



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 -

N° attribué par la bibliothèque

|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

Ecole doctorale : *Biologie Santé Environnement*

Spécialité : *Biologie cellulaire -Nutrition*

Par

Min CHEN

**Influence des donneurs de méthyle et du métabolisme de
l'homocystéine dans la physiopathologie des MICI : études
de population et modèle expérimental chez le raton carencé**

Thèse soutenue publiquement le 27 février 2009

Directeur de thèse: **Pr. Jean-Louis Guéant** *Professeur des Universités, Nancy I*
Co-Directeur : **Dr. Laurent Peyrin-Biroulet** *Docteur des Universités, Nancy I*

Membres du jury :

Rapporteurs : **Pr. Jean-Pierre Gendre** (Professeur des Universités, Paris VI)
Pr. Régis Guieu (Professeur de Université de la méditerranée)

Examineurs : **Pr. Bing Xia** (Professeur de Université de Wuhan)
Pr. Jean-François Stoltz (Professeur des Universités, Nancy I)
Pr. Jean-Louis Guéant (Professeur des Universités, Nancy I)
Pr. Bernard Namour (Professeur des Universités, Nancy I)

Au terme de ce travail, je tiens avant tout à adresser mes remerciements les plus chaleureux à tous ceux qui m'ont aidée au cours de sa réalisation.

Je tiens tout d'abord à manifester ma gratitude à Monsieur le Professeur Jean-Louis Guéant, mon directeur de thèse et directeur de l'unité Inserm U954, pour avoir dirigé ces recherches et pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Sa grande disponibilité a permis un suivi permanent du déroulement des travaux. Les discussions et les conseils qu'il m'a prodigués m'ont été d'une très grande utilité. Un grand merci pour son humanité, son ouverture d'esprit qui m'ont aussi permis d'avancer dans ma vie professionnelle et personnelle, et la patience dont il a témoigné lors de la correction de ce manuscrit.

Je remercie très sincèrement Monsieur le Professeur Bernard Namour, qui m'a encadrée et orientée au cours de ma thèse. Je le remercie plus spécialement pour les nombreuses discussions et suggestions précieuses et pour sa patience et ses encouragements.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Bing Xia, directeur de laboratoire à Wuhan, pour m'avoir donné la possibilité de participer à cette collaboration scientifique, pour son aide et ses conseils scientifiques.

J'exprime ma gratitude et mon profond respect à Monsieur le professeur Jean-Pierre Gendre, et à Monsieur le professeur Régis Gieu pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, ainsi qu'à Monsieur le Professeur Jean-François Stoltz, qui a accepté de siéger dans le jury de cette thèse est pour moi un grand honneur.

Je tiens à remercier le personnel du laboratoire de biochimie du CHU : Rosa-Maria Guéant-Rodriguez, Renée Debard, Denise Forest Tramoy, Corinne Payet, Thomas Josse, Pascal Perrin pour m'avoir initié à la biologie moléculaire et avoir pris le temps de m'aider et de m'expliquer.

Je remercie, pour leur participation indispensable et le plaisir que j'ai eu à travailler avec eux, Juliette Ravey, Carine Pourie, Florence Coste, Maira Alejandra et Amandine George. J'exprime ma reconnaissance également à Laurent Peyrin-Biroulet pour tout le temps qu'il a consacré à la correction de ce manuscrit.

J'exprime ma gratitude et mon amitié à Jean-Marc Alberto et Céline Chery pour leur disponibilité et leurs encouragements au cours de ma thèse ainsi que pour leur aide, leur gentillesse et leurs précieux conseils.

Enfin, mes remerciements vont également vers mes chers collègues et amis du laboratoire pour leur soutien et les rires aux éclats : Philippe, Dominique, Shyue-Fang, Sandra, Romain, Sandrine, Nassila, Cyril, Nicodème, Sonia, Patrice, Ma'atem, Hélène, Nicolas, Lydie, ... Sans eux la vie dans le laboratoire aurait été bien terne.

A tous mes amis chinois pour leur amitié et leur soutien moral, en particulier: Huahua, Man, Nian, Xiaobo, Fangyuan, longyun ...

Je tiens à manifester toute ma reconnaissance à mes parents, pour leurs compréhension, leurs sacrifices et surtout leur soutien. Malgré les kilomètres qui nous séparent... encore merci.

A toi, mon mari Haitao Pan, ce parcours de combattant tire à sa fin et je te remercie pour tout le sacrifice consenti. Cette thèse est le fruit de ta patience.

A la France pour m'avoir donné la possibilité de réaliser ce rêve.

Publications dans des revues internationales

- 1 *Chen M*, Xia B, Rodriguez-Gueant RM, Bigard M, Guéant JL. Genotypes 677TT and 677CT+1298AC of methylenetetrahydrofolate reductase are associated with the severity of ulcerative colitis in central China. *Gut* 2005; 54(5): 733-4.
- 2 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 (2): 399-406.
- 3 *Chen M*, Peyrin-Biroulet L, Bing X, Rodriguez-Guéant RM, Bronowicki JP, Bigard MA, Guéant JL. Methionine synthase A2756G polymorphism may predict ulcerative colitis and methylenetetrahydrofolate reductase C677T pancolitis, in Central China. *BMC Medical Genetics* 2008; 9: 78.
- 4 Guéant JL, Chabi NW, Guéant-Rodriguez RM, Mutchinick OM, Debard R, Payet C, Lu X, Villaume C, Bronowicki JP, Quadros EV, Sanni A, Amouzou E, Xia B, *Chen M*, Anello G, Bosco P, Romano C, Arrieta HR, Sánchez BE, Romano A, Herbeth B, Anwar W, Namour F. Environmental influence on the worldwide prevalence of a 776C->G variant in the transcobalamin gene (TCN2). *J Med Genet* 2007;44(6): 363-7.
- 5 *Chen M*, Xia B, Chen BX, Guo Q, Li J, Ye M, Hu Z. N-acetyltransferase 2 slow acetylator genotype was associated with adverse effects of sulphasalazine in the treatment of inflammatory bowel disease. *The Canadian Journal of gastroenterology* 2007; 21(3): 155-8.

ABREVIATION	1
INTRODUCTION	4
I. L'homocystéine	5
1. Métabolisme de l'homocystéine	5
1.1. Les voies de la reméthylation	6
1.2. La voie de la transulfuration	7
2. Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie	7
2.1. Facteurs environnementaux	10
2.2. Facteurs nutritionnels	10
2.2.1. Les folates ou vitamine B9	10
2.2.2. La vitamine B12	11
2.2.3. La vitamine B2	12
2.2.4. La vitamine B6	13
2.3. Facteurs Génétiques	14
2.3.1. Les polymorphismes du gène <i>MTHFR C677T A1298C</i> et <i>T1317C</i>	14
2.3.2. Les polymorphismes du gène <i>MTR A2756G</i>	15
2.3.3. Les polymorphismes du gène <i>MTRR A66G</i>	15
2.3.4. Les polymorphismes du gène <i>TCN C776G</i>	16
2.3.5. Les polymorphismes du gène <i>CBS T833C</i> et <i>G919A</i>	16
3. Homocystéine et dysfonction endothéliale	16
3.1. L'effet de homocystéine sur la fonction endothéliale	16
3.1.1. Thromboses	16
3.1.2. La relaxation vasculaire	18
3.1.3. L'inflammation	19
3.1.4. L'apoptose	19
3.2. L'effet moléculaire de l'homocystéine sur l'endothélium	20
3.2.1. La modification de la protéine	20
3.2.2. Stress du Réticulum Endoplasmique et <i>Unfolded protein response</i>	24
3.2.3. Stress oxydant	24
II. MICI	26
1. L'épidémiologie	26
2. Les facteurs impliqués dans la pathogénie des MICI	28
2.1. Les facteurs génétiques	28
2.2. Les facteurs environnements	32
2.3. Les facteurs immunitaires	33
3. Les traitements	34
III. MICI et homocystéine	35
1. Implication de l'homocystéine dans la pathogénie des MICI	35

1.1. Stress oxydant	35
1.2. Inflammation	36
1.3. Stress du Réticulum Endoplasmique	36
1.4. Hypométhylation	37
2. Les études cliniques d'association de l'homocystéine avec les MICI	38
2.1. Prévalence de l'hyperhomocysténiémie au cours des MICI	38
2.2. Hyperhomocysténiémie et thromboses au cours des MICI	39
2.3. Association des déterminants de l'homocystéine avec les MICI	40
2.3.1. Déterminants nutritionnels	40
2.3.2. Déterminants génétiques	41
2.3.3. Pharmacogénétique	43
 <i>OBJECTIFS DE LA THESE</i>	 44
 <i>PARTIE I. ETUDE DE POPULATIONS</i>	 47
 <i>MATERIELS ET METHODES</i>	 48
1. Recrutement des sujets	49
1.1. Cohorte française	49
1.2. Cohorte chinoise	49
2. Méthodes d'extraction de l'ADN	50
3. Analyses statistiques	50
4. Fiches techniques	51
 <i>RESULTATS ET PUBLICATIONS</i>	 62
 <i>DISCUSSION</i>	 79
 <i>PARTIE II. MODELE ANIMAL DES MICI CHEZ LE RATON</i>	 86
 <i>CARENCE</i>	
 <i>MATERIELS ET METHODES</i>	 87
1. Modèles d'étude	88
1.1. Entretien des animaux	88
1.2. Collection des prélèvements	89
2. Evaluation de l'inflammation	90
2.1. Index d'activité de la maladie (DAI)	90
2.2. Etude histopathologique	90
3. Dosages sanguins	91
3.1. Vitamines B12 et B9 (folates)	91

3.2. Homocystéine	91
4. Marqueurs du stress oxydant, apoptose et inflammation	92
4.1. Superoxyde dismutase (SOD)	92
4.2. Glutathion peroxydase (GPX)	93
4.3. Immunohistologie	94
4.4. Western Blotting	95
4.5. RT-PCR	98
RESULTATS	101
1. Observations générales	102
1.1. La mortalité	102
1.2. La morphologie	102
1.3. Index d'activité de la maladie (DAI)	105
1.4. Etudes histopathologique	106
2. Concentrations plasmatiques en vitamine B12, folates et homocystéine	107
3. Evaluation du stress oxydant: SOD et GPX	108
4. Effet apoptotique : expression colique de caspase3, Bax et Bcl2	108
5. Effet sur l'inflammation	111
5.1. L'expression colique de TNF- α mRNA	111
5.2. L'expression colique de protéine p38 et cPLA2	113
5.3. Immunohistologie de l'expression de cPLA2	115
5.4. L'expression colique du protéine COX 1, COX2 et 5-LOX	116
DISCUSSION	118
1. Les modèles animaux	119
1.1. Effet de la carence sur la progéniture	120
1.1.1. Altérations morphologique	120
1.1.2. Métabolisme de l'homocystéine	120
1.2. Influence de DSS associé à la carence	121
1.2.1. Le protocole de DSS	121
1.2.2. L'inflammation	121
2. Effets du DSS et de la carence sur le stress oxydant	122
3. Effets du DSS et la carence sur l'apoptose	124
4. Effets du DSS et la carence sur l'inflammation	125
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	129
REFERENCE	133

Abréviations

ADMA	Aiméthylarginine asymétrique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ATF	<i>Activating transcription factor</i>
ATG16L1	<i>Autophagy related 16-like protein 1</i>
BHMT	Bétaïne homocystéine méthyltransférase
BSA	Albumine de sérum bovin
C	Carencé
CAT	Catalase
Cb1	Cobalamine ou vitamine B12
CBS	Cystationine β synthase
CGL	Cystéine- γ -lyase
CH2-THF	Méthylènetétrahydrofolate
CH3-THF	Méthyltétrahydrofolate
COX	Cyclo-oxygénase
cPLA2	Phospholipase A2 cytotique
DAI	Index d'activité de la maladie
DSS	Dextran sulfate sodium
DTT	Diothiothréitol
ECM1	<i>Extracellular matrix protein 1</i>
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FI	Facteur intrinsèque
FMN	Flavine mononucléotide
GPX	Gluthation peroxydase
GRP	<i>Glucose regulated protein</i>
GSH	Gluthation
GSSG	Gluthation réduit
GSSGR	Gluthation réductase
Hcy	Homocystéine
hHcy	Hyperhomocystéine
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HTL	Homocystéine thiolactone
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
IRGM	<i>Immunity-related GTPase family, M</i>
JAK2	<i>Janus kinase 2</i>
LLRK2	<i>Leucine-rich repeat kinase 2</i>

LOX	Lipooxygénase
MAT	Méthionine adénosyl transférase
MAPK	<i>Mitogen-activated-protein-kinase</i>
MC	Maladie de Crohn
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MICI	Maladie inflammatoire chronique intestinale
MTHFR	Méthylènetétrahydrofolate réductase
MTR	Méthionine synthase
MTRR	Méthionine synthase réductase
NADPH	Nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate
NC	Non carencé
NF-κB	<i>Necrosis factor kappa B</i>
NO	Oxyde nitrique
NOD2	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
RCH	Rectocolite hémorragique
RE	Réticulum endoplasmique
RP29	<i>Ribosomal protein 29</i>
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
SAH	Sulfonium-adénosyl-L-homocystéine
SAHH	Sulfonium-adénosyl-L-homocystéine hydrolase
SAM	Sulfonium-adénosyl-L-méthionine
SDS	Sodium dodécylsulfate
SOD	Superoxyde dismutase
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TCII	Transcobalamine II
THF	Tétrahydrofolate
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNFα	<i>Tumor necrosis factor α</i>
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

Introduction

I. L'homocystéine

1. Métabolisme de l'homocystéine

L'homocystéine est un acide aminé soufré qui est absent des protéines. Toutes les homocystéines dans l'organisme sont formées à partir de la méthionine apportée par l'alimentation. L'homocystéine est à l'intersection de deux voies: la voie de la reméthylation et la voie de la transsulfuration (Figure 1).

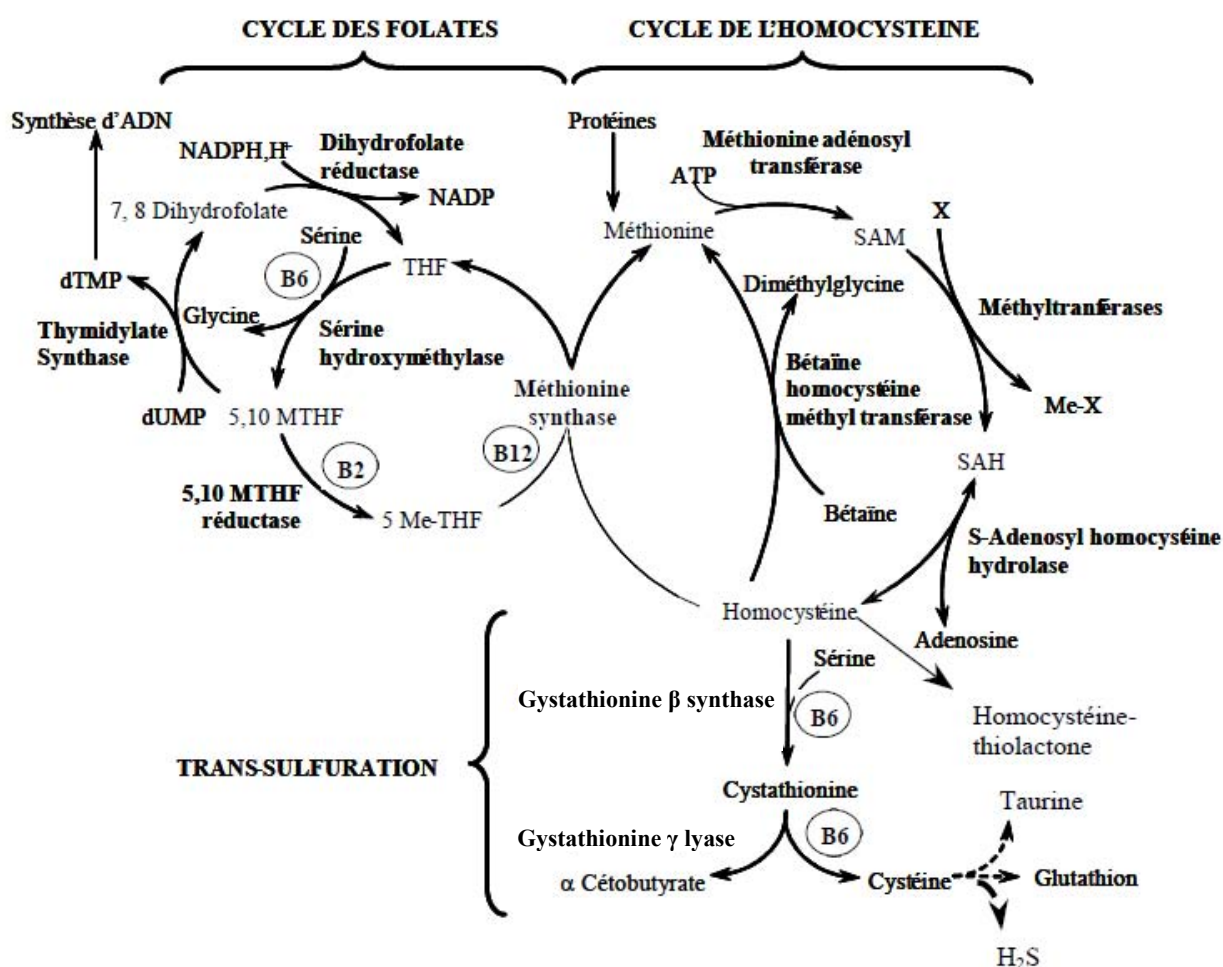


Figure 1 : Représentation du métabolisme de l'homocystéine

1.1. Les voies de la reméthylation

La reméthylation de l'homocystéine pour former de la méthionine est catalysée par une enzyme ubiquitaire: la méthionine synthase (MTR, E.C.2.1.1.13) dont le cofacteur est la vitamine B12. La méthylène tétra-hydrofolate réductase (MTHFR) catalyse la synthèse du méthyltétrahydrofolate, qui est le donneur de groupements méthyles de la réaction précédente. Cette enzyme utilise la flavine adénine dinucléotide (FAD) comme cofacteur.

