators compete and ameliorate Hcymediated endocardial endothelial cell activation. *Am J Physiol.* 283: 1073-1079.

ILEKIS JV, REDDY UM, ROBERTS JM (2007). Preeclampsia-a pressing problem : an executive summary of a National Institute of Child Health and Human Development workshop. *Reprod Sci.* 14 : 508-23.

JACOBSEN DW, (2001).Immulite: homocysteine to test and to treat. DPC. Technical report.

JACQUES PF, BOSTOM AG, WILSON PW, RICH S, ROSENBERG IH, SELHUB J (2001). Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr.* 73: 613-21.

JAIN A, POLOTSKY AJ, ROCHESTER D, BERGA SL, LOUCKS T, ZEITLIAN G et al., (2007). Pulsatile Luteinizing Hormone Amplitude and Progesterone Metabolite Excretion are Reduced in Obese Women. *J Clin Endocrinol Metab.* 92: 2468-2473.

JAY BLANK B (2009). Changes in serum homocysteine levels after roux en y gastric by pass surgery in severe obesity. Thesis Submitter for the degree of Master of Science. Wake Forest University, North Carolina: 1, 7-19.

JOHANNING GL, TAMURA T, JOHNSTON KE, WENSTROM KD (2000). Comorbidity of 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase gene polymorphisms and risk for neural tube defects. *J Med Genet.* 37 : 949-951.

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, RUGGIE N, GRCEVICH G (1988). Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in patients with coronary artery disease. *37: 611-3.*

KHAN KS, WOJDYLA D, SAY L, GÜLMEZOĞLU AM, VAN LOOK PF (2006). WHO analysis of causes of maternal death: asystematic review. *Lancet.* 367:1066–74.

KHOSHNOOD B, BOUVIER-COLLE MH, LERIDON H, BLONDEL B (2008). Impact de l'âge maternel élevé sur la fertilité, la santé de la mère et la santé de l'enfant. *Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction.* 37, 733-747.

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.

KLONOFF-COHEN HS, CROSS JL, PIEPER CF (1996). Job stress and preeclampsia. *Epidemiology.* 7: 245-249.

KOTHEKAR MA (2007). Homocysteine in cardiovascular disease: a culprit or an innocent by stander? *Indian J Med Sci.* 61:361-71.

KOURY MJ, PONKA P (2004). New insights into erythropoiesis: the role of folate, vitamin B12, and iron. *Annu Rev Nutr.* 24:105-31.

KULLO IJ, DING K, BOERWINKLE E, TURNER ST, MOSLEY TH JR, KARDIA SL, DE ANDRADE EM (2006). Novel genomic loci influencing plasma homocysteine levels. *37:1703–9.*

L'AGENCE NATIONALE DE SECURITE SANITAIRE (ANSES) (2012). <http://www.anses.fr/index.htm>

LACHMEIJER AM, ARNIGRIMSSON R, BASTIAANS EJ et al., (2001). Mutation in the gene for methylenetetrahydrofolate reductase, homocysteine levels and vitamin status in women with history of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 184:394-402.

LAMERS Y, COATS B, RALAT M, QUINLIVAN EP, STACPOOLE PW, GREGORY JF (2011). Moderate vitamin B6 restriction does not alter postprandial methionine cycle rates of remethylation, transmethylation, and total transsulfuration but increases the fractional synthesis rate of cystathionine in healthy young men and women. *J. Nutrition.* 141 835–842.

LARAQUI A, ALLAMI A et al., (2007). Relation between plasma homocysteine, gene polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes, and angiographically proven coronary artery disease. *Eur J Intern Med.* 18(6): 474-483.

LAUFER EM, HARTMAN TJ, BAER DJ, GUNTER EW, DORGAN JF, CAMPBELL WS, CLEVIDENCE BA, BROWN ED, ALBANES A, JUDD JT, TAYLOR PR (2004). Effects of moderate alcohol consumption of folate and vitamin B12 status in postmenopausal women. *Eur J Nutr.* 58: 1518-24.

LAUFER N, SIMON A, SAMUELOFF A, YAFFE H, MILWIDSKY A, GIELCHINSKY Y (2004). Successful spontaneous pregnancies in women older than 45 years. *Fertil Steril.* 81: 1328-1332.

LAVIOURI H, TURPEINEN U, VINIKKA L, YLIKOKALA O (1999). Plasma homocysteine levels elevated and inversely related to insulin sensitivity in preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 93:489-493.

LAWRENCE DE KONING AB, WERSTUCK GH, ZHOU J ET AUSTIN RC (2003). Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. *Clini Biochem.* 36(6): 431–41.

LE GRUSSE J et 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.

LEBANE D, AIT OUYAHIA B, VERT P, BREART G (2009). Programme National Périnatalité. Ed. AMDS, Alger. 99.

LECLERC D, CAMPEAU E, GOYETTE P, ADJALLA CE, CHRISTENSEN B, ROSS M, EYDOUX P, ROSENBLATT DS, ROZEN R, GRAVEL RA (1996). Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cbIG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Mol Gene.* 5: 1867-74.

