



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Université Henri Poincaré- Nancy-I
Faculté de médecine

Thèse pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE NANCY-I
Discipline : BIOLOGIE MOLECULAIRE

Par

Laurent PEYRIN-BIROULET
Le 6 mai 2008

Titre :

**Déterminants génétiques et nutritionnels de
l'homocystéine au cours des maladies
inflammatoires chroniques intestinales**

Directeur de thèse : **Professeur Jean-louis Guéant**, unité Inserm 724 et Laboratoire de
Biochimie des Protéines du CHU de Nancy

Jury

Professeur Laurent Beaugerie, professeur-praticien hospitalier à l'université Pierre et Marie
Curie (Paris), rapporteur
Professeur Bernard Duclos, professeur-praticien hospitalier à l'université de Strasbourg
Louis Pasteur, rapporteur
Professeur Jean-Pierre Bronowicki, professeur-praticien hospitalier à l'université de
Nancy-I, examinateur
Professeur Franck Broly, professeur-praticien hospitalier à l'université de Lille 2 Droit et
Santé, examinateur
Professeur Marc-André Bigard, professeur-praticien hospitalier à l'université de Nancy-I,
examinateur
Professeur Jean-louis Guéant, professeur-praticien hospitalier à l'université de
Nancy-I, examinateur

Table des matières

I-Les MICI, des maladies fréquentes, d'étiologie multifactorielle

1. Les MICI, un problème de santé publique dans les pays développés
2. Les MICI, des maladies complexes
 - 2.1. Implication des facteurs environnementaux et génétiques dans la pathogénie des MICI
 - 2.2. Hypothèses actuelles: un dialogue aberrant entre la flore et notre système immunitaire
3. Histoire naturelle et complications évolutives des MICI
4. Traitement des MICI en 2008 : un besoin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques

II-Métabolisme de l'homocystéine et déterminants de la concentration plasmatique

1. Métabolisme cellulaire de l'homocystéine
 - 1.1. Les voies de la reméthylation
 - 1.2. La voie de la transsulfuration
2. L'homocystéine circulante.
 - 2.1. Les différentes formes physicochimiques d'homocystéine circulantes
 - 2.2. Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie
 - 2.2.1. Les facteurs environnementaux
 - 2.2.2. Facteurs nutritionnels
 - 2.2.2.1. Les folates ou vitamine B9
 - 2.2.2.2. La vitamine B12
 - 2.2.2.3. La vitamine B6
 - 2.2.3. Facteurs Génétiques
 - 2.2.3.1. Les polymorphismes du gène *MTHFR* C677T, A1298C, T1317C
 - 2.2.3.2. Le polymorphisme *MTR* A2756G
 - 2.2.3.3. Le polymorphisme *MTRR* A66G
 - 2.2.3.4. Le polymorphisme *TCN* C776G
3. Homocystéine et dysfonction endothéliale

- 3.1. Homocystéine et lésion endothéliale
- 3.2. Homocystéine, Stress cellulaire et Méthylation
 - 3.2.1. Homocystéine et Stress oxydant
 - 3.2.2. Homocystéine et Stress du Réticulum Endoplasmique
 - 3.2.3. Homocystéine et Apoptose
 - 3.2.4. Hypométhylation
- 3.3. Homocystéine et dysfonction vasculaire.
 - 3.3.1. Diminution de la fonction de thromborésistance endothéliale
 - 3.3.2. Hyperplasie myointimale
 - 3.3.3. Inflammation
- 3.4. TNF-alpha et homocystéine
- 4. Les études cliniques d'association de l'homocystéine et de ses déterminants nutritionnels avec les maladies cardiovasculaires
 - 4.1. Études épidémiologiques rétrospectives, transversales, et observationnelles
 - 4.2. Les études d'intervention
 - 4.2.1. Etudes d'intervention et diminution de la progression des plaques carotidiennes.
 - 4.2.2. Etudes d'intervention et fonction artérielle et endothéliale.
 - 4.2.3. Etudes d'intervention et fonction artérielle et endothéliale.
 - 4.2.4. Etudes d'intervention post-angioplastie
 - 4.2.5. Etudes d'intervention pour la prévention des MCV chez des sujets sains avec antécédents familiaux de MCV précoce.
 - 4.2.6. Etudes en cours sur la prévention du risque secondaire
- 5. Les études cliniques associées aux déterminants génétiques de l'homocystéine avec les maladies cardiovasculaires
 - 5.1. L'association des maladies cardiovasculaires avec les polymorphismes *C677T*, *A1298C*, *T1317C* de *MTHFR*
 - 5.2. L'association des maladies cardiovasculaires avec le polymorphisme *MTR A2756G*
 - 5.3. L'association des maladies cardiovasculaires avec le polymorphisme *MTRR A66G*
 - 5.4. L'association des maladies cardiovasculaires avec le polymorphisme *TCN C776G*

III- MICI et métabolisme de l'homocystéine

- 1. Métabolisme de l'homocystéine et MICI : des interactions complexes

2. Hyperhomocystéinémie et stress cellulaire : une nouvelle piste dans la pathogénie des MICI ?

2.1. Stress oxydatif

2.2. Inflammation aiguë et chronique

2.3. Stress du réticulum endoplasmique

2.4. Hypométhylation

2.5. Interactions avec les entéropathogènes : Vers un rôle de l'homocystéine dans l'immunité Innée ?

3. Facteurs influençant l'homocystéinémie au cours des MICI

3.1. Prévalence de l'hyperhomocysténémie au cours des MICI

3.2. Facteurs nutritionnels

3.3. Facteurs génétiques

3.4. Influence des traitements

4. Métabolisme de l'homocystéine et thromboses au cours des MICI

IV-Objectifs de la thèse

1. Quels sont les déterminants de l'hyperhomocystéinémie au cours des MICI ?

2. Les déterminants génétiques du métabolisme de l'homocystéine sont-ils associés au risque de maladie de Crohn en France ?

3. Une hyperhomocystéinémie est-elle impliquée dans la pathogénie de la maladie de Crohn via un stress oxydatif accru ?

4. Les déterminants génétiques du métabolisme de l'homocystéine sont-ils associés au phénotype et au risque de rectocolite hémorragique en Chine ?

V-Matériel et méthodes

1. Recrutement des sujets

1.1. Cohorte française

1.2. Cohorte chinoise

2. Méthodes de dosage et de génotypage de l'ADN

3. Analyses statistiques

4. Fiches techniques

VI-Résultats

1. Quels sont les déterminants de l'hyperhomocystéinémie au cours des MICI ?
2. Les déterminants génétiques du métabolisme de l'homocystéine sont-ils associés au risque de maladie de Crohn en France ?
3. Une hyperhomocystéinémie est-elle impliquée dans la pathogénie de la maladie de Crohn via un stress oxydatif accru ?
4. Les déterminants génétiques du métabolisme de l'homocystéine sont-ils associés au phénotype et au risque de rectocolite hémorragique en Chine ?

VII-Discussion

Publications en rapport avec la thèse:

Peyrin-Biroulet L, Guéant-Rodriguez RM, Chen M, Bronowicki JP, Bigard MA,

Guéant JL. Association of MTRR 66A>G Polymorphism With Superoxide Dismutase and Disease Activity in Patients With Crohn's Disease. Am J Gastroenterol 2008;103:399-406.

Peyrin-Biroulet L, Rodriguez-Guéant RM, Chamaillard M, Desreumaux P, Xia B,

Bronowicki JP, Bigard MA, Guéant JL. Vascular and cellular stress in inflammatory bowel disease: revisiting the role of homocysteine. Am J Gastroenterol 2007;102:1108-15.

Chen M*, Peyrin-Biroulet L*, Bing X, Guéant-Rodriguez RM, Bronowicki JP, Bigard MA, Guéant JL. Methionine synthase A2756G polymorphism predicts ulcerative colitis and methylenetetrahydrofolate reductase C677T pancolitis, in Central China. BMC Genet (révisions mineures).

* *Contribution équivalente.*

I-Les MICI, des maladies fréquentes, d'étiologie multifactorielle

1. Les MICI, un problème de santé publique dans les pays développés

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI), maladie de Crohn (MC) et rectocolite hémorragique (RCH), sont des maladies fréquentes dans les pays riches (Europe du Nord et Amérique du Nord), avec par exemple une prévalence estimée à 200 pour 100 000 habitants aux Etats-Unis¹. La prévalence des MICI n'a cessé de croître dans les pays développés depuis les années 1940 pour toucher actuellement plus d'un million de personnes aux Etats-Unis et 2,2 millions de personnes en Europe². En France, l'incidence de la MC a continué d'augmenter dans le nord de la France pour atteindre 6,4 cas pour 100 000 habitants durant la période 1997-99 contre 5,2 cas pour 100 000 habitants durant la période 1988-90 ($P < 0,001$)³. Ces maladies représentent un véritable problème de santé publique dans ces pays de par leur impact négatif sur la qualité de vie des sujets atteints, une mortalité augmentée (pour la MC), un recours fréquent à la chirurgie et aux hospitalisations, les effets secondaires des traitements (corticoïdes notamment), et les coûts directs mais aussi indirects (arrêts de travail notamment) liés à leur prise en charge⁴. La prise en charge des malades avec une forme modérée à sévère de RCH réfractaire représente un coût non négligeable pour la société. Le coût moyen par hospitalisation était ainsi de 3 726 euros dans une enquête récente menée au Canada, une chirurgie majeure ayant été réalisée chez 55 % des malades hospitalisés⁵. La prise en charge extra-hospitalière (consultations, examens paracliniques...) d'un patient atteint de RCH représentait quant à elle un coût moyen annuel estimé à 3171 euros dans une étude allemande⁶.

2. Les MICI, des maladies complexes

2.1. Implication des facteurs environnementaux et génétiques dans la pathogénie des MICI

Leur étiologie complexe, probablement multifactorielle, reste mal connue. Actuellement, l'hypothèse communément admise pour expliquer le développement des MICI serait une dysrégulation de la réponse immunitaire muqueuse dirigée contre des éléments de la flore intestinale, survenant chez des patients génétiquement prédisposés⁷. L'identification en 2001 de mutations du gène *NOD2/CARD15*^{8 9} et plus récemment du gène de l'IL-23R¹⁰ chez les sujets souffrant de MICI a permis de souligner l'implication de facteurs génétiques dans la pathogénie de ces maladies. Cependant, seule une minorité des patients atteints de MICI sont porteurs d'une ou plusieurs de ces mutations. Ces résultats ne permettent donc pas d'expliquer la pathogénie de ces maladies sur la base des facteurs génétiques seuls⁷. Plusieurs publications ont souligné le rôle probable des facteurs environnementaux dans la pathogénie des MICI.

Initialement décrites aux Etats-Unis et en Europe du Nord, les MICI touchent désormais de nombreux endroits du globe que l'on pensait jusqu'ici épargnés. Les études épidémiologiques font ainsi état d'une augmentation de l'incidence des MICI dans les pays en voie de développement, parallèlement à leur niveau d'industrialisation¹¹. Quels sont les facteurs environnementaux pouvant expliquer cette augmentation d'incidence des MICI dans ces pays ? Plusieurs pistes sont à l'étude. Parmi elles, l'hypothèse d'une amélioration des conditions d'hygiène (usage *largu manu* des antibiotiques, campagnes de vaccinations à large échelle, assainissement des réseaux d'eau), notamment au cours de l'enfance, et la survenue ultérieure de maladies allergiques et/ou auto-immunes telles que les MICI ou l'asthme fait l'objet d'une attention particulière^{12, 13}. L'existence d'un gradient nord-sud en Amérique du Nord et en Europe est en faveur de cette hypothèse^{1, 3, 14}. Le rôle possible d'une moindre exposition à certains parasites comme les helminthes a par exemple été suggéré

par plusieurs travaux^{13, 15}. Les facteurs environnementaux potentiellement impliqués dans la pathogénie des MICI restent cependant mal connus.

2.2. Hypothèses actuelles: un dialogue aberrant entre la flore et notre système immunitaire

De nombreux arguments plaident en faveur d'un dialogue aberrant entre la flore et les acteurs de notre système immunitaire inné et spécifique (ce dernier est aussi appelé système acquis ou adaptatif)^{7, 16}. La réponse de l'hôte vis-à-vis de notre flore peut être divisée en 3 compartiments: l'épithélium intestinal, les cellules du système immunitaire inné (monocytes, granulocytes et cellules dendritiques) et le système immunitaire adaptatif (lymphocytes B et C) (**Figure 1A**). Les animaux déficients pour un de ces compartiments développent une inflammation intestinale^{7, 16}.

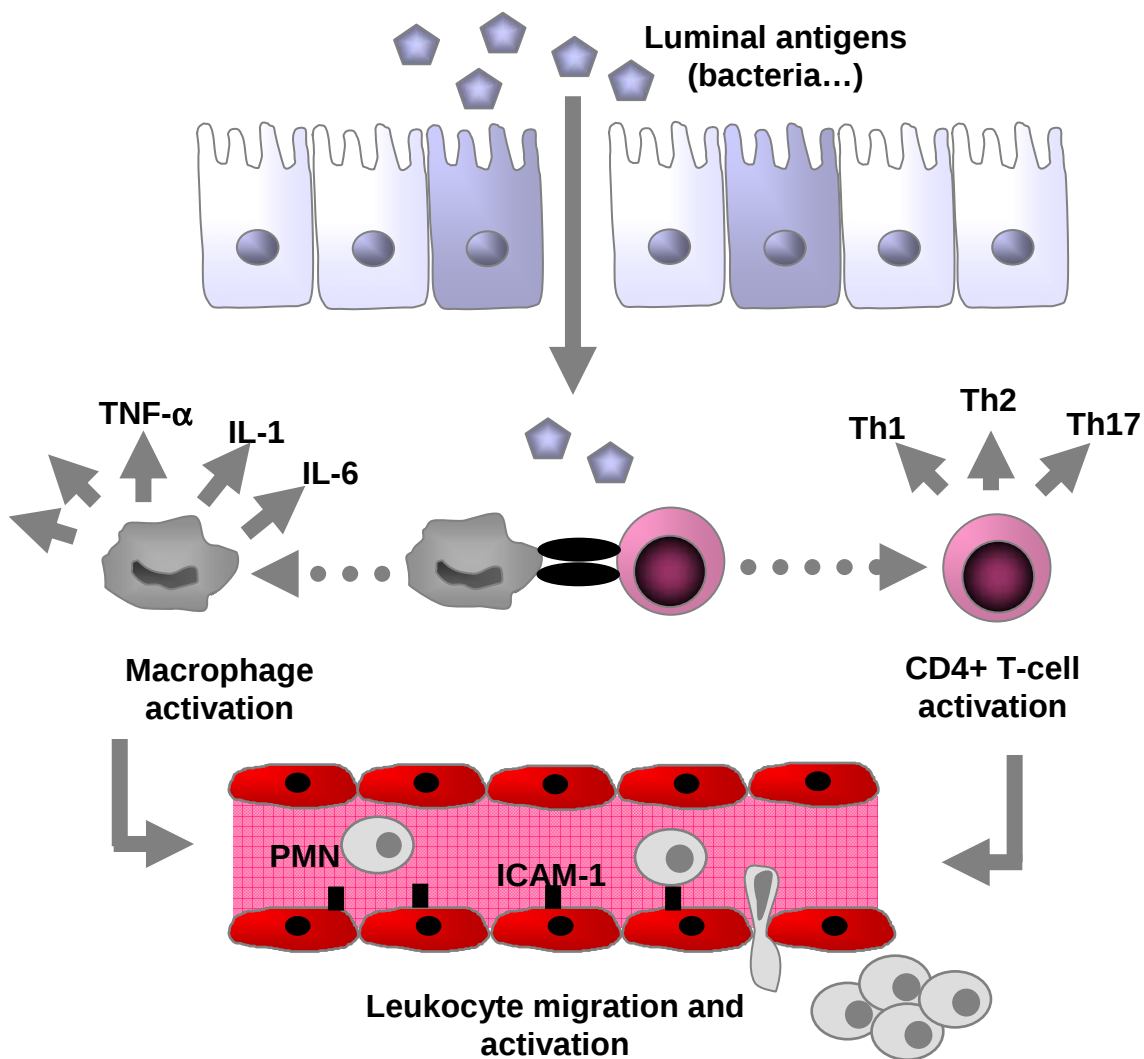


Figure 1A :Modèle physio-pathologique des maladies inflammatoires chroniques intestinales : La réponse de l'hôte aux composés bactériens peut être séparée en 3 compartiments : épithélium intestinal, cellules de l'immunité innée (macrophages, granulocytes...) et cellules de l'immunité spécifique (lymphocytes T CD4⁺ ...).

De nombreuses équipes à travers le monde ont tenté d'identifier un microorganisme qui pourrait être l'agent causal des MICI chez l'homme. La théorie actuelle suggère en fait plutôt un déséquilibre entre les agents pathogènes et la flore commensale. Le terme « dysbiose » a ainsi été proposé pour illustrer ce concept¹⁷. Alors que le rôle de *Mycobacterium paratuberculosis* reste très discuté, des études récentes ont clairement mis en avant le rôle possible joué par un *Escherichia coli* adhérent et invasif dans la pathogénie de la MC. Notre compréhension de la flore intestinale reste cependant incomplète et le caractère primitif ou secondaire des anomalies de la flore observées chez les sujets atteints de MICI reste à déterminer^{18, 19}. Des approches métagénomiques et des analyses du microbiome pourraient permettre une meilleure compréhension de la diversité de notre flore et donc de la pathogénèse des MICI^{7, 20}.

L'épithélium intestinal, qui fait partie du système immunitaire inné est largement impliqué dans le maintien d'une homéostasie intestinale. Les cellules épithéliales, qui forment normalement une barrière « étanche » entre l'environnement intra-luminal et notre corps, peuvent être à l'origine d'une activation excessive de notre système muqueux intestinal en cas de perméabilité intestinale accrue comme cela a été rapporté au cours de la MC^{21 7, 22}.

Le système immunitaire inné représente une défense non spécifique contre les pathogènes²¹. L'implication d'un déficit immunitaire inné au cours de la MC a été soulignée par l'identification de *Nucleotide-binding Oligomerization Domain containing 2 (NOD2)* comme gène de susceptibilité de la MC^{8, 9}. Les sujets homozygotes ou hétérozygotes composites pour une des 3 mutations communes du gène *NOD2* ont un risque 40 fois plus élevé de développer une MC iléale. La protéine NOD2 est un récepteur intra-cellulaire pour un composé de la paroi bactérienne, le muramyl-dipeptide, et est exprimé par les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules de Paneth⁷. Plus récemment, il a été

montré que NOD2 régulerait l'expression de certains peptides antimicrobiens considérés comme de véritables « antibiotiques naturels de l'intestin », dont font partie les défensines et dont l'expression est diminuée au cours de la MC²³, ce qui contribuerait au défaut d'élimination des microbes et donc au développement et au maintien d'une inflammation intestinale.

Ces anomalies du système immunitaire inné associées à une rupture de tolérance et donc à une inflammation intestinale (perte de l'homéostasie intestinale) vont entraîner une activation excessive du système immunitaire adaptatif qui va être responsable des lésions intestinales⁷. Cette réponse immunitaire spécifique à des antigènes est médiée par différents types cellulaires résidant dans la paroi intestinale ou recrutés lors du développement d'une inflammation : les lymphocytes B muqueux produisant des immunoglobulines, différentes sous-populations de lymphocytes T de phénotype Th1, Th2 ou Th17, et les lymphocytes T/B régulateurs⁷. Le développement d'une réponse Th1 faisant suite au contact avec des microbes va aboutir à la production d'IL-12p40 et d'interféron-gamma (IFN- γ), qui vont à leur tour activer des macrophages synthétisant entre autres de l'IL-1, de l'IL-6 et du tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) (**Figures 1A et B**). Classiquement, la MC est considérée comme étant de phénotype Th1. Récemment, une nouvelle lignée de lymphocytes T CD4 associée au phénotype Th17 a été mise en évidence et impliquée dans la pathogénie des MICI. Une étude cas-témoins menée en Amérique du Nord ayant analysé plus de 300 000 polymorphismes génétiques a identifié le gène codant pour le récepteur de l'IL-23, l'IL-23R, comme étant associé à un moindre risque de MC et pour la première fois de RCH¹⁰. Le développement d'une réponse Th17 est médiée par le TGF- β et l'IL-6, alors que l'IL-23 serait nécessaire à l'expansion et au maintien d'une population lymphocytaire de type Th17. Le récepteur de l'IL-23 comprend les sous-unités IL-23R et IL-12RB1, tandis que la cytokine IL-23 est composée des sous-unités p19 et p40¹⁶. D'autres types cellulaires que sont les lymphocytes T

régulateurs produisant IL-10 et/ou le transforming growth factor-beta (TGF- β) sont également nécessaires au maintien d'une homéostasie intestinale chez l'homme ⁷ (**Figure 1B**). Enfin, dans la MC où l'atteinte intestinale est typiquement transmurale, d'autres structures en contact avec notre intestin comme la graisse mésentérique pourraient jouer un rôle dans la pathogénie de cette maladie²⁴.

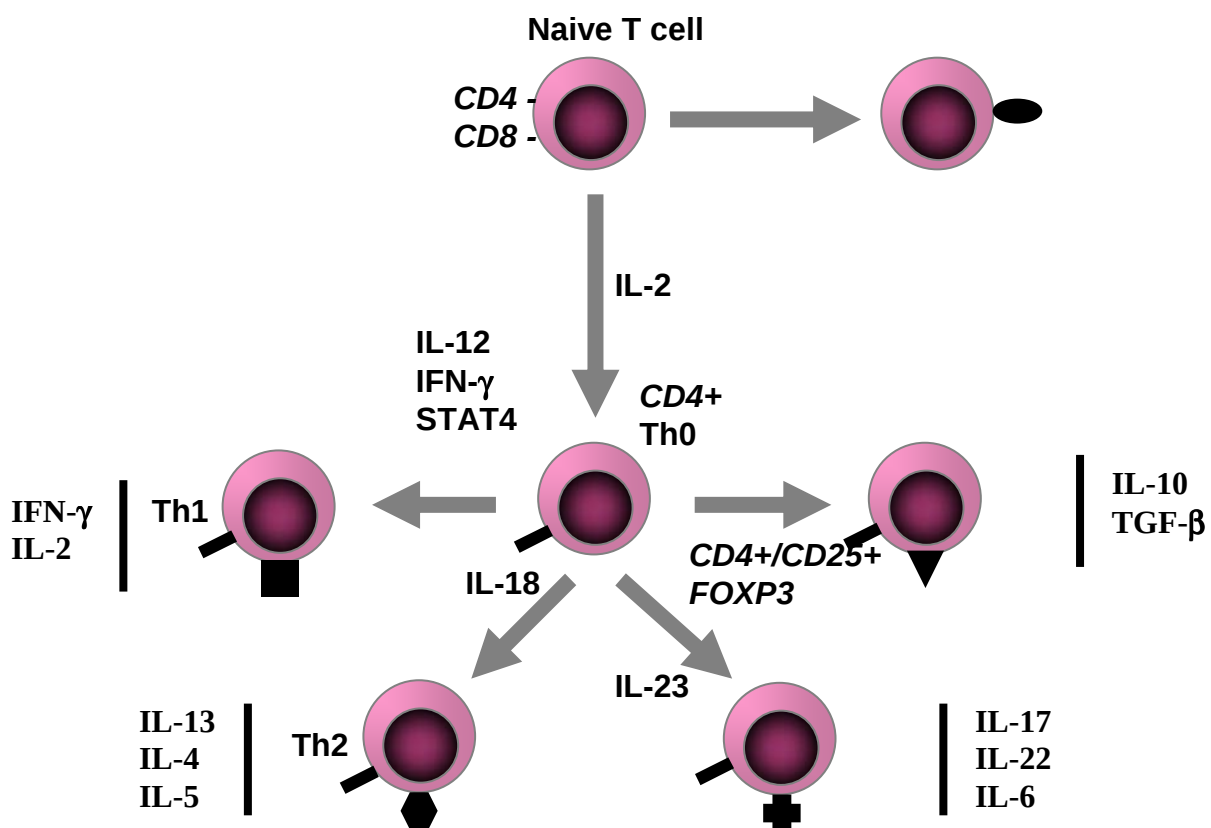


Figure 1B : Cytokines et différenciation des lymphocytes.

3. Histoire naturelle et complications évolutives des MICI

L'évolution des MICI est imprévisible. Des périodes de rémission (maladie quiescente) alternent avec des périodes d'évolution chronique active et des poussées dont l'intensité et la fréquence varient selon les sujets. L'histoire naturelle des MICI reste difficile à préciser mais les études randomisées contre placebo permettent d'en obtenir une estimation indirecte²⁵. Au cours de la MC, le profil évolutif de la maladie tend à devenir moins sévère avec le temps. Pendant la première année après le diagnostic, 80 % des patients ont une maladie qui reste active²⁶. Puis, ce pourcentage n'est plus que de 34 % à trois ans et chute à 24 % à 20 ans, sachant que l'évolutivité de la maladie durant les 3 premières années influence directement l'évolution ultérieure^{25, 26}. Il a été montré que la poursuite d'une intoxication tabagique après le diagnostic de MC était associée à un risque significativement augmenté de poussées ultérieures²⁷. Un arrêt total et définitif du tabagisme est donc indispensable dans la MC. Cosnes et al. ont démontré que sur 2573 sujets atteints de MC suivis dans leur service entre 1978 et 2003, 1070 (41,6 %) ont subi une résection intestinale, avec un taux annuel de recours à la chirurgie d'environ 5 %²⁸. Pour la RCH, peu de données sur son histoire naturelle sont disponibles dans la littérature et des données récentes manquent. La maladie évolue généralement (90 %) sur un mode intermittent, avec une alternance de poussées et de rémissions. Une rémission prolongée est quant à elle observée dans près de 10 % des cas⁴. Le risque d'extension d'une rectite ou d'une recto-sigmoïdite au-delà de l'angle colique gauche est de 30 % après 12 ans d'évolution²⁶. Dans une étude danoise portant sur 1 161 patients atteints de RCH suivis pendant 25 ans, un patient sur deux était en rémission clinique chaque année, avec un pourcentage stable d'une année sur l'autre²⁹. Plusieurs études ont montré qu'un antécédent d'appendicectomie réduisait le risque de voir se développer une RCH³⁰. En revanche, la réalisation d'une appendicectomie après le diagnostic de RCH ne modifie pas l'évolution ultérieure de la maladie^{30, 31}. La consommation de tabac a un effet « bénéfique »

bien établi sur l'évolution de la RCH³². Néanmoins, les risques de maladies cardio-vasculaires et de cancers liés au tabac ne permettent bien entendu pas de préconiser la poursuite d'une intoxication tabagique chez ces patients. Dans la RCH, le risque cumulé de colectomie à 5 ans est de 35 % en cas de pancolite, de 19 % en cas colite étendue dépassant l'angle colique G et de 9 % en cas de recto-sigmoïdite²⁹.