Comme la méthionine synthase, la bétaine-homocystéine méthyltransférase (BHMT, E.C.2.1.1.5) catalyse la reméthylation de l'homocystéine en méthionine, mais en utilisant la bétaine, et non le méthyltétrahydrofolate comme donneur de méthyle. La bétaine provient de la nourriture, comme les fruits de mer et les céréales ou l'oxydation de la choline. La BHMT est moins importante que la MTR car la BHMT n'est exprimée chez l'homme qu'au niveau du foie et du rein (Sunden *et al.* 1997).

La méthionine adénosyl transférase (MAT, E.C.2.5.1.6) catalyse la synthèse de S-adénosyl-méthionine (SAM) à partir d'ATP et de méthionine. Tous les organismes possèdent un ou deux des trois isoforme de la MAT: MATI, MATII et MATIII (Chamberlin *et al.* 2000). La S-adénosyl-méthionine est le donneur universel de groupements méthyles nécessaires au maintien de la méthylation cellulaire: ADN, ARN, protéines, lipides... Ce transfert du group méthyle, qui est catalysé par des méthyltransférases, induit la synthèse de S-adénosylhomocystéine (SAH).

La SAM joue aussi un rôle dans la régulation du métabolisme de l'homocystéine. SAM est un effecteur allostérique de la cystathione β synthase (CBS, E.C. 4.2.1.22). La fixation de la SAM sur le domaine de régulation de la CBS pourrait ne pas être coopérative, cependant cette liaison favorise un changement de conformation de l'enzyme, libérant le site actif (Janosik *et al.* 2001). Donc l'augmentation de SAM va provoquer un basculement du métabolisme de l'homocystéine vers son catabolisme, *i.e.* l'activation de la voie de transsulfuration. La SAM est aussi un inhibiteur allostérique de la MTHFR, empêchant ainsi la reméthylation de l'homocystéine par une diminution de la synthèse de méthyltétrahydrofolate. A l'inverse, la

SAH donc la structure est très proche de la SAM, est l'antagoniste de SAM et empêche le positionnement correct de la SAM sur sa protéine cible.

La S-adenosyl homocystéine hydrolase (SAHH, E.C.3.3.1.1) catalyse la réaction de conversion de SAH en homocystéine et en adénosine. C'est la seule réaction réversible parmi tous les réactions chimiques impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine. Elle est plus en faveur de la synthèse de SAH que la synthèse de l'homocystéine.

1.2. La voie de la transsulfuration

La voie de la transsulfuration est la seule voie de catabolisme de l'homocystéine chez les mammifères. La cystathionine β synthase (CBS, E.C. 4.2.1.22) condense le groupement thiol de l'Hcy avec l'hydroxyle d'une sérine pour former la L-cystathionine. Ensuite L-cystathionine est clivée et désaminée en cystéine et en α -cétobutyrate par la Cystéine- γ -lyase (CGL, E.C. 4.4.1.1). Ces deux réactions irréversibles nécessitent la présence d'un cofacteur, le pyridoxal 5' phosphate ou vitamine B6. Cette réaction ne se déroule qu'au niveau du foie, du rein, de pancréas et d'intestin (Brosnan *et al.* 2004).

2. Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie

L'homocystéine libre ne compose que 1%-2% de l'homocystéine totale (tHcy). 98%-99% de l'homocystéine totale circulent sous la forme de ponts disulfures: 1) 75%-80% de l'homocystéine totale sont liés aux résidus réactifs de cystéine des protéines, la plupart sont avec des cystéines 34 (Cys34) d'albumine et réduite de l'homocystéine totale. 2) D'autres homocystéines sont sous la forme de ponts disulfures libres, homocystine (Hcy-Hcy) et cystéine homocystéine (Hcy-Cys) (Ueland *et al.* 1995, Mudd *et al.* 2000).

L'homocystéine thiolactone (HTL), un thioester cyclique de l'homocystéine représente 0.29% et 28% de l'homocystéine totale dans le plasma et l'urine. L'homocystéine peut également se lier aux protéines par liaison amidé (N-Hcy-protéine). N-Hcy-hémoglobine et

N-Hcy-albumin comportent respectivement 75% et 22% de N-Hcy-protéine totale (Jakubowski *et al.* 2006).

Quand on mesure la concentration de l'homocystéine, tous les ponts disulfures sont réduits par un agent réducteur et toutes les homocystéines sous la forme de ponts disulfures passeront sous forme libre. Donc le terme homocystéine totale est la somme de l'homocystéine libre et liée par le pont disulfure. L'homocystéine totale ne compte pas l'homocystéine thiolactone (HTL) et l'homocystéine liée aux protéines par le pont amidé (N-Hcy-protéine), car cette liaison résiste au réactif réducteur, HTL et N-Hcy-protéine ne peuvent pas être réduits en homocystéine libre (Figure 2).

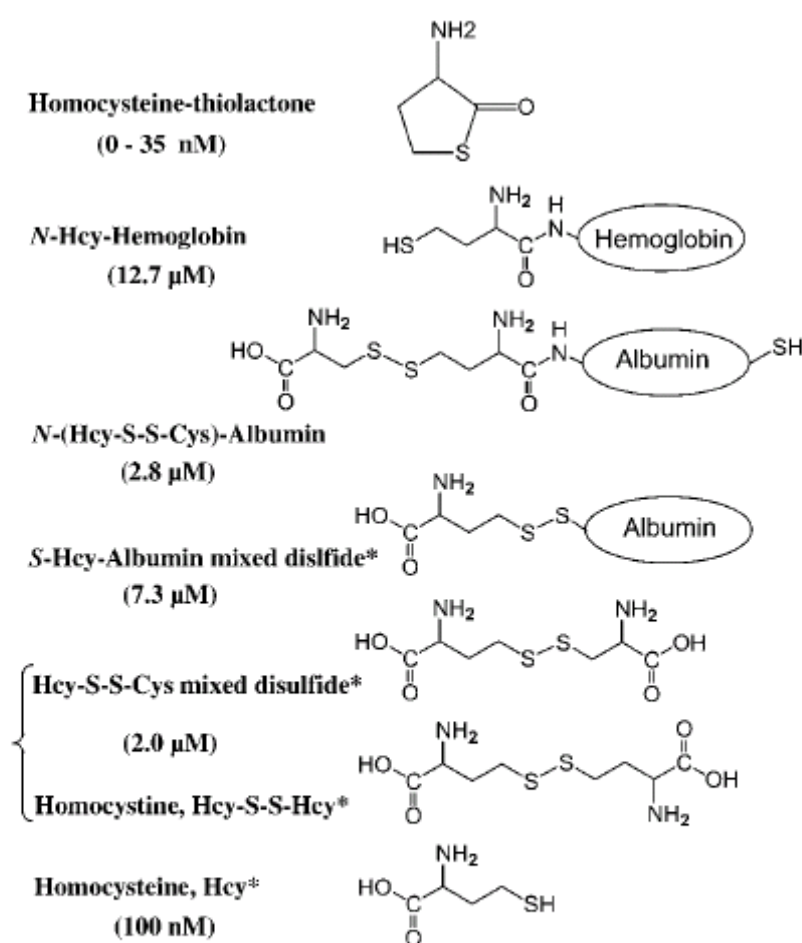


Figure 2 : Différentes formes de l'homocystéine dans le plasma humain

(d'après Jakubowski et al. 2006)

Le taux d'homocystéine totale plasmatique normal varie selon les experts et surtout selon les méthodes de dosage ; des valeurs comprises entre 5 et 12 $\mu\text{mol/L}$ sont habituellement considérées comme dans les limites de la normale. Pour la valeur pathologique, on retient trois niveaux: une hyperhomocystéinémie modérée (15 à 30 $\mu\text{mol/L}$), une hyperhomocystéinémie intermédiaire (31 à 100 $\mu\text{mol/L}$) et une hyperhomocystéinémie sévère (>100 $\mu\text{mol/L}$).

Plusieurs facteurs peuvent aboutir à une hyperhomocystéinémie. Ils comportent les facteurs génétiques, nutritionnels et environnementaux (Figure 3) .

Vitamin deficiency	Folate deficiency Cobalamin deficiency Vitamin B6 deficiency
Enzyme defects	Cystathionine- β -synthase deficiency MTHFR deficiency Thermolabile MTHFR- homozygosity
Diseases	Renal insufficiency/ impairment Cancer Rheumatoid arthritis Chronic inflammatory intestinal diseases Neurodegenerative diseases Vascular diseases Endocrine disorders
Drugs	Methotrexate Nitrous oxide Phenytoin Oral Anti-Diabetics L-dopa
Physiologic changes	Older age Male sex Increased muscle mass
Lifestyle	Smoking Coffee Alcohol Physical activity

Figure 3: Facteurs favorisant une hyperhomocystéine

2.1 les facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux entraînent habituellement une hyperhomocystéinémie modérée. Les personnes âgées et de sexe masculin ont une homocystéinémie plus élevée que les personnes jeunes et sexe féminin. Certaines habitudes peuvent augmenter le taux de l'homocystéine incluent l'usage de tabac, café, alcool et l'activité physique. L'hyperhomocystéinémie modérée peut être liée à la prise de certains médicaments comme le méthotrexate qui bloque la dihydrofolate réductase, la phénytoïne, la carbamazépine qui interfèrent avec le métabolisme des folates, l'azaribine qui empêche l'activité de la CBS (Quinn *et al.* 1997, James *et al.* 1997). Une hyperhomocystéinémie modérée est ainsi observée chez des patients atteints de maladies comme l'arthrite rhumatoïde, l'hypothyroïde, les maladies inflammatoires chroniques et neurodégénératives et certains cancers (De Bree *et al.* 2002, Widner *et al.* 2002, Roubenoff *et al.* 1997).

2.2 Facteurs nutritionnels

Plusieurs études ont montré qu'il existe une hyperhomocystéinémie chez les sujets soumis à une carence en vitamine B9, vitamine B12 et vitamine B6 (Hao *et al.* 2007, Van *et al.* 2005, Lee *et al.* 2003, Jacques *et al.* 2001, De Bree *et al.* 2001, Rasmussen *et al.* 2000). Ces molécules sont toutes impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine.

2.2.1 Les folates ou Vitamine B9

La vitamine B9 est également connue sous le nom d'acide folique. La déficience en folates est la cause principale des hyperhomocystéinémies. Les folates se trouvent dans l'alimentation, notamment les légumes verts comme les épinards, le concombre, les asperges, le fenouil.

La plus grande partie de l'acide folique est présente dans les aliments sous forme de polyglutamates. Les polyglutamates sont hydrolysés en monoglutamates par la γ -glutamyl

hydrolase et sont absorbés au niveau de l'intestin. Ensuite l'acide folique est réduit sous une forme métaboliquement active (dihydrofolate et en tétrahydrofolate) au niveau du duodénum et du jéjunum.

Le tétrahydrofolate joue un rôle important dans le métabolisme des groupements monocarbonés. Normalement un carbone est transféré de la sérine au tétrahydrofolate pour former le 5,10-méthylènetétrahydrofolate (5,10-MTHF) et libérer de la glycine. Ce composé est soit utilisé pour la synthèse de thymidine, soit oxydé en formyl-THF pour la synthèse des purines, soit réduit en 5-méthyltétrahydrofolate (5-Me-THF) par la méthyltétrahydrofolate réductase (MTHFR) pour la synthèse de la méthionine.

Une carence en folates est probablement la cause la plus importante et la plus étudiée d'une hyperhomocystéinémie. Une étude a montré que les taux plasmatiques des folates sont corrélés négativement aux taux d'homocystéine chez les adultes sains et les patients atteints de Maladie Coronaire ; les vitamines B12 et B6 ne sont pas les déterminants principaux de la concentration plasmatique d'homocystéine (Lee *et al.* 2003). Dans une étude hollandaise portant sur 234 enfants, on a rapporté que plus les taux plasmatiques de folates étaient bas, plus la concentration d'homocystéine était élevée (Van *et al.* 2005).

2.2.2 La vitamine B12

La vitamine B12 appartient à une classe de composés appelés corrinoïdes. Elle est constituée d'un noyau corrine et d'un ribonucléotide reliés entre eux par un pont amino2-propanol. Le noyau corrine est formé d'un atome de Co central relié à 4 noyaux pyrrole ainsi qu'à un radical anionique (-X) variable qui détermine le nom du composé vitaminique : la cyanocobalamine(-X=-CN), L'hydroxocobalamine(-X=-OH), la méthylcobalamine(-X=-CH₃) et la désoxyadénosyl cobalamine (-X=-5'd Ad).

Les besoins journaliers en vitamine B12 sont très faibles. La vitamine B12 est présente dans les aliments d'origine animale, certaines bactéries sont capables de la synthétiser. Liée aux protéines, elle est libérée du support alimentaire dans l'estomac sous l'effet du pH acide. La cobalamine libre va se fixer au facteur intrinsèque, synthétisé par les cellules pariétales

gastriques. Ce complexe va pénétrer dans les entérocytose par endocytose recepteur médié. Dans la cellule, la cobalamine est libérée et peut se lier à la transcobalamine II (TCII) pour rejoindre le sang.

La méthylcobalamine est le coenzyme de la méthionine synthase (MTR). Elle se comporte comme un donneur de groupement méthyle et sous l'action de la méthyltransférase, permet la synthèse de la méthionine à partir de l'homocystéine, en présence d'un co-substrat, le méthyl-THF.

Le rôle de la carence en vitamine B12 comme étant responsable d'une hyperhomocystéinémie est encore discuté. Dans une étude de cohorte, Jacques *et al.* (2001) ont montré qu'il existe une corrélation significative entre des valeurs basses de vitamine B12 plasmatique et l'homocystéine, ainsi qu'entre les folates et l'homocystéine, et entre la vitamine B6 et l'homocystéine. Une autre étude chinoise sur 2471 adultes a rapporté le même résultat (Hao *et al.* 2007). De Bree *et al.* (2001) ont montré que les taux plasmatiques de toutes les vitamines B (B2, B6, B9, B12) étaient corrélés négativement aux taux d'homocystéine en analyse univariée, cependant en analyse de régression multivariée, seuls les folates demeuraient corrélés négativement à l'homocystéinémie.

2.2.3 La Vitamine B2

La vitamine B2 ou la riboflavine est le précurseur de la flavine mononucléotide (FMN) et de la flavine adénine dinucléotide (FAD) intervenant dans les réactions d'oxydoréductions cellulaires.

La riboflavine pourrait intervenir dans la voie du métabolisme de l'homocystéine dans la réduction du méthylèneTHF en méthylTHF par la MTHFR ou la réduction de la cobalamine II en cobalamine I par la méthionine synthase réductase (MTRR) nécessaire au maintien de l'activité de la MTR.

Hustad *et al.* (2000) ont mis en évidence une association entre le taux de riboflavine et le taux d'homocystéine plasmatique dans une étude transversale portant sur 423 adultes sains.

Cette association est modifiée par le polymorphisme de la *MTHFR*. Dans une étude de cohorte de Framingham portant sur 450 adultes sains. Il a été montré que le taux de riboflavine est associé au taux d'homocystéine plasmatique, néanmoins cette association n'existe que chez les sujets dont la concentration de folates est inférieure à 12.5 nmol/L et le génotype de *MTHFR* est 677TT (Jacques *et al.* 2002). De même, Moat *et al.* (2003) ont montré que l'association entre le taux de la riboflavine et le taux d'homocystéine est influencée par le taux de folates.