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.

LEJEUNE V (2003). Epidemiology of vascular placental disease. *Ann Med Interne (Paris).* 154: 310-5.

- LEVALLOIS MP (2003).** Larousse médical. 1ère édition. Ed. Larousse, Paris. 499.
- LEWIN D, BERIC BM, CHAOUI A, VINEROU N (1985).** Influence de l'âge et de la parité sur les résultats obstétricaux dans traité d'obstétrique. Vokaer, lewin, Dewever. Paris Masson. 2 : 720.
- 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 Molec Genet. 5: 1851-1858.
- LUKE B et BROWN M (2007).** Elevated risks of pregnancy complications and adverse outcome with increasing maternal age. Hum reprod. 22:1264-1272.
- LUKE B et BROWN MB (2007).** Contemporary risks of maternal morbidity and adverse outcomes with increasing maternal age and plurality. Fertil Steril. 88 : 283-93.
- LYNN B, BAILEY, JESSE F, GREGORY (1999).** Folate metabolism and Requirements . Journal of nutrition. 129: 779-782.
- MA J, STAMPFER MJ, CHRISTENSEN B, GIOVANNUCCI E, HUNTER DJ, CHEN J et al., (1999).** A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocyst(e) ine, and colorectal cancer risk, Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. 8 : 825-829.
- MACONOCHE N, DOYLE P, PRIOR S, SIMMONS R (2007).** Risk factors for first trimester miscarriage—results from a UK-population-based case-control study. BJOG. 114:170–86.
- MAGEE LA, PELS A, HELEWA M, REY E, VON DADELSZEN P (2014).** Hypertension Guide line Committee. Diagnosis, evaluation, and management of the hypertensive disorders of pregnancy: Executive summary. J Obstet Gynaecol Can. 36:575–6.
- MAKEDOS G, PAPANICOLAOU A, HITOGLU A et al., (2007).** Homocysteine, folic acid and B12 levels in pregnancy complicated with preeclampsia. Arch Gynecol Obstet. 275: 121-124.
- MANCIA G, DE BACKER G, DOMINICZAK A, CIFKOVA R, FAGARD R, GERMANO G et al., (2007).** Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). J Hypertens. 25:1105-87.
- MASTROBATTISTA JM, SKUPSKI DW, MONGA M, BLANCO JD, AUGUST P (1997).** The rate of severe preeclampsia is increased in triplet as compared to twin gestations. Am J Perinatol. 14: 263-265.
- MATTHEWS RG, SHEPPARD C, GOULDING C (1998).** Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase: biochemistry and molecular biology. Eur J Pediatr. 157 (Suppl. 2): S54-9.

MC COWAN LM, BUIST RG, NORTH RA, GAMBLE G (1996). Perinatal morbidity in chronic hypertension. *Br J Obstet Gynaecol.* 103:123–9.

MC CULLY KS ET WILSON RB (1975). Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis.* 22: 215-27.

MC CULLY K S (2007). Homocysteine, vitamins, and vascular disease prevention. *Am J Clin Nutr.* 86:1563S- 8S.

MC DONALD SD, MALINOWSKI A, ZHOU Q, YUSUF S, DEVEREAUX PJ (2008). Cardiovascular sequelae of preeclampsia/eclampsia : a systematic review and meta-analyses. *Am Heart J.* 156 : 918-30.

MC DOWELL LR (2000). Vitamins in animal and human nutrition. 2nd edition, Iowa State University Press, Ames, IA.

MEEGDES NHLM, INGENHOES R, PEETERS LLH, EXALTO N (1988). Early pregnancy wastage: relationship between chorionic vascularization and embryonic development. *Fertil Steril.* 49:216–20.

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, CASLKE MJ, FREEMAN DJ (2013). Maternal obesity is associated With the formation of small dense LDL and hypo adiponectinemia in the third trimester. *J clin Endocrinol Metab.* 98(2) : 643-562.

MIGNINI L, LATTHE P, VILLAR J, KILBY M, CARROLI G, KHAN K (2005). Mapping the theories of preeclampsia: the role of homocysteine. *Obstet Gynecol.* 105:411-425.

MILETIC T, ABERLE N, MIKULANDRA F et al., (2002). Perinatal outcome of pregnancies in women aged 40 and over. *Coll Antropol.* 26: 251-258.

MOFFETT-KING A (2002). Natural killer cells and pregnancy. *Nat. Rev. Immunol.* 2:656–663.

MOHAZZAB KM, KAMINSKI PM, WOLIN MS (1994). NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol.* 266:2568-2572.

MOUCHABAC S (2008). Homocystéinémie, hyperhomocystéinémie et dépression. *Neuropsychiatrie : Tendances et Débats.* 32:9-18.

MOUNIER-VEHIER C, DELSART P (2009). Hypertension artérielle de la grossesse : une situation à risque cardiovasculaire. *Presse Med.* 38: 600–608

MUDD SH (1985). Vascular disease and homocysteine metabolism. *N Engl J Med.* 313:751–3.