D'autres complications peuvent survenir au cours de l'évolution des MICI : ce sont les complications osseuses (près d'un patient sur deux a une ostéopénie et une ostéoporose est présente chez environ 15 % des malades³³), nutritionnelles (75 % des malades hospitalisés pour une MC sont dénutris, un tiers des patients atteints de MC ont un indice de masse corporelle (IMC) inférieur à 20³⁴, et la prévalence de l'anémie varie de 8,8 à 73,7 % au cours des MICI³⁵), et thrombo-emboliques (risque de thromboses veineuses profondes et embolies pulmonaires 3 fois plus élevé chez les patients atteints de MC que dans le reste de la population générale³⁶). Environ 1 à 2 % de l'ensemble des cancers colorectaux (CCR) observés dans la population générale compliquent une MICI. L'augmentation du risque de cancer colorectal (CCR) au cours de la RCH est largement admise³⁷. Avant 8 ans d'évolution d'une pancolite, le risque de CCR ne dépasse pas celui du reste de la population générale mais s'accroît ensuite de 0,5 à 1 % par an. Ainsi, ce risque est estimé à 2 %, 8 % et 18 % après respectivement 10, 20 et 30 ans d'évolution d'une pancolite³⁸. En cas de colite gauche, ce risque est nettement plus faible et serait de 5 % après 30 ans d'évolution. Le risque n'est en revanche pas significativement augmenté en cas de rectite ou de recto-sigmoïdite. Le risque de CCR chez les patients atteints de MC a longtemps été considéré comme nettement inférieur à celui rencontré dans la RCH. Les patients de MC présentent également un risque accru de néoplasies digestives³⁹; chez les patients avec une atteinte colique étendue (dépassant l'angle colique gauche) évoluant depuis plus de 10 ans, le risque de CCR rejoindrait celui décrit au cours de la RCH, le risque de CCR au cours de la MC étant 18 fois

supérieur à celui de la population générale avec une incidence cumulée à 8 % après 22 ans d'évolution³⁸. A côté des facteurs de risque reconnus de CCR comme des antécédents familiaux de CCR, ce sont l'ancienneté de la maladie et l'étendue des lésions coliques (atteinte au-delà de l'angle gauche), ainsi que l'activité de la maladie (sévérité de l'inflammation histologique) qui représentent les trois facteurs de risque indépendants de CCR dans les MICI^{40, 41}. L'association d'une cholangite sclérosante et/ou d'une iléite de reflux à une RCH semblent également majorer le risque de CCR chez ces sujets ; l'âge de début de la maladie reste discuté car il pourrait s'agir d'un facteur confondant⁴¹.

Au vu de ces données de la littérature, la Société Française d'Endoscopie Digestive (SFED) a émis des recommandations qu'il convient de suivre si l'on veut pouvoir espérer réduire la mortalité par CCR au cours des MICI⁴. Après 8 à 10 ans d'évolution d'une pancolite ou à partir de 15 ans en cas de colite gauche, il faut réaliser une coloscopie tous les 3 ans entre 10 et 20 ans d'évolution, puis tous les 2 ans entre 20 et 30 ans d'évolution. Après 30 ans d'évolution, une surveillance rapprochée avec une coloscopie annuelle est conseillée⁴. Cette surveillance endoscopique a cependant plusieurs limites. Premièrement, aucun essai randomisé contrôlé n'a démontré son intérêt pour réduire le risque de cancer colorectal chez les malades, même si pour des raisons éthiques un tel ne verra probablement jamais le jour⁴². En effet, comment peut-on imaginer comparer une attitude visant à surveiller un malade par coloscopies régulières à celle visant à se limiter à un simple examen clinique dans l'état actuel des connaissances ? Par ailleurs, l'interprétation des lésions suspectes par l'endoscopiste et l'anatomo-pathologiste reste largement dépendante de l'opérateur⁴². C'est dans ce contexte que l'intérêt des 5-aminosalicylés (5-ASA) pour prévenir la survenue de néoplasies colorectales n'a cessé de croître au cours de ces dernières années⁴². Plusieurs études rétrospectives ont analysé l'efficacité des 5-ASA dans cette indication, avec des résultats parfois contradictoires. L'interprétation de ces résultats reste difficile compte tenu de

variations importantes dans le schéma de l'étude, la durée et la dose de 5-ASA ou sulfasalazine utilisée⁴². Une méta-analyse ayant repris les données de 6 études n'a pas mis en évidence de rôle bénéfique des 5-ASA dans la prévention de la dysplasie, alors que les 5-ASA permettaient de réduire significativement le risque de cancer colorectal chez ces malades⁴³. Récemment, une étude nord-américaine cas-témoins a comparé 26 cas de néoplasie colorectale (8 cancers colorectaux et 18 dysplasies) à 96 sujets contrôles atteints de MICI mais sans néoplasie colorectale connue⁴⁴. L'âge des malades, l'âge au diagnostic de la maladie, le sexe, l'étendue de l'atteinte colique et les antécédents de cholangite sclérosante primitive, de tabagisme ou encore de rectocolite hémorragique étaient identiques dans les 2 groupes. L'emploi d'un 5-ASA à la posologie minimale de 1,2 g/jour était associé à une réduction de 72 % du risque de dysplasie (OR = 0,28 ; IC à 95 % : 0,09-0,85). Il faut également retenir le fait que le risque de cancer/dysplasie colorectal diminuait de manière inversement proportionnelle à la dose de 5-ASA⁴⁴. Quelles conclusions tirer de cette étude ? Comme les précédentes, son caractère rétrospectif ne permet pas formellement d'établir l'efficacité des 5-ASA dans la prévention des néoplasies colorectales. Toutefois, étant donné que la survenue d'un cancer colique est un événement plutôt rare qui survient généralement après 8-10 d'évolution d'une pancolite et après 15 ans d'évolution d'un colite gauche, il paraît difficile de mener une étude prospective de grande ampleur afin de répondre à cette question⁴². De plus, là encore, le fait que le groupe contrôle ne reçoive pas de 5-ASA pourrait poser des problèmes éthiques en l'état actuel des connaissances. Plusieurs études ayant abouti à la même conclusion, la plupart des experts conseille donc de prescrire des 5-ASA au long cours dans les formes coliques gauches ou pancoliques de rectocolite hémorragique. Il est pour l'instant préconisé de prescrire ce traitement à vie en l'absence d'études à ce sujet. Une surveillance endoscopique doit être systématiquement associée au traitement par 5-ASA⁴².

En plus d'altérer la qualité de vie des sujets atteints de MICI et d'entraîner une morbidité non négligeable, une mortalité accrue a été rapportée au cours de la MC. En effet, alors que les sujets souffrant de RCH ont une survie identique au reste de la population générale⁴⁵, une méta-analyse a récemment confirmé qu'il existait une mortalité accrue au cours de la MC, avec un Odds ratio variant entre 1,29 (IC à 95 % : 1,12-1,45)⁴⁶ et 1,52 (IC à 95 % : 1,32-1,74)⁴⁷. La survenue plus fréquente d'infections et de cancers de l'intestin grêle expliquent en partie cette augmentation de la mortalité au cours de la MC⁴⁵ qui est d'autant plus importante lorsque la maladie est diagnostiquée tôt, entre 10 et 26 ans⁴⁶.

4. Traitement des MICI en 2008 : un besoin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques

En 2008, le traitement des MICI reste difficile. Il n'existe toujours pas de traitement curatif et seuls des traitements symptomatiques, suspensifs sont aujourd'hui disponibles. Alors que l'arsenal thérapeutique qui était à notre disposition au début des années 1990 se limitait aux aminosalicylés (locaux et oraux), aux corticoïdes (locaux et oraux), aux immunosuppresseurs (azathioprine, 6-mercaptopurine, ciclosporine, méthotrexate), et à la chirurgie. Au début des années 1990, le développement des biothérapies (ou thérapies biologiques ciblées), au premier rang desquelles figurent les molécules anti-TNF⁴⁸, a révolutionné la prise en charge des patients atteints de MICI ayant résisté au traitement médical standard (corticoïdes, immunosuppresseurs principalement). Les premiers patients souffrant de MC traité par anti-TNF (infliximab) le furent en 1995⁴⁹. Il a depuis été démontré que les anti-TNF diminuaient le recours à la chirurgie, réduisaient le nombre d'hospitalisations, permettaient un sevrage des corticoïdes et une cicatrisation muqueuse endoscopique, et amélioraient la qualité de vie des malades, en plus d'entraîner une mise en rémission de la maladie qui persiste chez environ un tiers des malades après un an de

traitement⁴⁸. Trois anti-TNF se sont révélés efficaces dans la maladie de Crohn luminale : infliximab/Rémicade® (développé par la société de biotechnologie américaine Centocor et commercialisé en Europe par Schering Plough), adalimumab/Humira® (Laboratoire Abbott) et certolizumab pegol/Cimzia® (Laboratoire UCB-Pharma) résistante au traitement médical conventionnel⁴⁸. A ce jour, seul l'infliximab a clairement démontré son efficacité dans la maladie de Crohn fistulante⁴⁸ ainsi que dans la rectocolite hémorragique⁵⁰.

Par analogie avec l'arsenal thérapeutique déjà à la disposition de nos confrères rhumatologues, la révolution des biothérapies dans les MICI n'en est toutefois probablement qu'à ses débuts. Des molécules ciblant d'autres voies que celle du TNF sont devenues indispensables chez les sujets non répondeurs initiaux (un tiers des malades sont d'emblée réfractaires à ces thérapies) ou développant une perte de réponse clinique aux anti-TNF⁵¹. De nombreuses molécules sont en cours de développement dans les MICI. Il n'est pas possible ici d'en dresser une liste exhaustive, ce d'autant que de nombreux essais ne sont pas encore connus du grand public.

Deux classes de biothérapies paraissent prometteuses, ce sont les thérapies anti-molécules d'adhésion et celles bloquant l'activation des lymphocytes T. Le natalizumab empêche la migration des leucocytes (diapédèse) vers les sites inflammatoires en bloquant les intégrines $\alpha 4\text{-}\beta 7$ et $\alpha 4\text{-}\beta 1$ exprimées par les leucocytes⁵¹. Cette molécule a démontré son efficacité dans la MC réfractaire mais le risque de leuco-encéphalopathie multifocale progressive aujourd'hui estimé à 1 cas pour 1000 malades traités a freiné son développement. Le natalizumab, qui a récemment obtenu aux Etats-Unis une AMM dans la MC réfractaire à tout traitement médical y compris aux anti-TNF, est en cours de réévaluation par l'agence européenne du médicament dans la MC réfractaire aux anti-TNF⁵¹. L'abatacept est une protéine soluble constituée de la partie active du CTLA-4 et d'un fragment de la partie Fc de l'immunoglobuline humaine G1, IgG1. L'abatacept est un CTLA-4 mimétique, soluble, c'est-

à-dire non attaché aux lymphocytes T. Il agit en se fixant aux molécules CD80 et CD86 des cellules présentatrices d'antogène, les masquent et les empêche d'interagir avec les CD28, exprimés à la surface des lymphocytes T⁵¹. L'abatacept est ainsi un inhibiteur de l'activation des lymphocytes T qui est généralement excessive dans la MC. Cette molécule a récemment obtenu une AMM dans la polyarthrite rhumatoïde ; son efficacité spectaculaire chez ces patients a poussé le laboratoire qui le commercialise à initier d'emblée des essais internationaux de phase 3, sans passer par des essais de phase I ou II. Ces données permettent de souligner la nécessité de développer de nouvelles pistes thérapeutiques dans les MICI⁵¹. La possible implication du métabolisme de l'homocystéine dans la pathogénie de ces maladies complexes pourrait représenter une nouvelle voie de recherche dans ce domaine.

Devant une MICI cortico-dépendante ou cortico-résistante, il est actuellement recommandé de débiter un traitement par immunosuppresseurs type azathioprine puis d'instaurer un traitement anti-TNF en cas d'échec ou d'intolérance aux immunosuppresseurs (azathioprine, 6-mercaptopurine, méthotrexate). Pourquoi ne pas débiter d'emblée lors de la première poussée de MC un traitement immunosuppresseur et/ou anti-TNF afin de changer l'histoire naturelle de la maladie ?

Une seule étude a évalué l'intérêt d'une stratégie thérapeutique agressive précoce dans la maladie de Crohn⁵². La stratégie ascendante classique (« step-up » en anglais), reposant sur l'introduction d'une corticothérapie, puis de l'azathioprine en cas d'échec et enfin de l'infliximab en cas de résistance à l'azathioprine, était comparée à la stratégie descendante (« top-down » en anglais) consistant en un traitement maximal d'emblée par l'association azathioprine-infliximab ; cette étude a inclus 129 malades naïfs pour les corticoïdes, l'azathioprine et l'infliximab et avait une durée de deux ans⁵². A un an, le taux de rémission clinique sans corticoïdes (objectif principal) était significativement plus élevé dans le bras « top-down » que dans le groupe « step-up » (61,5 versus 42,2 %, respectivement, P=0,03).

Cette différence n'était toutefois plus significative au-delà d'un an de traitement. De plus, la qualité de vie était identique dans les deux groupes. Un élément qui pourrait être en faveur de la stratégie « top-down » est le fait que pour le sous-groupe de 26 malades chez qui a été réalisée une coloscopie à l'entrée dans l'étude et à deux ans, le pourcentage d'ulcères était plus bas dans le groupe « top-down » que dans le bras « step-up » (30 versus 73 %, respectivement, $P=0,003$)⁵². Au total, cette étude n'est pas en faveur d'un traitement agressif précoce pour tous les patients avec une maladie de Crohn. Cependant, aucune conclusion définitive ne peut être tirée de cette étude car une fois encore, le schéma thérapeutique utilisé pour l'infliximab, avec des perfusions aux semaines 0, 2 et 6 puis un traitement épisodique, à la demande, pourrait avoir une efficacité inférieure à celle de perfusions systématiques toutes les 8 semaines.

Par ailleurs, la stratégie « top-down » présente plusieurs inconvénients parmi lesquels : le risque de traiter d'emblée avec une association azathioprine-infliximab des patients qui auraient eu une évolution peu sévère de leur maladie, mais aussi la tolérance à long terme (risques d'infections et de cancers après deux ans de traitement ?) qui est pourrait être moins bonne avec la stratégie descendante « top-down », même si dans l'étude citée ci-dessus, la tolérance était identique dans les deux bras.

En résumé, en l'état actuel des connaissances, une escalade thérapeutique progressive reste la référence, même si l'avenir est probablement à un traitement « à la carte » ; la stratégie « top-down » pourrait alors être réservée à un groupe sélectionné de malades avec des facteurs pronostiques évolutifs péjoratifs tels qu'un âge < 40 ans, une atteinte ano-périnéale ou un recours à la corticothérapie dès la première poussée, comme suggéré récemment par l'étude de Beaugerie et al.⁵³. L'intérêt d'utiliser des marqueurs sérologiques tels que les ASCA ou des marqueurs génétiques tels que *NOD2* pour identifier les patients qui évolueront vers une maladie sévère représente une piste intéressante mais qui mérite

confirmation⁵⁴⁻⁵⁶. L'identification de nouveaux sous-groupes de patients atteints de MICI qui pourraient bénéficier d'une thérapeutique agressive précoce pourrait donc améliorer la prise en charge de ces maladies qui restent incurables en 2008.

II-Métabolisme de l'homocystéine et déterminants de la concentration plasmatique

1. Métabolisme cellulaire de l'homocystéine

L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé soufré formé au niveau intracellulaire à partir de la méthionine apportée par l'alimentation. L'Hcy n'est pas codée génétiquement et est absente des protéines. Elle est synthétisée par toutes les cellules de l'organisme. Le catabolisme de Hcy se produit principalement dans le foie et dans les reins par deux voies: la voie de la reméthylation et la voie de la transulfuration (**Figure 1C**).

1.1. Les voies de la reméthylation

Elles assurent la reméthylation de l'Hcy en méthionine selon deux réactions enzymatiques distinctes.

La principale réaction fait intervenir deux enzymes : la 5-MéthylTétraHydroFolate (5-MTHF), donneuse de groupement méthyl. Sa formation est sous la dépendance d'une enzyme, la 5,10-MTHFR (5,10-MéthylèneTétraHydroFolate Réductase), et la Méthionine Synthase (MS) dont le cofacteur est la vitamine B12.

Ce transfert du groupe méthyl, qui permet la synthèse de la méthionine, n'est possible qu'en présence de méthylcobalamine ; d'où la synergie d'action entre la vitamine B9 et la vitamine B12^{57, 58}.

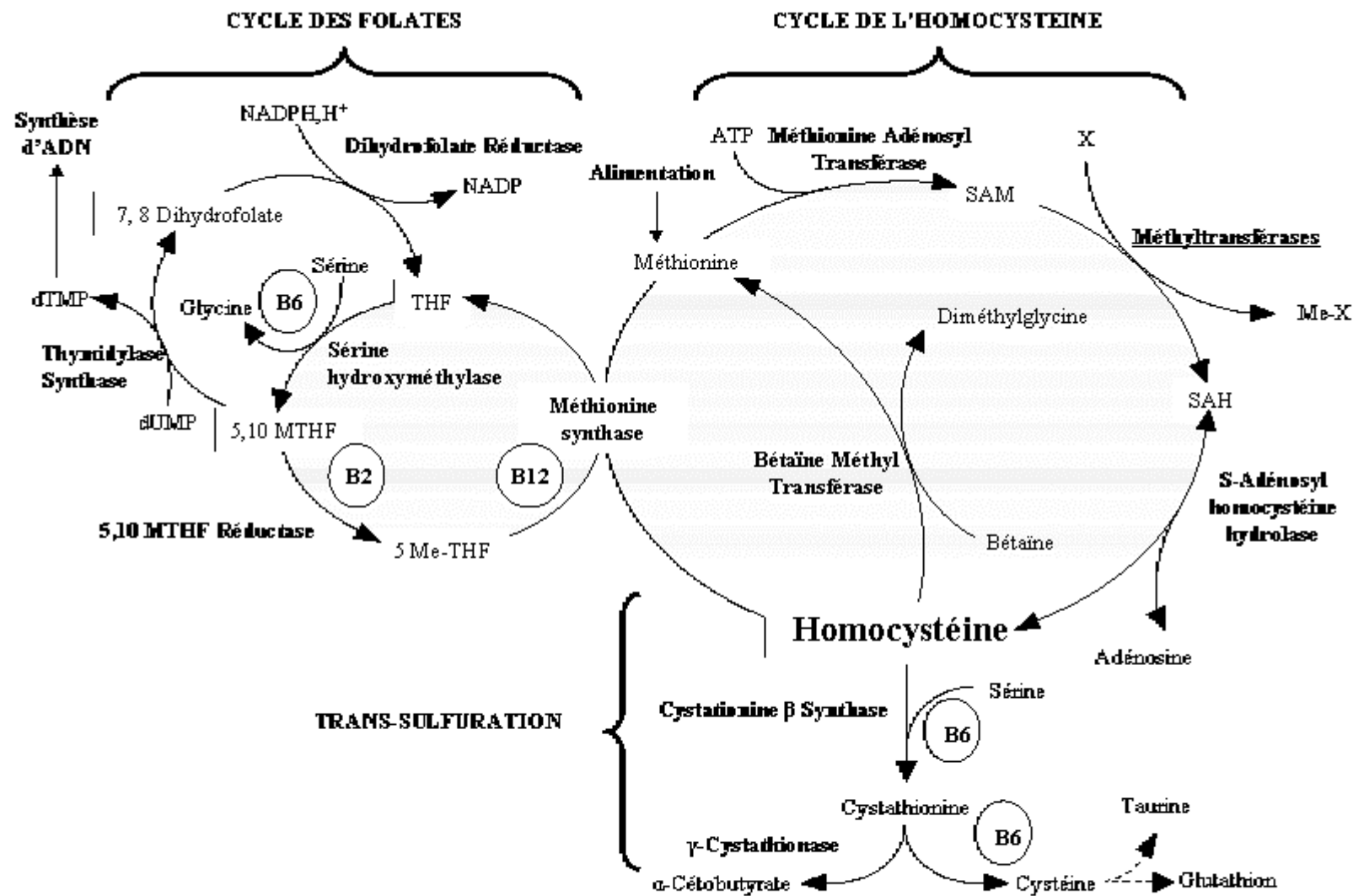


Figure 1: Représentation du métabolisme de l'homocystéine. THF: Tétrahydrofolate; DHF: Dihydrofolate; MTHF: Méthylène-THF; Me-THF: Méthyl-THF; SAM: S-adenosylméthionine; dUMP: Désoxyuracilemonophosphate; dTMP: désoxythymidine monophosphate; SAH: S-adenosylhomocystéine; FAD: Flavine-adenosine dinucléotide; NADP: Nicotinamide-adenine-dinucléotide phosphate

La deuxième réaction se déroule en grande partie au niveau du foie. Elle est de faible activité, et fait intervenir une enzyme hépatique, la bétaine-homocystéine méthyltransférase.

La bétaine est la molécule donneuse de groupement méthyl.

L'importance relative de ces deux voies de reméthylation varie en fonction du tissu considéré et du statut protéique. En cas d'apport protéique excessif la voie de la transulfuration est favorisée, à l'inverse en cas de déficit protéique, la voie de la reméthylation est favorisée afin de maintenir un pool cellulaire suffisant en méthionine^{57, 58}.

1.2. La voie de la transulfuration

La majorité de Hcy n'est pas reméthylée mais catabolisée en cystéine par la voie de la transulfuration. Cette voie permet à la méthionine, d'apporter un atome de soufre pour la formation de cystéine. L'activation de la méthionine en S-Adénosyl-L-Méthionine (SAM) se fait sous l'influence de la Méthionine-Adénosyl-Transférase (MAT). La SAM, principal donneur de groupement méthyl de l'organisme, cède ensuite ce groupement pour donner naissance à la S-Adénosine-L-Homocystéine (SAH). Cette molécule est hydrolysée en adénosine et en homocystéine par la S-Adénosyl-L-Homocystéine Hydrolase.

Sous l'influence de la Cystathionine- β -Synthase (CBS), l'Hcy se condense ensuite avec la sérine pour former la cystathionine, elle-même clivée et désaminée en cystéine et en α -céto butyrate (par la Cystéine γ Lyase [CGL]).

Ces deux réactions nécessitent la présence d'un cofacteur enzymatique, le phosphate de pyridoxal ou vitamine B6.

Contrairement aux autres voies métaboliques, cette dernière est irréversible, 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^{57, 58}.

2. l'homocystéine circulante.

	« REDUITE »	
Homocystéine	$\begin{array}{c} \text{NH}_3 + \\ \\ -\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2 - \text{SH} \end{array}$	1 %
	« OXYDÉE »	
Homocystine	$\begin{array}{c} \text{NH}_3 + \\ \\ -\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2 - \text{S} \\ \\ -\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2 - \text{S} \\ \\ \text{NH}_3 + \end{array}$	5 – 10 %
Homocystéine liée aux protéines	$\begin{array}{c} \text{NH}_3 + \\ \\ -\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2 - \text{S} \\ \\ \text{Protéine} - \text{S} \end{array}$	80 – 90 %
Homocystéine-cystéine	$\begin{array}{c} \text{NH}_3 + \\ \\ -\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2 - \text{S} \\ \\ -\text{OOCCHCH}_2 - \text{S} \\ \\ \text{NH}_3 + \end{array}$	5 – 10 %

Figure 2. Formes circulantes de l'homocystéine

2.1. Les différentes formes physicochimiques d'homocystéine circulantes

Il est important de comprendre le terme « homocystéine totale » (t-Hcy) dans un sens biochimique, parce que ceci aura pertinence dans les discussions qui suivent sur la méthodologie et sur les mécanismes pathophysiologiques. Le plasma humain contient des quantités réduites et oxydées d'homocystéine⁵⁹. Des définitions chimiques ont été établies par Butz et Du Vigneaud en 1932⁵⁷. Le sulfhydryle ou la forme réduite s'appelle homocystéine et le bisulfure ou la forme oxydée s'appelle homocystine. Les formes du bisulfure existent également avec de la cystéine et avec des protéines contenant les résidus réactifs de cystéine (homocystéine liée aux protéines). Les dernières formes oxydées sont désignées sous le nom des disulfides mélangés. Les formes oxydées d'homocystéine comportent habituellement 98–99% de l'homocystéine totale dans le plasma humain, 80–90% sont liées aux protéines⁵⁹. (Figure 2) L'homocystéine totale est donc la somme de toutes les formes d'homocystéine qui existent dans le plasma ou sérum.