2.2.4 La vitamine B6

Le terme «vitamine B6» désigne six composés : le pyridoxal (PL), la pyridoxine (PN), la pyridoxamine (PM), et leurs dérivés phosphorylés, le pyridoxal5'-phosphate (PLP), la pyridoxamine 5'-phosphate (PMP) et la pyridoxine 5'-phosphate (PNP). Nous nous intéressons seulement au phosphate de pyridoxal (PLP). Il est impliqué comme co-facteur en lien avec environ 120 enzymes. Le Pyridoxal phosphate est un co-facteur dans le métabolisme des acides aminés, des neurotransmetteurs et dans le métabolisme de la dégradation du glycogène.

Deux enzymes, la cystathione β synthase (CBS, E.C. 4.2.1.22) et la cystéine- γ -lyase (CGL, E.C. 4.4.1.1), qui interviennent dans la voie de la transulfuration nécessitent la présence de PLP comme un co-facteur. Hao *et al.* (2007) ont montré que la carence en vitamine B6 était responsable d'une hyperhomocystéinémie. McKinley *et al.* (2001) ont montré une supplémentation en vitamine B6 chez les sujets sains engendrait une normalisation de l'homocystéine.

2.3 Facteurs génétiques

Les polymorphismes ou variants génétiques du génome sont la conséquence de mutations qui sont plus souvent des mutations uniques (single nucleotide polymorphism ou SNP). Il existe plusieurs polymorphismes des enzymes intervenant dans le métabolisme de l'homocystéine. Il s'agit principalement de variants génétiques des enzymes 5, 10-

méthylènetétra hydrofolate réductase (*MTHFR C677T, A1298C*), méthionine synthase (*MTR A2756G*), méthionine synthase réductase (*MTRR A66G*). De plus, un polymorphisme portant sur une protéine de transport de vitamine B12, la transcobalamine (*TCN C776G*), a été rapporté et peut également s'associer à une hyperhomocystéinémie modérée (Namour F *et al.* 2001).

2.3.1 Les polymorphismes du gène *MTHFR C677T, A1298C* et *T1317C*

Le gène de la *MTHFR* humain est localisé dans le chromosome 1p 36.3. Le gène de la *MTHFR* comprend 11 exons et produit 656 résidus de l'acide aminé (Goyette *et al.* 1998). Il existe trois polymorphismes de la *MTHFR*: *C677T* qui est localisé dans l'exon 4, *A1298C* et *T1317C* qui sont localisés dans l'exon 7 (Sunder-Plassmann *et al.* 2003).

L'altération génétique la plus commune associée à une hyperhomocystéinémie modérée est la mutation par substitution d'une cytosine en une thymidine en position 677 (*C677T*) remplaçant au niveau de l'enzyme un acide aminé alanine en valine, rend *MTHFR* thermolabile avec une diminution de 50% de son activité (Frosst *et al.* 1995). La prédominance des homozygotes *677TT* est de 5% à 15% dans les populations caucasiennes (Brattstrom *et al.* 1998).

Le second polymorphisme de la *MTHFR* correspond à la substitution d'une adénine en cytosine en position 1298 (*A1298C*). Cette mutation provoque le remplacement d'un acide aminé glutamate en alanine et engendre une diminution de l'activité enzymatique. Ce polymorphisme isolé n'a pas d'influence sur la concentration en Hcy. Cependant, la double hétérozygotie *MTHFR C677T* et *A1298C* peuvent être associée à l'élévation plasmatique de l'homocystéine.

2.3.2 Les polymorphismes du gène *MTR A2756G*

Comme pour *MTHFR*, le gène humain de la *MTR* se trouve dans le chromosome 1q43 (Leclerc *et al.* 1996). Le polymorphisme prédominant de la méthionine synthase est la mutation

A2756G correspond à la substitution d'un acide aminé aspartate par une glycine. Harmon *et al.* (1999) ont rapporté que la mutation A2756G est un déterminant modeste, mais significative, de la concentration en homocystéine.

2.3.3 Les polymorphismes du gène *MTRR A66G*

La reméthylation de l'homocystéine en méthionine nécessite la MTR dont la cofacteur est la cob (I) alamine, ensuite la cob (I) est oxydée en cob (II) alamine, ce qui rend la MTR inactive. La méthionie synthase reductase (MTRR) régénère la forme active de la cobalamine. Un polymorphisme du gène de la *MTRR A66G* se traduit par une substitution d'une isoleucine par une méthionine. Gaughan *et al.* (2001) ont montré que ce polymorphisme est associé à une élévation de la concentration de l'Hcy. Brown *et al.* (2000) ont rapporté que cette mutation était associé au risque de maladie coronaire, mais n'est pas un facteur déterminant de l'hyperhomocystéinémie. Brilakis *et al.* (2003) ont démontré que ce polymorphisme est associé ni à la concentration en homocystéine, ni aux maladies coronaires.

2.3.4 Les polymorphismes du gène *TCN C776G*

La mutation la plus commune correspond à la substitution d'une base cytosine en guanine en position 776 (*C776G*). La conséquence au niveau protéique est le remplacement d'un acide aminé arginine au profit d'une proline (codon 259) (Namour *et al.* 2001). La fréquence de l'allèle TCN 776G est variable : la plus haute est 60,7% dans des populations chinoises, la plus basse est 17,8% dans des populations africaines. Une association entre ce polymorphisme et la concentration de l'homocystéine n'est observée que dans la population française et mexicaine, deux populations dont la fréquence de la carence en vitamine B12 (<100 pmol/l) sont parmi les plus hautes (Guéant *et al.* 2007). Nous avons également montré une faible influence de l'allèle TCN 776G sur la concentration de l'homocystéine dans des populations caucasiennes. (Namour *et al.* 2001)

2.3.5 Les polymorphismes du gène *CBS T833C et G919A*

La mutation homozygote du gène *CBS* favorise l'apparition d'une homocystinurie, qui est associée souvent à une hyperhomocystéinémie sévère, une thromboembolie et un retard mental. Environ une soixantaine de mutations différentes ont été décrites dont les plus communes sont la *T833C* et *G919A* (Kraus *et al.* 1998). Le polymorphisme *T833C* est le plus répandu et les individus homozygotes pour cette mutation ont souvent des problèmes de thromboses. (Gaustadnes *et al.* 2000).

3. Homocystéine et dysfonction endothéliale

3.1 L'effet de homocystéine sur la fonction endothéliale

Le terme « dysfonction endothéliale » signifie l'altération des propriétés homéostatiques de l'endothélium vasculaire, qui incluent la régulation endothélium- dépendante du tonus vasculaire, l'hémostase, et l'inflammation (Cai *et al.* 2000). Plusieurs études sur des modèles animaux et humains ont démontré que l'Hcy induit une dysfonction endothéliale (Eberhardt *et al.* 2000, Lentz *et al.* 2000 , Feraci *et al.* 2004, Dayal *et al.* 2001).

3.1.1 La thrombose

Une grande partie des études ont montré que l'hyperhomocystéinémie est associé à un risque de thromboses veineuses et artérielles (The Homocysteine Studies Collaboration 2002, Cattaneo *et al.* 1999, Welch *et al.* 1998). Une méta-analyse a montré qu'une augmentation de tHcy plasmatique de 5µmol/L était associée à un risque plus élevé de thromboses veineuses de 27 % (Den Heijer *et al.* 2005). Les mécanismes par lesquels l'hyperhomocystéinémie est associée à une thrombose sont encore mal connus.

Les travaux de Undas *et al.* (2001) suggère que l'hyperhomocystéinémie altère la capacité de la protéine C d'inactiver ses substrats principaux, facteur V via une réaction de S-thiolation. Cependant, l'importance patho-physiologique de cette réaction est incertaine, parce que la sensibilité apparente normale du Facteur V à la protéine C activée a été démontrée chez l'homme et chez les singes avec une hyperhomocystéinémie modérée, et chez la souris avec une hyperhomocystéinémie sévère (Lentz *et al.* 2002). Deux autres études cliniques n'ont pas démontré non plus d'association entre hyperhomocystéinémie et résistance à la protéine C (Podda *et al.* 2003, Zarychanski *et al.* 2004) (figure 4 (1)). L'hyperhomocystéinémie pourrait également inhiber l'activité de la thrombomoduline et de la protéine C. Une diminution de l'activité de thrombomoduline a été observée sur des modèles animaux d'hyperhomocystéinémie (Lentz *et al.* 1996, Dayal *et al.* 2001) (figure 4 (2)).

Une hyperhomocystéinémie peut favoriser une thrombose par l'inhibition des anticoagulants naturels. Dans une autre étude, Nishinaga *et al.* (1993) ont rapporté que l'incubation des cellules endothéliales aortiques porcines avec l'Hcy cause la perte de leur capacité à lier et activer l'antithrombine III, par une diminution de l'expression de sulfate d'héparine à la surface de cellules endothéliales. (figure 4(3)).

L'hyperhomocystéinémie peut aussi diminuer l'activité fibrinolytique. L'Hcy peut former un pont disulfide avec un résidu cystéine dans le domaine terminal aminé de l'annexine II, un récepteur pour l'activateur plasminogène tissulaire (t-PA) et plasminogène (Hajjar *et al.* 1993 et 1998) (figure 4 (4)).

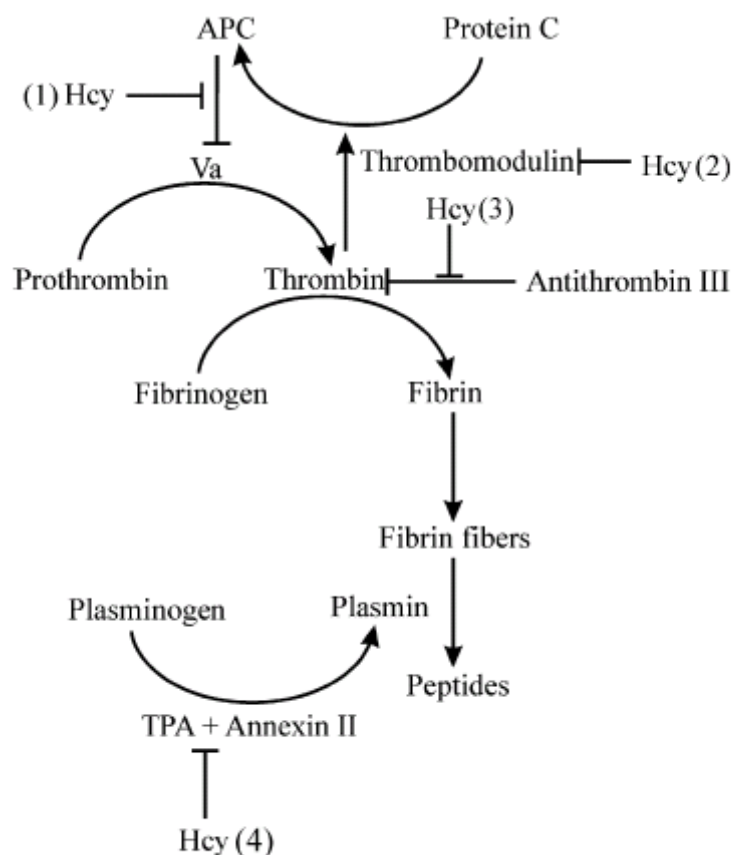


Figure 4: Influence de l'homocystéine sur la coagulation du sang et la fibrinolyse

(d'après Perta-Kaján et al. 2007)

3.1.2 La relaxation vasculaire

Une hyperhomocystéinémie chez l'homme est associée à l'altération de la fonction de relaxation endothélium-dépendante. La dysfonction endothéliale est généralement détectée par l'altération de la fonction de relaxation endothélium-dépendante des vaisseaux sanguins, elle est prédictive en outre des événements cardiovasculaires (Schachinger *et al.* 2000).

L'homocystéine peut changer certaines propriétés des cellules endothéliales par l'altération de la production ou de la disponibilité biologique des médiateurs vaso-actifs comme l'endothéline 1 (Demuth *et al.* 1999), l'oxyde nitrique (NO) (Upchurch *et al.* 1997) et la

prostacycline (Wang *et al.* 1993). L'incubation des cellules endothéliales avec Hcy (0,05-1,00mM) produit moins d'endothéline et cet effet est médié par des produits oxydatifs (Drunat *et al.* 2001). Plusieurs études utilisant des tissus vasculaires ont montré que l'Hcy provoque une production intracellulaire de superoxyde et par conséquent une altération de la relaxation (Lang *et al.* 2000, Duan *et al.* 2000, Franken *et al.* 1994). Le superoxyde est censé réagir avec le NO au peroxynitrite, limitant de ce fait la réponse vasodilatatrice normale (Gryglewski *et al.* 1986, Heinecke *et al.* 1987).

3.1.3 L'inflammation

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique, où des cytokines proinflammatoires jouent un rôle très important. L'exposition à l'Hcy pourrait induire une augmentation de cytokines proinflammatoires. Poddar *et al.* (2001) ont montré que l'homocystéine augmentait l'expression MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) et de IL-8 dans les cultures humaines de cellules endothéliales. Il suggère que l'Hcy pourrait influencer les maladies vasculaires par l'augmentation de l'attachement des monocytes à l'endothélium et à leur recrutement à l'espace sous-endothélial. L'augmentation de l'expression de MCP-1 est également observée dans les cultures humaines de cellules musculaires lisses (Wang *et al.* 2000) et dans les monocytes (Wang G *et al.* 2001) traités avec de l'homocystéine. L'augmentation de l'expression de MCP-1 et d'IL-8, en présence de l'Hcy, est médiée par l'activation du NF- κ B, facteur de transcription impliqué dans la régulation en aval du processus inflammatoire (Wang G *et al.* 2001, Au-Yeung *et al.* 2004)

3.1.4 L'apoptose

Zhang *et al.* (2001) ont démontré que l'homocystéine induit la mort cellulaire par apoptose des cellules endothéliales humaines en culture par l'activation de l'UPR (*Unfolded Protein Response*). La voie de signalisation de l'UPR est régulée par une protéine kinase transmembranaire de type-I ER (IRE-1) et des agents d'induction du stress du RE. L'IRE-1 est

responsable de la transduction du signal d'accumulation de UPR. L'activation de IRE-1 induite par l'Hcy provoque une activation rapide et soutenue des JNK-kinases (Cai *et al.* 2000, Urano *et al.* 2000). Puisque l'activation persistante de JNK-kinases est associée à la mort par apoptose (Chen *et al.* 1996), il est possible que l'Hcy induise la mort cellulaire par un mécanisme UPR-dépendant.

En outre, l'activation de la caspase 3 est essentielle pour l'apoptose induite par l'Hcy. Elle est impliquée dans l'apoptose des cellules HL-60 (Huang *et al.* 2001), des cellules endothéliales (Tyagi *et al.* 2006) et des cellules stromales humaines (Kim *et al.* 2006).

3.2 L'effet moléculaire de l'homocystéine sur l'endothélium

3.2.1 La modification de la protéine

L'homocystéine porte un groupement thiol réactif, qui peut former des ponts disulfures avec des les résidus réactifs de la cystéine. L'homocystéine est détectée dans plusieurs protéines, qui incluent albumine (Sengupta *et al.* 2001), fibronectine (Majors *et al.* 2002), transthyretine (Sass *et al.* 2003, Lim *et al.* 2003), facteur V (Undas *et al.* 2001) et annexine II (Hajjar *et al.* 1998). Le groupement thiol de la protéine intervient dans la fonction de nombreuses protéines. L'interaction avec ces protéines pourrait altérer ses fonctions et perturber le métabolisme cellulaire. (Hultberg *et al.* 1998, Jacobsen *et al.* 2005) (figure 5).

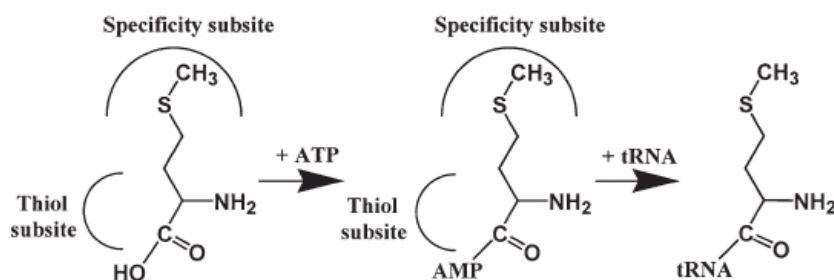
Protein	Hcy incorporation position	Protein function	Effect of S-homocysteinylation
Annexin II	Cys9	Receptor for tissue-type plasminogen activator	Inhibition of the tissue plasminogen activator binding
Fibronectin	5 homocysteine molecules per fibronectin dimer, mainly in the C-terminal region, within and adjacent to the fibrin-binding domain	Cell adhesion, cell migration, embryogenesis, hemostasis, thrombosis, wound healing, tissue remodeling	Impairing of fibronectin – fibrin interaction
Transthyretin	Cys10	Binding and transport of thyroid hormones	Possible role in pathology of amyloid diseases
Factor Va	Cys539, Cys585, Cys1085, Cys1960, Cys2113	Essential cofactor for prothrombin complex, which converts prothrombin into thrombin	Inhibition of factor Va inactivation by activated protein C

Figure 5 : les exemples et les conséquences du protéine S-homocystéinylation

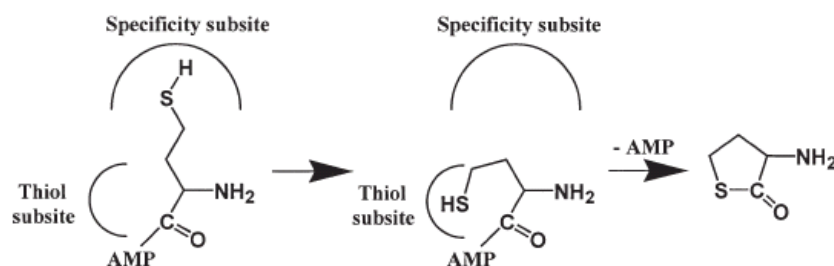
(d'après Perta-Kaján et al. 2007)

L'homocystéine pourrait également induire la modification de protéines via un autre mécanisme médié par un thioester cyclique de l'homocystéine (homocystéine thiolactone).