MUJUMDAR VS, ARU GM, TYAGI SC (2001). Induction of oxidative stress by homocyst(e)ine impairs endothelial function. *J Cell Biochem.* 82: 491–500.

MULLIS K ET FALOONA F (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods enzymol.* 155 : 335-350.

MURAKAMI S, MATSUBARA N, SAITOH M, MIYAKAW S, SHOJI M, KUBO T (2001). The relation between plasma homocysteine concentration and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in pregnant women. *J Obstet Gynaecol Res.* 27:349 –52.

NAMOUR F, HELFER AC. QUADROS EV, ALBERTO JM. BIBI HM. OMING LI ROSENBLATT DS, JEAN-LOUIS G (2003). Transcobalamin deficiency due to activation of an intra exonic cryptic splice site. *Br J Haematol.* 123(5):915-20. 144.

NELEN WL, BLOM HJ, STEEGERS EA, DEN HEIJER M, ESKES TK (2000). Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril.* 74 : 1196-1199.

NELEN WL, 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.* 95:519-24.

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 WLDM (2001). Hyperhomocysteinemia and human reproduction. *Clin Chem Lab Med.* 39:758-63.

NEXO E, CHRISTENSEN AL, PETERSEN TE, FEDOSOV SN (2000). Measurement of transcobalamin by ELISA. *Clin Chem.* 46: 1643-1649.

NICOLAS JP et GUEANT JL (1994). Absorption, distribution and excretion of vitamin B12. *Ann Gastroenterol Hepatol (Paris).* 30: 270-276, 281; discussion, 281-282.

NILSSON E, SALONEN ROS H, CNATTINGIUS S, LICHTENSTEIN P (2004). The importance of genetic and environmental effects for pre-eclampsia and gestational hypertension: a family study. *BJOG.* 111: 200-206.

NORLUND A, GRUBB A, FEX G, LEKSELL H, NILSSON JE, SCHEUCK H, HULTBERG B (1998). The increase of plasma homocysteine concentrations with age is partly due to the deterioration of renal function as determined by plasma cystatin C. *Clin Chem Lab Med.* 36:175-8.

NYBO ANDERSEN AM, WOHLFAHRT J, CHRISTENS P, OLSEN J, MELBYE M (2000). Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *General practice. BMJ.* 320:1708-12.

OBEID R, HERRMANN W (2007). Holotranscobalamin in laboratory diagnosis of cobalamin deficiency compared to total cobalamin and methylmalonic acid. *Clin Chem Lab Med.* 45:1746-50.

ODEGÅRD RA, VATTEN LJ, NILSEN ST, SALVESEN KA, AUSTGULEN R (2000). Risk factors and clinical manifestations of pre-eclampsia. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 107 : 1410-1416.

OH CR et BROWN DL (2003). Vitamin B12 deficiency. *American Family Physician.* 67(5).

O'LEARY VB et al., (2005). Analysis of methionine synthase reductase polymorphisms for neural tube defects risk association. *Mol Genet Metab.* 85 : 220-227.

ONALAN R, ONALAN G, GUNENC Z, KARABULUT E (2006). Combining 2nd-trimester maternal serum homocysteine concentrations and uterine artery Doppler for prediction of preeclampsia and isolated intrauterine growth restriction. *Gynecol Obstet Invest.* 61:142-8.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE (OMS) (1997). Obesity Preventing and managing the global Epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. 3-5 June. Geneva. WHO/NVT/NCD/98.1.

POWERS RW, EWANS RW, MAJORS AK, OJIMBA JI (1998). Plasma homocysteine concentration is increased in preeclampsia and is associated with evidence of endothelial activation. *Am J Obstet Gynecol.* 179:1605-1611.

PARHAM P (2004). NK cells and trophoblasts: partners in pregnancy. *J Exp Med.* 200: 951-5.

PATRICK ET STOVER (2004). Physiology of Folate and Vitamin B12 in Health and Disease. *Nutrition Reviews.* 62(6):S3-S12.

PERRIN AE, SIMON C (2002). Nutrition de la femme enceinte. *CahNutrDiet.* 37(1) : 59-64.

PETRUS A K, FAIRCHILD T J, et al., (2009). Traveling the vitamin B12 pathway: oral delivery of protein and peptide drugs. *Angew Chem Int Ed Engl.* 48(6): 1022-1028.

POWERS RW, DUNBAR MS, GALLAHER MJ, ROBERTS JM (2003). The 677 C-T methylenetetrahydrofolate reductase mutation does not predict increased maternal homocysteine during pregnancy. *Obstet Gynecol.* 101: 762-766

POWERS RW, EVANS RW, MAJORS AK, OJIMBA JI, NESS RB, CROMBLEHOLME WR, ROBERTS JM (1998). Plasma homocysteine concentration is increased in preeclampsia and is associated with evidence of endothelial activation. *Am J Obstet Gynecol.* 179: 1605-1611.