Sur la base des travaux menés, la gamme de la concentration totale en homocystéine dans le plasma « des adultes en bonne santé » est 5–15 $\mu\text{mol/L}$ (Tableau 1)⁶⁰.

Tableau 1. Valeurs normales et pathologiques d'homocystéine

	Homocystéine $\mu\text{mol/L}$
Normal	5 – 15
Souhaitable	< 10
Hyperhomocystéinémie	
Modérée	16 – 25
Intermédiaire	26 – 50
Sévère	> 50

Cependant, il faut être prudent dans l'utilisation de prétendues « gammes normales » pour l'homocystéine. Certains travaux ont prouvé que le risque pour la MC est représenté par un continuum de concentration totale en homocystéine, avec le risque substantiel se produisant entre 10 et 15 $\mu\text{mol/L}$ ⁶¹. Dans la plupart des cas les événements cardiovasculaires surviennent avec des hyperhomocystéinémies modérées (15–25 $\mu\text{mol/L}$)⁶². Cependant, si la fonction rénale est altérée, le taux de t-Hcy peut atteindre les concentrations intermédiaires (25–50 $\mu\text{mol/L}$)^{63, 64}.

Thiolactone

L'Hcy thiolactone, un thioester cyclique de l'homocystéine, a récemment suscité l'attention pour son rôle potentiel dans l'athérosclérose et la maladie thromboembolique^{65, 66}. En plus des voies de la transsulfuration et de la reméthylation, l'Hcy intracellulaire peut être convertie par l'enzyme méthionyl-tRNA synthase en un complexe homocystéine-AMP. Ensuite, ce complexe est catabolisé en Hcy thiolactone, empêchant de ce fait l'incorporation de l'homocystéine dans les chaînes naissantes de polypeptide. Cependant, l'Hcy thiolactone a des propriétés réactives uniques qui peuvent mener à l'homocystéinylation des résidus de lysine et des groupes libres d'amine sur de nombreuses protéines cellulaires, ayant pour résultat une diminution de l'activité biologique et une dégradation prématurée⁶⁶. En outre, l'Hcy thiolactone sécrétée dans la circulation peut s'associer aux protéines du plasma; ce qui pourrait potentiellement contribuer au développement de l'athérosclérose et de la maladie thromboembolique. Des travaux récents ont démontré que l'Hcy thiolactone diminue l'activité de la paraoxonase associée aux HDL (PON-HDL), rendant de ce fait les HDL moins protectrices contre des effets toxiques de l'Hcy thiolactone et contre le stress oxydant⁶⁷. Des études additionnelles employant les modèles *in vivo* physiologiquement appropriés sont nécessaires pour comprendre mieux le rôle l'Hcy thiolactone sur l'athérogenèse.

2.2. Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie

Les déterminants de l'homocystéine totale plasmatique sont complexes et impliquent des facteurs environnementaux, nutritionnels et génétiques (Tableau 2).

Tableau 2. Causes d'hyperhomocystéinémie

Causes	Hyperhomocystéinémies	
	Intermédiaire et modérée (16 – 50 $\mu\text{mol/L}$)	Sévère (> 50 $\mu\text{mol/L}$)
Génétiques	Déficit hétérozygote en CBS Polymorphisme <i>MTHFR C677T</i>	Déficit homozygote en CBS Déficit homozygote en MTHFR Déficit en méthionine synthase
Nutritionnelles	Déficit en folates Déficit en Vitamine B6 Déficit en Vitamine B12	
Thérapeutiques	Anticonvulsivantes Méthotrexate Phénytoïne Monoxyde d'azote Azaribine	
Etats pathologiques	Insuffisance rénale chronique Hypothyroïde Psoriasis Arthritie rhumatoïde Diabète type II Cancers (pancréas, sein, ovaire)	

2.2.1. Les facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux principaux qui contribuent à une hyperhomocytéinémie modérée, incluent l'âge, le sexe, certains médicaments et différentes conditions pathologiques. Les personnes âgées ont de taux plus élevé d'Hcy. Dans ce groupe d'âge, le statut vitaminique a une influence majeure⁶⁸. Les hommes ont une Hcy plus élevée que les femmes, due à une plus grande masse musculaire ou aux effets sur les hormones sexuelles^{69, 70}. L'hyperhomocystéinémie modérée peut être liée à la prise des certains médicaments comme le methotrexate, la phénytoïne, la carbamazepine qui interfèrent avec le métabolisme des folates, le monoxyde d'azote, qui inactivent la vitamine B12, l'azaribine qui empêche l'activité de la CBS. Les contraceptifs, la pénicillamine ou les oestrogènes oraux diminuent l'Hcy⁷¹. Mais d'une manière générale, des suppléments en folates et/ou en vitamine B12 sont suffisants pour abaisser le taux d'Hcy⁷². Des conditions pathologiques comme l'hypothyroïdie, l'insuffisance rénale, les affections inflammatoires (notamment intestinales), l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, le diabète de type II, les maladies lymphoprolifératives et certains cancers (sein, ovaire, pancréas)⁷³.

2.2.2. Facteurs nutritionnels

2.2.2.1. Les folates ou vitamine B9

La vitamine B9, comme toutes les vitamines du groupe B, est hydrosoluble. La vitamine B9, ou folacine, est aussi appelée acide folique pour la forme synthétisée servant de supplément et folate pour celle présente naturellement dans les aliments.

Les caractéristiques générales

Le terme de « folates » (ou folacine ou vitamine B9) qualifie l'ensemble des composés dans lesquels l'acide ptéroïque est lié à une ou plusieurs molécules de glutamate (Figure 3). La plus

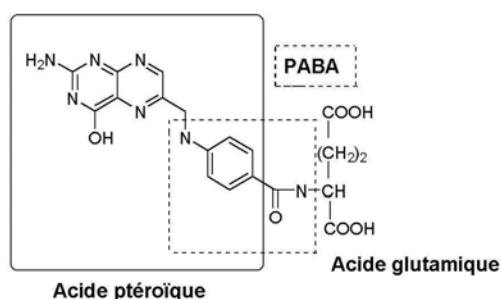


Figure 3. **ACIDE FOLIQUE**

grande partie de l'acide folique est présente dans les aliments sous forme de polyglutamates (entre 1 et 7 résidus glutamates reliés en chaîne au glutamyl constitutif).

L'absorption se fait au niveau du duodénum et du jéjunum, après hydrolyse en monoglutamate; c'est un processus actif saturable très dépendant du pH et du sodium. Le sang portal achemine l'acide ptéroylglutamique au foie où il est méthylé^{57, 58}.

C'est sous cette forme que la molécule est transportée dans le sérum, excrétée dans la bile, puis réabsorbée. Ce cycle entérohépatique représente une très forte circulation quotidienne de folates (>80 µg/jour) et constitue une voie importante de redistribution de l'acide folique aux tissus périphériques.

Les fonctions physiologiques

Les folates facilitent le transfert des unités mono carbonées à partir de multiples biomolécules vers des nombreuses réactions biosynthétiques telles que la synthèse de purine et de pyrimidine, la synthèse de la méthionine à partir de l'Hcy. Un apport adéquat en folates est essentielle pour la division cellulaire et l'homéostasie, en produisant de l'ADN (Figure 4)⁷⁴.

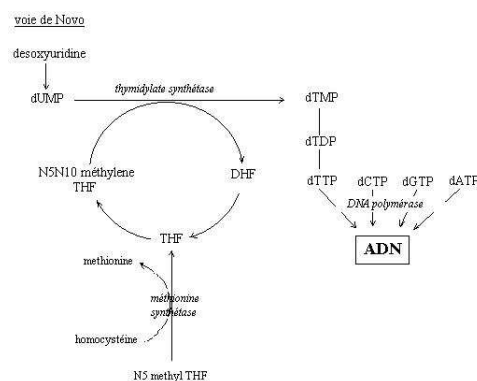


Figure 4. Folates et synthèse de l'ADN

Réduction de l'acide folique

Pour être métaboliquement active, la molécule doit être réduite par une enzyme, la dihydrofolate réductase qui fixe d'abord 2, puis 4 atomes d'hydrogène sur la molécule, ce qui explique sa grande sensibilité à l'oxydation.

Ainsi, le ptéroylglutamate subit une double réduction en THF (TétraHydroFolate).

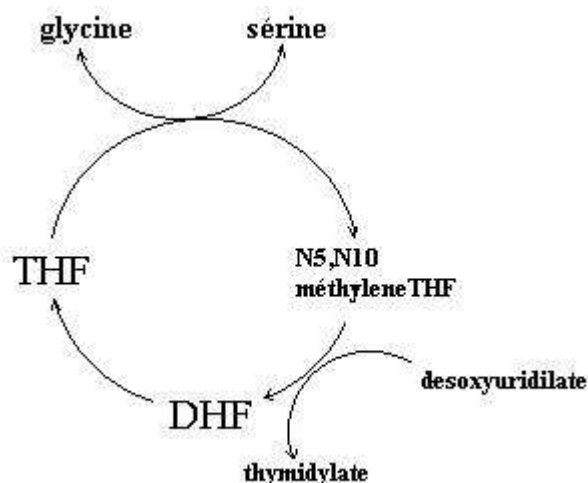


Figure 5. Cycle des folates

Méthylation du THF

La fixation des groupements monocarbonés en 5 et 10 conduit aux formes circulantes et actives (5,10-MTHF et 5-MTHF).

Déméthylation du 5-MTHF

La molécule de 5-MTHF véhiculée par le sérum doit être déméthylée pour intégrer le cycle folique cellulaire, et ce transfert de méthyl qui permet la synthèse de la méthionine, nécessite la MTHFR et son cofacteur enzymatique, la méthylcobalamine.

C'est en tant que donneur de méthyl que l'acide folique joue un rôle fondamental dans le métabolisme de l'Hcy et, par voie de conséquence, dans le métabolisme cérébral et nerveux.

2.2.2.2. La vitamine B12

La vitamine B12 appartient à la famille des corrinoïdes. Elle est constituée d'un noyau corrine et d'un ribonucléotide reliés entre eux par un pont amino2- propanol (Figure 6) :

- le ribonucléotide : il résulte de la condensation de la 5,6 - diméthylbenzimidazole (= base azotée) avec un sucre, le Ribose 3' phosphate.

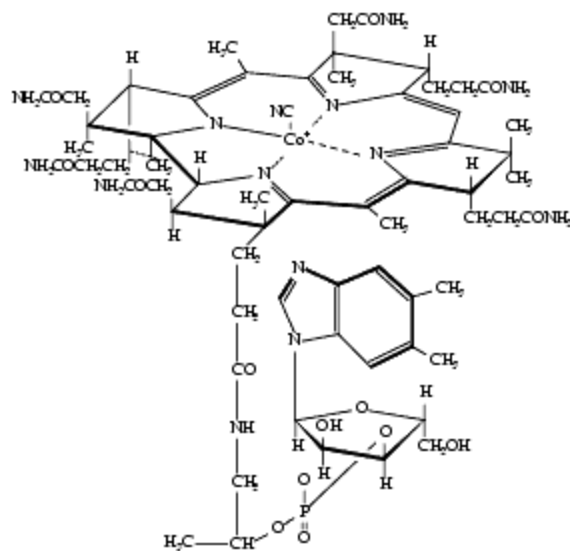


Figure 6. Vitamine B12 ou cyanocobalamine

Le noyau corrine : il est formé d'un atome de Co central relié à 4 noyaux pyrrole ainsi qu'à un ligand anionique ($-X$), dont la nature permettra de définir :

* La cyanocobalamine ($-X = -CN$), l'hydroxocobalamine ($-X = -OH$) : ces 2 composés sont à Co $3+$, stables et utilisés en thérapeutique

* La méthylcobalamine ($-X = -CH_3$), et la 5' -désoxyadenosyl cobalamine ($-X = -5'd Ad$) sont les formes coenzymes actives (avec Co $1+$)

Métabolisme

La vitamine B12 est présente dans les aliments d'origine animale et est exclusivement synthétisée par des bactéries. Liée aux protéines, elle est libérée du support alimentaire dans l'estomac sous l'effet du pH acide. L'absorption digestive (iléon) nécessite la liaison à une protéine, le facteur intrinsèque, synthétisé par les cellules pariétales gastriques. Le transport est assuré par des transporteurs spécifiques : les transcobalamines I, II, III.

La transcobalamine II.

Elle est la plus importante car elle fixe plus de 80 % de la vitamine B12 absorbée. C'est une glycoprotéine de 38 000 Da synthétisée par divers tissus (hépatocyte, entérocyte, macrophage,

cellules médullaires). Elle délivre la vitamine B12 aux cellules utilisatrices (moelle osseuse, foie, glandes endocrines) par un mécanisme d'endocytose récepteur-dépendant

Les transcobalamines I et III.

Ce sont des glycoprotéines ubiquitaires (PM = 120 000 Da) produites essentiellement par les granulocytes, surtout les promyélocytes et myélocytes. Elles transportent la B12 sans la distribuer aux cellules utilisatrices.

2.2.2.3. La vitamine B6

La vitamine B6, en tant que cofacteur de la CBS et de la CGL (voie de transulfuration) est un important modulateur des taux plasmatiques d'Hcy.

Le terme « vitamine B6 » désigne 6 composés : le pyridoxal (PL), la pyridoxine (PN), la pyridoxamine (PM), et leurs dérivés phosphorylés respectifs, le pyridoxal 5'-phosphate (PLP), la pyridoxamine 5'-phosphate (PMP), et la pyridoxine 5'-phosphate (PNP).

Nous nous intéressons seulement au phosphate de pyridoxal ou PLP.

Métabolisme

Dans la lumière de l'intestin grêle, le PLP et le PMP présents dans les produits animaux sont hydrolysés par une phosphatase pour être absorbés sous forme de PL et de PM par l'entérocyte, par un mécanisme de diffusion passive non saturable.

Le PLP est formé par phosphorylation du PL catalysé par la pyridoxal kinase. Certains tissus (le foie, le cerveau et les érythrocytes) peuvent synthétiser le PLP à partir de la PN (présents dans les produits végétaux).

Le foie est le principal site de synthèse du PLP et c'est le seul organe capable de libérer dans le sang la vitamine B6, sous forme de PLP.

Le rôle très important de ces vitamines du groupe B comme cofacteurs enzymatiques et comme substrats dans le métabolisme de l'Hcy explique la relation inverse entre les taux plasmatiques d'Hcy et ceux de vitamines B9, B6 et B12.

2.2.3. Facteurs Génétiques

Il existe plusieurs polymorphismes des enzymes intervenant dans le cycle des folates et la reméthylation de l'homocystéine. Il s'agit principalement de variants génétiques des enzymes 5,10-Méthylènetétrahydrofolate réductase (*MTHFR* C677T, A1298C), Méthionine synthase (*MTR* A2756G), Méthionine synthase réductase (*MTRR* A66G). De plus, un polymorphisme portant sur une protéine de transport de la vitamine B12, la transcobalamine (*TCN* C776G), a été rapporté et peut également s'associer à une hyperhomocystéinémie relative (Figure 7).

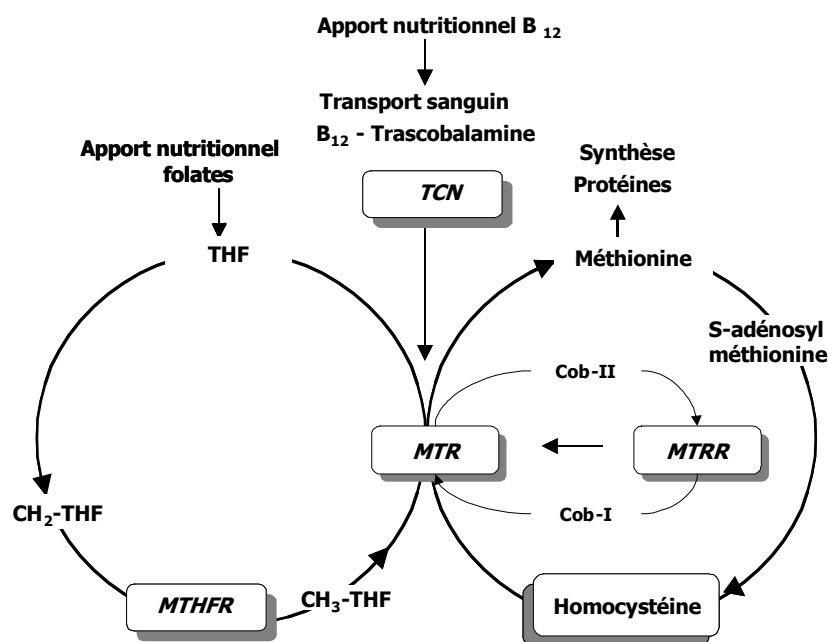


Figure 7. Gènes des enzymes intervenant dans le métabolisme de l'homocystéine.

2.2.3.1. Les polymorphismes du gène *MTHFR* C677T, A1298C, T1317C

Le gène de la MTHFR fut localisé par Goyette et al. en 1994 dans le chromosome 1⁷⁵. Le gène de la MTHFR comprend 11 exons⁷⁶. Plus tard, Gaughan et al. ont montré que le gène ne contient pas TATA box, mais contient plusieurs îlots CpG très importants pour les sites d'union pour des autres facteurs de transcription. MTHFR catalyse la formation de 5 méthyl-THF à partir de méthylène-THF 5.10^{77} . Ce dérivé méthylé du THF est nécessaire pour la reméthylation de l'homocystéine en méthionine. Le polymorphisme C677T (substitution d'une alanine pour une valine), rend MTHFR thermolabile avec une diminution de 50% de son activité⁷⁸. Deux autres polymorphismes de type SNP ont été identifiés dans le gène *MTHFR*, A1298C et une mutation silencieuse T1317C⁷⁹.

La prédominance du polymorphisme C677T est relativement élevée dans la population générale ; la prédominance des homozygotes 677TT est de 5 à 15% dans la plupart des populations caucasiennes⁸⁰.

La concentration de t-Hcy est d'autant plus élevée chez les porteurs du génotype 677TT que le statut folique est déficient⁸⁰⁻⁸³ ou qu'il existe des apports insuffisants^{83, 84}. Il existe d'autres polymorphismes, dont le plus fréquent est A1298C. Ce polymorphisme considéré isolément n'a pas d'influence sur la concentration en Hcy.

2.2.3.2. Le polymorphisme *MTR* A2756G

La reméthylation de l'homocystéine en méthionine nécessite une enzyme, la 5-méthyltétrahydrofolate-homocystéine S-méthyltransférase, mieux connue sur le nom de méthionine synthase (MS). Cette enzyme a comme cofacteur la vitamine B12.

En 1996, Li et al. ont isolé et caractérisé le gène humain de la MS (*MTR* dans la nomenclature des gènes)⁸⁵. Comme pour MTHFR, le gène codant pour l'enzyme se trouve dans le chromosome 1 (1q43)⁸⁶.

Les mutations de *MTR* peuvent produire une diminution de l'activité de l'enzyme et par conséquent une élévation de l'Hcy. Le polymorphisme A2756G (substitution d'un résidu de acide aspartique par la glycine) a été décrit par ^{86, 87}. La diminution de l'activité enzymatique joue un rôle dans la tumorigénèse et dans le retard mental. Ce polymorphisme a donc été étudié principalement dans les anomalies du tube neural et Syndrome de Down ^{85, 88, 89 90}. La relation entre ce polymorphisme et les MCV a été étudiée plus récemment⁹¹.

2.2.3.3. Le polymorphisme *MTRR* A66G

La reméthylation de l'Hcy en méthionine nécessite la MS (le gène est *MTRR* dans la nomenclature) dont le cofacteur est la cob(I)alamine, ensuite la cob(I)alamine est oxydée (cob(II)alamine), ce qui rend la MS inactive. La méthionine synthase reductase (MSR) régénère la forme fonctionnelle de la cobalamine⁹².

Un polymorphisme du gène de la MSR (*MTRR* A66G) se traduit par une substitution d'une isoleucine par une méthionine. *MTRR* GG peut théoriquement influencer le transport cellulaire et le métabolisme de la vitamine B12. Ce polymorphisme est associé aux anomalies de fermeture du tube neural (AFTN) en présence d'un niveau bas de vitamine B12⁹², à une élévation de la concentration de l'Hcy⁹³; mais les résultats des autres études sont contradictoires ⁹⁴⁻⁹⁷.

2.2.3.4. Le polymorphisme *TCN* C776G

La transcobalamine II (TCII) est une globuline plasmatique de transport de la vitamine B12. Son absence provoque une anémie mégaloblastique sévère détectée dès l'enfance⁹⁸. Le gène (TCN) de la TCII peut présenter plusieurs polymorphismes à l'origine de modifications de la concentration plasmatique en homocystéine. La mutation la plus commune correspond à la substitution d'une base cystine en guanine en position 776 (C776G)⁹⁹. La conséquence au niveau protéique est le remplacement d'un acide aminé arginine au profit d'une proline (codon 259)⁹⁹. L'allèle *TCN* 776 G diminue la transcription de la TCII et il existe par

conséquent une diminution de la concentration plasmatique en TCII. L'influence faible de l'allèle *TCN 776 G* sur la concentration de l'Hcy a été documentée dans des populations de Caucasiens^{99, 100}. En revanche, l'association des formes mutées de la *MTHFR* et de la *TCN* favorise l'apparition d'une hyperhomocystéinémie sévère chez l'embryon et augmente le risque d'avortement spontané¹⁰¹.

III- MICI et métabolisme de l'homocystéine

1. Métabolisme de l'homocystéine et MICI : des interactions complexes

Une hyperhomocystéinémie modérée est fréquente chez les sujets atteints de MICI¹⁰². Etant donné qu'une hyperhomocystéinémie est un facteur de risque reconnu de thromboses dans la population générale et que les patients avec MICI présentent un risque accru de maladie thrombotique, plusieurs équipes ont cherché à expliquer ce surrisque par une hyperhomocystéinémie. Aucune étude n'a pu à ce jour montrer une association entre métabolisme de l'homocystéine et thromboses au cours des MICI¹⁰². En revanche, des données récentes suggèrent une relation entre homocystéinémie et histoire naturelle de la maladie. En effet, l'homocystéine pourrait favoriser le développement et le maintien d'une inflammation de la muqueuse intestinale via un stress oxydatif et une augmentation de la production de cytokines proinflammatoires comme le $\text{TNF}\alpha$ ¹⁰³, contribuer à l'état inflammatoire de l'endothélium muqueux par le biais d'un stress du réticulum endoplasmique (RE)¹⁰⁴ voire même moduler la relation avec les microbes de notre flore¹⁰⁵. Contrairement au glutathion et à la cystéine, qui ont des fonctions d'homéostasie cellulaire et une action anti-oxydante, l'homocystéine est ainsi considérée comme un « mauvais » thiol¹⁰⁶. Récemment, les taux d'homocystéine ont ainsi été corrélés à l'activité, au nombre de poussées et à la durée de la RCH¹⁰⁷. Par ailleurs, les anomalies épigénétiques (méthylation de l'ADN) associées à une hyperhomocystéinémie et à

une carence en folates pourraient quant à elles expliquer, au moins en partie, l'augmentation du risque de cancer colorectal observée chez les malades souffrant de MICI^{108, 109}.

2. Hyperhomocystéinémie et stress cellulaire : une nouvelle piste dans la pathogénie des MICI ?

2.1. Stress oxydatif

L'homocystéine possède *in vitro* une action pro-oxydante, son groupe thiol étant oxydé pour former des espèces réactives de l'oxygène qui sont responsables de lésions et de dysfonctionnement cellulaires¹¹⁰. De nombreuses études ont mis en évidence le rôle majeur joué par les espèces réactives de l'oxygène dans la survenue des lésions de la muqueuse colique au cours des MICI^{111, 112}. Des taux accrus de glutathion peroxydase ont ainsi été mesurés dans le plasma des patients atteints de MICI en réponse au stress oxydatif¹¹³. L'homocystéine peut également sensibiliser les cellules au stress oxydatif en diminuant l'expression d'une large gamme d'enzymes anti-oxydantes. Des résultats récents indiquent notamment que l'expression et l'activité de l'hème oxygénase-1 et de la glutathion peroxidase étaient diminuées lors de cultures de cellules endothéliales après traitement par de l'homocystéine^{114, 115}. C'est ainsi qu'une diminution de la capacité antioxydante totale a été rapportée chez les sujets atteints de MICI¹¹⁶. La prise de méthionine et une hyperhomocystéinémie entraînant des lésions endothéliales et épithéliales potentiellement impliquées dans la pathogénie des MICI, trois anti-oxydants ont été testés dans des modèles expérimentaux de colite inflammatoire chez la souris¹¹⁷. Les résultats prometteurs obtenus avec ces molécules doivent être à présent confirmés chez l'homme. Des études complémentaires sur le rôle pivot du stress oxydatif secondaire à l'activation de la voie Necrosis Factor kappa B (NF- κ B) en présence d'homocystéine sont également attendues^{118, 119}.

2.2. Inflammation aiguë et chronique

Il a été montré *in vitro* que l'homocystéine pouvait stimuler la production de plusieurs facteurs pro-inflammatoires tels que MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), une chémokine pour les monocytes, et l'interleukine (IL)-8, une chémokine pour les lymphocytes T et les neutrophiles, ceci via l'activation du facteur de transcription NF- κ B^{104, 118, 120}.

L'homocystéine est également capable de moduler la réponse inflammatoire en régulant la synthèse de molécules d'adhésion comme VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) et ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), ainsi que celle du PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1)¹²¹, l'expression de ces 3 molécules étant augmentée chez les patients atteints de MICI¹²². Enfin, Les résultats d'expériences menées *in vitro* et *in vivo* suggèrent que l'homocystéine pourrait provoquer des lésions de la muqueuse intestinale par un effet cytotoxique médié par le TNF. En effet, l'homocystéine induirait une mort cellulaire en augmentant la capacité du TNF α à détruire les potentiels membranaires mitochondriaux¹²³.