La formation de l'Homocystéine-thiolactone est une conséquence d'une réaction d'erreur-édition de méthionyl-tRNA synthase. Dans la synthèse peptidique, l'homocystéine pourrait poser un problème à cause de sa similarité avec la méthionine. L'homocystéine peut s'insérer par erreur la première étape de la synthèse peptidique et former Hcy-AMP avec méthionyl-tRNA synthase. Ensuite cette erreur est corrigée par la conversion d'homocystéine en homocystéine-thiolactone. La chaîne latérale d'Hcy, qui ne comporte pas de groupement méthyle de la méthionine, réagit moins efficacement avec le résidu spécifique de la méthionyl-tRNA synthase. Ceci permet à la chaîne latérale d'Hcy de se déplacer au résidu thiol-liant, qui favorise la synthèse du pont de thioester (figure 6).



Aminoacylation of tRNA^{Met} with methionine catalyzed by MetRS: methionine completes the synthesis pathway because its side chain is firmly bound to the specificity subsite of the enzyme and the thiol subsite is unoccupied.



Editing of Hcy by MetRS: Hcy is edited because its side chain can enter the thiol subsite. The cyclization of Hcy-AMP to Hcy-thiolactone with the release of AMP in the synthetic/editing active site of MetRS is shown.

Figure 6 : La formation de l'Homocystéine-thiolactone (d'après Jakubowski et al. 2004)

Les ponts thioamides de l'Hcy sont susceptibles de se lier avec les groupes amines des chaînes latérales de lysines protéiques (Hcy-ε-N-Lys-protéine). L'Hcy-N-protéine représente 0.3%-0.23% de l'homocystéine totale plasmatique. Dans la majorité des échantillons du sérum examinés, les niveaux d'Hcy-N-protéine sont directement proportionnels à la teneur en homocystéine totale, et sont inversement proportionnels à la teneur en méthionine, folates et HDL (Jakubowski *et al.* 2000). Une étude récente a montré que les niveaux d'Hcy-N-protéine et d'Hcy-S-protéine sont plus élevés chez les patients ayant une urémie élevée que chez les sujets sains. Une supplémentation en folates normalise les niveaux d'Hcy-N-protéine et diminue, mais ne normalise pas les niveaux d'Hcy-S-protéine (Perna *et al.* 2007). Yang *et al.* (2006) ont montré que les niveaux d'Hcy-N-protéine plasmatiques sont plus élevés chez les patients atteints de maladie coronarique que chez les sujets sains. Pourtant, ils n'ont pas trouvé une corrélation entre les niveaux d'Hcy-N-protéine et les niveaux d'Hcy plasmatique.

Cette modification par l'homocystéine-Thiolactone provoque des dommages sur sa structure et une perte de fonction (figure 7). Les formes liées aux hémoglobines (Hcy-N-Hb) et albumines (Hcy-N-albumine) sont les plus courantes. L'homocystéine pourrait se lier par des résidus amide aux autres protéines, qui incluent les LDL, HDL, antitrypsine, transferrine et fibrinogène. (Jakubowski *et al.* 2002)

Les protéines modifiées par l'homocystéine-Thiolactone sont délétères et induisent une réponse immune anormale (Jakubowski *et al.* 2005 et 2006). Il existe chez l'homme des anticorps qui vont reconnaître spécifiquement les Hcy-ε-N-Lys-protéine sur les protéines modifiées par l'homocystéine-Thiolactone.

Protein	Function	Effect of N-homocysteinylation	References
Albumin	Maintenance of the blood within the vascular system, transport of metabolic products, regulatory mediators, nutrients and proteins, neutralization of endogenous or exogenous toxins	Structural changes, influence the function of Cys34, increase of susceptibility to proteolysis, diminished binding capacity for diazepam	Jakubowski (1999, 2000b) Perla et al. (2004) Undas et al. (2004, 2005) Perna et al. (2006)
High density lipoprotein – Paraoxonase	Protection against lipid peroxidation of LDL and HDL	A decrease in the activity of the enzyme HDL-PON, resulting in diminished protection against oxidative damage and toxicity of homocysteine thiolactone	Ferretti et al. (2003)
Low density lipoprotein*	Transport of cholesterol to tissues and regulation of cholesterol synthesis	Protein aggregation and spontaneous precipitation, higher accumulation of intracellular cholesterol	Naruszewicz et al. (1994)
Fibrinogen	Precursor of fibrin	Protein aggregation, fibers thinner and more resistant to fibrinolysis	Jakubowski (1999) Sauls et al. (2005)
Antitrypsin*	Proteases inactivation	Recognized by human N-Hcy-protein specific antibodies	Perla et al. (2004)
Trypsin	Cleavage of amide and ester bonds of Arg and Lys	Complete inactivation when ~88% lysine residues modified	Jakubowski (1999)
Methionyl-tRNA synthetase	Aminoacylation of tRNA ^{Met} with methionine	Complete inactivation when ~33% lysine residues modified	Jakubowski (1999)
Cytochrome c	Electron transport	Protein aggregation	Jakubowski (1999)
Hemoglobin*	Oxygen transport	Protein aggregation	Jakubowski (1999, 2004) Perla et al. (2004) Undas et al. (2004)
Myoglobin	Oxygen transport	Protein aggregation	Jakubowski (1999)
γ-Globulin	Antibodies	Protein aggregation	Jakubowski (1999)
Transferrin*	Iron transport	Protein aggregation	Jakubowski (1999) Perla et al. (2004)
RNase A [14]	RNA hydrolysis	Protein aggregation	Jakubowski (1999)
α2-macroglobulin	Proteases inactivation	Unknown	Jakubowski (2000)
Crystallin	Eye structural protein	Unknown	Jakubowski (2000)
DNase I	DNA hydrolysis	Unknown	Jakubowski (2000)

* N-Homocysteinylation forms are recognized by human autoantibodies

Figure 7 : les exemples et les conséquences du protéine S-homocystéinylation

(d'après Perta-Kaján *et al.* 2007)

3.2.2 Stress du Réticulum Endoplasmique et unfolded protein response

Dans les cellules eucaryotes, le réticulum endoplasmique (RE) est le site principal de maturation des protéines transmembranaires, sécrétoires et résidentes (Kaufman *et al.* 2002, Rutkowski *et al.* 2004) Pour assurer le repliement correct des protéines récemment synthétisées, le RE contient de nombreuses molécules chaperonnes telles que la GRP78 (*glucose regulated protein-78*), la GRP 94, la calnexine, la calreticuline et la protéine bisulfure isomérase. Les protéines avec un mauvais repliement ou non repliées vont être dégradées par le protéasome cytoplasmique (Kaufman *et al.* 2002). Le stress du Réticulum Endoplasmique est une condition pathologique où des protéines « mal repliées » ou non repliées s'accumulent. Le stress du RE active le *unfolded protein response* (UPR), une voie de signalisation intracellulaire intégrée qui fait intervenir trois kinases RE-résidentes : le IRE-1 (*A type-1 ER transmembrane protein kinase*), ATF-6 (*Activating transcription factor 6*) et PERK (*The PKR like ER kinase*), et par conséquent, il existe une diminution de la traduction des protéines.

3.2.3. Stress oxydant

L'homocystéine porte un groupement thiol réducteur qui est aisément auto-oxydé et peut engendrer des radicaux libres (ROS) responsables de lésions vasculaires, même si ceci reste discuté. En effet, la cystéine est présente dans le plasma à des concentrations 20 à 30 fois plus élevées que l'Hcy et son groupement thiol réducteur est plus réactif que celui de l'Hcy. Pourtant la cystéine ne provoque pas des lésions endothéliales et n'est pas considérée comme un facteur de risque cardiovasculaire (Jacobsen *et al.* 2000). Par ailleurs, une étude a démontré que la forme oxydée de l'Hcy vient en grande partie de l'échange des disulfures, et de manière assez rare de l'auto-oxydation directe de l'Hcy (Sengupta *et al.* 2001).

Des travaux suggèrent que le stress oxydant induit par l'Hcy est dû à l'effet « biochimique » qu'à son effet « chimique ». Le stress oxydant n'est induit que dans l'endothélium incubé avec de L-homocystéine naturelle, mais pas avec la D-homocystéine (Heydrick *et al.* 2004). L'effet pro-oxydant de la L-homocystéine peut être expliqué par un

mécanisme appelé « *eNOS uncoupling* » (Pritchard *et al.* 1995, Zhao *et al.* 2003). Brièvement, la L-homocystéine fait que eNOS devient la source majeur de l'anion superoxyde (O_2^-). L' O_2^- inactive rapidement NO, conduisant à la formation de fortes concentrations de peroxynitrite ($ONOO^-$), un oxydant très puissant et toxique. Un autre mécanisme potentiel de l'accumulation d'anion superoxyde (O_2^-) en présence d'Hcy est l'inhibition de la production du NO provoquée par le diméthylarginine asymétrique (ADMA), inhibiteur endogène de l'eNOS. Dans un modèle animal avec de l'Hcy, il a été montré une élévation plasmatique d'ADMA (Boger *et al.* 2000). Quand l'endothélium est exposé à l'Hcy ou à son précurseur méthionine, la concentration d'ADMA dans le milieu de culture augmente de manière dose- et temps-dépendante, et est corrélée avec une diminution de la synthèse de NO. Un autre mécanisme possible du stress oxydant induit par l'Hcy est la perturbation de la fonction de deux enzymes anti-oxydantes : superoxyde dismutase (SOD) et glutathion peroxydase (GPX). La SOD est une enzyme catalysant la réduction de l'anion superoxyde (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène. Il est rapporté que le niveau d'Hcy plasmatique est corrélé avec une augmentation de SOD extracellulaire chez les patients avec homocystinurie (Wilcken *et al.* 2000) et chez les patients atteints d'une hyperhomocystéinémie modérée (Wang *et al.* 1999). Cet effet est probablement causé par la diminution de la liaison de la SOD extracellulaire avec la surface de la cellule endothéliale, parce que l'Hcy pourrait altérer la surface du protéoglycane d'héparane sulfate (Yamamoto *et al.* 2000). Cet effet pourrait conduire à une perte de sa capacité à protéger la surface endothéliale contre la stress oxydant.

Des résultats montrent que l'Hcy diminue l'expression et l'activité de la glutathion peroxydase (GPX) (Huang *et al.* 2001 Weiss *et al.* 2001 et 2002). La GPX catalyse la réduction de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en H_2O par oxydation du GSH en GSSG. Une hyperhomocystéinémie pourrait empêcher, limiter le potentiel antioxydant de certaines cellules (Dayal *et al.* 2002). Ceci a été démontré dans des modèles animaux génétiquement modifiés. Weiss *et al.* (2001) ont rapporté que la surexpression de GPX atténue le dysfonctionnement endothélial induit par l'homocystéine.

II. MICI

1. L'épidémiologie

La terme de maladie inflammatoire chronique intestinale (MICI) regroupe trois entités différentes: la maladie de Crohn (MC), la recto-colite hémorragique (RCH) et les colites indéterminées.

L'incidence des MICI varie de manière importante selon les pays (Shivanada S *et al.* 1996). Elle est plus élevée dans les pays du nord de l'Europe et en Amérique du Nord. Les incidences de MICI sont estimées à 0,5~17/100 000 dans les pays occidentaux. (Bernstein *et al.* 2008). Les MICI sont moins fréquentes dans les pays asiatiques que dans les pays développés. L'incidence de la RCH (Jiang *et al.* 2002, Jiang *et al.* 2006, Ka-Ho *et al.* 2008, Ouyang *et al.* 2005) et de la MC (Leong *et al.* 2004) est toutefois en forte augmentation dans les pays asiatiques.

L'incidence de RCH est supérieure à celle de la MC dans les pays asiatiques, en Corée (Park *et al.* 2006), en Chine (Jiang *et al.* 2006), en Inde (Sood *et al.* 2003), et en Iran (Aghazadeh *et al.* 2005), contrairement aux pays développés (Bernstein *et al.* 2008) (Figure 7, 8).

En Chine centrale, la MC et la RCH sont plus fréquentes chez l'homme que la femme (1.53:1 et 2.32:1) (Jiang *et al.* 2006). Dans les pays occidentaux, La MC est plus fréquente chez la femme que chez l'homme, et la RCH est plus fréquente chez l'homme que chez la femme (Farrokhyar *et al.* 2001). L'âge moyen de diagnostic de la RCH en Chine est 42 ans contre 34.5 ans dans les pays occidentaux (Jiang *et al.* 2006, Loftus *et al.* 2000).

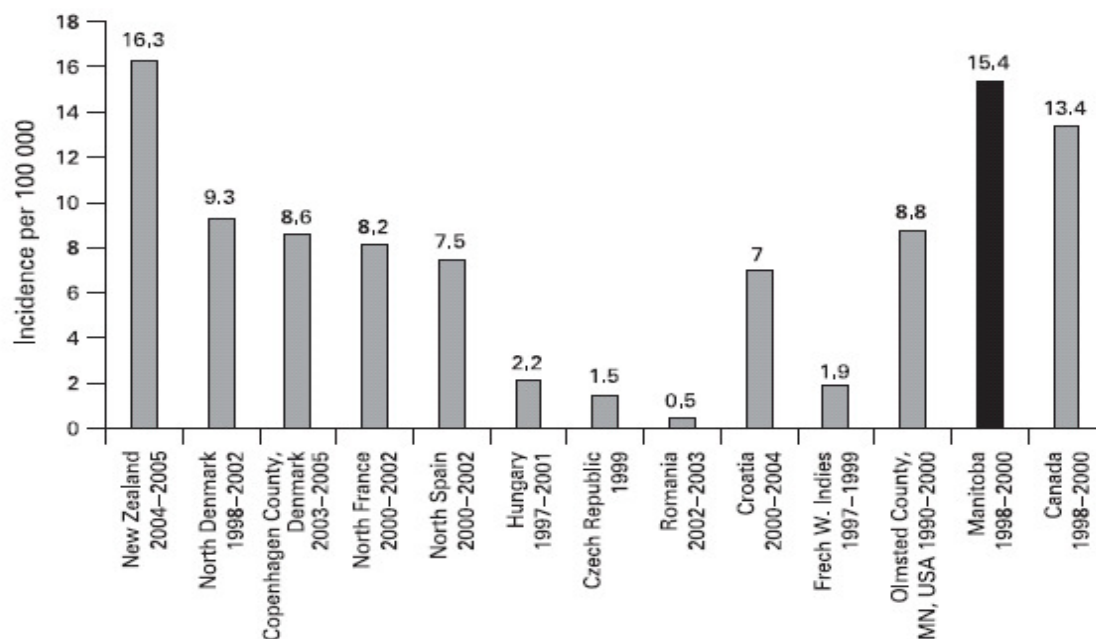


Figure 7 : Incidence de la Maladie de Crohn dans des pays différents

(d'après Bernstein et al. 2008)

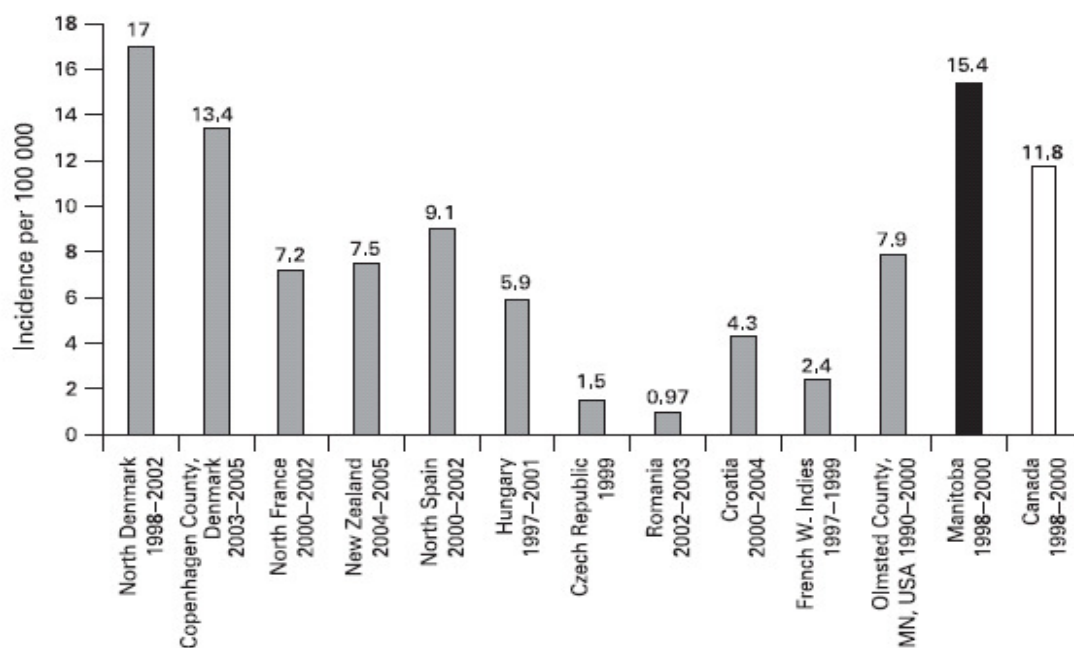


Figure 8 : Incidence de rectocolite hémorragique dans des pays différents

(d'après Bernstein et al. 2008)

2. Les facteurs impliqués dans la pathogénie des MICI

La pathogénie des MICI reste encore mal connue. Elle est complexe et probablement multifactorielle, faisant intervenir des facteurs génétiques, des anomalies de la réponse immune et des facteurs environnementaux.