POWERS RW, EVANS RW, NESS RB, CROMBLEHOLME WR, ROBERTS JM (2001). Homocysteine and cellular fibronectin are increased in preeclampsia, not transient hypertension of pregnancy. *Hypertens Pregnancy.* 20: 69-77.

PREROST MR (1997). Correlation of homocysteine concentration with plasma fibrinogen and physical activity in males with coronary artery disease. Thesis Submitter for the degree of Master of science in clinical exercise physiology in Human Nutrition, Foods, and Exercise. Blacksburg, Virginia: 8-16, 20-22.

PRYSAK M, LORENZ RP, KISLY A (1995). Pregnancy outcome in nulliparous women 35 years and older. *Obstet Gynecol.* 85(1) :65-70.

QUADROS EV, REGEC AL, KHAN KM, QUADROS E, ROTHENBERG SP (1999). Transcobalamin II synthesized in the intestinal villi facilitates transfer of cobalamin to the portal blood. *Am J Physiol.* 277: G161-G166.

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.

RACEK J, RUSNAKOVA H, TREFIL L, SIALA KK (2005). The Influence of Folate and Antioxidants on Homocysteine Levels and Oxidative Stress in Patients with Hyperlipidemia and Hyperhomocysteinemia. *Physiol Res.* 54: 87-95.

RAJKOVIC A, CATALANO PM, MALINOW MR (1997). Elevated homocyst(e)ine levels with preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 90: 168-171.

RAJKOVIC A, MAHOMED K, MALINOV MR, SORESNON TK (1999). Plasma homocysteine concentrations in eclamptic and preeclamptic African women postpartum. *Obstet Gynecol.* 94:355-360.

RASMUSSEN LB, OVESEN L, BULOW I, KNUDSEN N, LAURBERG P, PERRILD H (2000). Folate intake, life style factors, and homocysteine concentrations in younger and older women. *Am J Clin Nutr.* 72: 1156-63.

RAY JG, VERMEULEN MJ, SCHULL MJ, REDELMEIER DA (2005). Cardiovascular health after maternal placental syndromes (CHAMPS): population-based retrospective cohort study. *Lancet.* 366:1797-803.

REFSUM H, SMITH D, UELAND PM, NEXO E, CLARKE R, MCPRTLIN 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, NURK E, SMITH D, UELAND PM, GJESDAL CG, BJELLAND I, TVERDAL A, TELL GS, NYGARD O, VOLLSET SE (2006). The Hordaland Homocysteine study: A community-Based Study of homocysteine, its determinants, and associations with disease. *J Nutr.* 136:1731S-40S.

REGAN L, BRAUDE PR, TREMBATH PL (1989). Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. *BMJ.* 299: 541–545.

REPORT OF THE NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION PROGRAM WORKING GROUP ON HIGH BLOOD PRESSURE IN PREGNANCY (NHBPEP). *Am. J. Obst. Gynecol.* 183:S1-S22.

REY E et COUTURIER A (1994). The prognosis of pregnancy in women with chronic hypertension. *Am J Obstet Gynecol.* 171:410–6.

ROBERTS JM, TAYLOR RN, MUSCI TJ, RODGERS GM, HUBEL CA, MCLAUGHLIN MK (1989). Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol.* 161: 1200-1204.

ROBERTS JM et HUBEL CA (1999). Is oxidative stress the link in the two-stage model of preeclampsia? *Lancet.* 354 : 788-789.

ROBERTS JM et COOPER DW (2001). Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet.* 357(9249):53–6.

ROBERTS JM, PEARSON GD, CUTLER JA, LINDHEIMER MD (2003). National Heart Lung and Blood Institute Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertens Pregnancy.* 22: 109-127

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.

ROUBENOFF R, DELLARIPA P, NADEAU MR, ABAD LW, MULDOON BA, SELHUB J, ROSENBERG IH (1997). Abnormal homocysteine metabolism in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 40: 718-22.

ROZEN R (2001). Polymorphisms of folate and cobalamin metabolism. In: Carmel R, Jacobsen DW, editors. *Homocysteine in health and disease* Cambridge. Cambridge Univ Press. 259-70.

ROZENBAUM H (2003). Le déclin de la fertilité féminine avec l'âge. *Reproduction humaine et Hormones.* 16: 5-12.

RUFENACHT P, MACH-PASCUAL S, ITEN A (2008). Hypovitaminose B12: challenge diagnostique et thérapeutique. *Rev Med Suisse.* 4:2212-7.

RUSSELL-JONES GJ et ALPERS DH (1999). Vitamin B12 transporters. *Pharm Biotechnol.* 12: 493-520.