Au total, les lésions induites par l'homocystéine via une augmentation de la production de molécules d'adhésion, de cytokines, et de chémokines pourraient participer au maintien d'une inflammation chronique de la muqueuse intestinale chez les patients atteints de MICI. Des études portant sur d'autres cytokines induites par l'homocystéine, dont IL-6, pourraient permettre une meilleure compréhension du rôle de l'homocystéine dans la régulation de l'inflammation intestinale¹²⁴.

2.3. Stress du réticulum endoplasmique

Dans les cellules eucaryotes, le réticulum endoplasmique (RE) est le site principal de synthèse et de maturation des protéines transmembranaires et des protéines résidentes du RE¹²⁵. Afin d'assurer le repliement correct des protéines synthétisées avant leur passage dans l'appareil de Golgi, il existe dans le RE de nombreuses molécules chaperonnes telles que la

GRP78 (glucose regulated protein-78) aussi appelée Bip¹²⁵. Lorsque les capacités du RE sont dépassées, empêchant donc le repliement correct des protéines, on parle de « stress du RE ». A l'état normal, le système appelé « unfolded protein response » va alors être activé et aboutir à la dégradation de ces protéines de mauvaise qualité¹²⁵. Cependant, un stress prolongé du RE, comme cela est observé en cas d'hyperhomocystéinémie, peut causer une apoptose des cellules endothéliales¹²⁶.

Récemment, Danese et al. ont montré que la néoangiogénèse était un phénomène impliqué dans la pathogénie des MICI¹²⁷. Les auteurs ont notamment montré que le taux de VEGF (vascular endothelial growth factor) était significativement élevé dans des prélèvements de muqueuse intestinale de patients atteints de MC ou de RCH¹²⁷. Etant donné qu'*in vitro*, on observe une surexpression du VEGF et de la GRP78 après stimulation des cellules par l'homocystéine¹²⁸, un lien entre stress du RE, VEGF et homocystéine est probable au cours des MICI. La bétaine est un donneur de méthyle dans la reméthylation de l'homocystéine en méthionine⁵⁸. L'apport alimentaire en bétaine étant connu pour diminuer le taux d'homocystéine et diminuer les lésions hépatiques liées à la prise d'alcool chez la souris¹²⁹, la bétaine pourrait donc être utilisée pour prévenir et/ou traiter le stress du RE induit par l'homocystéine. Ces données méritent toutefois confirmation chez l'homme.

2.4. Hypométhylation

La méthylation des régions promotrices du génome joue un rôle majeur dans la régulation de l'expression des gènes. Une hyperméthylation entraîne une répression, alors qu'une hypométhylation est associée à une activation de gènes¹³⁰.

L'homocystéine influence le niveau de méthylation de l'ADN car : (a) la reméthylation de l'homocystéine produit de la méthionine, le précurseur de la S-adénosylméthionine (SAM) qui est un donneur de groupes méthyles impliqués dans plus de 100 réactions de méthylations

(dont celle de l'ADN) dans notre organisme, et (b) la SAM, est un puissant inhibiteur des enzymes responsables de la méthylation de l'ADN, les méthyltransférases¹³⁰; l'inhibition de ces dernières par une hyperhomocystéinémie est donc responsable d'un état d'hypométhylation dans la cellule. Cette hypométhylation pourrait alors avoir comme conséquence d'activer certains gènes pro-inflammatoires chez les sujets atteints de MICI, même si aucune donnée n'est à ce jour disponible à ce sujet.

Par ailleurs, une hypométhylation globale de l'ADN¹³¹ associée à une hyperméthylation spécifique de gènes suppresseurs de tumeurs est un trait caractéristique des cellules tumorales, comme cela a été démontré dans le cancer colorectal et le carcinome hépatocellulaire^{108, 109, 130}. Il a notamment été rapporté une hyperméthylation spécifique des promoteurs des gènes p16 et hMLH1 dans les tumeurs colorectales^{108, 109, 130}. Une hypométhylation globale de l'ADN, peut-être secondaire à une hyperhomocystéinémie par carence en folates, a été mise en évidence dans les formes sévères de RCH¹³². Cette données pourraient donc expliquer, au moins en partie, le surrisque de cancer colorectal chez les sujets souffrant de MICI. Plus récemment, une hyperméthylation du récepteur à l'œstrogène a été proposée comme un marqueur du risque de néoplasie colorectale dans la RCH¹³³, soulignant l'implication possible d'anomalies épigénétiques dans la carcinogénèse colorectale au cours des MICI ou d'autres cancers digestifs¹³⁴.

2.5. Interactions avec les entéropathogènes : Vers un rôle de l'homocystéine dans l'immunité Innée ?

L'intestin humain est constamment en contact étroit avec divers microorganismes. Des études récentes sur l'immunité innée suggèrent que la reconnaissance de bactéries spécifiques par l'hôte est cruciale pour empêcher le développement d'une inflammation intestinale excessive⁵⁵. L'un des principaux systèmes antimicrobiens des cellules phagocytaires est iNOS

(inducible nitric oxide synthase), qui est responsable de la production de la molécule effectrice, l'oxyde nitrique (NO)¹³⁵. En effet, des souris déficientes en iNOS sont plus susceptibles à diverses infections intestinales, y compris *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes* et *Salmonella enterica*¹³⁵. Une hyperhomocystéinémie pouvant empêcher l'action antimicrobienne du NO sur *Salmonella typhimurium*¹⁰⁵, une hyperhomocystéinémie pourrait augmenter la susceptibilité vis-à-vis de certains entéropathogènes au cours des MICI¹³⁶. Cette piste pourrait expliquer au moins en partie le rôle délétère de l'hyperhomocystéinémie chez ces patients.

3. Facteurs influençant l'homocystéinémie au cours des MICI

3.1. Prévalence de l'hyperhomocystéinémie au cours des MICI

En 2001, Papa et al. rapportaient une hyperhomocystéinémie chez 26,5 % des patients atteints de MICI contre 3,3 % chez les sujets sains¹³⁷. Onze études ont retrouvé une hyperhomocystéinémie modérée (8,7 à 15,9 $\mu\text{mol/L}$) chez les patients atteints de MC ou de RCH¹⁰². Le tableau 3 reprend les résultats de ces différentes études. Deux études ont également étudié la concentration en homocystéine sur des prélèvements de muqueuse colique chez des sujets atteints de MICI : les taux intra-muqueux étaient nettement plus élevés que chez les sujets sains^{104, 138}, permettant de confirmer clairement l'existence d'une association entre hyperhomocystéinémie et MICI.

Tableau 3. Homocystéinémie chez les sujets atteints de MICI (maladie de Crohn notée MC ou rectocolite hémorragique notée RCH).

		Homocystéine (μmol/L) : moyenne ± écart-type ou médiane [extrêmes]		
Références	Patients atteints de MICI (RCH/MC)	Patients atteints de MICI	Sujets sains	Valeur de P
Cattaneo et al. ¹³⁹	61 (29/32)	12.2 ± 7.7	10.5 ± 4.6	P = 0.045
Mahmood et al. ¹⁴⁰	68 (37/31)	13.2 ± 7.8	7.4 ± 2.8	p < 0.01
Maire et al. ¹⁴¹	171 (0/171)	14.8 [4.1-51]	4.4-12.4	ND
Ramagnuolo et al. ¹⁴²	65 (9/56)	8.7 ± 1	6.6 ± 0.4	p < 0.05
Koutroubakis et al. ¹⁴³	108 (53/55)	15.9 ± 10.3(RCH) et 13.6 ± 6.5 (MC)	9.6 ± 3.4	p < 0.05
Oldenburg et al. ¹⁴⁴	231 (89/142)	12.3 [4.6-51,3]	11.1 [3.9-27.6]	P = 0.001
Chowers et al. ¹⁴⁵	105 (0/105)	10.9 ± 5.1	7.5 ± 1.5	p = 0.0001
Lambert et al. ¹⁴⁶	21 (0/21)	13.24 ± 5.53	10.2 ± 3.6	p < 0.01
Bjerregaard et al. ¹⁴⁷	106 (52/54)	10.7	ND	ND
Papa et al. ¹³⁷	64 (39/25)	11.7 ± 5.7	7.8 ± 2.5	P = 0.001
Mahmud et al. ¹⁴⁸	174 (91/83)	10.85 [3.25-39.24]	8.99 [4.13-16.16]	p = 0.0001

ND : non déterminé.

3.2. Facteurs nutritionnels

Les carences nutritionnelles observées chez les sujets atteints de MICI peuvent être la conséquence de nombreux phénomènes tels que : l'anorexie, les carences nutritionnelles d'apport, l'amaigrissement, la malabsorption secondaire aux résections chirurgicales ou aux lésions causées par l'inflammation muqueuse chronique.

Plusieurs études ont exploré l'influence des déterminants nutritionnels de l'hyperhomocystéinémie chez les patients atteints de MICI¹⁰².

Globalement, il faut retenir que dans ces études, une carence en folates et/ou vitamine B12 semblait être la principale cause des hyperhomocystéinémies constatées chez les patients atteints de MICI¹⁰².

Dans deux études italiennes, la prévalence d'une carence en folates était plus élevée chez les patients MICI (15 %) que chez les sujets sains (5 %, $P = 0,02$) et le seul facteur indépendant significativement associé à une hyperhomocystéinémie était le taux de folates, ceci quels que soient les génotypes *MTHFR* ou *CBS*^{137, 139}. De même, des sujets sains avaient des taux significativement plus élevés de vitamine B12 et de folates que les patients RCH ainsi que les patients MC dans deux autres séries, mais le taux d'homocystéine sérique était seulement associé de manière indépendante au taux de folates^{143, 145}.

En effet, le lien entre vitamine B12 et homocystéinémie semble moins évident au cours des MICI. Mahmood et al.¹⁴⁰ ont mis en évidence des taux de vitamine B12 significativement plus élevés chez les patients atteints de MICI par rapport aux sujets sains (en moyenne 490 ng/L versus 289 ng/L respectivement ; $p < 0,0005$), mais il n'existait qu'une faible corrélation entre les taux d'homocystéine et de vitamine B12. Ces résultats ont été confirmés par Ramagnuolo et al.¹⁴² montrant que l'hyperhomocystéinémie au cours des MICI était associée à une baisse des taux de vitamine B12 mais pas à une réelle carence en vitamine B12.

Contrairement aux folates et à la vitamine B12, l'influence du taux de vitamine B6 (pyroxidine) sur celui de l'homocystéine dans les MICI serait quasi nulle. Dans une étude cas-témoins, la concentration en vitamine B6 a été trouvée inférieure chez les patients MICI que chez les sujets témoins, mais aucune association significative n'a été observée avec les taux d'homocystéine plasmatique¹⁴⁹.

3.3. Facteurs génétiques

Les données concernant la prévalence du variant *C677T* de la *MTHFR* restent discordantes ; ils sont résumés dans le tableau 4. Alors que deux études réalisées en Europe du Nord retrouvaient une augmentation significative de la fréquence du génotype homozygote *MTHFR TT*^{147, 148}, quatre études réalisées en Europe du sud (deux en Italie, une en France et une au Portugal) et une série chinoise ne retrouvaient pas de différence significative pour ce variant^{137, 150-153}.

Mahmud et al.¹⁴⁸ ont été les premiers à retrouver une prévalence accrue de l'hyperhomocystéinémie et du variant *MTHFR 677 T* dans une série de patients irlandais atteints de MICI ; les auteurs retrouvaient 17,2 % de patients atteints de MICI présentant ce génotype contre 7,3% de sujets témoins (p=0,01). Une étude Danoise¹⁴⁷ a confirmé ces résultats, avec 15,1 % de patients atteints de MICI présentant une homozygotie *C677T* contre 8,3% dans la population générale (p<0,01).

Cinq autres études ont analysé la prévalence du variant *C677T* dans les MICI ; aucune de ces études n'a retrouvé de différence significative entre les sujets avec MICI et les témoins¹⁰². Ces résultats sont cependant difficilement interprétables car la fréquence des polymorphismes de la *MTHFR* varie selon des facteurs géographiques et ethniques. Le faible effectif ainsi que l'absence de données sur le statut en folates dans ces études pourraient également expliquer ces résultats discordants.

Tableau 4. Association entre polymorphismes de la *MTHFR* et risque de MICI (maladie de Crohn notée MC ou rectocolite hémorragique notée RCH).

Références	Année	Pays	Nombre de cas (RCH/MC)	Fréquence du génotype TT (% [IC à 95%])		Odds ratio [IC à 95%]	P
				Patients atteints de MICI	Sujets sains		
Chen et al. ¹⁵²	2005	Chine	72 (72/0)	13,9 [5,84-21,93]	18,9 [11,60-26,24]		p = 0,3707
Magro et al. ¹⁵³	2003	Portugal	116 (42/74)	12,9 [6,80-19,06]	9,9 [4,98-14,88]		NS
Bjerregaard et al. ¹⁴⁷	2002	Danemark	106 (52/54)	15,1 [8,25-21,94]	8,3 [6,66-9,95]	2 [1,1-3,5]	p < 0,01
Vecchi et al. ¹⁵¹	2000	Italie	102 (51/51)	25,5 [16,99-33,99]	23,6 [17,62-29,56]		NS
Guedon et al. ¹⁵⁰	2001	France	73 (11/62)	9,6 [2,79-16,39]	10,7 [4,06-17,37]		NS
Papa et al. ¹³⁷	2001	Italie	64 (39/25)	17,2 [7,87-26,50]	17,9 [12,55-23,35]		p = 1,0
Mahmud et al. ¹⁴⁸	1999	Irlande	174 (91/83)	17 [11,61-22,87]	7,3 [4,23-10,42]	RCH : 2,81 [1,28-6,13] MC : 2,67 [1,19-5,97]	p = 0,01

NS : non significatif.

Un autre variant de la *MTHFR* a été étudié au cours des MICI, le génotype *A1298C* ; une étude réalisée en Chine centrale sur 72 patients porteurs d'une RCH n'a pas retrouvé d'association significative entre le variant *A1298C* et le risque d'être atteint d'une RCH. Dans cette dernière étude, il existait en revanche un risque accru de RCH pancolique chez les sujets porteurs des génotypes *677TT* et *C677T/A1298C*, avec un Odds ratio à 4,92 (intervalle de confiance à 95% :1,3-18,3)¹⁵².

Peu d'études ont porté sur les polymorphismes des autres enzymes du métabolisme de l'homocystéine. Une seule étude a porté sur l'association du polymorphisme de *CBS* (864ins68) aux MICI¹³⁷. Les résultats concluaient que la prévalence de la mutation hétérozygote de *CBS* était identique chez les patients atteints de MICI et chez les sujets sains. Le variant *C776G*, étudié dans une série de patients atteints de RCH, n'était pas non plus associé au risque de développer la maladie¹⁵². Des études portant sur de plus larges échantillons de populations sont donc nécessaires afin de mieux étudier l'influence de ces polymorphismes sur le niveau d'homocystéine plasmatique au cours des MICI et sur le risque de développer de la maladie.

3.4. Influence des traitements

Parmi les traitements incriminés, les aminosalicylés ont longtemps été considérés comme une cause d'hyperhomocystéinémie dans les MICI. On pensait en effet que l'absorption des folates était inhibée par la sulfasalazine¹⁵⁴. Cependant, aucune association n'a été observée entre l'utilisation des aminosalicylés et le taux d'homocystéine plasmatique dans les études les plus récentes¹⁰². Les effets du méthotrexate, un antagoniste de l'acide folique, sur l'homocystéinémie n'ont jamais été évalués dans les MICI, alors que cette molécule est une cause reconnue d'hyperhomocystéinémie chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde¹⁵⁵. Par ailleurs, les polymorphismes du gène *MTHFR* ne semblent pas influencer l'efficacité du méthotrexate¹⁵⁶. En revanche, ils pourraient moduler la toxicité liée à ce

traitement. En effet, les effets secondaires sous méthotrexate seraient plus fréquents chez les individus homozygotes pour l'allèle 1298C de la *MTHFR*¹⁵⁶.

4. Métabolisme de l'homocystéine et thromboses au cours des MICI

Dans les MICI, le "dysfonctionnement endothélial" associé à l'hyperhomocystéinémie pourrait prédisposer à la survenue d'une maladie thromboembolique par différents mécanismes : augmentation du stress oxydatif vasculaire, perte du potentiel de vasodilatation NO-dépendante et/ou apoptose des cellules endothéliales résultant du stress prolongé du RE¹⁵⁷. De plus, l'homocystéine provoque une augmentation des taux de ICAM-1, VCAM-1, IL-8, MCP-1 et de PAI-1 qui pourrait contribuer au développement des complications thromboemboliques puisque ces molécules ont des propriétés à la fois proinflammatoires et prothrombotiques. Une stimulation de la production de facteurs procoagulants (facteur tissulaire, facteur V), une inhibition de molécules anticoagulantes (heparin-like glycosaminoglycan, antithrombine III, protéine C activée, thrombomoduline) et une diminution de la fibrinolyse pourraient également favoriser le développement de thromboses¹⁵⁷.

Les complications thrombotiques représentent une cause de morbidité et de mortalité non négligeable chez les sujets atteints de MICI, avec une incidence évaluée entre 1,3 et 6,4% selon les séries mais qui peut atteindre 39% dans des séries autopsiques^{158, 159}. Il faut noter que les complications thromboemboliques observées au cours des MICI sont principalement des thromboses veineuses profondes (atteignant avec prédilection les membres inférieurs) et des embolies pulmonaires^{158, 159}.

Récemment, une augmentation du risque d'athérosclérose a été rapportée chez les patients atteints de MICI, avec notamment une association significative entre l'épaisseur de l'intima/média des artères carotides communes et le taux d'homocystéine plasmatique, suggérant une possible implication de l'hyperhomocystéinémie dans la survenue des

thromboses au cours des MICI¹⁶⁰. Cependant, dans une étude précédente, Papa et al.¹³⁷ n'avaient pas retrouvé de différence de prévalence de l'hyperhomocystéinémie entre les patients atteints de MICI ayant présenté des antécédents personnels de maladie thrombotique et ceux indemnes de ce type de complication. Oldenburg et al. ont confirmé cette absence d'association dans une série indépendante¹⁴⁴.

Peu de travaux ont analysé les relations entre les polymorphismes des enzymes du métabolisme de l'homocystéine et les complications thromboemboliques dans les MICI. A notre connaissance, une seule étude a évalué l'association entre le variant *677TT* de la *MTHFR* et la survenue d'événements thrombotiques dans les MICI¹⁵⁰. Dans cette étude française, Guedon et al. avaient ainsi comparé quatre populations (un groupe de patients atteints de MICI sans complication thrombotique, un groupe de malades avec MICI et complications thrombotiques, un groupe aux antécédents de thromboses mais indemnes de MICI, et un groupe de témoins sains): Les différences de prévalences du variant *677TT* n'étaient pas statistiquement significatives entre ces quatre populations¹⁵⁰.

L'absence d'association entre les polymorphismes de la *MTHFR* et le risque de maladie thrombotique au cours des MICI démontre que le métabolisme de l'homocystéine ne semble pas jouer un rôle majeur dans la survenue de ce type de complication chez ces sujets. Grip et al.¹⁶¹ ayant confirmé le fait que des thromboses veineuses survenaient de façon plus précoce au cours de la vie chez les sujets atteints de MICI que dans le reste de la population générale, les thromboses ont probablement une origine multifactorielle chez ces malades. C'est ainsi que pour certains auteurs, le risque de thromboses pourrait être augmenté uniquement si le génotype homozygote *677TT* est associé à d'autres anomalies de la coagulation comme une mutation du facteur V de Leyden^{153, 162, 163}.

IV-Objectifs de la thèse

1. Quels sont les déterminants de l'hyperhomocystéinémie au cours des MICI ?

Une hyperhomocystéinémie modérée est fréquente au cours des MICI. Même si plusieurs études ont identifié une carence en folates (et à un moindre degré une carence en vitamine B12) comme une cause majeure d'hyperhomocystéinémie chez ces individus, les déterminants nutritionnels et génétiques de cette hyperhomocystéinémie chez les sujets atteints de MICI restent mal connus. En effet, dans la plupart des études disponibles dans la littérature, l'influence des facteurs nutritionnels était analysée indépendamment de celle des facteurs génétiques. Seuls Papa et al. ont étudié l'influence des facteurs génétiques et nutritionnels sur une même population et n'ont pas retrouvé d'influence du variant *C677T* de la *MTHFR* sur le niveau d'homocystéinémie¹³⁷. Cependant, le faible nombre de malades inclus (n=64) ne permettait de tirer aucune conclusion. Certaines études ont suggéré qu'une résection iléale était associée à une hyperhomocystéinémie au cours de la MC¹⁶⁴. L'influence des autres caractéristiques cliniques reste peu connue. Par ailleurs, divers médicaments sont susceptibles de modifier le niveau d'homocystéinémie chez ces patients. Alors que les études les plus récentes n'ont pas pu confirmer l'effet des aminosalicylés sur les taux de folates et d'homocystéine plasmatiques¹⁰², d'autres médicaments comme l'azathioprine métabolisé entre autres par l'enzyme TPMT pourraient interférer avec le métabolisme de l'homocystéine¹⁶⁵. Nous avons donc déterminé l'influence des déterminants nutritionnels et génétiques mais aussi des caractéristiques cliniques et des médicaments sur le niveau d'homocystéine plasmatique sur une large série de patients atteints de MC.

2. Les déterminants génétiques du métabolisme de l'homocystéine sont-ils associés au risque de maladie de Crohn en France ?

Les données concernant l'association du variant *C677T* de la *MTHFR* au risque de MICI restent discordantes. Alors que deux études réalisées en Europe du Nord retrouvaient une augmentation significative de la fréquence du génotype homozygote *MTHFR TT*, quatre études réalisées en Europe du sud (deux en Italie, une en France et une au Portugal) ne retrouvaient pas de différence significative pour ce variant¹⁰². Ces résultats sont toutefois difficilement comparables puisque la fréquence des polymorphismes de la *MTHFR* varie selon des facteurs géographiques et ethniques. Le faible effectif ainsi que l'absence de données sur le statut en folates/vitamine B12 dans ces études sont d'autres facteurs qui pourraient expliquer au moins en partie les différences observées entre les études. Peu d'études ont porté sur les polymorphismes des autres enzymes du métabolisme de l'homocystéine (*MTR*, *MTRR*, *TCN* et *CBS*). Une seule étude a porté sur l'association du polymorphisme de *CBS* (864ins68) aux MICI¹³⁷ ; la prévalence de la mutation hétérozygote de *CBS* était identique chez les patients atteints de MICI et chez les sujets sains. Nous avons donc étudié l'association des polymorphismes *MTRR A66G*, *MTHFR C677T* et *A1298C*, *MTR A2756G*, *TCN C776G* avec le risque de MC dans une cohorte de patients français avec une MC.

3. Une hyperhomocystéinémie est-elle impliquée dans la pathogénie de la maladie de Crohn via un stress oxydatif accru ?

Alors qu'aucune étude n'a retrouvé à ce jour une association entre complications thrombo-emboliques et hyperhomocystéinémie au cours des MICI, plusieurs études ont suggéré qu'une hyperhomocystéinémie pouvait promouvoir une inflammation chronique de la muqueuse intestinale, principalement par le biais d'un stress oxydatif^{102, 111, 112}. Il a été démontré que les taux élevés d'homocystéine augmentaient l'activité de la superoxyde

dismutase (SOD), un marqueur fiable et validé du stress oxydatif¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Récemment, des taux plasmatiques d'activité de la SOD plus élevés ont été rapportés chez des patients avec MICI¹⁶⁹, et les taux d'homocystéine ont été corrélés à l'activité, au nombre de poussées et à la durée de la maladie¹⁰⁷. Nous avons donc analysé la relation activité de la maladie, stress oxydatif mesuré ici par le taux de SOD et hyperhomocystéinémie au cours de la MC.

4 Les déterminants génétiques du métabolisme de l'homocystéine sont-ils associés au phénotype et au risque de rectocolite hémorragique en Chine ?

Globalement, les facteurs génétiques potentiellement impliqués dans la pathogénie de la RCH restent mal connus. Seul le gène de l'IL-23R a été récemment associé à la RCH. Dans une précédente étude réalisée en Chine centrale sur 72 patients porteurs d'une RCH, nous n'avons pas retrouvé d'association significative entre les polymorphismes *MTHFR C677T* et *A1298C* et le risque d'être atteint d'une RCH¹⁵². Les polymorphismes du gène *TCN* n'étaient pas non plus associés au risque de développer la maladie. Il existait en revanche un risque accru d'atteinte pancolique chez les sujets porteurs des génotypes *677TT* et *C677T/A1298C*, avec un Odds ratio à 4,92 (intervalle de confiance à 95% :1,3-18,3, $p=0,017$)¹⁵². Après avoir mis en évidence une association entre le polymorphisme *MTRR 66A>G* et maladie de Crohn chez des sujets français, nous avons donc étudié l'association des polymorphismes *MTRR A66G*, *MTHFR C677T* et *A1298C*, *MTR A2756G*, *TCN C776G* avec le phénotype et le risque de RCH dans une plus large cohorte de patients chinois souffrant de RCH.