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 prédisposés.

2.1 Les facteurs génétiques

Des études épidémiologiques, portant sur des jumeaux, et sur les différences raciales et ethniques de la prévalence de la maladie, soulignent l'implication de facteurs génétiques dans la pathogénie des MICI. De nombreux variants ont été récemment identifiés dans la susceptibilité génétique des maladies inflammatoires de l'intestin du génome par des études d'association (figure 9).

Les modifications dans les gènes du système immunitaire inné, comme *NOD2* (*nucleotide-binding oligomerization domain protein 2*, également connu sous le nom de *CARD15*), *ATG16L1* (*autophagy related 16-like protein 1*), *IRGM* (qui code *immunity-related GTPase family, M*) et *LLRK2* (*leucine-rich repeat kinase 2*) sont spécifiques de la maladie de Crohn et ne sont pas associés à la RCH. En revanche, plusieurs gènes impliqués dans la voie de l'IL-23, y compris *IL23R* (qui code une sous-unité essentielle de l'IL-23 receptor), *IL12B* (qui code la sous-unité p40 de IL-12 et IL-23) et *STAT3* (qui code signal transducer and activator of transcription 3) ont été associés à la fois à la maladie de Crohn et la RCH. Le *NKX2-3* (*NK2 transcription factor related, locus 3*) et *HLA* (*Human leucocyte antigen*) montre également une association avec les deux maladies (Franke *et al.* 2008). Enfin, un nouveau locus de susceptibilité *ECM1* (*Extracellular matrix protein 1*) été identifiée récemment comme facteur de risque associée avec la RCH (Fisher *et al.* 2008).

En 2001, le premier gène de prédisposition à la maladie de Crohn, baptisé *Nucleotide-binding Oligomerization Domain containing 2 (NOD2)* puis renommé *Caspase activation recruitment domains 15 (CARD15)* a été découvert (Hugot *et al.* 2001, Ogura *et al.* 2001). Environ 25-30% des gènes de susceptibilité de la MC peuvent être expliqués par les mutations du gène *NOD2/CARD15*, mais ces études n'ont pas trouvé d'association entre les mutations du gène *NOD2/CARD15* et la RCH (Lesage *et al.* 2002, Rosenstiel *et al.* 2003).

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 Paneth (Lesage *et al.* 2002, Rosenstiel *et al.* 2003). NOD2/CARD15 est impliqué dans l'identification d'un produit bactérien, le peptidoglycan-derived muramyl dipeptide (MDP). L'activation de NOD2 par le MDP met en jeu les voies du NF- κ B (facteur nucléaire- κ B) et des MAPKs (mitogen-activated-proteins-kinases) (Kobayashi *et al.* 2005). Trois variants de type SNPs rares dans NOD2, Arg702Trp, Gly908Arg et Leu1007fsinsC (insertion de cytosine provoquant une frameshift à Leu1007) sont fortement associés à la susceptibilité à la maladie de Crohn. Dans les cellules mononucléées humaines primaires, chacun des trois principaux variants de NOD2 est associée à une diminution de l'activation de NF- κ B en réponse à la stimulation MDP (Abraham *et al.* 2006).

Les mécanismes qui sous-tendent la relation entre NOD2 et la maladie de Crohn restent mal connus. Une diminution significative de l'expression des α -défensines a été observée chez les patients atteints de la maladie de Crohn qui sont porteurs du variant de *NOD2* (Wehkamp *et al.* 2005, McDonald *et al.* 2005, Yamamoto-Furusho *et al.* 2006). La diminution de la clairance microbienne des muqueuses résultant d'une diminution de l'expression des défensines pourrait tenir compte des changements dans la flore intra-luminale, ce qui génère une vulnérabilité tout au long de la barrière épithéliale à l'infection par des agents pathogènes tels que *E. Coli* adhérent-invasif et *Mycobacterium paratuberculosis* (Peyrin-Biroulet *et al.* 2006). Cependant, des données plus récentes ont montré que la diminution de l'expression des α -défensines est indépendante de NOD2 et reflète une perte de cellules épithéliales de surface et une réduction du nombre de cellules Paneth secondaire à l'inflammation, et non un mécanisme pathogène primaire.

Dans le gène *ATG16L1*, un SNP (Ala281Thr) est très significativement associé à la maladie de Crohn (Hamper *et al.* 2007). *ATG16L1* est membre d'une famille de gènes impliqués dans l'autophagie. Une mutation de *ATG16L1* aurait pour conséquence de la réduction de la clairance des agents pathogènes. Il a été rapporté que l'expression de *ATG16L1* par les cellules épithéliales intestinales est essentielle à l'efficacité de l'autophagie de *S. Typhimurium* (Rioux *et al.* 2007). Une observation intéressante a été celle de l'association de variants génétiques dans le gène *IRGM* avec la maladie de Crohn (Parkes *et al.* 2007). Des expériences de knockdown d' *IRGM* ont permis de montrer son rôle dans l'autophagie, et donc le contrôle de la charge en mycobactéries intracellulaires (Singh *et al.* 2006). Une étude récente a montré l'induction de l'autophagie par un mutant *LRRK2* (leucine-rich repeat kinase 2), qui est fortement associé aux associations à la maladie de Crohn et aux gènes d' autophagie *ATG16L1* et *IRGM2-5* (Plowey *et al.* 2008). Dans l'ensemble, les associations de SNPs dans *NOD2*, *ATG16L1*, *IRGM* et *LRRK2* avec la maladie de Crohn, mais pas avec la RCH, indiquent que les modifications du devenir intracellulaire des bactéries constituent un élément central de la pathogenèse de la maladie de Crohn.

Plus récemment un nouveau gène *IL23R* associé aux MICI a été mis en évidence (Duerr *et al.* 2006) en analysant plus de 300 000 polymorphismes génétiques dans une population d'Amérique du Nord et ont identifié le gène codant pour *IL23R*, le récepteur de l'IL-23, comme étant associé à un moindre risque de MC et de RCH. IL-23 est composé des sous-unités p19 (IL23A, chromosome 12q13) et p40 (IL12B, chromosome 5q33). Le blocage par des anticorps spécifiques de p40 inhibe les voies de signalisation liées à IL-23 et IL-12, alors que des anticorps spécifiques de p19 seulement inhibent seulement les voies liées à l'IL-23. Suite à l'engagement de l'IL-23R par IL-23, Janus kinase 2 (JAK2) est activé, ce qui conduit à l'autophosphorylation de JAK2 et la phosphorylation de l'IL-23R. Cela se traduit par l'homodimérisation et la translocation nucléaire de STAT3. STAT3 joue un rôle central dans la différenciation des cellules Th17 (Parham *et al.* 2002). Dans une méta-analyse des GWA (études d'association pangénomique) sur des cohortes européennes et nord-américaines, il a été montré une association de plus de 30 régions génomiques avec la maladie de Crohn (Barrett *et al.* 2008). Sur les trente régions, quatre (*IL23R*, *IL12B*, *STAT3* et *JAK2*) ont un rôle dans la signalisation IL-23R. De plus, d'importantes associations de *IL23R*,

IL12B et *STAT3* ont récemment été signalés dans la RCH (Fisher *et al.* 2008, Franke *et al.* 2008).

L'IL23 régule l'expression de l'IL17. L'IL17 stimule la sécrétion de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires par des fibroblastes, les cellules endothéliales, les macrophages et les cellules épithéliales (Fossiez *et al.* 1998) et la production locale de IL17 va aboutir à l'activation des cellules inflammatoires (Yen *et al.* 2006). L'IL 23 peut contribuer à maintenir une inflammation chronique pathologique (Yen *et al.* 2006).

Les gènes du *HLA* sont situés dans la région MICI3, qui est la région la plus étudiée. Le *HLA* joue un rôle important dans l'immunité adaptative. Le lymphocyte T ne reconnaît que l'antigène associé aux produits du gène *HLA*. *ECM1* est un gène candidat plausible pour la RCH: il code pour la protéine 1, une glycoprotéine exprimée dans le petit et le gros intestin, et il interagit avec la membrane basale et inhibe la matrix metalloproteinase 9 (Chan *et al.* 2007). *ECM1* active fortement la voie de signalisation NF- κ B. Récemment, une forte association entre le locus *ECM1* et la RCH ont été identifiés (Fisher *et al.* 2008).

La recherche de gènes de prédisposition aux MICI est loin d'être achevée et il est probable que dans les toutes prochaines années, d'autres associations seront décrites.

Chromosome	Location (Mb)	Genes of Interest	Associated with Crohn's disease	Associated with ulcerative colitis
1p31	67	<i>IL23R</i>	Yes	Yes
2q37	231	<i>ATG16L1</i>	Yes	No
3p21	49	Multiple, including <i>MST1</i>	Yes	Yes
5p13	40	Intergenic, <i>PTGER4</i>	Yes	No
5q31	131	Multiple, including <i>SLC22A5</i>	Yes	Unclear
5q33	150	Multiple, including <i>IRGM</i>	Yes	No
5q33	158	<i>IL12B</i> (p40)	Yes	Yes
10q21	64	<i>ZNF365</i>	Yes	Unclear
10q24	101	<i>NKX2-3</i>	Yes	Yes
16q12	49	<i>NOD2</i>	Yes	No
17q21	37	Multiple, including <i>STAT3</i>	Yes	Yes
18p11	12	<i>PTPN2</i>	Yes	Unclear

ATG16L1, autophagy related 16-like protein 1; *IL12B*, interleukin-12 β ; *IL23R*, interleukin-23 receptor; *IRGM*, immunity-related GTPase family, M; *NKX2-3*, NK2 transcription factor related, locus 3; *NOD2*, nucleotide-binding oligomerization domain protein 2; *PTGER4*, prostaglandin receptor, EP4; *PTPN2*, protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2; *SLC22A5*, solute carrier family 22, member 5; *STAT3*, signal transducer and activator of transcription 3; *ZNF365*, zinc-finger protein 365.

Figure 9: Des gènes de susceptibilité des MIC (D'après Cho *et al.* 2008)

2.2 Les facteurs environnementaux

L'augmentation du risque de MICI pour les Asiatiques migrant en Europe et inversement la diminution du risque chez les Européens migrant dans ce pays sont en faveur de l'existence de facteurs environnementaux impliqués dans la pathogénie des MICI (Yang *et al.* 2001). L'absence de concordance totale chez les jumeaux monozygotes (Halfvarson *et al.* 2003), l'agrégation familiale dans les MICI (Hugot *et al.* 2003) sont autant d'éléments en faveur de l'intervention de facteurs d'environnement comme les microbes dans la genèse des MICI (Baumgart *et al.* 2007).

Deux facteurs d'environnement ont un rôle établi: le tabac et l'appendicectomie. De nombreux autres facteurs d'environnement font l'objet de recherches actives. Il s'agit d'agents infectieux, alimentaires, du stress et de facteurs socio-économiques.

La consommation de tabac a un effet « bénéfique » bien établi sur l'évolution de la RCH (Lindberg *et al.* 1992, Russel *et al.* 1998). Plusieurs études concordantes ont démontré qu'un antécédent d'appendicectomie avait un effet "protecteur" vis-à-vis de la RCH en réduisant le risque d'environ 70%. Cet effet "protecteur" ne s'observe que chez les malades opérés avant l'âge de 20 ans pour une authentique appendicite. (Andersson *et al.* 2001). L'effet bénéfique de l'appendicectomie sur le cours évolutif d'une RCH déjà diagnostiquée n'est pas démontré, mais des observations suggèrent qu'une appendicectomie pourrait permettre d'obtenir une amélioration de l'évolution dans les formes sévères de RCH résistantes au traitement médical (Okazaki *et al.* 2000). Par contre, la réalisation d'une appendicectomie est associée à un risque de MC (Russel *et al.* 1997).

Plusieurs agents infectieux ont été incriminés dans la genèse des MICI : le virus de la rougeole, le CMV, *listeria monocytogenes*, *chlamydia trachomatis*, *Escherichia. Coli*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Saccharomyces cerevisiae*. Mais le rôle de *Mycobacterium paratuberculosis* et des autres agents pathogènes reste très discuté.

Les aliments ont également été proposés comme potentiellement impliqués dans la pathogénie des MICI. Il a été rapporté que les légumes, les fruits, le poisson, les fibres et les acide gras ω -3 à longue chaîne protègent contre la MC (Amre *et al.* 2007). Les acides gras

saturés augmentent l'activation de NF- κ B par Toll-like receptor (TLR), et cette activation est inhibée par acide gras ω -3 (Lee *et al.* 2004). Les ω -3 acides gras poly-insaturés produisent les médiateurs anti-inflammatoires comme LTB-5 et Prostaglandine 3 (Plat *et al.* 2005). Ces pistes n'ont pour l'instant pas été confirmées.

L'hypothèse de l'hygiène permet d'intégrer les facteurs d'environnement aux données connues de la physiopathologie des MICI. Une amélioration des conditions d'hygiène, notamment au cours de l'enfance, est souvent mise pour expliquer l'augmentation de l'incidence des MICI dans les pays en voie de développement et l'augmentation de l'incidence des MICI depuis la dernière guerre (Klement *et al.* 2008).

2.3 Les facteurs immunitaires

Le système immunitaire inné représente une défense non spécifique contre les pathogènes. L'implication d'un déficit immunitaire inné au cours de la MC a été soulignée par l'identification de NOD2 et TLR comme des gènes de susceptibilité de la MC (Lesage *et al.* 2002, Rosenstiel *et al.* 2003, Franchimont *et al.* 2004, Pierik *et al.* 2006, Torok *et al.* 2004). Jusqu'à présent, plus de 11 TLRs, 23 NODs, quelques C-type lectin-like molecules et β -glucan receptors ont été identifiés. Plus récemment, il a été montré que NOD2 régule l'expression de certains peptides antimicrobiens dont font partie les défensines et dont l'expression est diminuée au cours de la MC, ce qui contribuerait au défaut d'élimination des microbes (Wehkamp *et al.* 2005).

Ces anomalies du système immunitaire inné sont associées à une rupture de tolérance et donc à une inflammation intestinale qui va entraîner une activation excessive du système adaptatif qui va être responsable des lésions intestinales. 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 G et A, différentes sous-populations de lymphocytes T de phénotype Th1, Th2 ou Th17, et les lymphocytes T/B régulateurs (Xavier *et al.* 2007). Classiquement, la MC est considérée comme étant de phénotype Th1, et La RCH comme étant de phénotype Th2.

Récemment, des études suggèrent un chevauchement plus complexe et plus significatif entre RCH et MC, les deux formes principales de MICI. Une nouvelle lignée de lymphocytes T CD4 au phénotype Th17 a été mise en évidence et impliquée dans la pathogénie des MICI. La population de Th17 est développée par IL23 et est inhibée par des facteurs des transcriptions qui sont nécessaires à Th1 et Th2 (Kastelein et al 2007, Weaver *et al.* 2007). Enfin, 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.