- SACKO I (2010).** Accouchement chez les grandes multipares dans le service de Gynéco-Obstétrique du Centre de Santé de Référence de la Commune IV.
- SAFTLAS AF, OLSON DR, FRANKS AL, ATRASH HK, POKRAS R (1990).** Epidemiology of preeclampsia and eclampsia in the United States, 1979-1986. *Am J Obstet Gynecol.* 163: 460-465.
- SCALABRINO G et PERACCHI M (2006).** New insights into the pathophysiology of cobalamin deficiency. *Trends Mol Med.* 12:247-54.
- SCALABRINO G, VEBER D, MUTTI E (2008).** Experimental and clinical evidence of the role of cytokines and growth factors in the pathogenesis of acquired cobalamin-deficient leukoneuropathy. *Brain Res Rev.* 59:42-54.
- SCHADE S G et SCHILLING R F (1967).** Effect of pepsin on the absorption of food vitamin B12 and iron. *Am J Clin Nutr.* 20(6): 636-640.
- SCHOEN C, ROSEN T (2009).** Maternal and perinatal risks for women over 44 years a review. *Maturitas.* 64:109-13.
- SCHRIER LS (2011).** Physiology of vitamin B12 and folic acid deficiency. UpToDate.
- SEETHARAM B, BOSE S, LI N (1999).** Cellular import of cobalamin (Vitamin B-12). *J Nutr.* 129: 1761-1764.
- SEETHARAM B et LI N (2000).** Transcobalamin II and its cell surface receptor. *Vitam Horm.* 59: 337-366.
- SELHUB J (1999).** Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr.* 19:217-46.
- SENTILHES L, GILLARD P, BIQUARD F, DESCHAMPS P (2008).** Hypertension et grossesse. In *Obstétrique pour le praticien.* 5ème Edition, (c) Masson, Paris. 161-171.
- SERRAJ K, MECILI M, ANDRES E (2010).** Signes et symptômes de la carence en vitamine B12: revue critique de la littérature. *Med Thérap.* 16:13-20.
- SHARMA P, SENTHILKUMAR RD, BRAHMACHARI V, SUNDARAMOORTHY E, MAHAJAN A, SHARMA A, SENGUPTA S (2006).** Mining literature for a comprehensive pathway analysis: a case study for retrieval of homocysteine related genes for genetic and epigenetic studies. *Lipids Health Dis.* 5:1-19.
- SIBAI BM, GORDON T, THOM E, CARITIS SN, KLEBANOFF M, MCNELLIS D, PAUL RH (1995).** Risk factors for preeclampsia in healthy nulliparous women: a prospective multicenter study. The National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *Am J Obstet Gynecol.* 172: 642-648.
- SIBAI BM (2003).** Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 102:181-92.

SIBAI B, DEKKER G, KUPFERMINC M (2005). Pre-eclampsia. *Lancet*. 365 : 785-99.

SIFROI JP et MOLINA-GOMES D (1991). Le point sur le diagnostic prénatal des anomalies chromosomiques. *Reproduction Humaine et Hormones*. 4:185-191.

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.

SKJAERVEN R, WILCOX AJ, LIE RT (2002). The interval between pregnancies and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*. 346: 33-38.

SLAMA R, BOUYER J, WINDHAM G, FENSTER L, WERWATZ A, SWAN SH (2005). Influence of paternal age on the risk of spontaneous abortion. *Am J Epidemiol*.161:816–23.

SNOW CF (1999). Laboratory diagnosis of vitamin B12 and folate deficiency: a guide for the primary care physician. *Arch Intern Med*. 159:1289-98.

SOHDA S, ARINAMI T, HAMADA H, YAMADA N, HAMAGUCHI H, KUBO T (1997). Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and pre-eclampsia. *J Med Genet*. 34: 525-526

SOLOMON LR (2007). Disorders of cobalamin (vitamin B12) metabolism: emerging concepts in pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood Rev*. 21:113-30.

SORENSEN TK, MALINOV MR, WILLIAMS MA, KING IB, LUTHY DA (1999). Elevated second trimester serum homocysteine levels and subsequent risk of preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest*. 48:98-103.

SOUCI SW, FACHMANN W, KRAUT H (1994). *Food Composition and Nutrition Tables*, 5th ed, CRC Press, Boca Raton and Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart.

STABLER SP, MARCELL PD, PODELL ER, ALLEN RH, SAVAGE DG, LINDENBAUM J (1988). Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography mass spectrometry. *J Clin Invest*. 81:466-474.

STANGER O, WEGER M, RENNER W, KONETSCHNY R (2001). Vascular dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia. Implications for atherothrombotic disease. *Clin Chem Lab Med*. 39: 725-733.

STEEGERS-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.

STEPHENSON MD (1996). Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. *Fertil Steril*. 66: 24–7.

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

STIRRAT GM (1990). Recurrent miscarriage I: definition and epidemiology. *Lancet.* 336:673-5.

STUHLINGER MC, TSAO PS, HER JH, KIMOTO M, BALINT RF, COOKE JP (2001). Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation.* 104: 2569-2575.

SUNDEN SL, RENDUCHINTALA MS, PARK EI, MIKLASZ SD, GARROW TA (1997). Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. *Arch Biochem Biophys.* 345: 171-4.