V-Matériels et Méthodes

1. Recrutement des sujets

1.1. Cohorte française

Les patients éligibles étaient des hommes et des femmes âgés d'au moins 18 ans, atteints d'une MC avérée. Le diagnostic de MC reposait sur des arguments cliniques, radiologiques, endoscopiques et/ou histologiques. Cent quarante patients recrutés au Service d'Hépatogastroentérologie (Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, Pr MA Bigard) ont été recrutés de manière prospective dans une étude cas-témoins. Les informations concernant les caractéristiques cliniques et les traitements médicamenteux concomitants étaient recueillies à l'entrée dans l'étude. La topographie de la maladie a été définie selon la classification de Montréal ^{170, 171}. Ces sujets ont été comparés à 248 volontaires sains d'un Centre de Médecine Préventive. Les sujets témoins étaient appariés aux sujets du groupe MC en fonction de l'âge et du sexe. Les patients recevant un traitement et/ou une supplémentation en vitamines B susceptible d'influencer le métabolisme de l'homocystéine étaient exclus. Tous les sujets étaient des Français d'origine européenne. Le protocole de l'étude a été approuvé par le Comité Consultatif de Protection des Personnes se prêtant à des Recherches Biomédicales de Nancy, et les sujets inclus dans l'étude ont donné leur consentement éclairé par écrit.

1.2. Cohorte chinoise

Les patients éligibles étaient des hommes et des femmes âgés d'au moins 18 ans, atteints d'une RCH avérée. Le diagnostic de RCH reposait sur des arguments cliniques, radiologiques, endoscopiques et/ou histologiques. Cent soixante-huit patients recrutés au Department of Internal Medicine and Research center of Digestive diseases, Zhongnan

Hospital, Wuhan, province of Hubei (RP China) étaient inclus prospectivement dans une étude cas-témoins qui a duré 2 ans. Les informations concernant les caractéristiques cliniques et les traitements médicamenteux concomitants étaient recueillies à l'entrée dans l'étude. La topographie de la maladie a été définie selon la classification de Montréal ¹⁷⁰. Ces 168 sujets ont été comparés à 219 volontaires sains d'un centre de dons de sang de Wuhan (RP Chine). Les sujets témoins étaient appariés aux sujets du groupe MC en fonction de l'âge et du sexe ; ils ne présentaient aucun symptôme évoquer une MICI. Tous les sujets inclus étaient d'origine ethnique Han (l'ethnie majoritaire en Chine) et étaient originaires de la province de Hubei, en Chine centrale. Le protocole de l'étude a été approuvé par le Comité éthique local, et les sujets inclus dans l'étude ont donné leur consentement éclairé par écrit, conformément à la déclaration d'Helsinki.

2. Méthodes de dosage et de génotypage de l'ADN

Les prélèvements sanguins ont été collectés à jeun dans des tubes EDTA et après centrifugation immédiate les parties aliquotées ont été stockées à -70° C jusqu'à l'analyse. La concentration en homocystéine a été déterminée par polarisation de fluorescence (IMx-Homocystéine, Division diagnostique des laboratoires ABBOTT, Abbott Park-IL, Etats-Unis). La vitamine B12 et les folates plasmatiques ont été analysées par immuno-dosage sur un ACS 180 (Chiron Diagnostics Corporation, Etats-Unis) avec des valeurs- seuil établies respectivement à 100 pmol/L et à 7 nmol/L, selon les critères de l'OMS (Bollander-Gouaille 2002). La mesure de l'activité de la SOD a été réalisée avec le kit Ransod (Randox, USA) selon les instructions du fabricant. L'ADN génomique a été isolé avec le kit de Qiagen conformément aux recommandations du fabricant (Qiagen-France, Courtaboeuf) (Fiche No. 1) . La détermination des génotypes a été faite par technique RFLP ou par PCR en temps réel selon les protocoles décrits dans les fiches No. 2,3,4 et 5.

3. Analyses statistiques

Les variables qualitatives nominales sont exprimées sous forme de nombre de cas et de pourcentages avec l'intervalle de confiance à 95 %, et les variables continues sous forme de moyenne $\pm$ écart-type ou de médiane avec les 25èmes et 75èmes centiles. Pour les variables nominales, un test de χ^2 avec correction de continuité a été utilisé pour évaluer les différences entre les groupes. Pour les variables continues, un test U de Mann-Whitney ou un test de Kruskal-Wallis ont été utilisés. Une analyse par régression linéaire multiple a été utilisée pour mesurer les déterminants indépendants significatifs de t-Hcy, et une analyse par régression de Cox pour évaluer l'association entre les quartiles du score CDAI (Crohn's Disease Activity Index) et l'activité de la SOD. La significativité statistique, les odds ratios et l'intervalle de confiance à 95 % des variables indépendantes nominales et continues relatives au risque de MICI ont été déterminées par régression logistique multiple utilisant un modèle incluant l'âge, le sexe et les variables ayant une valeur de $P < 0,10$ dans les analyses univariées. Une valeur de P inférieure ou égale à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative. Les données étaient analysées avec le logiciel Statview 5 pour Windows (SAS Institute, Berkeley, Californie, USA) et le logiciel SPSS 10.0 pour Windows (SPSS, Paris, France).

4. Fiches techniques

Fiche Technique No 1 Extraction de l'ADN génomique du sang Kit commercial Bac Nucleon® ¹

Lyse des Globules Rouges

Pipeter 7-10 mL de sang total dans un tube Eppendorf® ²

Rajouter 4 volumes de réactif A pour 1 volume de sang

Mélanger 4 minutes à température ambiante

Centrifuger 5 minutes à 2800 rpm

Rejeter le surnageant

Rajouter 1 mL de réactif A

Mettre dans la glace 5 minutes

Centrifuger 5 min à 2800 rpm

Rejeter le surnageant

Garder le culot

Destruction des Membranes des Globules Blancs

Rajouter au culot 2 mL du réactif B

Vortexer jusqu'à dissocier le culot

Rajouter 500 µL de perchlorate ¹

Agiter par retournement 7 fois

Elimination des Protéines

Rajouter 2 mL de chloroforme ³

Agiter par retournement 7 fois

Rajouter 250 µL de résine ¹

Centrifuger 3 minutes à 2800 rpm

Récupération de l'ADN

Récupérer la phase supérieure à la résine

Rajouter 2.5 fois le volume récupéré d'éthanol 4 absolu froid

Récupérer le filament d'ADN dans un tube Eppendorf® ²

Eluer l'ADN avec 100 µL de tampon Tris ¹

Agiter

¹ Kit Nucleon Bac57 3®. Ref .RPN8512 Amersham-Pharmacia-Biotch. Parc technologique, rue René Razel 91898 Orsay Cedex France

² Eppendorf

3 Sigma Ref C-2432

4. RP NormapurTM Prolabo Ref 20821321

Fiche Technique No 2
MTHFR C677T et A1298C
méthylènetétrahydrofolate réductase
Technique Light Cycler®

Amorces ¹

MTHFR 677

Sens = 5' TGGCAGGTTACCCCAAAGG 3' T_m = 60°C
T_m=59°C

Antisens = 5' TGATGCCCATGTCGGTGC 3' T_m = 58°C

MTHFR 1298

Sens = 5' CTTTGGGAGCTGAAGGACTACTAC 3' T_m = 74°C
T_m=71°C

Antisens = 5' CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG 3' T_m = 68°C

Sondes fluorescentes ²

MTHFR 677

Probe Flu 5' TGAGGCTGACCTGAAGCACTTGAAGGAGAAGGTGTCT 3' T_m = 112°C
T_m=85°C

Probe Red 5' CGGGAGCCGATTCATCAT 3' T_m = 58°C

MTHFR 1298

Probe Flu 5' AAGGAGGAGCTGCTGAAGATGTGGGGGAGGAGCT 3' T_m = 112°C
T_m=88°C

Probe Red 5' ACCAGTGAAGAAAGTGTCTTTGA 3' T_m = 64°C

	µl	Concentration finale	X (Nb de capillaires ³ + 1)
H ₂ O ⁴	2.2		
MgCl ₂ ⁵ (25mM)	0.8	2mM	
Amorce sens MTHFR C677T 4picoM/µl	0.5	0.2µM	
Amorce anti-sens C677T 4picoM/µl	0.5	0.2µM	
Amorce sens MTHFR A1298C 4picoM/µl	0.5 de SF	0.2µM	
Amorce anti-sens MTHFR2 A1298C 4picoM/µl	0.5 de SF PREPARER LES SOLUTIONS FILLES(SF) A PARTIR DES SOLUTIONS MERES(SM) FEUILLES AMORCES	0.2µM	
Probe Flu MTHFR C677T 4 picoM/µl	0.5 de SM SM=1+24µl ou 2+48µl H ₂ O	0.2µM	
Probe Red MTHFR1 8 picoM/µl LC Red640	0.5 de SM SM=2+23 ou 4+46µl H ₂ O	0.4µM	
Probe Flu MTHFR A1298C 8 picoM/µl	0.5 de SM SM=1+24µl ou 2+48µl H ₂ O	0.2µM	
Probe Red MTHFR2 8picoM/µl LC Red705	0.5 de SM SM=2+23 ou 4+46µl H ₂ O	0.4µM	
Kit LC hybridization probe ⁵	1 de SM		

	SM=60µl deb dans a		
--	--------------------	--	--

Déposer 8µl de mix dans chaque capillaire et ajouter ensuite 2µl de DNA(concentration comprise entre 50et 100ng /analyse).

Programme d'amplification PCR ⁶ (F2/F3)

DENATURATION	Type : None		Cycles : 1	
Segment	°C.	Temp en sec.	Pente (°C/sec.)	Type
1	95	10 : 00	20	None

PCR	Type : Quantification		Cycles : 40	
Segment	°C.	Temp en sec.	Pente (°C/sec.)	Type
1	95	10	20	None
2	55	5	20	Single
3	72	5	20	None

COURBES DE FUSION	Type : Melting curves		Cycles : 1	
Segment	°C.	Temp en sec.	Pente (°C/sec.)	Type
1	95	10	20	None
2	45	20	20	None
3	85	0	0.2	Continu

REFROIDISSEMENT	Type : None		Cycles : 1	
Segment	°C.	Temp en sec.	Pente (°C/sec.)	Type
1	40	30	20	None

RESULTATS ⁷ :

Selon les Températures de fusion :

Lecture en F2

MTHFR C677T

homozygote sauvage

CC 63°C

homozygote muté

TT 55°C

hétérozygote

CT 55°C+64°C

Lecture en F3

MTHFR A1298C

homozygote sauvage

AA 63°C

homozygote muté

CC 60°C

hétérozygote

AC 61°C

¹ Synthétisées dans le Secteur Commun de Biologie Moléculaire ou par la société Tib MolBiol. Syntherselabor GmbH. D-12103 Berlin, Germany.

² Tib MolBiol. Syntherselabor GmbH. D-12103 Berlin, Germany.

³ H₂O PCR Grade. Réf. 03315932. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.

⁴ LC capillaries 20µl. Réf. 11909339. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.

⁵ LC Fast Start Hyb Pr. Réf. 12239272. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.

⁶ Light Cycler®. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.

⁷ Calibration tous les 6 mois par le kit Color Compensation Set Réf. 2158850. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.

Fiche Technique No 3
MTR A2756G
Methionine Synthase
Technique en Light Cycler®

Amorces ¹

sens MTR1 = 5' TATGGCTATCTTGCATTTTCA G 3'

Tm = 60°C

Tm=58°C

antisens MTR2 = 5' TTTACACTCCTCAAAACCATT 3'

Tm = 56°C

Sondes fluorescentes ²

Probe Flu = 5'AGACTCATAATGGCCCTGTCTATAT 3'

Tm = 72°C

Tm=85°C

Probe Red = 5'TCATATTCTTCCATGATTTCCTCAAAGTATTCATCCT3'

Tm = 98°C

	µl/tube	Concentration finale	X (Nb de capillaires ³ + 1)
H ₂ O ⁴	3.2		
MgCl ₂ ⁵ (25mM)	0.8	2mM	
Amorce sens (5µM)	1	0.5µM	
Amorce antisens (5µM)	1	0.5µM	
Probe Flu (4µM)	0.5 (SM=1+24µL ou 2+48µL H ₂ O)	0.2µM	
Probe Red (8µM)	0.5 (SM=2+23 µL ou 4+46µL H ₂ O)	0.4µM	
Kit LC hybridization probe ⁵ (60µl de b dans a)	1		

Déposer 8µl de mix dans chaque capillaire et ajouter ensuite 2µl de DNA (concentration comprise entre 50 et 100 ng/analyse)

Programme d'amplification PCR ⁶ (Programme : F2/F1)

DENATURATION	Type : None		Cycles : 1	
Segment	°C.	Temp en sec	Pente (°C/sec.)	Type
1	95	10 :00	20	none

PCR	Type : Quantification		Cycles : 40	
Segment	°C.	Temp en sec.	Pente (°C/sec.)	Type
1	95	10	20	None
2	50	5	20	Single
3	72	10	20	None

COURBES DE FUSION	Type : Melting curves		Cycles : 1	
Segment	°C.	Temp en sec.	Pente (°C/sec.)	Type
1	95	5	20	None
2	45	10	20	None
3	95	0	0.1	Continuous

REFROIDISSEMENT	Type : None		Cycles : 1	
Segment	°C.	Temp en sec.	Pente (°C/sec.)	Type
1	40	30	20	None

RESULTATS : Selon la température de fusion :

Homozygote sauvage	AA	56°C
Homozygote muté	GG	62°C
Hétérozygote	AG	56°C+62°C

¹ Synthétisées dans Secteur Commun de Biologie Moléculaire ou par la société Tib MolBiol. Syntherselabor GmbH. D-12103 Berlin, Germany.

² Tib MolBiol. Syntherselabor GmbH. D-12103 Berlin, Germany.

³ H₂O PCR Grade. Réf. 03315932. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.

⁴ LC capillaries 20µl. Réf. 11909339. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.

⁵ LC Fast Start Hyb Pr. Réf. 12239272. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.

⁶ Light Cycler®. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.

Technique en Light Cycler® mise au point au Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire CHU-Brabois

Fiche Technique No 4

MTRR A66G

Methionine Synthase Reductase

Technique RFLP

Amorces ¹

sens MTRR1 = 5' GCAAAGGCCATCGCAGAAGACAT 3'
 antisens MTRR2 = 5 'GTGAAGATCTGCAGAAAATCCATGTA 3'

T_m = 72°C.

T_m = 70°C

Préparation de la PCR

	µl	Concentration finale
DNA 250 ng/µl	1	250 ng
Tampon PCR 10X ²	5	1 X
MgCl ₂ 50 mM ²	2	2 mM
dNTP 1.25 mM ³	1	0.02 mM
Amorce sens MTRR1 10µM	4	0.8µM
Amorce antisens MTRR2 10µM	4	0.8 µM
Hot Start Taq DNA 5U/µl ²	0.4	2 U
H ₂ O ⁴	32.6	

Programme d'amplification PCR ⁵ :

	Température°C.	Temps en min
Dénaturation initiale	95	15

30 cycles		
	Température°C	Temps en sec
Dénaturation	96	30
Hybridation	60	35
Elongation	72	1

	Température°C	Temps en min
Elongation	72	7

Electrophorèse

Dépôt de 10 µl sur gel d'agarose ⁶ à 2 % migration ⁷ : 130 V ⁸ pendant 1h.

Préparation de la digestion ⁹

	µl
Produit de PCR	8
H ₂ O ⁴	8
Tampon Enzyme ¹⁰	2
Enzyme de restriction ¹⁰ NdeI 5U/µl	2

Incubation à 37°C. pendant 4h.

Electrophorèse

Dépôt de 20 μ l sur gel de polyacrylamide ¹¹ à 8%
Migration¹² 100 V ⁸ pendant 1h. dans TBE ¹³ 1X

Résultats^{14, 15}

	Nb de paires de bases
Homozygote sauvage AA	44 - 22
Homozygote muté GG	66
Hétérozygote AG	66 - 44 - 22

¹ Synthétisées dans le Secteur Commun de Biologie Moléculaire CHU Brabois

² Kit QIAGEN Ref. 203203. QIAGEN S.A. 3, av du Canada LP 809 91974 Courtaboeuf, Cedex, France

³ Réf. dNTP100mM : mélange dATP, dCTP, dGTP, et dTTP.. Prendre 12.5µL de chaque solution et ajouter 950 µL de H₂O milliQ Sigma Aldrich BP 701, 38297 St Quentin Fallavier Cedex, France

⁴ préparée au CHU Brabois

⁵ thermocycleur : PCR System 2400, Perkin Elmer, Applied Biosystems ; ZAC Paris Nord II, BP 50086, 95948 Roissy CDG, Cedex, France

⁶ Agarose Electrophoresis grade 100 g, Réf. 315510-019, Invitrogen Sarl, BP 96, 95613 Cergy Pontoise, Cedex, France

⁷ Cuves : Sub-Cell® GT Agarose Gel. BioRad, Life Science Group, Hercules California 94547, USA

⁸ Générateur: PowerPac™ . BioRad, Life Science Group, Hercules California 94547, USA

⁹ Bain Marie: Lauda E 100

¹⁰ Enzyme de restriction + Tampon ; Réf. RO111S 20000 U/ml. Ozyme, Biolab, BP 78053, St Quentin Yveline, Cedex, France

¹¹ (4 ml de polyacrylamide 30%BIORAD ref.161-0156 + 1.5ml de TBE 10X + 150µl de persulfate d'ammonium 10% + 15 µl de Temed + H₂O QSP 15ml)

¹² Cuves : Mini Proton ® 3. Electrophoresis Cell. BioRad, Life Science Group, Hercules California 94547, USA

¹³ Eurobio. 91953 Les Ulis, France

¹⁴ UVP Dual Intensity Transilluminator

¹⁵ Gel Doc Scanner. BioRad, Life Science Group, Hercules California 94547, USA

Fiche Technique No 5

TC II Transcobalamine

TCN C776G - Codon 259

Amorces ¹

sens CAS	=	CTCATGACTTCCCCCATGCC	T _m = 64 °C.
sens SIS	=	CTCATGACTTCCCCCATGCG	T _m = 64 °C.
antisens ERGE	=	TGCCAGACAGTCTGGGAAGA	T _m = 62 °C.

Préparation de la PCR

	µl	Concentration finale
DNA 250 ng/µl	1	250 ng
Tampon PCR 10X ²	5	1 X
MgCl ₂ 50 mM ²	2	2 mM
dNTP 1.25 mM ³	8	0.2 mM
Amorce sens CAS ou SIS 10µM	0.75	0.2 µM
Amorce antisens ERGE 10µM	0.75	0.2 µM
TaqDNA 5 U/µl ²	0.25	1.25 U
H ₂ O ⁴	32.25	

QSP 50 µl

Programme d'amplification PCR ⁵ :

	Température°C.	Temps en min
Dénaturation initiale	94	2

30 cycles		
	Température°C	Temps en sec
Dénaturation	94	20
Hybridation	60	20
Elongation	72	20

	Température°C	Temps en min
Elongation	72	7

Electrophorèse

Dépôt de 10 µl sur gel d'agarose ⁶ à 1.5 % + 3 µl de gel loading solution ⁷

Migration ⁸ : 130 V ⁹ pendant 1h.dans TBE ¹⁰ 1X

Résultats ^{11,12}

Taille attendue du fragment : 177 pb.

	primer 5WT	primer 5M
homozygote Proline - sauvage	1 bande	-
homozygote Arginine - muté	-	1 bande
hétérozygote Proline / Arginine	1 bande	1 bande

¹ Synthétisées dans le Secteur Commun de Biologie Moléculaire CHU Brabois

² Kit 18038-026. Invitrogen Sarl, BP 96, 95613 Cergy Pontoise, Cedex, France

³ Réf. dNTP100mM : mélange dATP, dCTP, dGTP, et dTTP. Prendre 12.5µL de chaque solution et ajouter 950 µL de H₂O milliQ Sigma Aldrich BP 701, 38297 St Quentin Fallavier Cedex, France

⁴ préparée au CHU Brabois

⁵ thermocycleur : PCR System 2400, Perkin Elmer, Applied Biosystems ; ZAC Paris Nord II, BP 50086, 95948 Roissy CDG, Cedex, France

⁶ Agarose Electrophoresis grade 100 g. Réf. 315510-019, Invitrogen Sarl, BP 96, 95613 Cergy Pontoise, Cedex, France

⁷ Gel Loading Réf. G2526. Sigma Aldrich BP 701, 38297 St Quentin Fallavier Cedex, France

⁸ Cuves : Sub-Cell® GT Agarose Gel. BioRad, Life Science Group, Hercules California 94547, USA

⁹ Générateur: PowerPac™ . BioRad, Life Science Group, Hercules California 94547, USA

¹⁰ Eurobio. 91953 Les Ulis, France

¹¹ UVP Dual Intensity Transilluminator

¹² Gel Doc Scanner. BioRad, Life Science Group, Hercules California 94547, USA

Polymorphisme mis en évidence à l'unité INSERM U-724 (Namour F 1997)

VI-Résultats

1. Quels sont les déterminants de l'hyperhomocystéinémie au cours des MICI ?

Nous avons tout d'abord confirmé que les taux d'homocystéine plasmatique étaient significativement plus élevés dans le groupe MC que dans le groupe témoin (respectivement 11,8 (4,05-30,61) et 10,4 (5,5-21,6) $\mu\text{mol/L}$, $P=0,0004$). En outre, un nombre plus élevé de patients (24 %) présentait une hyperhomocystéinémie modérée ($>15 \mu\text{mol/L}$), en comparaison avec les 8 % rapportés dans le groupe témoin. Inversement, les taux de vitamine B12 et de folates étaient plus faibles chez les sujets MICI comparés aux sujets témoins : respectivement 207 (79-783) contre 255 (93-1480) pmol/L , $P=0,0082$ et respectivement 8,6 (1,8-48) vs 11 (2,9-34) nmol/L , $P=0,0036^{172}$.

En analyse univariée, le taux de t-Hcy plasmatique était inférieur chez les sujets MC traités par azathioprine que chez ceux qui ne recevaient pas ce traitement, avec un résultat à la limite de la significativité ($P=0,0505$) (Tableau 5). L'influence des stéroïdes et des aminosalicyles n'était pas analysable puisque respectivement trois et deux patients recevaient ces traitements. De même, un seul patient avait un antécédent personnel de néoplasie digestive (adénome du côlon). Le traitement par infliximab et le méthotrexate n'avait aucun effet sur le niveau d'homocystéine plasmatique. La localisation de la maladie (définie selon la classification de Montréal) n'était pas associée au niveau d'hyperhomocystéinémie. Le risque de thromboses que ce soit au niveau des antécédents personnels ou familiaux n'était pas associé à une hyperhomocystéinémie chez ces sujets. En revanche, des antécédents de résection iléale étaient associés à des niveaux d'homocystéine plasmatique plus élevés. Le variant *MTHFR* 677 *TT* était le seul déterminant génétique qui était associé de manière significative à une valeur t-Hcy accrue à la fois chez les sujets témoins (10,2 (8,6-12,1) contre 12,5 (9,9-17,0), $P=0,0030$) et chez les patients MC (Tableau

5). Le taux de t-Hcy plasmatique était plus élevé chez les sujets MC porteurs du génotype *MTR* 2756 AA, mais la différence n'était pas statistiquement significative ($P=0,0910$)¹⁷².

Les taux de vitamine B12 et de folates étaient corrélés de manière significative à celui de l'homocystéine plasmatique en analyse univariée. L'âge, les taux de vitamine B12 et de folates étaient les seuls facteurs influençant de manière indépendante le taux d'homocystéine plasmatique en régression multiple (respectivement $P<0,0001$, $P=0,0014$, $P=0,0005$) (données non montrées). Nous avons alors recherché si les caractéristiques cliniques des 140 patients avec une MC pouvaient influencer leur statut en folates et en vitamine B12 sériques. En analyse multivariée, les patients ayant des antécédents personnels de résection iléale (médiane 156 vs 208 pmol/L, $P=0,0389$), d'iléite (médiane 159 vs 219 pmol/L; $P=0,0261$) ou de colectomie (médiane 155 vs 206 pmol/L, $P=0,0246$) avaient des taux de vitamine B12 significativement moins élevés que les sujets MC n'ayant pas ces caractéristiques. Le tabagisme actif était le seul facteur négativement associé au taux de folates sériques chez les sujets MC (médiane 6,6 contre 9,2 nmol/L chez les patients MC non fumeurs, $P=0,0123$). En régression multiple, la vitamine B12 et le fait d'être porteur du variant *MTHFR* 677 TT étaient les deux seuls facteurs prédictifs indépendants d'une hyperhomocystéinémie $> 15 \mu\text{mol/L}$ (Tableau 6)¹⁷².

Tableau 5 : Caractéristiques cliniques et génétiques des 140 patients MC et leur association avec le taux de t-Hcy plasmatique.