3. Les traitements

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. Les progrès dans la connaissance de l'immunopathogénie des MICI ont ouvert une nouvelle gamme de traitements ciblés. Dans le cadre "normal" des situations, la muqueuse intestinale est dans un état de «contrôle» réglementé par un équilibre délicat entre cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 et IL-12) et anti - inflammatoires (IL-4, IL-10, IL-11 et IL-13). Les thérapies ciblées en s'opposant aux cytokines pro-inflammatoires et à leurs récepteurs, permettent en théorie de rétablir "l'équilibre" entre pro-et anti-cytokines inflammatoires, l'inhibition de la différenciation T helper (Th) 1 et la persistance de l'activation des lymphocytes T.

Infliximab est le seul agent approuvé par la US Food and Drug Administration (FDA) pour l'induction et le maintien de la rémission clinique chez les patients porteurs de Crohn modéré à sévère, et qui ont une réponse inadéquate au traitement conventionnel (Sandborn *et al.* 2002). D'autres anti-TNF sont apparus, y compris CDP571, CDP870, etanercept, onercept et adalimumab. Lymphocyte-endothelial interactions médiées par des molécules d'adhésion

jouent un rôle important dans la migration des leucocytes et de recrutement à des sites de l'inflammation, et de blocage sélectif de ces molécules d'adhésion est une nouvelle et prometteuse pour traiter le Crohn. D'autres agents sont à l'étude, inhibiteurs de la différenciation Th1 (anti-IL-12, anti-IL-18, anti-interféron- γ), inhibiteurs de l'activation des lymphocytes T (CD40 ligand), thérapie anti-CD4 (cM -T412, MAX.16H5, F-5), hormone de croissance, thérapie immunostimulation (filgrastim, sargramostim), et immunomodulateurs (interférons). Les agents utilisés pour le traitement de la colite ulcéreuse incluent un grand nombre de ceux mentionnés ci-dessus, ainsi que le daclizumab et le basiliximab (anticorps anti-IL-2 receptor), visilizumab (un anticorps humanisé dirigé à l'invariant de la chaîne CD3 T cell receptor), repifermin (un facteur de croissance des kératinocytes) et le facteur de croissance épidermique (Peyrin-Biroulet *et al.* 2008).

III. MICI et l'homocystéine

1. Implication de l'homocystéine dans la pathogénie des MICI

1.1 Stress oxydant

L'homocystéine provoque une production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et par conséquent un stress oxydant. 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 (McKenzie *et al.* 1996, Kruidenier *et al.* 2003).

De plus, l'homocystéine sensibilise les cellules au stress oxydant en diminuant l'expression de nombreuses enzymes anti-oxydantes dont la glutathion peroxydase (GPX) et l'hème oxygénase-1 (HO-1) (Outinen *et al.* 1999, Upchurch *et al.* 1997). Une diminution du pouvoir anti-oxydant a ainsi été rapportée chez les sujets atteints de MICI (Koutroubakis *et al.* 2004, Dincer *et al.* 2007).

1.2 Inflammation

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 *Necrosis Factor kappa B* (NF- κ B). Par ailleurs, l'homocystéine est capable de moduler la réponse inflammatoire en régulant la synthèse de molécules d'adhésion comme VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) et PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*) (Wang *et al.* 2002). l'expression de ces 3 molécules étant augmentée chez les patients atteints de MICI (Jones *et al.* 1995). L'homocystéine pourrait également provoquer des lésions de la muqueuse intestinale par un effet cytotoxique médié par le tumor necrosis factor- α (TNF- α). En effet, l'homocystéine induirait une mort cellulaire en augmentant la capacité du TNF- α à détruire les potentiels membranaires mitochondriaux (Ratter *et al.* 1999). L'Hcy induit ainsi une inflammation sur l'endothélium microvasculaire d'intestin humain en stimulant l'expression de VCAM-1, MCP-1 et la phosphorylation de p38 (Danese *et al.* 2005).

Au total, les lésions induites par l'homocystéine via une augmentation 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.

1.3 Stress du Réticulum Endoplasmique

Récemment, Danese *et al.* (2006) ont montré que la néoangiogénèse était un phénomène impliqué dans la pathogénie des MICI. En effet, le taux de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) est significativement élevé dans des prélèvements de muqueuse intestinale de patients atteints de maladie de Maladies de Crohn (MC) ou de rectocolite hémorragique (Danese *et al.* 2006). Etant donné qu'*in vitro*, on observe une surexpression du VEGF et de la GRP78 (*glucose regulated protein-78*) après stimulation des cellules par l'homocystéine, un lien entre stress du

RE (réticulum endoplasmique), VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et homocystéine est possible au cours des MICI (Roybal *et al.* 2004).

1.4 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 gènes (Peyrin-Biroulet *et al.* 2004).

L'homocystéine influence le niveau de méthylation de l'ADN car : 1) 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 cent réactions de méthylations dans notre organisme ; 2) SAH, est un puissant inhibiteur des enzymes responsables de la méthylation de l'ADN, les méthyltransférases ; 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'ADN associée à une hyperméthylation spécifique de gènes suppresseurs de tumeurs est un trait caractéristique des cellules tumorales, comme cela été rapporté une hyperméthylation spécifique des promoteurs des gènes *p16* et *hMLH1* (*human mutL homologue 1*) dans les tumeurs colorectales (Peyrin-Biroulet *et al.* 2004). 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 RCH (Gloria *et al.* 1996). Ces 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'oestrogène a été proposée comme un marqueur du risque de néoplasie colorectale dans la RCH (Fujii *et al.* 2005), soulignant l'implication possible d'anomalies épigénétiques dans la carcinogénèse colorectale au cours des MICI.

2. Les études cliniques d'association de l'homocystéine avec les MICI

Une hyperhomocystéinémie modérée est fréquente chez les sujets atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Etant donné qu'une hyperhomocystéinémie est un facteur de risque 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. D'après des données récentes de la littérature, l'homocystéine pourrait promouvoir une inflammation muqueuse chronique par le biais d'un stress oxydant (Robert *et al.* 2005), d'un stress du réticulum endoplasmique (RE), et d'une activation de facteurs pro-inflammatoires (Danese *et al.* 2005). Les anomalies épigénétiques (méthylation de l'AND) 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. Dans une étude récente, le niveau d'homocystéine plasmatique est corrélé à l'activité, au nombre de poussées et à la sévérité et à la durée de la RCH (Drzewoski *et al.* 2006). L'ensemble de ces éléments pourrait permettre une meilleure compréhension de la physiopathologie des MICI.

2.1 Prévalence de l'hyperhomocystéinémie au cours des MICI

En 2001, Papa *et al.* (2001) rapportaient une hyperhomocystéinémie chez 26,5% des patients atteints de MICI contre 3,3% chez les sujets sains. Zazos *et al.* (2005) ont trouvé le même résultat. Depuis 1998, onze autres études ont étudié la concentration de l'homocystéine plasmatique chez les patients atteints de MC ou de RCH. Parmi eux, dix études ont retrouvé que le taux de l'homocystéine est plus élevé chez les patients atteints de MICI que chez les sujets sains (figure 10). Deux études ont également étudié la concentration de l'homocystéine sur des prélèvements de muqueuse colique chez des sujets atteints de MICI : les taux intra-muqueux s'avèrent nettement plus élevés que chez les sujets sains (Morgenstern *et al.* 2003, Danese *et al.* 2005), ce qui souligne l'implication possible de l'hyperhomocystéinémie dans la pathogénie des MICI.

Reference	Case Number (UC/CD)	Homocysteine ($\mu\text{mol/L}$, Mean $\pm$ SD or Median [Range])		P Value
		IBD Patients	Controls	
(45)	61 (29/32)	12.2 $\pm$ 7.7	10.5 $\pm$ 4.6	0.045
(47)	68 (37/31)	13.2 $\pm$ 7.8	7.4 $\pm$ 2.8	<0.01
(48)	171 (0/171)	14.8 (4.1–51)	4.4–12.4	ND
(49)	65 (9/56)	8.7 $\pm$ 1	6.6 $\pm$ 0.4	<0.05
(50)	108 (53/55)	15.9 $\pm$ 10.3 (UC) and 13.6 $\pm$ 6.5 (CD)	9.6 $\pm$ 3.4	<0.05
(54)	231 (89/142)	12.3 (4.6–51.3)	11.1 (3.9–27.6)	0.001
(51)	105 (0/105)	10.9 $\pm$ 5.1	7.5 $\pm$ 1.5	0.0001
(52)	21 (0/21)	13.24 $\pm$ 5.53	10.2 $\pm$ 3.6	<0.01
(53)	106 (52/54)	10.7 (not reported)	ND	ND
(46)	64 (39/25)	11.7 $\pm$ 5.7	7.8 $\pm$ 2.5	0.001
(5)	174 (91/83)	10.85 (3.25–39.24)	8.99 (4.13–16.16)	0.0001

UC = ulcerative colitis; CD = Crohn's disease; ND = not determined.

Figure 10. Le niveau de l'homocystéinémie chez les sujets atteints de MICI et les sujets sains
(D'après Peyrin-Biroulet *et al.* 2007)

2.2 L'hyperhomocystéinémie et thromboses au cours des MICI

L'homocystéine pourrait favoriser le développement de thromboses par des mécanismes différents: l'inhibition de molécules anticoagulantes (*Heparin-like glycosaminoglycan*, antithrombine III, protéine C réactive, thrombomoduline) ou une diminution de la fibrinolyse (Perta-Kaján *et al.* 2007).

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 (Warren *et al.* 1949, Bargen *et al.* 1936, Edwards *et al.* 1964), mais pouvant atteindre 39% dans des séries autopsiques (Graef *et al.* 1966). Il faut noter que les complications thromboemboliques observées au cours des MICI sont principalement des thromboses veineuses profondes et des embolies pulmonaires.

Slot *et al.* (1995) rapportent le cas d'un patient ayant une Maladie de Crohn, atteinte de thromboses étendues après l'accouchement avec ischémie du territoire médullaire et symptômes neurologiques graves. L'HHcy provoquée par le déficit en folate est la cause principale des thromboses. Récemment, une augmentation du risque d'athérosclérose a été rapportée chez les patients souffrants 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 MICI (Papa *et al.* 2006). Cependant, dans une étude précédente, Papa *et al.* (2001) n'ont pas trouvé 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.* (2000) ont confirmé cette absence d'association dans une autre série indépendante.

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 MICI. Dans cette étude, Guedon *et al.* (2001) n'ont pas trouvé la différence significative de prévalences du variant 677TT entre quatre populations: un groupe de patients atteints de MICI avec ou sans les complications thrombotiques, un groupe de témoins indemnes de MICI, avec ou sans les complications thrombotiques. Les thromboses ont probablement une origine multifactorielle chez les patients ayant des MICI (Danese *et al.* 2007). Cattaneo *et al.* (1997) ont démontré que le risque de thromboses peut être augmenté uniquement si le génotype homozygote 677TT est associé à l'autres anomalies de la coagulation comme une mutation du facteur V de Leyden.

2.3 Association des déterminants de l'homocystéine avec les MICI

2.3.1 Déterminants nutritionnels

Les patients atteints des MICI prédisposent aux carences nutritionnelles qui peuvent être causées par: 1) Réduction des apports alimentaires secondaire à l'anorexie, aux nausées et aux douleurs abdominales liées à la maladie ; 2) La malabsorption secondaire aux résections de l'iléum (Vasilopoulos *et al.* 2001) ou aux lésions causées par l'inflammation muqueuse chronique ; 3) Entéropathie exsudative ; 4) Hypermétabolisme secondaire au processus inflammatoire, aux complications infectieuses ou encore au stress chirurgical et aux

complications postopératoires ; 5) L'inhibition d'absorption des folates à cause de la prise d'aminosalicylés (Halsted *et al.* 1981).

Plusieurs études ont exploré l'influence des déterminants nutritionnels de l'hyperhomocystéinémie chez les patients atteints de MICI. Globalement, une carence en folates est la principale cause des hyperhomocystéinémies constatées chez les patients atteints de MICI (Mahmud *et al.* 1999, Romagnuolo *et al.* 2001, Koutroubakis *et al.* 2000, Chowers *et al.* 2000, Zegos *et al.* 2005, Oldenburg *et al.* 2000, Fernandez-Miranda *et al.* 2005). C'est ainsi que certains auteurs ont trouvé que le taux de folates est le seul facteur indépendant significativement associé à une hyperhomocystéinémie (Papa *et al.* 2001).

Le lien entre vitamine B12 et homocystéinémie semble moins évident au cours des MICI. Des travaux ont mis en évidence la corrélation entre la carence en vitamine B12 et les hyperhomocystéinémies (Mahmood *et al.* 2005, Romagnuolo *et al.* 2001, Chowers *et al.* 2000, Peyrin-Biroulet *et al.* 2007, Zegos *et al.* 2005, Oldenburg *et al.* 2000, Papa *et al.* 2002). Ces résultats n'ont pas été confirmés par des autres auteurs, qui montre malgré une baisse des taux de vitamine B12 chez les patients atteints des MICI (Mahmud *et al.* 1999, Koutroubakis *et al.* 2000).

Par apport aux folates et à la vitamine B12, l'influence du taux de vitamine B6 et vitamine B2 sur celui de l'homocystéine dans les MICI serait nulle. A notre connaissance, il n'y a qu'Oldenbrug *et al.* (2000) qui ont montré une association significative entre le taux de vitamine B6 et le taux de l'homocystéine. Dans une autre étude, l'hyperhomocystéinémie a été trouvée plus fréquemment chez les patients atteints de MICI, mais aucune association significative n'a été observée entre le taux de vitamine B6 et le taux de homocystéine (Saibeni *et al.* 2003).

2.3.2 Déterminants génétiques

Les données disponibles concernant la prévalence du variant de la *MTHFR* restent discordantes. Deux études réalisées en Europe du Nord montrent une augmentation significative de la fréquence du génotype homozygote *MTHFR 677TT*. Muhmud *et al.* (1999)

ont été les premiers à retrouver une prévalence accrue de l'hyperhomocystéinémie et du variant *MTHFR 677T* dans une série de patients irlandais atteints de MICI: les auteurs montrent que 17,2% de patients atteints de MICI présentant ce génotype contre 7,3% de sujets témoins ($P=0.01$). Une étude Danoise a confirmé ces résultats, avec 15,1% de patients atteints de MICI présentant une homozygotie *677TT* contre 8,3% dans la population générale ($P<0.01$) (Bjerregaard *et al.* 2002). Cinq études réalisées en Europe de sud (deux en Italie, une en France, une en Espagne, et une au Portugal) et une série chinoise ne retrouvaient pas de différence significative pour ce variant (Cattaneo *et al.* 1998, Guedon *et al.* 2001, Vecchi *et al.* 2000, Chen *et al.* 2005 et 2008, Magro *et al.* 2003).

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.

Nous avons étudié un autre variant de la *MTHFR*, le génotype *A1298C*. Dans cette étude réalisée en Chine centrale sur 168 patients porteur d'une RCH, il n'existait pas d'association significative entre le variant *A1298C* et le risque d'être atteint d'une RCH. nous avons retrouvé un risque de RCH pancolique chez les sujets porteurs des génotypes *677TT* et *C677T/A1298C* ($OR=3,3$, 95% C.I.=1,4-7,9, $P=0,0084$) (Chen *et al.* 2008).

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 la *CBS* (864ins68) aux MICI (Papa *et al.* 2001). Les conclusion sont que la prévalence de la mutation hétérozygote de *CBS* était identique chez les patients atteints de MICI et chez les sujets sains.

Cependant, nous avons montré que le variant *A66G* de la *MTRR* est plus fréquent chez les patients français atteints de MICI que chez le sujet contrôles ($OR=4,0$, 95% C.I.=1,7-9,2) (Peyrin-Biroulet *et al.* 2006). De plus, nous avons retrouvé très récemment une association entre le variant *A2756G* de la *MTR* et le risque de développer une RCH dans notre série de patients chinois (Chen *et al.* 2008).

2.3.3 Pharmacogénétique

Parmi les traitements incriminés, les aminosalicylés ont longtemps été considérés comme une cause potentielle d'hyperhomocystéinémie dans les MICI: on pensait en effet que l'absorption des folates était inhibée par la sulfasalazine (Halsted *et al.* 1981). Cependant, aucune association n'a été observée entre l'utilisation des aminosalicylés et le taux d'homocystéine plasmatique dans les études les plus récentes (Mahmud *et al.* 1999, Papa *et al.* 2001, Koutroubakis *et al.* 2000).

Les effets du méthotrexate, un antagoniste de l'acide folique, sur l'homocystéinémie n'avaient jamais été évalués dans les MICI, alors que cette molécule est une cause reconnue d'hyperhomocystéinémie chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Van Ede *et al.* 2002). Nous avons démontré que le traitement par méthotrexate ne semble pas influencer le taux d'homocystéine au cours des MICI (Peyrin-Biroulet *et al.* 2006). Par ailleurs, les polymorphismes du gène *MTHFR* ne semblent pas influencer l'efficacité du méthotrexate. 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* (Herrlinger *et al.* 2005).