SUTTERLIN M, BUSSEN S, RUPPERT D, STECK T (1997). Serum levels of folate and cobalamin in women with recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod.* 12: 2292-6.

TESSAROLO M, BRIZZOLARA M, ARDUINO S, LEO L, FEBO G, WIERDIS T et al., (1997). Grand multiparity: a study of 168 cases. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 24(1):41-3.

TOURE IA, BRAH F, PRUAL A (1997). Hypertension artérielle et grossesse au Niger : Etude cas /témoins à propos de 70 cas. *Médecine d'Afrique Noire.* 44 (4) :205-208.

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

TSATSARIS V, FOURNIER T, WINER N (2008). Pathophysiologie de la pré-éclampsie. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 37(1):16-23.

UBBINK JB, VERMAAK WJH, DELPORT R, VAN DER MERWE A, BECKER PJ, POTGIETER H (1995). Effective homocysteine metabolism may protect south African blacks against coronary heart disease. *Am J Clin Nutr.* 62:802-8.

UELAND PM, REFSUN H (1989). Plasma homocystein for vascular disease : plasma levels in health, disease and drug therapy. *Lab Clin Med.* 114:473-501.

UELAND PM, REFSUM H, STABLER SP, MALINOW MR, ANDERSSON A, ALLEN RH (1993). Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem.* 39: 1764-79.

UELAND PM, REFSUM H, SCHNEEDE J (2000). Determinants of Plasma Homocysteine. In: *Homocysteine and Vascular Disease.* K. Robinson .Ed. Dordrecht: Kluwer. 59-84.

UELAND PM, NYGARD O, VOLLSET SE, REFSUM H (2001). The Hordaland Homocysteine Studies. *Lipids.* 36:S33-9.

UELAND PM, ROZEN R (2005). MTHFR polymorphisms and disease. *Georgetown : Landes Bioscience.* 210p.

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.

VAN DER PUT NM et al., (1997). Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease. *QJM.* 90 : 511-517.

VANAERTS LA, BLOM HJ, DEABREU RA, TRIJBELS FJ, ESKES TK, COPIUS JH, et al., (1994). Prevention of neural tube defects by and toxicity of Lhomocysteine 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.

VESIN C, HORELLOU M-H, MAIRESSE S, CONARD J, SAFAR M, BLACHER J (2007). Homocystéine et risque cardiovasculaire. *Sang thrombose vaisseaux.* 19:143-9.

VILLAR J, CARROLI G et al., (2006). Preeclampsia, gestational hypertension and intrauterine growth restriction, related or independent conditions?. *Am J Obstet Gynecol.* 194(4):921-931.

VOLLSET SE, REFSUM H, IRGENS LM, EMBLEM BM, TVERDAL A, GJESSING HK et al., (2000). Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr.* 71:962-8.

VON DADELSZEN P ET MAGEE L (2008). What matters in preeclampsia are the associated adverse outcomes : the view from Canada. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 20: 110-5.

VUKOVIC BOBIC M, ČERKEZ HABEK J, HABEK D (2016). Maternal and umbilical homocysteine in preeclampsia. *Period biol.*118(2) : 117-122.

WARBURTON D, KLINE J, STEIN Z, HUTZLER M, CHIN A, HASSOLD T (1987). Does the karyotype of a spontaneous abortion predict the karyotype of a subsequent abortion? – evidence from 273 women with two karyotyped spontaneous abortions. *Am J Hum Genet.* 41:465–83.

WEINSTEIN L (1982). Syndrome of hemolysis, elevated liver enzyme and low platelet count: a severe consequence of hypertension in pregnancy. *Am. J. Obstetr. Gynecol.* 142 : 159- 167.

WEISBERG I, TRAN P, CHRISTENSEN B, SIBANI S, ROZEN R (1998). A second genetic polymorphism in methylentetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab.* 64:169-72.

WEISS JL, MALONE FD, EMIG D et al., (2004). Obesity, obstetric complications and cesarean delivery rate--a population-based screening study. *Am J Obstet Gynecol.* 190 : 1091-7.

WHO/OMS (2003). Programme of Work 2004-2008 of Department of Reproductive Health and Research. Genève: WHO/OMS.

WIDNER B, LEBLHUBER F, FRICK B, LAICH A, ARTNER-DWORZAK E, FUCHS D (2002). Moderate hyperhomocysteinaemia and immune activation in Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 109: 1445-52.

WILCKEN DEL, WILCKEN B, DUDMAN NPB, TYRRELL PA (1983). Homocystinuria-the effects of betaine in the treatment of patients not responsive to pyridoxine. *N Engl J Med.* 309: 448- 53.

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.

XIONG X, MAYES D, DEMIANCZUK N et al., (1999). Impact of pregnancy induced hypertension on foetal growth. *Am J Obstet Gynecol.* 180:207-213.

YAHIA M, CHAOUI N, CHAOUCH A, MASSINISSA YAHIA (2014). Determination of Some Biochemical Parameters in Women during the First Trimester of Pregnancy (Normal Pregnancy and Missed Miscarriage). *World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Medical, Health, Biomedical, Bioengineering and Pharmaceutical Engineering.* 8 (2) : 102-104.