Caractéristique	Nombre de cas	Pourcentage (intervalle de confiance à 95%)	Homocystéine $\mu\text{mol/L}$: médiane (quartiles 25-75 %)		Valeur de P
			Avec caractéristique	Sans caractéristique	
Sexe masculin	53	37,9 (30,2-46,1)	14,24 (9,8-16,3)	11,06 (8,97-14,50)	0,0143
Antécédents familiaux de néoplasie digestive	15	10,7 (6,6-16,9)	12,4 (9,4-16,6)	11,4 (9,4-14,6)	0,7163
Antécédents familiaux de thromboses	16	11,4 (7,2-17,8)	10,8 (9,1-12,3)	11,9 (9,4-14,9)	0,3021
Antécédents personnels thromboses	8	5,7 (2,9-10,8)	12,3 (8,4-16,2)	12,0 (9,5-14,9)	0,9579
Fumeur	54	38,6 (30,9-46,8)	12,6 (9,7-16,1)	11,8 (9,2-14,6)	0,2760
Consommation d'alcool > 20 g/jour	3	2,1 (0,1-6,0)	15,1 (10,6-22,6)	11,9 (9,5-14,7)	0,4115
Médicaments concomitants :					
Infliximab	106	75,7 (68,0-82,1)	11,8 (9,4-14,8)	14,2 (11,2-15,1)	0,3857
Azathioprine	92	65,7 (57,5-73,1)	11,7 (9,0-14,6)	14,3 (10,8-16,4)	0,0505
Méthotrexate	7	5,0 (2,5-10,0)	16,5 (10,7-17,2)	11,9 (9,4-14,6)	0,1123
Topographie de la maladie :					
Iléon (L1)	22	15,7 (10,6-22,7)	11,9 (9,6-16,6)	12,0 (9,1-14,6)	0,4539
Côlon (L2)	60	42,8 (34,9-51,1)	12,4 (9,1-14,6)	11,9 (9,9-17,2)	0,1649
Caractéristique	Nombre de cas	Pourcentage (intervalle de confiance à 95%)	Homocystéine $\mu\text{mol/L}$: médiane (quartiles 25-75 %)		Valeur de P
			Avec caractéristique	Sans caractéristique	
Iléocôlon (L3)	57	40,7 (32,9-49,0)	13,7 (10,8-16,5)	11,7 (9,1-14,6)	0,1080
Tractus gastro-intestinal supérieur isolé (L4)	0	-	-	-	-
Maladie périanale	45	32,1 (25,0-40,3)	11,21 (9,1-15,1)	12,3 (9,7-15,1)	0,6282
Antécédents personnels chirurgicaux :					
Résection iléale	18	12,9 (8,3-19,4)	15,8 (11,2-18,2)	11,8 (9,2-14,5)	0,0133
Colectomie	12	8,6 (5,0-14,4)	14,6 (11,3-16,7)	11,8 (9,3-14,6)	0,0603
Chirurgie périanale	21	15,0 (10,0-21,9)	11,8 (9,5-14,0)	12,3 (9,5-15,3)	0,4927
Génotypes :					
<i>MTHFR 677 TT</i>	13	9,2 (5,5-15,3)	17,1 (9,0-22,3)	11,3 (9,5-14,5)	0,0219
<i>MTHFR 1298 CC</i>	12	8,6 (5,0-14,4)	10,9 (8,9-13,9)	10,7 (9,0-13,5)	0,9331

<i>MTR 2756 GG</i>	6	4,2 (2,0-9,0)	11,3 (8,0-12,6)	10,7 (9,0-13,5)	0,1516
<i>MTRR 66 GG</i>	29	20,7 (14,8-28,2)	10,2 (8,5-15,5)	11,8 (9,6-14,7)	0,2629
<i>TCN 776 GG</i>	27	19,3 (13,6-26,6)	11,9 (9,4-14,7)	11,9 (9,4-12,9)	0,5568

Tableau 6 : Facteurs associés à une hyperhomocystéinémie (> 15 µmol/L) chez les patients avec maladie de Crohn (analyse par régression logistique multiple).

Variable	Initial			Résiduel		
	OR	IC 95%	Valeur de P	OR	IC 95%	Valeur de P
Score CDAI	0,99	(0,98-1,00)	0,0981	-	-	NS
Folates sériques	0,95	(0,87-1,03)	0,2263	-	-	NS
Vitamine B12	0,99	(0,98-0,99)	0,0206	0,99	(0,98-0,99)	0,0187
SOD	1,00	(0,99-1,00)	0,6353	-	-	NS
Albumine	1,04	(0,89-1,21)	0,5923	-	-	NS
Protéine C-réactive	1,02	(0,97-1,07)	0,4795	-	-	NS
Prise d'azathioprine	1,12	(0,26-4,76)	0,8768	-	-	NS
Prise d'infliximab	1,96	(0,27-14,37)	0,5092	-	-	NS
Prise de Méthotrexate	3,26	(0,14-75,79)	0,4609	-	-	NS
<i>MTHFR 677 TT</i>	16,35	(1,09-244,97)	0,0430	6,40	(1,76-23,31)	0,0048
<i>MTHFR 1298 CC</i>	5,55	(0,52-59,33)	0,1562	-	-	NS
<i>MTRR 66 GG</i>	2,46	(0,36-16,94)	0,3591	-	-	NS
<i>MTR 2756 AG/GG</i>	1,26	(0,35-4,56)	0,7239	-	-	NS

OR, Odds ratio ; IC, intervalle de confiance ; NS, non significatif

2. Les déterminants génétiques du métabolisme de l'homocystéine sont-ils associés au risque de maladie de Crohn en France ?

Les fréquences alléliques des polymorphismes des gènes *MTHFR*, *MTR*, et *TCN* n'étaient pas statistiquement différentes entre les sujets témoins et les patients avec une MC. En revanche, la fréquence de l'allèle A pour génotype *MTRR* était 1,34 fois plus élevée chez les sujets MC par rapport aux sujets témoins (Tableau 7). Nous sommes parvenus à la même conclusion en prenant en compte non plus les fréquences alléliques mais les fréquences génotypiques, avec le génotype *MTRR* 66AA qui était 3 fois plus fréquent chez les patients MC que chez les témoins ($P=0,0009$) (Tableau 7)¹⁷².

L'association des polymorphismes des gènes codant pour des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine avec le risque de MC a ensuite été évaluée par régression multiple utilisant un modèle qui incluait l'âge, le sexe et les variables qui avaient une valeur de $P < 0,10$. Nous avons confirmé que le seul facteur indépendant de risque de MC était la présence du génotype *MTRR* AA, avec un odds ratio pour le risque de MC à 3,77 (IC à 95% : 1,22-11,65) (Tableau 8)¹⁷².

Tableau 7 : Fréquences des génotypes et fréquences des allèles mineurs des polymorphismes génétiques chez les patients MC et les sujets témoins.

	Sujets témoins : pourcentage (IC 95%)	Patients MC : pourcentage (IC 95%)	Valeur de P
MTHFR 677			
CC	0,43 (0,37-0,49)	0,43 (0,35-0,52)	0,3320
CT	0,43 (0,37-0,49)	0,47 (0,39-0,55)	
TT	0,15 (0,11-0,19)	0,09 (0,06-0,15)	
Allèle T	0,36 (0,32-0,40)	0,33 (0,28-39)	0,4151
MTHFR 1298			
AA	0,43 (0,37-0,49)	0,41 (0,34-0,50)	0,7334
AC	0,47 (0,41-0,53)	0,50 (0,42-0,58)	
CC	0,11 (0,07-0,15)	0,09 (0,05-0,14)	
Allèle C	0,34 (0,30-0,38)	0,36 (0,31-0,42)	0,6010
MTR 2756			
AA	0,68 (0,62-0,74)	0,61 (0,52-0,68)	0,3042
AG	0,29 (0,23-0,35)	0,35 (0,28-0,43)	
GG	0,03 (0,01-0,06)	0,04 (0,02-0,09)	
Allèle G	0,17 (0,14-0,21)	0,22 (0,17-0,27)	0,1273
MTRR 66			
AA	0,08 (0,04-0,13)	0,24 (0,17-0,31)	0,0009
AG	0,61 (0,52-0,69)	0,56 (0,47-0,64)	
GG	0,31 (0,24-0,40)	0,21 (0,15-0,28)	
Allèle G	0,62 (0,56-0,68)	0,49 (0,43-0,55)	0,0019
TCN 776			
CC	0,32 (0,27-0,38)	0,30 (0,23-0,38)	0,9146
CG	0,49 (0,43-0,55)	0,51 (0,43-0,59)	
GG	0,19 (0,14-0,24)	0,19 (0,13-0,27)	
Allèle G	0,43 (0,39-0,48)	0,45 (0,39-0,51)	0,3839

IC, intervalle de confiance

Tableau 8 : Régression logistique concernant l'association des déterminants génétiques du métabolisme de l'homocystéine avec le risque de MC.

Variable	Modèle multivarié initial			Déterminant résiduel		
	OR	IC 95%	Valeur de P	OR	IC 95%	Valeur de P
Porteurs de <i>MTHFR</i> 677 <i>CT</i>	1,231	(0,491-3,087)	0,6576	-	-	<i>NS</i>
Porteurs de <i>MTHFR</i> 677 <i>TT</i>	1,770	(0,450-6,970)	0,4141	-	-	<i>NS</i>
Porteurs de <i>MTHFR</i> 1298 <i>AC</i>	2,159	(0,845-5,519)	0,1080	-	-	<i>NS</i>
Porteurs de <i>MTHFR</i> 1298 <i>CC</i>	2,946	(0,676-12,849)	0,1504	-	-	<i>NS</i>
Porteurs de <i>MTRR</i> AA	4,132	(1299-13,149)	0,0163	3,77	(1,22-11,65)	0,0213
Porteurs de <i>MTR</i> 2756 <i>AG</i>	1,401	(0,609-3,223)	0,4275	-	-	<i>NS</i>
Porteurs de <i>MTR</i> 2756 <i>GG</i>	8,064	(1,023-63-593)	0,475	-	-	<i>NS</i>
Porteurs de <i>TCN</i> 776 <i>CG</i>	1,362	(0,463-4,007)	0,5742	-	-	<i>NS</i>
Porteurs de <i>TCN</i> 776 <i>CG</i>	1,207	(0,466-3,123)	0,6984	-	-	<i>NS</i>

OR, Odds ratio ; IC, intervalle de confiance: NS, non significatif

3. Une hyperhomocystéinémie est-elle impliquée dans la pathogénie de la maladie de Crohn via un stress oxydatif accru ?

Nous avons tout d'abord étudié l'association des polymorphismes des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine avec le stress oxydatif et l'activité de la maladie. Dans cette étude, le stress oxydatif était mesuré par l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et l'activité de la maladie par le score de Best ou CDAI en anglais (pour Crohn's Disease Activity Index). L'activité de la SOD était significativement plus élevée chez les patients avec une MC porteurs du génotype *MTRR* AA que chez ceux de génotype *GG* (Figure 8A), contrairement aux polymorphismes des gènes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* et *TCN* qui n'étaient pas associés à l'activité de la SOD (données non présentées). Une association significative entre l'activité de la maladie (répartie en quartiles selon le score CDAI) et le taux de SOD a été retrouvée chez les patients avec le génotype *MTRR* AA (Figure 8B), mais pas chez ceux avec un génotype AG/GG¹⁷².

Enfin, nous avons étudié la corrélation entre les taux d'homocystéine plasmatique et ceux de vitamine B12 (qui est le substrat de l'enzyme *MTRR*) en fonction du niveau d'activité de la SOD chez les patients avec une MC. Les concentrations d'homocystéine étaient corrélées aux taux de folates et de vitamine B12 chez les patients avec maladie de Crohn indépendamment de la SOD (Figures 9A et B). Il existait une corrélation inverse statistiquement significative entre homocystéinémie et taux de vitamine B12 uniquement chez les patients qui avaient une activité de la SOD supérieure à la médiane, c'est à dire > 1100 UI/g d'hémoglobine ($P < 0,0001$) (Figure 9C et D). En revanche, l'activité de la SOD n'avait aucune influence sur la corrélation entre homocystéinémie et taux de folates chez les sujets avec une MC (données non montrées)¹⁷².

Figure 8. L'association entre l'activité de la superoxide dismutase (SOD) et le polymorphisme de la *MTRR* (A). Une association significative entre l'activité de la SOD et la distribution quartile du score de Crohn's Disease Activity Index (CDAI, Q1-Q4) a été trouvée chez les patients avec le génotype *MTRR* AA, mais pas chez ceux présentant les génotypes AG/GG (B).

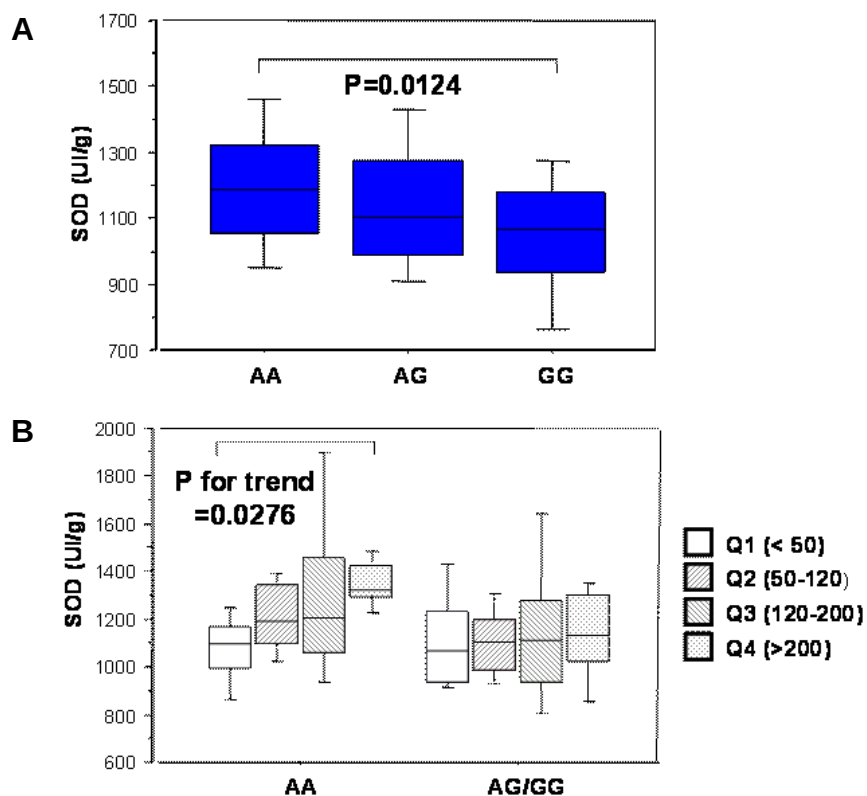
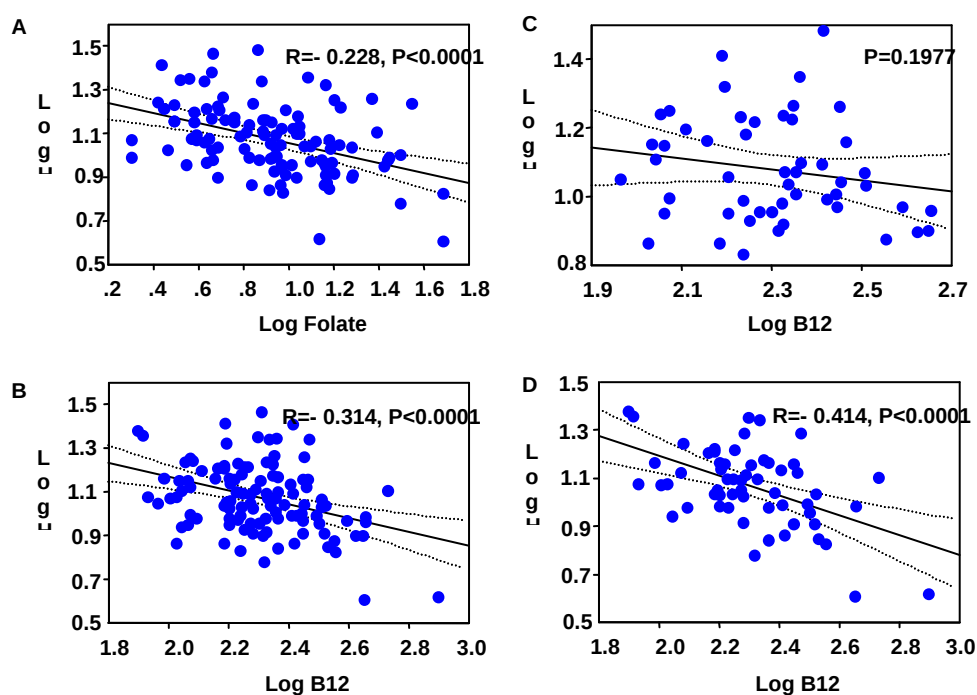


Figure 9. Les concentrations d'homocystéine sont corrélées aux taux de folates (A) et de vitamine B12 (B) chez les patients avec maladie de Crohn. L'association entre l'homocystéine et la vitamine B12 reste significative chez les patients avec maladie de Crohn ayant une concentration de superoxyde dismutase (SOD) supérieure à 1100 UI/g hémoglobine (médiane) (D) mais pas chez ceux ayant une activité de la SOD plus faible (C).



4 Les déterminants génétiques du métabolisme de l'homocystéine sont-ils associés au phénotype et au risque de rectocolite hémorragique en Chine ?

Nous avons dans un premier temps étudié l'association entre les polymorphismes génétiques des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine et le risque de RCH. Les fréquences génotypiques et alléliques pour les polymorphismes des gènes *MTHFR*, *MTRR* et *TCN* n'étaient pas statistiquement différentes entre les sujets témoins et les patients avec une RCH (Tableau 9) ¹⁷³. En revanche, les génotypes *MTR*2756AG/GG étaient significativement plus fréquents chez les patients avec une RCH que chez les sujets contrôles (respectivement 26,3 et 16,5 %, $P=0,0212$). La même observation était faite en prenant cette fois-ci en compte les fréquences alléliques ; l'allèle G pour le génotype MTR était significativement plus fréquent chez les patients avec une RCH que chez les témoins (respectivement 15 et 9 %, $P=0,0137$) (Tableau 10). En régression multiple dans un modèle incluant l'âge, le sexe et les différents polymorphismes génétiques *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* et *TCN*, et en ne retenant dans l'analyse résiduelle que les variables avec un $P < 0,1$, le seul facteur génétique indépendamment associé au risque de RCH était l'allèle G pour le génotype MTR, avec un odds ratio à 1,8 (IC à 95 % : 1,09-2,99) (Tableau 11) ¹⁷³.

Dans une précédente étude réalisée en Chine centrale sur 72 patients porteurs d'une RCH, nous avons montré qu'il existait un risque accru d'atteinte pancolique chez les sujets porteurs des génotypes 677TT et C677T/A1298C, avec un Odds ratio à 4,92 (intervalle de confiance à 95% : 1,3-18,3, $p=0,017$) ¹⁵². Nous avons donc étudié la relation entre ces polymorphismes génétiques et les caractéristiques cliniques des 168 patients chinois avec une RCH. En analyse univariée, aucun des polymorphismes n'était associé à l'âge de diagnostic de la maladie. Alors que les polymorphismes des gènes *MTR*, *MTRR* et *TCN* n'étaient associés ni à la localisation ni à l'étendue des lésions (pancolite versus colite distale ne dépassant pas l'angle colique gauche), le génotype *MTHFR*677TT était 2,7 fois plus fréquent chez les patients avec

une forme pancolique de RCH que chez ceux avec forme distale de RCH (respectivement 27,3 et 10,5 %, $P=0,0123$)¹⁷³. En prenant en compte les génotypes *MTHFR677TT* et *MTHFR1298AC* non plus de manière isolée mais de façon combinée (génotype *MTHFR677TT* et hétérozygotes composites *MTHFR677CT/1298AC*), la différence de fréquences génotypiques entre les sujets avec une atteinte pancolique et ceux avec une RCH distale était encore plus importante (respectivement 43,2 et 20,2 %, $P=0,0048$). En régression multiple dans un modèle incluant l'âge, le sexe, les traitements et les différents polymorphismes génétiques, les seuls facteurs indépendants prédictifs du risque d'atteinte pancolique étaient les génotypes *MTHFR677TT* (odds ratio = 5,9 et $P=0,0073$) et *MTHFR1298AC* (odds ratio = 3,09 et $P=0,0386$) (Tableau 12)

¹⁷³.

Tableau 9. Fréquences génotypiques des 168 patients avec rectocolite hémorragique (RCH) comparées aux 219 sujets contrôles.

	Contrôles	Patients avec RCH	Valeur de P
	Nombre (pourcentage)	Nombre (pourcentage)	
MTHFR 677			
CC	88 (40.9)	64 (38.1)	0,8534
CT	93 (43.3)	76 (45.2)	
TT	34 (15.8)	28 (16.7)	
Nombre total	215	168	
MTHFR 1290			
AA	141 (66.2)	111 (69.4)	0,5117
AC	62 (29.1)	45 (28.1)	
CC	10 (4.7)	4 (2.5)	
Nombre total	213	160	
MTR 2756			
AA	182 (83.5)	115 (73.7)	0,0602
AG	33 (15.1)	36 (23.1)	
GG	3 (1.4)	5 (3.2)	
Nombre total	218	156	
MTRR 66			
AA	127 (58.0)	88 (53.7)	0,6617
AG	78 (35.6)	63 (38.4)	
GG	14 (6.4)	13 (7.9)	
Nombre total	219	164	
TCN2 776			
CC	47 (21.8)	27 (18.5)	0,4709
CG	84 (38.9)	66 (45.2)	
GG	85 (39.3)	53 (36.3)	
Nombre total	216	146	

Abréviations : methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*), methionine synthase

(*MTR*), methylenetetrahydrofolate reductase (*MTRR*) and transcobalamin (*TCN2*)

Tableau 10. Fréquences alléliques des 168 patients avec rectocolite hémorragique (RCH) comparées aux 219 sujets contrôles.

	Contrôles Pourcentage (intervalle de confiance à 95 %)	Patients avec RCH Pourcentage (intervalle de confiance à 95 %)	Valeur de P
MTHFR 677			
Allèle (n)	430	336	0.6027
Allele C	0.63 (0.58 – 0.67)	0.61 (0.55 – 0.66)	
Allele T	0.37 (0.33 – 0.42)	0.39 (0.34 – 0.45)	
MTHFR 1290			
Allèle (n)	426	320	0.3455
Allele A	0.81 (0.77 – 0.84)	0.83 (0.79 – 0.87)	
Allele C	0.19 (0.16 – 0.23)	0.17 (0.13 – 0.21)	
MTR 2756			
Allèle (n)	436	312	0.0137
Allele A	0.91 (0.88 – 0.93)	0.85 (0.81 – 0.89)	
Allele G	0.09 (0.07 – 0.12)	0.15 (0.11– 0.19)	
MTRR 66			
Allèle (n)	438	328	0.2401
Allele A	0.76 (0.71 – 0.80)	0.73 (0.68 – 0.77)	
Allele G	0.24 (0.20 – 0.28)	0.27 (0.23 – 0.32)	
TCN 776			
Allèle (n)	432	292	0.9447
Allele C	0.50 (0.46 – 0.55)	0.41 (0.35 – 0.46)	
Allele G	0.50 (0.45 – 0.54)	0.59 (0.54 – 0.64)	

Abréviations : *methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)*, *methionine synthase (MTR)*, *methylenetetrahydrofolate reductase (MTRR)* and *transcobalamin (TCN2)*

Tableau 11. Régression logistique concernant l'association entre les variants génotypiques et le risque de rectocolite hémorragique.

Variable	Initial*			Résiduel*		
	OR	IC à 95 %	Valeur de P	OR	IC à 95 %	Valeur de P
Sex	0.77	0.47-1.25	0.2913	-	-	NS
Age	1.00	0.99-1.02	0.3075	-	-	NS
<i>MTHFR</i> 677 TT	1.16	(0.54-2.47)	0.7036	-	-	NS
<i>MTHFR</i> 1298 CC	0.43	(0.09-2.11)	0.2970	-	-	NS
<i>MTR</i> 2756 AG/GG	1.75	(0.97-3.17)	0.0561	1.80	1.09-2.99	0.0222
<i>MTRR</i> 66GG	1.68	(0.69-4.11)	0.2520			NS
<i>TCN</i> 776 GG	0.98	(0.58-1.67)	0.3075	-	-	NS

*(OR: Odds ratio; IC à 95 %:intervalle de confiance à 95 %)

Abréviations : *methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)*, *methionine synthase (MTR)*, *methylenetetrahydrofolate reductase (MTRR)* and *transcobalamin (TCN2)*

Tableau 12. Régression logistique concernant l'association entre les variants génotypiques et le risque de rectocolite hémorragique pancolique.

Variable	Initial*			Résiduel*		
	OR	95% CI	P-value	OR	95% CI	P-value
Sex	1.52	0.41-5.6	0.5273	-	-	NS
Age	0.98	0.94-1.02	0.2613	0.97	0.94-1.00	0.0790
Sulfasalazine	3.01	0.83-11.39	0.0912	-	-	NS
5-Aminosalicylate	2.39	0.66-8.61	0.1821	-	-	NS
Steroids	2.76	0.75-10.09	0.1287	-	-	NS
Antibiotics	0.91	0.25-3.38	0.8932	-	-	NS
MTHFR 677 TT	5.94	1.04-33.83	0.0446	5.89	1.61-21.51	0.0073
MTHFR 1298 AC	4.45	0.96-20.57	0.0558	3.09	1.06-8.98	0.0386
MTR 2756 AG/GG	1.77	(0.44-7.08)	0.4210	-	-	NS
MTRR 66GG	1.10	(0.13-9.21)	0.9313	-	-	NS
TCN 776 GG	1.50	(0.39-5.74)	0.5527	-	-	NS

*(OR: Odds ratio; IC à 95 %:intervalle de confiance à 95 %)

Abréviations : *methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)*, *methionine synthase (MTR)*, *methylenetetrahydrofolate reductase (MTRR)* and *transcobalamin (TCN2)*

VII-Discussion

Nous avons tout d'abord confirmé qu'une hyperhomocystéinémie modérée est fréquente au cours des MICI puisqu'elle concernait un quart des patients avec une MC dans notre étude. Nous avons également confirmé que les taux de folates et de vitamine B12 étaient significativement plus bas chez les sujets atteints de MICI que chez des sujets témoins. Alors que le niveau d'homocystéine plasmatique était associé aux taux de vitamine B12 et de folates en analyse univariée, l'analyse multivariée a révélé que seule la vitamine B12 était un facteur prédictif indépendant d'hyperhomocystéinémie dans notre population de patients avec une MC.

Rogers et al.¹⁷⁴ ont récemment démontré qu'une hyperhomocystéinémie reflète le plus souvent une carence en folates mais seulement dans des conditions physiologiques. En effet, en cas de stress oxydatif accru, une carence en folates n'est plus le seul facteur déterminant le niveau d'homocystéine plasmatique. Nos résultats montrant que ce sont les taux de vitamine B12 qui sont corrélés au niveau d'homocystéine plasmatique, uniquement en cas de stress oxydatif élevé (reflété dans notre étude par une activité de la SOD > 1100 UI/g d'hémoglobine), sont donc en accord avec ceux de Rogers et al. Dans les conditions pathologiques où est présent un stress oxydatif élevé comme dans la MC, une carence en folates ne serait donc plus le principal déterminant nutritionnel des hyperhomocystéinémies.