Objectifs de la thèse

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

Partie I: Etude de populations.

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 est 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'homocystéinémie. Cependant, le faible nombre de malades inclus (n=64) ne permettait de tirer aucune conclusion. Nous avons donc étudié l'association des polymorphismes *MTRR A66G*, *MTHFR C677T* et *A1298C*, *MTR A2756G*, *TCN C776G* avec le niveau de l'homocystéine dans une cohorte de patients français avec Maladie de Crohn.

2. Les déterminants génétiques du métabolisme de l'homocystéine sont-ils associés au phénotype et au risque de MICI ?

Partie I : Etude de populations.

Globalement, les facteurs génétiques potentiellement impliqués dans la pathogénie de la RCH restent moins bien connus que ceux de la MC. De plus il existe une situation symétrique entre la Chine et la France pour la prévalence respective de la MC et de la RCH. Nous avons donc étudié et comparé l'association des polymorphismes *MTRR A66G*, *MTHFR C677T* et *A1298C*, *MTR A2756G*, *TCN C776G* avec le phénotype et le risque de RCH et de MC dans deux cohortes de patients respectivement de la Chine centrale (prédominance des cas de RCH) et de France (prédominance des cas de MC).

3. Quelles sont les conséquences d'une carence en groupements méthyles sur le stress oxydant, l'apoptose et l'inflammation de la muqueuse colique exposée à un facteur déclenchant? Partie II : Etude expérimentale de MICI produite par DSS chez le raton carencé en donneurs de groupements méthyles.

Une hyperhomocystéinémie modérée est fréquente chez les sujets atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Deux études ont montré que la concentration en homocystéine est plus élevée sur des prélèvements de muqueuse colique chez les sujets atteints de MICI que chez les sujets sains. D'après des données de la littérature, l'homocystéine pourrait promouvoir une inflammation muqueuse chronique par le biais d'un stress oxydant, de l'induction de l'apoptose, et d'une activation de facteurs pro-inflammatoires. C'est ainsi que dans une étude récente, le niveau d'homocystéine plasmatique a été corrélé au nombre de poussées, à la sévérité et à la durée de la maladie, ce qui souligne l'implication possible de l'hyperhomocystéinémie dans la pathogénie des MICI.

Nous avons évalué l'influence des donneurs de méthyle de l'homocystéine dans la physiopathologie des MICI chez le raton carencé en groupements méthyles.

Partie I Etude de populations

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'Hépto-Gastroentérologie (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 (Satsangi *et al.* 2006). 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 Reseach 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 (Satsangi *et al.* 2006). Ces 168 patients 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 évoquant 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. 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 a 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

Ajouter 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

Ajouter au culot 2 mL du réactif B

Vortexer jusqu'à dissocier le culot

Rajouter 500 µL de perchlorate¹

Agiter par retournement 7 fois

Élimination des Protéines

Rajouter 2 mL de chloroforme³

Agiter par retournement 7 fois

Rajouter 250 µL de résine¹

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 Tris¹

Agiter

¹ Kit Nucleon Bac0 3®. Ref .RPN8512 Amersham-Pharmacia-Biotch. Parc technologique, rue René Razel 91898 Orsay Cedex France

² Eppendorf

³ Sigma Ref C-2432

⁴. RP Normapur™ Prolabo Ref 20821321

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

Amorces ¹**MTHFR 677**

Sens = 5' TGGCAGGTTACCCCAAAGG 3'

Tm = 60°C Tm=59°C

Antisens = 5' TGATGCCCATGTCGGTGC 3'

Tm = 58°C

MTHFR 1298

Sens = 5' CTTTGGGAGCTGAAGGACTACTAC 3'

Tm = 74°C Tm=71°C

Antisens = 5' CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG 3'

Tm = 68°C

Sondes fluorescentes ²**MTHFR 677**

Probe Flu 5' TGAGGCTGACCTGAAGCACTTGAAGGAGAAGGTGTCT 3'

Tm = 112°C Tm=85°C

Probe Red 5' CGGGAGCCGATTTCATCAT 3'

Tm = 58°C

MTHFR 1298

Probe Flu 5' AAGGAGGAGCTGCTGAAGATGTGGGGGAGGAGCT 3'

Tm = 112°C Tm=88°C

Probe Red 5' ACCAGTGAAGAAAGTGTCTTTGA 3'

Tm = 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			
<i>MTHFR C677T</i>	homozygote sauvage	CC	63°C
	homozygote muté	TT	55°C
	hétérozygote	CT	55°C+64°C
Lecture en F3			
<i>MTHFR A1298C</i>	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.

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'TCATATTCTTCCATGATTTCTCAAAGTATTCATCCT3'

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 µl 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

Technique mise au point au laboratoire

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 ⁷Migration 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 et al., 1998)

Résultats et Publications

1. Déterminants génétiques et nutritionnels du métabolisme des donneurs de méthyle et de l'hyperhomocystéinémie dans la cohorte de MICI de l'Est de la France.

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 , $P=0,0036$.

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 ($P=0,0505$) (*Am J Gastroenterol.* Tableau 1). 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'homocystéinémie. 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 (*Am J Gastroenterol.* Tableau 1). Le taux de t-Hcy plasmatique était plus élevé chez les sujets MC porteurs du génotype *MTR 2756AA*, mais la différence n'était pas statistiquement significative ($P=0,0910$).

Les taux de vitamine B12 et de folates étaient corrélés de manière significative à celui de l'homocystéine plasmatique en analyse univariée (*Am J Gastroenterol.* Figure2). 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 $> 15 \mu\text{mol/L}$ (*Am J Gastroenterol.* Tableau 2).

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 (*Am J Gastroenterol.* Tableau 3). 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 ($P = 0,0009$) (*Am J Gastroenterol.* Tableau 3).

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) (*Am J Gastroenterol.* Tableau 4).

2. Association du métabolisme des donneurs de méthyles et de la SOD dans la maladie de Crohn : étude de la cohorte de l'Est de la France.

Nous avons étudié l'association des polymorphismes des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine avec le stress oxydant et l'activité de la maladie. Dans cette étude, le stress oxydant était mesuré par l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et l'activité de la maladie par CDAI (*Clinical 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* (*Am J Gastroenterol.* Figure3), 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* ($P=0,0124$) (*Am J Gastroenterol.* Figure3), mais pas chez ceux avec un génotype *AG* ou *GG*.

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. Il existait une corrélation inverse statistiquement significative ($P=0,0276$) 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 ($P < 0,0001$) (*Am J Gastroenterol.* Figure 3). 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.

3. Les déterminants génétiques du métabolisme des moniocarbones : association au risque de rectocolite hémorragique en Chine Centrale.

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. Dans une première étude réalisée sur 72 patients porteurs d'une RCH, nous avons montré qu'il existe 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, $p=0,017$) (*Gut* Tableau1). Nous avons ensuite étudié la relation entre les polymorphismes génétiques et

les caractéristiques cliniques des 168 patients chinois avec une 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. En revanche, les génotypes *MTR2756 AG/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 %, $P=0,0137$). 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) (*BMC medical genetics*. Tableau2)

Nous avons ensuite étudié l'association à l'âge de survenue et à la sévérité de la maladie. 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 %, $P=0,0123$) (*BMC medical genetics*. Tableau 2). En prenant en compte les génotypes *MTHFR 677TT* et *MTHFR 1298AC* non plus de manière isolée mais de façon combinée (génotype *MTHFR 677TT* et hétérozygotes composites *MTHFR 677CT/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 $P=0,073$) et *MTHFR1298AC* (odds ratio=3,09 et $P=0,0386$).

Table 1 Clinical characteristics and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and transcobalamin (TCN) polymorphisms in 72 patients with ulcerative colitis (UC) and 111 controls from central China

	Ulcerative colitis	Controls	p Value
n	72	111	
Sex (F/M)	35/37	58/60	0.9423
Age (y) (mean (SD))	41 (15)	40 (13)	0.4809
Age of onset (y) (mean (SD))	38 (14)		
Current smoker (n (%))	1 (1.4)		
Extent of UC (n (%))			
Rectum	40 (55.6)		
Left colitis	15 (20.8)		
Right colon	1 (1.4)		
Total colon	17 (23.6)		
Treatment (n (%))			
5-ASA/SASP	53 (73.6)		
Steroids	15 (20.8)		
Antibiotics	13 (18.1)		
Intestinal resections (n (%))	1 (1.4)		
Genetic polymorphisms (n (%)) [95% CI]			
MTHFR 667T allele	40 (34.7) [27.3–42.7]	91 (41.0) [34.7–47.5]	0.2286
MTHFR 677T	10 (13.9) [7.2–23.0]	21 (18.9) [12.4–26.8]	0.3707
MTHFR 1298C allele	18 (14.1) [8.8–20.7]	41 (18.5) [13.7–23.9]	0.2889
MTHFR 677CT+1298AC	4 (6.2) [2.0–14.0]	17 (15.3) [9.5–22.7]	0.0755
MTHFR 677T/CT+1298AC	14 (21.2) [12.6–32.0]	38 (34.2) [25.9–43.3]	0.0659
TCN 776G allele	62 (63.3) [53.6–72.3]	138 (60.0) [53.6–66.2]	0.5709
TCN 776CG+GG	42 (85.7) [74.3–93.6]	89 (77.4) [69.3–84.3]	0.2236
Total colon	7 (43.7) [22.6–66.6]	Less extended UC	
MTHFR 677T/CT+1298AC		7 (14.0) [6.3–25.2]	0.0162

Genotypes 677 TT and 677CT+1298AC of methylenetetrahydrofolate reductase are associated with the severity of ulcerative colitis in central China

Increased blood levels of homocysteine have been found to be associated with inflammatory bowel disease (IBD) in several studies.^{1,2} The main genetic determinant associated with elevated plasma levels of homocysteine (t-Hcy) is the MTHFR 677C→T gene polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase, a critical enzyme involved in the remethylation pathway of homocysteine.³ An association of the MTHFR 677T allele with IBD has been reported in Northern Europe⁴ but not in three other series from Italy and France.^{1,2} Double heterozygosity MTHFR 677CT+1298AC also produces reduced enzyme activity and increased t-Hcy, but its association with IBD has never been studied. Similarly, the association of IBD with transcobalamin (TCN) 776 C→G, a genetic determinant that influences transcobalamin levels and t-Hcy, is not known. Transcobalamin is the protein that promotes intestinal transcytosis and cell delivery of vitamin B12, the cofactor of the methionine synthase dependent remethylation pathway.⁵

In this study, we have evaluated the association of ulcerative colitis (UC) with MTHFR 677C→T, MTHFR 1298A→C, and TCN 776 C→G in a series of 72 patients from central China who gave informed consent. This series was compared with 111 age and sex matched controls. The research protocol was approved by the local appointed committee. Extraction of DNA and determination of polymorphisms were performed as described

previously by us.^{6,7} A continuity corrected χ^2 test and an ANOVA test were used, respectively, to assess differences in categorical and continuous variables between groups. Odds ratios of independent categorical variables that differed significantly between patients and controls were determined by logistic regression analysis. A p value <0.05 was considered to indicate statistical significance.

The main clinical characteristics are summarised in table 1. Most of the cases were recently diagnosed. None had any thrombotic manifestations. TCN 776 G allele frequency was approximately 1.5-fold higher compared with Caucasians, and we failed to find any association with the risk of UC or severity of disease. MTHFR 677T allele frequency in our control group was close to that reported in South Europe and much higher than that of North Europe. There was no significant association of the MTHFR 677 TT or 677T allele with the risk of UC. By comparison, this association was significant in two UC series of 52 and 91 cases, respectively, from the UK and Denmark, two countries with a lower MTHFR 677T allele frequency, but not in other series from Italy and France where allele frequency was comparable with that observed in our population. These discrepant results could therefore be related, at least in part, to ethnic variations in 677 T allele frequency, as previously observed with Down syndrome, spina bifida, and cardiovascular diseases.⁸ In contrast, we found a significant association with age at onset. Onset in 677T allele carriers occurred later than that of non-carriers, with respective mean ages of 42.4 (15.7) and 35.4 (13.8) (p = 0.0487).

Our results were different when the two 677TT and 677CT+1298AC genotypes of MTHFR were considered together, that corresponded to decreased catalytic activity. Firstly, the difference in frequency between patients

and controls was at the limit of significance and this could be related to the limited size of our patient series (table 1). Secondly, these genotypes were associated with an increased risk of extensive UC (whole colon) (table 1), with an odds ratio of 4.92 (95% confidence interval 1.3–18.3; p = 0.017), after adjustment for age and sex.

In conclusion, our study showed that the genotypes of MTHFR, associated with a decrease in enzyme activity, seemed to be more significantly associated with extension of disease than with the primary risk, at least in central China.

M Chen, B Xia

Department of Internal Medicine and Gastroenterology, Zhongnan Hospital and Research Centre of Digestive Diseases, Wuhan University Medical School, Wuhan, RP China

R M Rodriguez-Gueant, M Bigard, J-L Gueant
INSERM-0014 and Department of Hepato-Gastroenterology, Medical Faculty and University Hospital Centre, University of Nancy, Nancy, France

Correspondence to: Dr J-L Gueant, INSERM-0014 and Department of Hepato-Gastroenterology, Medical Faculty and University Hospital Centre, University of Nancy, Nancy, France; j.gueant@chu-nancy.fr

doi: 10.1136/gut.2004.062539

Conflict of interest: None declared.

References

- Mahmud N, Molloy A, McFarlin J, et al. Increased prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase C677T variant in patients with inflammatory bowel disease, and its clinical implications. *Gut* 1999;45:389–94.
- Papa A, Danese S, Grillo A, et al. Review article: inherited thrombophilia in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1247–51.
- Bellender Gousselle C. Focus on homocysteine and the vitamins involved in its metabolism, 2nd edn. Paris: Springer-Verlag, 2002.
- Nelson JM, Jansen TB, Fritholm L, et al. Increased prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase C677T variant in patients with IBD. *Gut* 2000;47:456–7.
- Vecchi M, Sacchi E, Sabini S, et al. Inflammatory bowel diseases are not associated with major hereditary conditions predisposing to thrombosis. *Dig Dis Sci* 2000;45:1465–9.
- Papa A, De Stefano V, Danese S, et al. Hyperhomocysteinemia and prevalence of polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2677–82.
- Guedon C, le Cam-Duchet, Labaude O, et al. 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.
- Namoun F, Olivier J, Abdelmoutalib I, et al. Transcobalamin in 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.
- Amezou E, Chabi N, Adjalla C, et al. High prevalence of hyperhomocysteinemia related to folate deficiency and mutated 677 C→MTHFR, in the coast of West Africa. *Am J Clin Nutr* 2004;79:619–24.
- Gueant J, Rodriguez-Gueant RM, Anello G, et al. Genetic determinants of folate and vitamin B12 metabolism: a common pathway in neural tube defect and Down syndrome. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1473–7.

Research article

Open Access

Methionine synthase A2756G polymorphism may predict ulcerative colitis and methylenetetrahydrofolate reductase C677T pancolitis, in Central China

Min Chen^{†1,2}, Laurent Peyrin-Biroulet^{†1,3}, Bing Xia^{†2}, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez¹, Jean-Pierre Bronowicki^{1,3}, Marc-André Bigard^{1,3} and Jean-Louis Guéant^{*1,3}

Address: ¹Inserm, U724, Laboratory of Cellular and Molecular Pathology in Nutrition, Faculty of Medicine, Nancy-Université, Nancy-Vandœuvre, France, ²Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital and Research Center of Digestive diseases, Wuhan University School of Medicine, Wuhan, PR China and ³Department of Hepato-Gastroenterology, University Hospital of Nancy, Nancy-Vandœuvre, France

Email: Min Chen - chenmin8106@yahoo.com.cn; Laurent Peyrin-Biroulet - peyrin-biroulet@netcourrier.com; Bing Xia - bingxia2004@yahoo.com.cn; Rosa-Maria Guéant-Rodriguez - rm.rodriquez@chu-nancy.fr; Jean-Pierre Bronowicki - jp.bronowicki@chu-nancy.fr; Marc-André Bigard - ma.bigard@chu-nancy.fr; Jean-Louis Guéant - jlgueant@medecine.uhp-nancy.fr

* Corresponding author †Equal contributors

Published: 13 August 2008

BMC Medical Genetics 2008, 9:78 doi:10.1186/1471-2350-9-78

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/9/78>

© 2008 Chen et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Received: 24 August 2007

Accepted: 13 August 2008

Abstract

Background: The association of genetic polymorphisms related to metabolism of homocysteine with inflammatory bowel disease has been evidenced in Crohn disease and remains an open question in ulcerative colitis. We evaluated the association of the polymorphisms of MTHFR, MTR, MTRR and TCN2 genes with ulcerative colitis in Central China.