YAMAMOTO M, HARA H, ADACHI T (2000). Effects of homocysteine on the binding of extracellular-superoxide dismutase to the endothelial cell surface. *FEBS Lett.* 486: 159–162.

YATES, Z. AND M. LUCOCK (2003). Interaction between common folate polymorphisms and B vitamin nutritional status modulates homocysteine and risk for a thrombotic event. *Mol Genet Metab.* 79(3): 201-213.

YOGEV Y, MELAMED N, BARDIN R, TENENBAUM-GAVISH K, BEN-SHITRIT G, BEN-HAROUSH A (2010). Pregnancy outcome at extremely advanced maternal age. *Am J Obstet Gynecol.* 203:e1-7.

ZHOU Y, FISHER SJ, JANATPOUR M, GENBACEV O, DEJANA E, WHEELOCK M et al., (1997). Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion ? *J Clin Invest.* 99:2139-51.

ZIADEH SM (2002). Maternal and perinatal outcome in nulliparous women aged 35 and older. *Gynecol Obstet Invest.* 54: 6-10.

ZITTOUN J, ZITTOUN R (1999). Modern clinical testing strategies in cobalamin and folate deficiency. *Semin Hematol.* 36:35-46.

ZITTOUN J (2002). Anémie macrocytaire carencielle .EMC, Hématologie.13.001A.11p.



Annexes

Annexe 1

Questionnaire

I- Données relatives à la patiente :

-Nom et prénom :

-Age :

-Poids :

-Adresse/tél :

-Age de couple :

-Origine ethnique :

-Education :

-Nombre de grossesse :

-Nombre d'avortement :

-Intervalle avec la dernière grossesse :

-Stade de grossesse :

-Antécédents personnels ou familiaux des complications de grossesse :

II-Données sur la mode de vie :

| | Oui | Non | |
|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| -Tabagisme | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| -Alcoolisme | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| - Drogues | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| -Irradiations | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| -Incompatibilité sanguine | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Faible | Modérée | Elevée |
| -Niveau de stress | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| -Intensité de travail journalière | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

| -Alimentation | Faible | Moyen | Elevée |
|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| • Les aliments d'origine végétale | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| • Les aliments d'origine animale | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| • Produits laitiers | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| • Apports en vitamines | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| • Apports en protéines | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| • Apports en glucides | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| • Apports en lipides | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| • Nombre de repas par jour | | | |

| -Utilisation des suppléments vitaminique | Oui | Non |
|---|--------------------------|--------------------------|
| • Acide folique | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| • Vitamine B | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| • Fer | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| • Quand tu as commencée leur utilisation. | | |

-Prise des médicaments Oui Non

-Quel type de médicament

| | Oui | Non |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| -Malformation utérine | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| -HTA liée à la grossesse | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| -Diabète gestationnel | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| -Fièvre | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| -Anémie | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| -Maladies thyroïdiennes | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| -Maladies pulmonaires | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| -Maladies infectieuse | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| -Maladies cardiovasculaires | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| -Thrombose veineuse | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Annexe 2

Réactif :

- TE 20 :5 : (Tris 20 mM, EDTA 5 mM, pH 7.5) auto clavé

- Tompon de lyse : NaCl 400mM
EDTA 2mM
Tris 10mM
pH 8.2

- SDS 10% : 100 g SDS + H₂O 1000 ml.

- Protéinase K : 10 mg/ml

- NaCl 4M

- Ethanol absolu

- Ethanol 70%

- TBE 1X : 100ml TBE10X + 900ml H₂O

Annexe 3

- Préparation du gel d'agarose 1.5% pour le control de la PCR :

| Composition du gel d'agarose 1.5% | Quantité |
|--|-----------------|
| Agarose | 1.5 g |
| TBE (1X) | 100ml |
| BET (Bromure d'éthidium) | 10 μ l |

- Préparation du gel d'agarose 3% pour la migration des fragments digérés par Hae III :

| Composition du gel d'agarose 1.5% | Quantité |
|--|-----------------|
| Agarose | 3 g |
| TBE (1X) | 100ml |
| BET (Bromure d'éthidium) | 10 μ l |

Perturbation du métabolisme de l'homocystéine et son impact sur les complications de grossesse

Résumé :

Les complications de grossesse peuvent avoir des risques sur la santé de la femme. Il semble clair que l'hyperhomocystéinémie représente un facteur de risque pour ces complications en particulier les avortements spontanés à répétition (ASR), l'hypertension artérielle (HTA) et la pré-éclampsie (PE).

Le but de cette étude consiste en la recherche de la mutation A2756G du gène de la méthionine synthase, et l'estimation de sa fréquence ainsi que le dosage de la vitamine B12 chez les femmes à risque dans notre population. Ceci afin d'examiner leur impact sur la survenue des complications.