Des antécédents personnels d'atteinte iléale (résection ou iléite) mais aussi de colectomie, étaient des facteurs de risque de carence en B12 et d'hyperhomocystéinémie dans cette cohorte de patients avec une MC. Alors que l'atteinte iléale est connue pour altérer l'absorption de la vitamine B12, la relation entre colectomie et taux de vitamine B12 bas avait été peu explorée jusqu'ici. Une colectomie pourrait entraîner une malabsorption de la vitamine B12 par le biais d'une colonisation bactérienne^{164, 175}. Un tabagisme actif était associé à des taux de folates significativement plus bas, confirmant les résultats d'études

menées chez des sujets sains¹⁷⁶. Cependant, contrairement à l'étude de Maire et al.¹⁴¹, un tabagisme actif n'était pas associé à une hyperhomocystéinémie. La carence en folates et/ou l'hyperhomocystéinémie associées au tabagisme actif expliquent-elles au moins en partie l'effet délétère du tabac au cours de la maladie de Crohn ? Des données chez les sujets atteints de RCH sont désormais attendues puisque contrairement à la MC, le tabac a un effet « bénéfique » sur l'évolution de la RCH.

Parmi les différents médicaments étudiés, seule la prise d'azathioprine était associée à des taux d'homocystéine plus bas, suggérant des interactions entre les métabolismes de l'homocystéine et de l'azathioprine. Ceci est probablement lié au fait que l'enzyme thiopurine méthyltransférase (TMPT) inactive la 6-mercaptopurine, le métabolite actif de l'azathioprine, en transférant un groupe méthyle de la S-adénosylméthionine sur la 6-mercaptopurine, formant ainsi la S-adénosylhomocystéine qui est par la suite hydrolysée en homocystéine¹⁶⁵. Une variation génétique du gène *MTHFR* peut avoir pour résultat des concentrations réduites en S-adénosylméthionine, menant à une augmentation de la dégradation enzymatique par la TPMT et potentiellement une modulation de l'efficacité de l'azathioprine¹⁶⁵.

Nous avons également évalué l'influence des déterminants génétiques du métabolisme de l'homocystéine sur le niveau d'homocystéinémie au cours de la MC. Comme dans la population générale⁸⁰, le génotype *MTHFR677TT* était associé à une hyperhomocystéinémie en analyse univariée et en régression multiple chez ces patients. Les variants génétiques *MTHFR 1298 A>C*, *MTR 2756 A>G*, *MTRR 66 A>G*, et *TCN2 677 C>G* n'avaient quant à eux aucune influence sur le taux d'homocystéine dans notre étude. Dans la cohorte de patients chinois avec une RCH, les 2 déterminants génétiques indépendants qui étaient prédictifs du risque d'atteinte pancolique étaient les génotypes *MTHFR677TT* et *MTHFR1298AC*. Ces 2 génotypes sont connus pour être associés à une réduction de l'activité enzymatique de la *MTHFR* et donc à une hyperhomocystéinémie. On peut ainsi émettre l'hypothèse selon

laquelle le stress oxydatif secondaire à cette hyperhomocystéinémie pourrait être associé à des lésions intestinales plus sévères et donc à un risque plus élevé de formes pancoliques de RCH. Une des limites de notre étude menée chez ces patients chinois est l'absence de données sur le statut en folates, vitamine B12 et homocystéine. Il n'est donc pas possible de confirmer cette hypothèse dans l'état actuel de nos connaissances.

Dans notre étude, la fréquence des antécédents personnels de thromboses était de 5,7 % chez les patients avec une MC ; une hyperhomocystéinémie modérée n'était pas associée à un risque accru de thromboses, confirmant les données de la littérature à ce sujet ^{150, 177}. En revanche, plusieurs équipes ont montré que l'homocystéine était capable d'induire un stress cellulaire et vasculaire qui contribuerait au maintien d'une inflammation chronique de la muqueuse intestinale au cours des MICI ^{102, 104}. C'est ainsi que les taux d'homocystéine ont été récemment corrélés à l'activité, au nombre de poussées et à la durée de la RCH ¹⁰⁷. Ces données sont donc en faveur d'une implication directe du métabolisme de l'homocystéine dans la pathogénie des MICI, probablement via un stress oxydatif accru. En effet, un stress oxydatif anormalement élevé a été rapporté chez les sujets avec une hyperhomocystéinémie ainsi que chez les patients avec une MICI. Des études expérimentales chez l'animal ont quant à elles permis de démontrer que des souris transgéniques surexprimant la SOD présentent une colite inflammatoire plus sévère après administration de dextran sulfate de sodium (DSS) que des souris sauvages ¹⁷⁸. Nous avons alors analysé l'association des polymorphismes des gènes *MTR*, *MTRR*, *MTHFR* et *TCN* au risque de MICI, et leur relation avec le stress oxydatif et l'activité de la maladie. Le génotype *MTHFR677TT* n'était pas associé au risque de MC dans notre étude. Ces résultats concordent avec ceux de quatre études menées en Europe du Sud (deux italiennes, une française, et une portugaise) qui n'ont retrouvé aucune association entre le génotype *MTHFR677TT* et le risque de MICI ^{137, 150, 151, 153}. Deux études en Europe du Nord ont rapporté une fréquence significativement plus élevée du génotype *MTHFR677TT* chez les

patients MICI par rapport à des témoins^{147, 148}. Ces différences de résultats entre l'Europe du Nord et du Sud pourraient s'expliquer par des variations ethniques et géographiques concernant la distribution des variants du gène *MTHFR*, ce d'autant que la *MTHFR* possède une influence phénotypique plus faible sur le niveau d'homocystéine plasmatique dans les populations caucasiennes du sud de l'Europe que dans celles du nord de l'Europe¹⁷⁹. Dans une petite série de patients avec une MICI, aucune variation de la fréquence du génotype *MTHFR* *A1298C* n'a été observée par rapport à des sujets témoins¹⁸⁰. La possible implication des polymorphismes *MTR* et *MTRR* dans la pathogénie de la MC n'avait quant à elle jamais été étudiée. La découverte d'une association entre génotype *MTRR* *AA*, risque de MC et activité de la SOD pourrait permettre une meilleure compréhension du rôle joué par le métabolisme de l'homocystéine dans la pathogénie des MICI. Récemment, le génotype *MTRR* *AA* a été associé à un risque plus élevé de pathologie coronarienne, une autre maladie inflammatoire chronique associée à un stress oxydatif anormalement élevé^{181 182}. La reméthylation de l'Hcy en méthionine nécessite la MS (le gène est *MTR* dans la nomenclature) dont le cofacteur est la cob(I)alamine qui est oxydée en cob(II)alamine), ce qui rend la MS inactive. La méthionine synthase reductase (MSR, le gène est *MTRR* dans la nomenclature) régénère la forme fonctionnelle de la cobalamine⁹². Par conséquent, l'association de l'allèle *MTRR* *A* à un risque accru de MC peut être vue comme un moyen pour l'organisme de s'adapter au stress oxydatif anormalement élevé chez les patients avec une MC. En effet, la fonction métabolique de la *MTRR*, qui est entre autres de maintenir la vitamine B12 sous sa forme réduite, peut se révéler cruciale dans des conditions cellulaires où le stress oxydatif est élevé. Ceci pourrait également expliquer pourquoi la vitamine B12 était corrélée au taux d'homocystéine seulement chez les patients avec une MC qui présentaient par ailleurs une activité de la SOD élevée. Depuis près de 20 ans, l'incidence des MICI est en augmentation constante en Asie, même si leur incidence estimée à 50 cas pour 6 millions d'habitants dans la ville de Wuhan¹¹

reste inférieure à celle observée en Europe de l'Ouest et en Amérique du Nord. Contrairement à l'Europe de l'Ouest, la RCH est la forme la plus fréquente de MICI en Chine, avec 9 cas de RCH pour un cas de MC en 2003¹¹. En dehors des facteurs nutritionnels et environnementaux qui varient entre la Chine et les pays développés (Amérique du Nord et Europe de l'Ouest), plusieurs études ont montré que les facteurs génétiques associés aux MICI différaient également entre l'Asie et les pays occidentaux. C'est ainsi que les mutations du gène *NOD2* ne semblent pas être associées à la MC en Chine^{183, 184}. Globalement, les facteurs génétiques potentiellement impliqués dans la pathogénie de la RCH ont été peu étudiés. Seul le gène de l'IL-23R a été récemment associé à la RCH¹⁰. La mise en évidence d'une association entre les génotypes *MTR2756AG/GG* et le risque de RCH dans la cohorte de patients chinois est également en faveur d'une implication du métabolisme de la vitamine B12 dans la pathogénie des MICI, même si ces résultats doivent être confirmés dans de plus larges séries.

Alors que l'association entre l'allèle *MTRR A* et un risque accru de MC mérite elle aussi d'être confirmée dans des études génétiques portant sur de plus larges populations, l'identification d'un lien entre stress oxydatif, métabolisme de la vitamine B12 et sévérité de la maladie chez des patients avec une MC pourrait nous conduire à mener des études d'intervention. Ce d'autant qu'un travail récent a montré que l'homocystéine était capable d'induire *in vitro* l'expression de la transcobalamine (un transporteur plasmatique de la vitamine B12) et de son récepteur¹⁸⁵. Les auteurs ont également rapporté une surexpression de la transcobalamine et de son récepteur dans la muqueuse colique de rats avec une colite inflammatoire expérimentale induite par l'administration intra-rectale d'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) ainsi que chez des patients avec une MC¹⁸⁵. Une supplémentation en vitamines du groupe B est connue pour avoir des effets antioxydants et anti-inflammatoires, indépendamment de son effet sur le niveau d'homocystéine plasmatique¹⁸⁶.

Peut-on améliorer l'inflammation intestinale et donc modifier l'histoire naturelle de la maladie en corrigeant une carence en vitamine B12 chez les sujets souffrant de MICI ? Il est encore trop tôt pour répondre à cette question. D'après nos résultats, ces études d'intervention visant à normaliser les taux de vitamine B12 chez les sujets carencés pourrait être bénéfique principalement chez les patients porteurs du génotype *MTRR* AA et avec une activité de la SOD élevée. L'intérêt d'une telle supplémentation vitaminique ciblée mérite d'être évaluée dans des études prospectives qui devront également s'assurer de la bonne tolérance à long terme de cette stratégie. En effet, une étude récente a suggéré qu'une supplémentation en vitamines du groupe B pourrait augmenter le risque de maladie cardio-vasculaire¹⁸⁷

Ces données pourraient également ouvrir d'autres perspectives dans la prise en charge des patients avec une MICI. En effet, ces sujets présentent un risque accru de développer un cancer colorectal qui pourrait s'expliquer en partie par des anomalies épigénétiques impliquées dans la carcinogénèse colorectale et en rapport avec une hyperhomocystéinémie. Dans notre étude, seul un patient avec une MC avait des antécédents personnels de néoplasie digestive. Nous n'avons donc pas pu évaluer ce paramètre chez les sujets avec une MC. Une étude préliminaire menée par une équipe française a montré qu'une hyperhomocystéinémie était associée à un risque plus élevé de néoplasies colorectales au cours des MICI et que ce risque était encore majoré en d'association à une carence en folates¹⁸⁸. Enfin, le risque de complications osseuses et notamment d'ostéoporose pourrait être augmenté en cas d'hyperhomocystéinémie au cours de la MC¹⁸⁹.

En conclusion, ces résultats soulignent la nécessité de dépister les carence en folates et en vitamine B12, particulièrement en cas d'atteinte iléale, de tabagisme actif et/ou d'antécédent de résection intestinale (iléale et/ou colique) chez les sujets atteints de MICI, même si l'intérêt d'une supplémentation vitaminique reste à évaluer chez ces patients dans des études d'intervention.

Bibliographie

1. Kappelman MD, Rifas-Shiman SL, Kleinman K, Ollendorf D, Bousvaros A, Grand RJ, Finkelstein JA. The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:1424-9.
2. Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004;126:1504-17.
3. Molinie F, Gower-Rousseau C, Yzet T, Merle V, Grandbastien B, Marti R, Lerebours E, Dupas JL, Colombel JF, Salomez JL, Cortot A. Opposite evolution in incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Northern France (1988-1999). *Gut* 2004;53:843-8.
4. Peyrin-Biroulet L, Bigard MA. [Circumstances of the diagnosis and clinical course of inflammatory bowel disease]. *Rev Prat* 2005;55:962-76.
5. Bernstein CN, Papineau N, Zajackowski J, Rawsthorne P, Okrusko G, Blanchard JF. Direct hospital costs for patients with inflammatory bowel disease in a Canadian tertiary care university hospital. *Am J Gastroenterol* 2000;95:677-83.
6. Ebinger M, Leidl R, Thomas S, Von Tirpitz C, Reinshagen M, Adler G, Konig HH. Cost of outpatient care in patients with inflammatory bowel disease in a German University Hospital. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:192-9.
7. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007;448:427-34.
8. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
9. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-6.
10. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barmada MM, Rotter JJ, Nicolae DL, Cho JH. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006;314:1461-3.
11. Jiang L, Xia B, Li J, Ye M, Yan W, Deng C, Ding Y, Luo H, Hou W, Zhao Q, Liu N, Ren H, Hou X, Xu H. Retrospective survey of 452 patients with inflammatory bowel disease in Wuhan city, central China. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:212-7.
12. Hugot JP, Alberti C, Berrebi D, Bingen E, Cezard JP. Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet* 2003;362:2012-5.
13. Laclotte C, Oussalah O, Rey P, Bensenane M, Pluvinage N, Chevaux JB, Trouilloud I, Serre AA, Boucekkine T, Bigard MA, Peyrin-Biroulet L. Helminths and inflammatory bowel diseases. *Gastroenterol Clin Biol* 2008 (Sous presse).
14. Nerich V, Monnet E, Etienne A, Louafi S, Ramee C, Rican S, Weill A, Vallier N, Vanbockstael V, Auleley GR, Allemand H, Carbonnel F. Geographical variations of inflammatory bowel disease in France: a study based on national health insurance data. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:218-26.
15. Elliott DE, Urban JJ, Argo CK, Weinstock JV. Does the failure to acquire helminthic parasites predispose to Crohn's disease? *Faseb J* 2000;14:1848-55.

16. Cho JH, Weaver CT. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2007;133:1327-39.
17. Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF. Dysbiosis as a prerequisite for IBD. *Gut* 2004;53:1057.
18. Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, Darcha C, Jantscheff P, Allez M, Peeters H, Bommelaer G, Desreumaux P, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest* 2007;117:1566-74.
19. Abraham C, Cho JH. Bugging of the intestinal mucosa. *N Engl J Med* 2007;357:708-10.
20. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature* 2007;449:804-10.
21. Bamias G, Nyce MR, De La Rue SA, Cominelli F. New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Ann Intern Med* 2005;143:895-904.
22. Buhner S, Buning C, Genschel J, Kling K, Herrmann D, Dignass A, Kuechler I, Krueger S, Schmidt HH, Lochs H. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut* 2006;55:342-7.
23. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R, Feathers RW, Chu H, Lima H, Jr., Fellermann K, Ganz T, Stange EF, Bevins CL. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:18129-34.
24. Peyrin-Biroulet L, Chamaillard M, Gonzalez F, Beclin E, Decourcelle C, Antunes L, Gay J, Neut C, Colombel JF, Desreumaux P. Mesenteric fat in Crohn's disease: a pathogenetic hallmark or an innocent bystander? *Gut* 2007;56:577-83.
25. Lerebours E, Savoye G, Guedon C. [Epidemiology and natural history of chronic inflammatory bowel disease]. *Gastroenterol Clin Biol* 2003;27:S76-80.
26. Etienne I, Bouhnik Y, Gendre JP, Lemann M, Cosnes J, Matuchansky C, Beaugerie L, Modigliani R, Rambaud JC. Crohn's disease over 20 years after diagnosis in a referral population. *Gastroenterol Clin Biol* 2004;28:1233-9.
27. Cosnes J, Beaugerie L, Carbonnel F, Gendre JP. Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study. *Gastroenterology* 2001;120:1093-9.
28. Cosnes J, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Afchain P, Tired E, Gendre JP. Impact of the increasing use of immunosuppressants in Crohn's disease on the need for intestinal surgery. *Gut* 2005;54:237-41.
29. Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, Binder V. Course of ulcerative colitis: analysis of changes in disease activity over years. *Gastroenterology* 1994;107:3-11.
30. Selby WS, Griffin S, Abraham N, Solomon MJ. Appendectomy protects against the development of ulcerative colitis but does not affect its course. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2834-8.
31. Peyrin-Biroulet L. Appendectomy and inflammatory bowel disease: the end of a dogma? *Am J Gastroenterol* 2008;103:491-2.
32. Odes HS, Fich A, Reif S, Halak A, Lavy A, Keter D, Eliakim R, Paz J, Broide E, Niv Y, Ron Y, Villa Y, Arber N, Gilat T. Effects of current cigarette smoking on clinical course of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2001;46:1717-21.
33. Lemann M, Bonnet J, Allez M, Gornet JM, Mariette X. [Bone and joints in inflammatory bowel disease]. *Gastroenterol Clin Biol* 2004;28:D75-82.
34. Razack R, Seidner DL. Nutrition in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23:400-5.

35. Wilson A, Reyes E, Ofman J. Prevalence and outcomes of anemia in inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am J Med* 2004;116 Suppl 7A:44S-49S.
36. Bernstein CN, Blanchard JF, Houston DS, Wajda A. The incidence of deep venous thrombosis and pulmonary embolism among patients with inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. *Thromb Haemost* 2001;85:430-4.
37. Loftus EV, Jr. Epidemiology and risk factors for colorectal dysplasia and cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterol Clin North Am* 2006;35:517-31.
38. Eaden J. Review article: colorectal carcinoma and inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20 Suppl 4:24-30.
39. von Roon AC, Reese G, Teare J, Constantinides V, Darzi AW, Tekkis PP. The risk of cancer in patients with Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 2007;50:839-55.
40. Gupta RB, Harpaz N, Itzkowitz S, Hossain S, Matula S, Kornbluth A, Bodian C, Ullman T. Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. *Gastroenterology* 2007;133:1099-105; quiz 1340-1.
41. Xie J, Itzkowitz SH. Cancer in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:378-89.
42. Gitin Y, Farraye FA. Can regular use of 5-ASAs protect against the development of dysplasia and colorectal cancer in patients with ulcerative colitis? *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1051-2.
43. Velayos FS, Terdiman JP, Walsh JM. Effect of 5-aminosalicylate use on colorectal cancer and dysplasia risk: a systematic review and metaanalysis of observational studies. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1345-53.
44. Rubin DT, LoSavio A, Yadron N, Huo D, Hanauer SB. Aminosalicylate therapy in the prevention of dysplasia and colorectal cancer in ulcerative colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:1346-50.
45. Hutfless SM, Weng X, Liu L, Allison J, Herrinton LJ. Mortality by medication use among patients with inflammatory bowel disease, 1996-2003. *Gastroenterology* 2007;133:1779-86.
46. Canavan C, Abrams KR, Hawthorne B, Mayberry JF. Long-term prognosis in Crohn's disease: An epidemiological study of patients diagnosed more than 20 years ago in Cardiff. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;25:59-65.
47. Canavan C, Abrams KR, Mayberry JF. Meta-analysis: mortality in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;25:861-70.
48. Peyrin-Biroulet L, Deltenre P, deSuray N, Branche J, Sandborn WJ, Colombel JF. Efficacy and safety of tumor necrosis factor antagonists: meta-analysis of placebo-controlled trials. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008 (Sous presse).
49. van Dullemen HM, van Deventer SJ, Hommes DW, Bijl HA, Jansen J, Tytgat GN, Woody J. Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* 1995;109:129-35.
50. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, Travers S, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR, de Villiers WJ, Present D, Sands BE, Colombel JF. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005;353:2462-76.
51. Peyrin-Biroulet L, Desreumaux P, Sandborn WJ, Colombel JF. New drug classes for Crohn's disease: Beyond tumour necrosis factor antagonists *Lancet* 2008 (Sous presse).
52. D'Haens G, Baert F, van Assche G, Caenepeel P, Vergauwe P, Tuynman H, De Vos M, van Deventer S, Stitt L, Donner A, Vermeire S, Van de Mierop FJ, Coche JC, van

- der Woude J, Ochsenkuhn T, van Bodegraven AA, Van Hootegeem PP, Lambrecht GL, Mana F, Rutgeerts P, Feagan BG, Hommes D. Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease: an open randomised trial. *Lancet* 2008;371:660-7.
53. Beaugerie L, Seksik P, Nion-Larmurier I, Gendre JP, Cosnes J. Predictors of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2006;130:650-6.
 54. Peyrin-Biroulet L, Standaert-Vitse A, Branche J, Chamaillard M. IBD serological panels: facts and perspectives. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1561-6.
 55. Peyrin-Biroulet L, Vignal C, Dessein R, Simonet M, Desreumaux P, Chamaillard M. NODs in defence: from vulnerable antimicrobial peptides to chronic inflammation. *Trends Microbiol* 2006;14:432-8.
 56. Peyrin-Biroulet L, Chamaillard M. NOD2 and defensins: translating innate to adaptive immunity in Crohn's disease. *J Endotoxin Res* 2007;13:135-9.
 57. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 1999;19:217-46.
 58. Stipanuk MH. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu Rev Nutr* 2004;24:539-77.
 59. McCully KS, Wilson RB. Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis* 1975;22:215-27.
 60. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993;39:1764-79.
 61. Robinson K, Mayer EL, Miller DP, Green R, van Lente F, Gupta A, Kottke-Marchant K, Savon SR, Selhub J, Nissen SE, et al. Hyperhomocysteinemia and low pyridoxal phosphate. Common and independent reversible risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 1995;92:2825-30.
 62. Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K. Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:517-27.
 63. Dennis VW, Robinson K. Homocysteinemia and vascular disease in end-stage renal disease. *Kidney Int Suppl* 1996;57:S11-7.
 64. Bostom AG, Lathrop L. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney Int* 1997;52:10-20.
 65. Jakubowski H. Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. *J Biol Chem* 1997;272:1935-42.
 66. Jakubowski H, Ambrosius WT, Pratt JH. Genetic determinants of homocysteine thiolactonase activity in humans: implications for atherosclerosis. *FEBS Lett* 2001;491:35-9.
 67. Ferretti G, Bacchetti T, Marotti E, Curatola G. Effect of homocysteinylation on human high-density lipoproteins: a correlation with paraoxonase activity. *Metabolism* 2003;52:146-51.
 68. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *Jama* 1993;270:2693-8.
 69. Jacobsen DW, Gatautis VJ, Green R, Robinson K, Savon SR, Secic M, Ji J, Otto JM, Taylor LM, Jr. Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. *Clin Chem* 1994;40:873-81.

70. Andersson A, Brattstrom L, Israelsson B, Isaksson A, Hamfelt A, Hultberg B. Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender, and menopausal status. *Eur J Clin Invest* 1992;22:79-87.
71. Verhoef P, de Groot LC. Dietary determinants of plasma homocysteine concentrations. *Semin Vasc Med* 2005;5:110-23.
72. Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J Lab Clin Med* 1989;114:473-501.
73. De Bree A, Verschuren WM, Kromhout D, Kluijtmans LA, Blom HJ. Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. *Pharmacol Rev* 2002;54:599-618.
74. Scott JM, Weir DG. Folic acid, homocysteine and one-carbon metabolism: a review of the essential biochemistry. *J Cardiovasc Risk* 1998;5:223-7.
75. Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AM, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1994;7:195-200.
76. Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M, Rozen R. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome* 1998;9:652-6.
77. Gaughan DJ, Barbaux S, Kluijtmans LA, Whitehead AS. The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene. *Gene* 2000;257:279-89.
78. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-3.
79. Akar N, Akar E, Akcay R, Avcu F, Yalcin A, Cin S. Effect of methylenetetrahydrofolate reductase 677 C-T, 1298 A-C, and 1317 T-C on factor V 1691 mutation in Turkish deep vein thrombosis patients. *Thromb Res* 2000;97:163-7.
80. Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation* 1998;98:2520-6.
81. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996;93:7-9.
82. de Bree A, Verschuren WM, Blom HJ, Kromhout D. Association between B vitamin intake and plasma homocysteine concentration in the general Dutch population aged 20-65 y. *Am J Clin Nutr* 2001;73:1027-33.
83. McQuillan BM, Beilby JP, Nidorf M, Thompson PL, Hung J. Hyperhomocysteinemia but not the C677T mutation of methylenetetrahydrofolate reductase is an independent risk determinant of carotid wall thickening. The Perth Carotid Ultrasound Disease Assessment Study (CUDAS). *Circulation* 1999;99:2383-8.
84. de Bree A, Verschuren WM, Blom HJ. Biological cardiovascular risk factors and plasma homocysteine levels in the general Dutch population. *Atherosclerosis* 2001;154:513-4.
85. Li YN, Gulati S, Baker PJ, Brody LC, Banerjee R, Kruger WD. Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Hum Mol Genet* 1996;5:1851-8.
86. Leclerc D, Campeau E, Goyette P, Adjalla CE, Christensen B, Ross M, Eydoux P, Rosenblatt DS, Rozen R, Gravel RA. Human methionine synthase: cDNA cloning and

- identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Mol Genet* 1996;5:1867-74.
87. Chen LH, Liu ML, Hwang HY, Chen LS, Korenberg J, Shane B. Human methionine synthase. cDNA cloning, gene localization, and expression. *J Biol Chem* 1997;272:3628-34.
 88. Gulati S, Baker P, Li YN, Fowler B, Kruger W, Brody LC, Banerjee R. Defects in human methionine synthase in cblG patients. *Hum Mol Genet* 1996;5:1859-65.
 89. Doolin MT, Barbaux S, McDonnell M, Hoess K, Whitehead AS, Mitchell LE. Maternal genetic effects, exerted by genes involved in homocysteine remethylation, influence the risk of spina bifida. *Am J Hum Genet* 2002;71:1222-6.
 90. Bosco P, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, Namour F, Caraci F, Romano A, Romano C, Gueant JL. Methionine synthase (MTR) 2756 (A --> G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. *Am J Med Genet A* 2003;121:219-24.
 91. Zhang Y, Zhang M, Niu T, Xu X, Zhu G, Huo Y, Chen C, Wang X, Xing H, Peng S, Huang A, Hong X, Xu X. D919G polymorphism of methionine synthase gene is associated with blood pressure response to benazepril in Chinese hypertensive patients. *J Hum Genet* 2004;49:296-301.
 92. Brown CA, McKinney KQ, Kaufman JS, Gravel RA, Rozen R. A common polymorphism in methionine synthase reductase increases risk of premature coronary artery disease. *J Cardiovasc Risk* 2000;7:197-200.
 93. Gaughan DJ, Kluijtmans LA, Barbaux S, McMaster D, Young IS, Yarnell JW, Evans A, Whitehead AS. The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. *Atherosclerosis* 2001;157:451-6.
 94. Geisel J, Zimbelmann I, Schorr H, Knapp JP, Bodis M, Hubner U, Herrmann W. Genetic defects as important factors for moderate hyperhomocysteinemia. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:698-704.
 95. Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H, Gravel RA, Rozen R. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab* 1999;67:317-23.
 96. Jacques PF, Bostom AG, Selhub J, Rich S, Ellison RC, Eckfeldt JH, Gravel RA, Rozen R. Effects of polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase on total plasma homocysteine in the NHLBI Family Heart Study. *Atherosclerosis* 2003;166:49-55.
 97. Brilakis ES, Berger PB, Ballman KV, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C>T and methionine synthase reductase (MTRR) 66A>G polymorphisms: association with serum homocysteine and angiographic coronary artery disease in the era of flour products fortified with folic acid. *Atherosclerosis* 2003;168:315-22.
 98. Hakami N, Neiman PE, Canellos GP, Lazerson J. Neonatal megaloblastic anemia due to inherited transcobalamin II deficiency in two siblings. *N Engl J Med* 1971;285:1163-70.
 99. Namour F, Olivier J, Abdelmouttaleb I, Adjalla C, Debard R, Salvat C, Gueant J. Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. *Blood* 2001;97:1092-8.

100. Miller JW, Ramos MI, Garrod MG, Flynn MA, Green R. Transcobalamin II 775G>C polymorphism and indices of vitamin B12 status in healthy older adults. *Blood* 2002;100:718-20.
101. Zetterberg H. Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:7.
102. Peyrin-Biroulet L, Rodriguez-Gueant RM, Chamaillard M, Desreumaux P, Xia B, Bronowicki JP, Bigard MA, Gueant JL. Vascular and cellular stress in inflammatory bowel disease: revisiting the role of homocysteine. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1108-15.
103. Robert K, Nehme J, Bourdon E, Pivert G, Friguet B, Delcayre C, Delabar JM, Janel N. Cystathionine beta synthase deficiency promotes oxidative stress, fibrosis, and steatosis in mice liver. *Gastroenterology* 2005;128:1405-15.
104. Danese S, Sgambato A, Papa A, Scaldaferri F, Pola R, Sans M, Lovecchio M, Gasbarrini G, Cittadini A, Gasbarrini A. Homocysteine triggers mucosal microvascular activation in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2005;100:886-95.
105. De Groote MA, Testerman T, Xu Y, Stauffer G, Fang FC. Homocysteine antagonism of nitric oxide-related cytostasis in *Salmonella typhimurium*. *Science* 1996;272:414-7.
106. Mato JM, Lu SC. Homocysteine, the bad thiol. *Hepatology* 2005;41:976-9.
107. Drzewoski J, Gasiorowska A, Malecka-Panas E, Bald E, Czupryniak L. Plasma total homocysteine in the active stage of ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:739-43.
108. Peyrin-Biroulet L, Barraud H, Ancel D, Petit-Laurent F, Bigard MA, Gueant JL, Bronowicki JP. [Folate metabolism and colorectal carcinogenesis]. *Gastroenterol Clin Biol* 2004;28:582-92.
109. Peyrin-Biroulet L, Barraud H, Darfeuil F, Lefebvre M, Bigard MA, Gueant JL, Bronowicki JP. [Epigenetic changes and liver carcinogenesis]. *Gastroenterol Clin Biol* 2006;30:1354-9.
110. Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 1996;98:5-7.
111. McKenzie SJ, Baker MS, Buffinton GD, Doe WF. Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1996;98:136-41.
112. Middleton SJ, Shorthouse M, Hunter JO. Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. *Lancet* 1993;341:465-6.
113. Tuzun A, Erdil A, Inal V, Aydin A, Bagci S, Yesilova Z, Sayal A, Karaeren N, Dagalp K. Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Biochem* 2002;35:569-72.
114. Outinen PA, Sood SK, Pfeifer SI, Pamidi S, Podor TJ, Li J, Weitz JI, Austin RC. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood* 1999;94:959-67.
115. Upchurch GR, Jr., Welch GN, Fabian AJ, Freedman JE, Johnson JL, Keaney JF, Jr., Loscalzo J. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1997;272:17012-7.
116. Koutroubakis IE, Malliaraki N, Dimoulis PD, Karmiris K, Castanas E, Kouroumalis EA. Decreased total and corrected antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2004;49:1433-7.
117. Oz HS, Chen TS, McClain CJ, de Villiers WJ. Antioxidants as novel therapy in a murine model of colitis. *J Nutr Biochem* 2005;16:297-304.

118. Collins T, Cybulsky MI. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest* 2001;107:255-64.
119. Au-Yeung KK, Woo CW, Sung FL, Yip JC, Siow YL, O K. Hyperhomocysteinemia activates nuclear factor-kappaB in endothelial cells via oxidative stress. *Circ Res* 2004;94:28-36.
120. Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello PM, Robinson K, Jacobsen DW. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation* 2001;103:2717-23.
121. Xu D, Neville R, Finkel T. Homocysteine accelerates endothelial cell senescence. *FEBS Lett* 2000;470:20-4.
122. Jones SC, Banks RE, Haidar A, Gearing AJ, Hemingway IK, Ibbotson SH, Dixon MF, Axon AT. Adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Gut* 1995;36:724-30.
123. Ratter F, Gassner C, Shatrov V, Lehmann V. Modulation of tumor necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity by changes of the cellular methylation state: mechanism and in vivo relevance. *Int Immunol* 1999;11:519-27.
124. Holven KB, Aukrust P, Retterstol K, Hagve TA, Morkrid L, Ose L, Nenseter MS. Increased levels of C-reactive protein and interleukin-6 in hyperhomocysteinemic subjects. *Scand J Clin Lab Invest* 2006;66:45-54.
125. Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 2005;74:739-89.
126. Zhang C, Cai Y, Adachi MT, Oshiro S, Aso T, Kaufman RJ, Kitajima S. Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem* 2001;276:35867-74.
127. Danese S, Sans M, de la Motte C, Graziani C, West G, Phillips MH, Pola R, Rutella S, Willis J, Gasbarrini A, Fiocchi C. Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2006;130:2060-73.
128. Roybal CN, Yang S, Sun CW, Hurtado D, Vander Jagt DL, Townes TM, Abcouwer SF. Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4. *J Biol Chem* 2004;279:14844-52.
129. Ji C, Kaplowitz N. Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology* 2003;124:1488-99.
130. Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 2003;3:253-66.
131. Goelz SE, Vogelstein B, Hamilton SR, Feinberg AP. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science* 1985;228:187-90.
132. Gloria L, Cravo M, Pinto A, de Sousa LS, Chaves P, Leitao CN, Quina M, Mira FC, Soares J. DNA hypomethylation and proliferative activity are increased in the rectal mucosa of patients with long-standing ulcerative colitis. *Cancer* 1996;78:2300-6.
133. Fujii S, Tominaga K, Kitajima K, Takeda J, Kusaka T, Fujita M, Ichikawa K, Tomita S, Ohkura Y, Ono Y, Imura J, Chiba T, Fujimori T. Methylation of the oestrogen receptor gene in non-neoplastic epithelium as a marker of colorectal neoplasia risk in longstanding and extensive ulcerative colitis. *Gut* 2005;54:1287-92.
134. Peyrin-Biroulet L, Gueant JL. Does hyperhomocysteinaemia contribute to gastric carcinogenesis in *Helicobacter pylori* infected patients? *Gut* 2007;56:1480; author reply 1480-1.
135. Fang FC. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:820-32.

136. Keller L, Surette MG. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* 2006;4:249-58.
137. Papa A, De Stefano V, Danese S, Chiusolo P, Persichilli S, Casorelli I, Zappacosta B, Giardina B, Gasbarrini A, Leone G, Gasbarrini G. Hyperhomocysteinemia and prevalence of polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2677-82.
138. Morgenstern I, Raijmakers MT, Peters WH, Hoensch H, Kirch W. Homocysteine, cysteine, and glutathione in human colonic mucosa: elevated levels of homocysteine in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2003;48:2083-90.
139. Cattaneo M, Vecchi M, Zighetti ML, Saibeni S, Martinelli I, Omodei P, Mannucci PM, de Franchis R. High prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with inflammatory bowel disease: a pathogenic link with thromboembolic complications? *Thromb Haemost* 1998;80:542-5.
140. Mahmood A, Needham J, Prosser J, Mainwaring J, Trebble T, Mahy G, Ramage J. Prevalence of hyperhomocysteinemia, activated protein C resistance and prothrombin gene mutation in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:739-44.
141. Maire F, Beaugerie L, Cohen M, Deschamps A, Cosnes J, Capeau J, Gendre JP. [Factors associated with hyperhomocysteinemia in Crohn's disease]. *Gastroenterol Clin Biol* 2001;25:745-8.
142. Romagnuolo J, Fedorak RN, Dias VC, Bamforth F, Teltscher M. Hyperhomocysteinemia and inflammatory bowel disease: prevalence and predictors in a cross-sectional study. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2143-9.
143. Koutroubakis IE, Dilaveraki E, Vlachonikolis IG, Vardas E, Vrentzos G, Ganotakis E, Mouzas IA, Gravanis A, Emmanouel D, Kouroumalis EA. Hyperhomocysteinemia in Greek patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2000;45:2347-51.
144. Oldenburg B, Fijnheer R, van der Griend R, vanBerge-Henegouwen GP, Koningsberger JC. Homocysteine in inflammatory bowel disease: a risk factor for thromboembolic complications? *Am J Gastroenterol* 2000;95:2825-30.
145. Chowers Y, Sela BA, Holland R, Fidler H, Simoni FB, Bar-Meir S. Increased levels of homocysteine in patients with Crohn's disease are related to folate levels. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3498-502.
146. Lambert D, Benhayoun S, Adjalla C, Gelot MA, Renkes P, Felden F, Gerard P, Belleville F, Gaucher P, Gueant JL, Nicolas JP. Crohn's disease and vitamin B12 metabolism. *Dig Dis Sci* 1996;41:1417-22.
147. Bjerregaard LT, Nederby NJ, Fredholm L, Brandslund I, Munkholm P, Hey H. Hyperhomocysteinemia, coagulation pathway activation and thrombophilia in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:62-7.
148. Mahmud N, Molloy A, McPartlin J, Corbally R, Whitehead AS, Scott JM, Weir DG. Increased prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase C677T variant in patients with inflammatory bowel disease, and its clinical implications. *Gut* 1999;45:389-94.
149. Saibeni S, Cattaneo M, Vecchi M, Zighetti ML, Lecchi A, Lombardi R, Meucci G, Spina L, de Franchis R. Low vitamin B(6) plasma levels, a risk factor for thrombosis, in inflammatory bowel disease: role of inflammation and correlation with acute phase reactants. *Am J Gastroenterol* 2003;98:112-7.
150. Guedon C, Le Cam-Duchez V, Lalaude O, Menard JF, Lerebours E, Borg JY. Prothrombotic inherited abnormalities other than factor V Leiden mutation do not play a role in venous thrombosis in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1448-54.

151. Vecchi M, Sacchi E, Saibeni S, Meucci G, Tagliabue L, Duca F, De Franchis R. Inflammatory bowel diseases are not associated with major hereditary conditions predisposing to thrombosis. *Dig Dis Sci* 2000;45:1465-9.
152. Chen M, Xia B, Rodriguez-Gueant RM, Bigard M, Gueant JL. Genotypes 677TT and 677CT+1298AC of methylenetetrahydrofolate reductase are associated with the severity of ulcerative colitis in central China. *Gut* 2005;54:733-4.
153. Magro F, Dinis-Ribeiro M, Araujo FM, Pereira P, Fraga MC, Cunha-Ribeiro LM, Tome-Ribeiro A. High prevalence of combined thrombophilic abnormalities in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:1157-63.
154. Halsted CH, Gandhi G, Tamura T. Sulfasalazine inhibits the absorption of folates in ulcerative colitis. *N Engl J Med* 1981;305:1513-7.
155. van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, Boers GH, Haagsma CJ, Thomas CM, De Boo TM, van de Putte LB. Homocysteine and folate status in methotrexate-treated patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:658-65.
156. Herrlinger KR, Cummings JR, Barnardo MC, Schwab M, Ahmad T, Jewell DP. The pharmacogenetics of methotrexate in inflammatory bowel disease. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15:705-11.
157. Undas A, Brozek J, Szczeklik A. Homocysteine and thrombosis: from basic science to clinical evidence. *Thromb Haemost* 2005;94:907-15.
158. Warren S, Sommers SC. Pathogenesis of ulcerative colitis. *Am J Pathol* 1949;25:657-79.
159. Edwards FC, Truelove SC. The Course and Prognosis of Ulcerative Colitis. Iii. Complications. *Gut* 1964;5:1-22.
160. Papa A, Santoliquido A, Danese S, Covino M, Di Campi C, Urgesi R, Grillo A, Guglielmo S, Tondi P, Guidi L, De Vitis I, Fedeli G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Increased carotid intima-media thickness in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22:839-46.
161. Grip O, Svensson PJ, Lindgren S. Inflammatory bowel disease promotes venous thrombosis earlier in life. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:619-23.
162. Cattaneo M, Tsai MY, Bucciarelli P, Taioli E, Zighetti ML, Bignell M, Mannucci PM. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (C677T) increases the risk for deep-vein thrombosis in patients with mutant factor V (factor V:Q506). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1662-6.
163. Danese S, Papa A, Saibeni S, Repici A, Malesci A, Vecchi M. Inflammation and Coagulation in Inflammatory Bowel Disease: The Clot Thickens. *Am J Gastroenterol* 2006.
164. Vasilopoulos S, Saiean K, Emmons J, Berger WL, Abu-Hajir M, Seetharam B, Binion DG. Terminal ileum resection is associated with higher plasma homocysteine levels in Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol* 2001;33:132-6.
165. Arenas M, Simpson G, Lewis CM, Shobowale-Bakre el M, Escuredo E, Fairbanks LD, Duley JA, Ansari A, Sanderson JD, Marinaki AM. Genetic variation in the MTHFR gene influences thiopurine methyltransferase activity. *Clin Chem* 2005;51:2371-4.
166. Nishio E, Watanabe Y. Homocysteine as a modulator of platelet-derived growth factor action in vascular smooth muscle cells: a possible role for hydrogen peroxide. *Br J Pharmacol* 1997;122:269-74.
167. Wang XL, Duarte N, Cai H, Adachi T, Sim AS, Cranney G, Wilcken DE. Relationship between total plasma homocysteine, polymorphisms of homocysteine metabolism

- related enzymes, risk factors and coronary artery disease in the Australian hospital-based population. *Atherosclerosis* 1999;146:133-40.
168. Moat SJ, Bonham JR, Cragg RA, Powers HJ. Elevated plasma homocysteine elicits an increase in antioxidant enzyme activity. *Free Radic Res* 2000;32:171-9.
 169. Dincer Y, Erzin Y, Himmetoglu S, Gunes KN, Bal K, Akcay T. Oxidative DNA damage and antioxidant activity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2007;52:1636-41.
 170. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;55:749-53.
 171. Peyrin-Biroulet L. Is ileocaecal Crohn's disease L1 or L3 according to the Montreal classification? *Gut* 2008;57:427.
 172. Peyrin-Biroulet L, Gueant-Rodriguez RM, Chen M, Bronowicki JP, Bigard MA, Gueant JL. Association of MTRR 66A>G Polymorphism With Superoxide Dismutase and Disease Activity in Patients With Crohn's Disease. *Am J Gastroenterol* 2008;103:399-406.
 173. Chen M, Peyrin-Biroulet L, Bing X, Guéant-Rodriguez RM, Bronowicki JP, Bigard MA, Guéant JL. Methionine synthase A2756G polymorphism predicts ulcerative colitis and methylenetetrahydrofolate reductase C677T pancolitis, in Central China. *BMC Genet* (Soumis).
 174. Rogers EJ, Chen S, Chan A. Folate deficiency and plasma homocysteine during increased oxidative stress. *N Engl J Med* 2007;357:421-2.
 175. Oostenbrug LE, van Dullemen HM, te Meerman GJ, Jansen PL, Kleibeuker JH. Clinical outcome of Crohn's disease according to the Vienna classification: disease location is a useful predictor of disease course. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006;18:255-61.
 176. Gabriel HE, Crott JW, Ghandour H, Dallal GE, Choi SW, Keyes MK, Jang H, Liu Z, Nadeau M, Johnston A, Mager D, Mason JB. Chronic cigarette smoking is associated with diminished folate status, altered folate form distribution, and increased genetic damage in the buccal mucosa of healthy adults. *Am J Clin Nutr* 2006;83:835-41.
 177. Bernstein CN, Sargent M, Vos HL, Rosendaal FR. Mutations in clotting factors and inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2007;102:338-43.
 178. Krieglstein CF, Cerwinka WH, Laroux FS, Salter JW, Russell JM, Schuermann G, Grisham MB, Ross CR, Granger DN. Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergent roles of superoxide and nitric oxide. *J Exp Med* 2001;194:1207-18.
 179. Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Debard R, Thirion S, Hong LX, Bronowicki JP, Namour F, Chabi NW, Sanni A, Anello G, Bosco P, Romano C, Amouzou E, Arrieta HR, Sanchez BE, Romano A, Herbeth B, Guillard JC, Mutchinick OM. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr* 2006;83:701-7.
 180. Fernandez-Miranda C, Martinez Prieto M, Casis Herce B, Sanchez Gomez F, Gomez Gonzalez P, Martinez Lopez J, Saenz-Lopez Perez S, Gomez de la Camara A. Hyperhomocysteinemia and methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T and 1298A-->C mutations in patients with inflammatory bowel disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2005;97:497-504.
 181. Madamanchi NR, Runge MS. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res* 2007;100:460-73.

182. Gueant-Rodriguez RM, Juilliere Y, Candito M, Adjalla CE, Gibelin P, Herbeth B, Van Obberghen E, Gueant JL. Association of MTRRA66G polymorphism (but not of MTHFR C677T and A1298C, MTRA2756G, TCN C776G) with homocysteine and coronary artery disease in the French population. *Thromb Haemost* 2005;94:510-5.
183. Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, Wong ML, Tse P, Jewell DP, Sung JJ. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:1465-70.
184. Guo QS, Xia B, Jiang Y, Qu Y, Li J. NOD2 3020insC frameshift mutation is not associated with inflammatory bowel disease in Chinese patients of Han nationality. *World J Gastroenterol* 2004;10:1069-71.
185. Kalra S, Ahuja R, Binion DG, Seetharam S, Seetharam B. Upregulation of transcobalamin (TC) and its receptor in colonic inflammation: Effect of homocysteine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007.
186. Ullegaddi R, Powers HJ, Gariballa SE. B-group vitamin supplementation mitigates oxidative damage after acute ischaemic stroke. *Clin Sci (Lond)* 2004;107:477-84.
187. Bonaa KH, Njolstad I, Ueland PM, Schirmer H, Tverdal A, Steigen T, Wang H, Nordrehaug JE, Arnesen E, Rasmussen K. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;354:1578-88.
188. Phelip JM, Ducros V, Faucheron JL, Flourie B, Roblin X. Association of hyperhomocysteinemia and folate deficiency with colon tumors in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:242-8.
189. Roblin X, Phelip JM, Genevois M, Ducros V, Bonaz B. Hyperhomocysteinaemia is associated with osteoporosis in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;25:797-804.

Titre : Déterminants génétiques et nutritionnels de l'homocystéine au cours des maladies inflammatoires chroniques intestinales

Résumé :

Nous avons étudié l'association des déterminants génétiques et nutritionnels du métabolisme de l'homocystéine aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, et analysé l'implication possible d'une hyperhomocystéinémie dans la pathogénie de la maladie de Crohn via un stress oxydatif accru mesuré par l'activité de la superoxyde dismutase (SOD). La vitamine B12 ($p=0,0187$) et le génotype *MTHFR* 677 TT ($p=0,0048$) étaient les deux seuls facteurs prédictifs indépendants d'une hyperhomocystéinémie $>15 \mu\text{mol/L}$ chez des sujets avec une maladie de Crohn. Les patients avec un antécédent de résection iléale ou de colectomie, ou avec une iléite avaient des taux de vitamine B12 significativement plus bas. L'association entre vitamine B12 et homocystéine restait significative uniquement chez les patients présentant les taux les plus élevés de SOD ($p<0,0001$). Le génotype *MTRR* AA était le seul facteur prédictif de risque de maladie de Crohn (odds ratio 3.7, 95% CI 1.218–11.649, $P = 0.0213$). Le niveau de SOD était plus élevé ($p = 0.0143$) et corrélé à l'activité de la maladie de Crohn (score CDAI) ($p= 0.0276$) chez les sujets porteurs du génotype *MTRR* AA. Dans la cohorte chinoise, la fréquence de l'allèle 2756G de la méthionine synthase était plus élevée chez les sujets avec une rectocolite hémorragique que chez les contrôles (0,09 (IC à 95 % :0,07-0,12) versus 0,15 (IC à 95% :0,11-0,19), $P=0,0137$) et était un facteur prédictif de risque de rectocolite hémorragique (Odds ratio = 1,8, IC à 95% :1,09-2,99, $P=0,0222$). Le génotype *MTHFR* 677TT était 2,7 plus fréquent chez les patients avec une atteinte pancolique (27,3%, IC à 95% :16,4-42,0 et 10,5%, IC à 95 % :6,3-17,1, $P= 0.0123$).

Mots-clé: Homocysteine, folate, vitamine B12, maladie inflammatoire chronique intestinale, stress oxydatif, *MTHFR*, *MTRR*, *MTR*

Title : Genetic and nutritional determinants of homocysteine in inflammatory bowel diseases

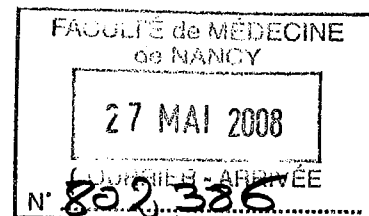
Summary :

We investigated the association of genetic and nutritional determinants of homocysteine metabolism with inflammatory bowel diseases and the possible implication of hyperhomocysteinemia in the pathogenesis of Crohn's disease via an increased oxidative stress measured by superoxide dismutase activity. In multivariate analysis, vitamin B12 and *MTHFR* 677 TT carriers were the two significant independent factors of plasma homocysteine $>15 \mu\text{mol/L}$ in CD patients ($P = 0.0187$ and 0.0048, respectively). Patients with a personal history of ileal resection, ileitis, or colectomy had significantly lower vitamin B12 levels. The significant association between homocysteine and vitamin B12 levels remained significant only in patients with the highest superoxide dismutase values ($P < 0.0001$). The *MTRR* AA genotype was a significant independent predictor of CD risk (odds ratio 3.7, 95% CI 1.218–11.649, $P = 0.0213$). The level of superoxide dismutase was significantly higher ($P = 0.0143$) and was correlated with Crohn's Disease Activity Index (CAI) scores (P for trend = 0.0276) in patients carrying *MTRR* AA genotype. In The Chinese cohort, methionine synthase 2756G allele frequency was higher in ulcerative colitis than in controls (0.09 (95% C.I. 0.07 – 0.12) vs 0.15 (95% C.I. 0.11– 0.19), $P=0.0137$) and predicted ulcerative colitis risk in multivariate logistic regression, with an Odds ratio at 1.8 (95 C.I. 1.09-2.99), $P=0.0222$. Methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype was 2.7-fold more prevalent in individuals with pancolitis, with respective percentages of 27.3 (95% C.I.16.4-42.0) and 10.5 (95% C.I. 6.3-17.1) ($P= 0.0123$).

Key words: Homocysteine, folate, vitamin B12, inflammatory bowel disease, oxidative stress, *MTHFR*, *MTRR*, *MTR*

Area: Molecular biology

Laboratory: Inserm U-724, Cellular and Molecular Pathology in Nutrition, medical faculty, University Henri Poincaré, Avenue de la Forêt de Haye, 54500, Nancy-Vandoeuvre, France



Nom : **Monsieur PEYRIN-BIROULET**

Prénom : **Laurent**

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT

Spécialité : ARN : BIOGENÈSE ET STRUCTURE / FONCTION

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N°

Nancy, le 27/05/08

Le Président de l'Université

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'JP Finance', enclosed within a faint circular stamp.

Jean-Pierre FINANCE