L'étude porte sur 62 femmes incluant 31 femmes témoins et 31 femmes malades. La recherche de mutation est réalisée par la méthode PCR/RFLP alors que le dosage de la vitamine B12 est réalisé par un immunodosage par compétition.

Nous n'avons pas révélé une carence plasmatique en vitamine B12 dans notre population d'étude. Par ailleurs, les fréquences des génotypes AA, AG et GG étaient respectivement de 80,56 %, 12,9 % et 6,45% chez les malades et de 100%, 0% et 0% chez les témoins. Les fréquences des génotypes AA, AG et GG étaient respectivement égales à 64,28 %, 21,4 % et 14,28% pour les femmes avec ASR et à 94,1 %, 5,88% et 0% pour les femmes avec PE. Nous suggérons que la mutation A2756G du gène de la MS soit un facteur de risque pour l'apparition des complications, notamment les ASR, dans notre population.

Cette étude a donc montré une association entre le polymorphisme MS A2756G et le risque des complications de grossesses, et de ce fait, une perturbation de la voie de reméthylation de l'homocystéine chez les femmes à risque d'une population Algérienne.

Mots clés : complication de grossesse, hyperhomocystéinémie, vitamine B12, méthionine synthase, population Algérienne.

Disturbance of homocysteine metabolism and its impact on pregnancy complications

Summary:

Pregnancy complications can have a health risk for women. It seems clear that hyperhomocysteinemia is a risk factor for these complications, in particular repetitive spontaneous abortions (ASR), hypertension (HTA) and pre-eclampsia (PE).

The aim of this study is to investigate the A2756G mutation in the methionine synthase gene and to estimate its frequency and the dosage of vitamin B12 in women at risk in our population. This is to examine their impact on the occurrence of complications.

The study included 62 women, including 31 female controls and 31 female patients. The mutation research is carried out by the PCR / RFLP method while the vitamin B12 assay is performed by competitive immunoassay.

We did not reveal a vitamin B12 deficiency in our study population. Moreover, the frequencies of the genotypes AA, AG and GG were respectively 80.56%, 12.9% and 6.45% in the patients and 100%, 0% and 0% in the controls. The frequencies of the genotypes AA, AG and GG were respectively 64.28%, 21.4% and 14.28% for women with ASR and 94.1%, 5.88% and 0% for women with EP. We suggest that the A2756G mutation in the MS gene is a risk factor for the development of complications, especially ASR, in our population.

This study therefore showed an association between the polymorphism MS A2756G and the risk of pregnancy complications, and consequently a disturbance of the remethylation route of homocysteine in women at risk of an Algerian population.

Key words: pregnancy complication, hyperhomocysteinemia, vitamin B12, methionine synthase, Algerian population.

اضطراب في استقلاب الهيموسستين وأثره على مضاعفات الحمل

المخلص:

يمكن لمضاعفات الحمل أن تؤدي إلى مخاطر صحية للمرأة. يبدو واضحا أن فرط الهوموسستين في الدم هو أحد عوامل الخطر لهذه

المضاعفات وخاصة الإجهاض التلقائي المتكرر (ASR)، وارتفاع ضغط الدم (HTA) وتسمم الحمل (PE).

والغرض من هذه الدراسة هو البحث عن الطفرة A2756G من ميثيونين سنتاز، وتقدير ترددها ومعرفة تركيز الفيتامين ب12 في النساء المعرضات للخطر في سكاننا لمعرفة تأثير ذلك على حدوث مضاعفات.

وركزت الدراسة على 62 امرأة بينهم 31 امرأة شاهدة و31 امرأة مريضة. البحث عن الطفرة تم بواسطة تقنية PCR / RFLP بينما يتم معرفة تركيز الفيتامين ب12 عن طريق التركيز المناعي التنافسي.

لم يكتشف عن نقص فيتامين ب12 في الدم في عينة دراستنا. وعلاوة على ذلك، كانت ترددات الأنماط الوراثية AA، AG و GG، على

التوالي، 80.56% و 12.9% و 6.45% لدى المرضى، و 100% و 0% و 0% في الشواهد. كانت ترددات الأنماط الوراثية AA، AG و GG على التوالي تساوي 64.28% و 21.4% و 14.28% للنساء الاجهاض المتكرر التلقائي و 94.1%، 5.88% و 0% للنساء المصابة بتسمم الحمل. نقترح

أن الطفرة A2756G من الميثيونين سنتاز هو أحد عوامل الخطر لظهور المضاعفات، بما في ذلك الاجهاض التلقائي المتكرر لدى عينة الدراسة.

وقد أظهرت هذه الدراسة وجود ارتباط بين تعدد الأشكال للطفرة A2756G ميثيونين سنتاز و خطر حدوث مضاعفات الحمل، وبالتالي تعطيل مسار الحمض الاميني هوموسستين في النساء المعرضات للخطر من سكان الجزائر.

الكلمات المفتاحية : مضاعفات الحمل، فرط الهوموسستين في الدم، وفيتامين B12، سينسيز ميثيونين، الشعب الجزائري.