Methods: 168 patients were genotyped for these polymorphisms and compared to 219 matched controls.

Results: Methionine synthase 2756G allele frequency was higher in ulcerative colitis than in controls 0.15 (95% C.I. 0.11–0.19) vs 0.09 (95% C.I. 0.07–0.12), ($P = 0.0137$) and predicted ulcerative colitis risk in logistic regression, with an Odds ratio at 1.8 (95% C.I. 1.15–2.84). Methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype was 2.7-fold more prevalent in individuals with pancolitis than in those with left colitis or proctitis, with respective percentages of 27.3 (95% C.I. 16.4–42.0) and 10.5 (95% C.I. 6.3–17.1) ($P = 0.0123$). The carriage of 677TT or 677CT/1298AC genotypes of methylenetetrahydrofolate reductase was more frequent in cases with pancolitis than in subjects with left colitis or proctitis ($P = 0.0048$), with an Odds ratio adjusted by age and sex at 3.3 (95% C.I. 1.4–7.9), $P = 0.0084$ in logistic regression.

Conclusion: Methionine synthase and methylenetetrahydrofolate reductase are genes of vitamin B12 and folate cellular metabolism associated respectively with risk and extent of ulcerative colitis, at least in Central China. This finding may open new insights, particularly for the potential interest in treating patients carrying the 677TT MTHFR genetic trait and a deficit in folate.

Background

Homocysteine is a key metabolite of the one carbon metabolism, at the cross point between the remethylation pathway that produces methionine and the transsulfuration pathway that produces cysteine [1]. Plasma homocysteine (t-Hcy) is influenced by genetic polymorphisms of the key enzymes of the remethylation pathway, *methyl-ene-tetrahydrofolate reductase* (*MTHFR* C677T) [2,3], *methionine synthase* (*MTR* A2756G) [4] and *methionine synthase reductase* (*MTRR* A66G) [5]. *MTHFR* catalyses the synthesis of methyltetrahydrofolate, the methyl donor of homocysteine and *MTR* and *MTRR* are the two key enzymes of the synthesis of methionine by remethylation of homocysteine. The C677T genetic polymorphism in the *MTHFR* gene is found to be associated with a thermolabile variant enzyme that shows a reduced activity [2]. A genetic polymorphism in the *transcobalamin* gene (*TCN2* C776G) is another genetic trait that may influence the vitamin B12 cellular delivery and consequently, homocysteine metabolism [6]. Transcobalamin is a specific plasma transporter of cobalamin (vitamin B12) and facilitates the cellular uptake of the vitamin by receptor-mediated endocytosis [6].

Hyperhomocysteinemia is recognized as a risk factor for both venous and arterial thrombosis in the general population [7,8]. In this regard, genetic determinants of homocysteine metabolism have received increasing attention over the past decade as potential contributors to the greater risk of thrombosis in inflammatory bowel disease (IBD) subjects [9]. Homocysteine has also a crucial role in cellular stress, epigenetic events, inflammatory processes and host-microbial interactions. Hyperhomocysteinemia might therefore influence the clinical history of IBD, including disease severity [9]. Mahmud and colleagues were the first to report a higher prevalence of *MTHFR* 677T allele in IBD patients, compared to controls [10]. Nevertheless a number of subsequent studies have produced conflicting results, possibly related with complex interactions between environmental and genetic factors [11-17]. Ethnic and geographical variations in the distribution and phenotypic influence of *MTHFR* variants may explain, at least in part, discrepancies between case control studies on the association between *MTHFR* polymorphism and IBD [18,19]. Polymorphisms of other homocysteine metabolism-related enzymes may also contribute to the link between homocysteine metabolism and IBD patients. The influence of *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* and *TCN2* polymorphisms on the primary and secondary risk of ulcerative colitis have never been evaluated in a same sample population. Most of the case-control studies have evaluated Caucasian populations from North America and Europe, where the prevalence of Crohn disease is predominant, in contrast with populations from Asia, where UC is the most frequent form of IBD. In contrast to *MTHFR* 677T allele, the G allele frequency of *TCN2* poly-

morphism is dramatically higher in Central China, compared with that reported in Caucasian populations [16,18,19].

The aim of this study was therefore to evaluate the influence of genetic determinants of homocysteine metabolism, *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* and *TCN2* with the primary risk and the clinical manifestations of UC, in a case-control study of a sample population from Central China.

Methods

Study subjects

Eligible patients were males or females with established ulcerative colitis UC. 168 patients who were recruited from one single department (Department of Gastroenterology and Research center of Digestive diseases, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, province of Hubei, RP China) were prospectively enrolled in a case-control study, during a 2-years period. Information regarding concomitant medications was collected at study entry. Extent of UC was defined according to Montreal Classification [20]. The term "Pancolitis" means "ulcerative colitis that involves the entire colon." The UC subjects were compared to 219 healthy volunteers from a blood donor Center of Wuhan, who presented without anemia, abdominal pain, inflammation, diarrhea nor blood in the stools. The controls were extracted from a larger cohort and were matched for age and sex with UC patients. All individuals belonged to Han ethnicity and originated from the Hubei province, in Central China. This study was approved by the local ethic committee, and the subjects included gave informed consent, according to the Helsinki declaration.

Assays and DNA genotyping procedures

Fasting venous blood was collected in EDTA-containing tubes, immediately centrifuged, and stored at -20°C until analysis. DNA was isolated from a lymphocyte-enriched fraction of whole blood with NUCLEON BACC3 for extraction of genomic DNA kit (Amersham Pharmacia Biotech, Milan, Italy). The procedures for detecting the C677T and A1298C polymorphisms of *MTHFR*, as well as the A2756G *MTR* and the A66G *MTRR* polymorphisms, were based on polymerase chain reaction (PCR) amplification, restriction cleavage and separation of the DNA fragments by 15% non denaturant polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), as previously described [18,19]. Genotyping of the *TCN2* C776G polymorphism was performed by the amplification-refractory mutation system, as described recently by us [6]. DNA samples corresponding to amplified DNA of the *MTHFR*, *MTR* and *MTRR* genotypes were sequenced and subsequently used as controls in all series of genotype determination. Five % of the samples were re-genotyped to check for genotype calling consistency, with a genotyping success rate higher than 98%.

Statistical analysis

The tested *a priori* hypotheses were the association of the genetic determinants of homocysteine metabolism with the primary risk and the clinical characteristics of the disease, respectively. Categorical variables were reported as counts, percentages and 95% confidence interval, and continuous variables as means $\pm$ SD. For categorical variables, continuity-corrected chi-square test or exact Fisher test (when variables were stratified in function of clinical characteristics) were used to assess differences. For continuous variables, a Mann-Whitney U-test was employed. The significance, odds ratios (OR) and 95% confidence interval of independent determinants regarding the risk of IBD were determined by logistic regression analysis using a model that included age, sex and the genetic and clinical variables. The residual model of logistic regression multivariate analysis considered only the variables with P-value < 0.10 in the univariate analysis. The minimal size of our sample was estimated at 150 patients, with a study power $1-\beta = 0.8$ and $\alpha = 0.05$, assuming a 1.5-fold difference in the less frequent alleles between controls and patients. P-value lower than 0.05 indicated statistical significance and Bonferroni correction for multiple testing was used as described previously, when several dependent or independent statistical tests were being performed simultaneously [18]. (Data were prospectively collected and analyzed using the Statview 5 software for Windows (SAS Institute, Berkeley, California, USA) and the SPSS 10.0 software for Windows (SPSS, Paris, France). HWE was tested using the chi-square two-tailed calculation of Knud Christensen, population genetics, www.kursus.kvl.dk.

Results

Clinical characteristics of UC patients

There were no significant difference in sex ratio between controls and UC patients, with respectively 38% and 42% of females ($P = 0.3660$); the age was respectively 41 ± 15 and 41 ± 12 years ($P = 0.7428$). The age onset was 38 ± 15 , without difference among gender. The main clinical char-

acteristic of the UC patients are summarized in table 1. A quarter presented with an extensive form of colitis and about 57% with lesions limited to rectum and/or sigmoid. None of the cases presented with a reported thromboembolic episode.

Comparison of the genetic characteristics of UC patients and controls

There was no linkage disequilibrium among different genotypes. The genotype of *MTHFR* C677T, A1298C, *MTR*, *MTRR*, and *TCN* could be determined in respectively 215, 213, 218, 219, 216 of the 219 DNA samples from controls and in respectively 168, 160, 156, 164, 146 of the 168 DNA samples from UC cases. The genotype distributions of *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, and *TCN* polymorphisms of patients were in Hardy-Weinberg equilibrium (P-values of two tailed chi-square 0.5071, 0.8231, 0.3055, 0.7184, 0.4237, respectively) and were not influenced by gender (data not shown). *MTHFR* 677T and 1298C alleles were in complete disequilibrium, as previously reported in other populations [3].

The genotype distributions of *MTHFR*, *MTRR* and *TCN* polymorphisms did not differ between controls and UC patients (table 2). The same observation was made for allele frequencies (table 2). In contrast, the carriers of *MTR* 2756AG/CG genotypes were more frequent in UC than in the control group, with respective percentages of 26.3 (95% C.I. 20.0–33.7) and 16.5 (12.2–22.0) ($P = 0.0212$). The same observation was made with the *MTR* 2756G allele frequency, with a difference even more significant (table 2). In logistic regression, carriage of *MTR* 2756G allele was an independent predictor of UC, with an Odds ratio estimated at 1.8 (table 2).

Association of genetic polymorphisms with clinical characteristics of UC patients

We next examined the association of polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes with the clin-

Table 1: Categorical clinical characteristics of the 168 patients with ulcerative colitis.

Characteristic	Number of cases	Percentage (95% confidence interval)
Male sex	97	57.7 (50.2–57.7)
Past smoking	14	8.3 (5.1–13.5)
Current smoker	12	7.1 (4.2–12.1)
Concomitant medications:		
Steroids	50	29.8 (23.4–29.8)
Sulfasalazine	98	58.3 (50.8–65.5)
5-aminosalicylate	69	41.1 (33.9–48.6)
Antibiotics	15	8.9 (5.5–14.2)
Disease location:		
Rectum	78	46.4 (39.0–54.0)
Left colon	46	27.4 (21.2–34.6)
Pancolitis	44	26.2 (20.1–33.3)
Personal history of surgery:		
Colectomy	2	1.2 (0.4–4.2)

Table 2: Genotype frequencies and minor allele frequencies of genetic polymorphisms in ulcerative colitis patients and controls.

	Controls Frequencies (%)	UC patients Frequencies (%)	P-value	OR (95% CI)*
MTHFR 677				
CC [#]	40.9	38.1		
CT [#]	43.3	45.2	0.6053 ^a	1.12 (0.72–1.75)
TT	15.8	16.7	0.6821 ^a	1.13 (0.62–2.05)
Total number of patients analysed	215	168		
Allele T	0.37	0.39	0.6027	1.09 (0.81–1.46)
MTHFR 1298				
AA [#]	66.2	69.4		
AC	29.1	28.1	0.7277 ^a	0.92 (0.58–1.46)
CC	4.7	2.5	0.2631 ^a	0.51 (0.15–1.66)
Total number of patients analysed	213	160		
Allele C	0.19	0.17	0.3455	0.86 (0.59–1.26)
MTR 2756				
AA [#]	83.5	73.7		
AG	15.1	23.1	0.0422 ^a	1.72 (1.02–2.92)
GG	1.4	3.2	0.1899 ^a	2.64 (0.62–11.25)
Total number of patients analysed	218	156		
Allele G	0.09	0.15	0.0137	1.81 (1.15–2.84)
MTRR 66				
AA [#]	58.0	53.7		
AG	35.6	38.4	0.4839 ^a	1.17 (0.76–1.79)
GG	6.4	7.9	0.4746 ^a	1.34 (0.60–2.99)
Total number of patients analysed	219	164		
Allele G	0.24	0.27	0.2401	1.18 (0.85–1.64)
TCN2 776				
CC [#]	21.8	18.5		
CG	38.9	45.2	0.3358 ^a	1.26 (0.79–2.01)
GG	39.3	36.3	0.7835 ^a	1.09 (0.61–1.95)
Total number of patients analysed	216	146		
Allele G	0.58	0.59	0.9447	1.0 (0.74–1.35)

* (OR: unadjusted odds ratio; 95% CI: 95% confidence interval)

Abbreviations: 5-methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR), methionine synthase (MTR), methylenetetrahydrofolate reductase (MTRR) and transcobalamin (TCN2)

[#] Dominant genotype. ^a Comparison with dominant genotype.

ical characteristics. None of the polymorphisms influenced the age onset of the disease. In univariate analysis, *MTR*, *MTRR* and *TCN* polymorphisms were not associated with location and extent of UC while *MTHFR* 677TT genotype was associated with pancolitis. The frequency of the TT genotype of *MTHFR* C677T polymorphism was 2.7-fold higher in UC individuals with pancolitis than in other UC cases, with respective percentages of 27.3 (95% C.I. 16.4–42.0) and 10.5 (95% C.I. 6.3–17.1) ($P = 0.0123$). The frequency of subjects who presented with either 677TT or the double heterozygous 677CT/1298AC genotype was also significantly different between subjects with pancolitis and those with left colitis or proctitis, with respective percentages of 43.2 (95% C.I. 29.6–43.2) and 20.2 (95% C.I. 14.1–28.1) ($P = 0.0048$).

Finally, the association of gene polymorphisms of genes of the remethylation pathway with the risk of pancolitis was estimated by logistic regression analysis using a

model that included age, sex, medications and genetic polymorphisms. We confirmed that the only significant independent gene predictor of extensive lesions was *MTHFR*. The sex and age adjusted odds ratio of the association between pancolitis and *MTHFR* 677 TT was estimated to 3.82 (95% C.I. 1.3–11.7, $P = 0.0179$). When the age and sex adjusted analysis was performed by considering the carriers of 677TT or C677CT/1298AC genotypes of *MTHFR* instead of *MTHFR* 677TT only, the same conclusion was reached, with an Odds ratio at 3.3 (95% C.I. 1.4–7.9, $P = 0.0084$).

Discussion

Genetic factors possibly associated with ulcerative colitis remain poorly known. This is the first study that evaluated the association of genes of the remethylation pathway of homocysteine, *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* and *TCN2*, in a case population restricted to UC, in China. It evidenced a significant association of *MTR* and *MTHFR* variants with the

primary risk and the extent of the disease, respectively; 677TT and C677T/1298AC genotypes of *MTHFR* were predictors of extensive colitis, while no association was found with the primary risk of UC. In contrast, *MTR* 2756G allele was associated with an increased risk of UC and had no influence on the extent of the disease. *MTR* and *MTHFR* have a complementary role in this pathway. During the remethylation of homocysteine into methionine, a methyl group provided by 5-methyltetrahydrofolate (5-methylTHF) is transferred to homocysteine by *MTR*. In this remethylation pathway, cobalamin (vitamin B12) is involved as an intermediate carrier of the methyl group while the 5-methylTHF is synthesized by *MTHFR*. The phenotypic influence of the 2756G allele on the activity of *MTR* has not been clearly evidenced [4]. In contrast, both 677TT and 1298AC/677CT genotypes are known to produce a decreased catalytic enzyme activity of *MTHFR* [2]. Notably, the 677TT genotype of *MTHFR* is encoding a thermolabile variant characterized by an alanine to valine substitution at position 222, and a 50% reduction in enzyme activity [2]. As a consequence, *MTHFR* C677T polymorphism produces a decreased cellular level of methyl-THF and a cellular accumulation of homocysteine, particularly in patients with insufficient folate supply [21]. Interestingly, recent experimental findings raise the possibility that homocysteine-induced cellular and vascular stress may contribute to the maintenance of a chronic mucosal inflammatory state in IBD [9,22].

Clinical implications of the *MTHFR* C677T polymorphism include increased risk for several diseases, such as vascular, neurological and for birth defects [21,23]. Its phenotypic influence on homocysteine metabolism is neutral in subjects with sufficient folate supply, as in South Europe [18]. Similarly, the association of *MTHFR* with other diseases than IBD seems to be neutral in South European countries, where the status of populations in folate is better than in North Europe, while some studies have showed association with *MTR* and *MTRR* in these countries [23,24]. This could explain some of the discrepant results produced on association studies with IBD in populations with contrasted status in folate. Indeed, two studies performed in Northern Europe reported a significant increased frequency of the *MTHFR* TT genotype [10,25], whereas four studies in Southern Europe (two Italian, one French, one Portuguese) and one Chinese study showed no difference [11,14-17]. In contrast, we found a higher frequency of *MTRR* 66A allele in patients with Crohn's disease compared with controls, and we observed an influence of this gene variant on the extent of the disease [26]. We also evidenced that vitamin B12 was a nutritional determinant of homocysteinemia, that was under the influence of oxidative stress [26]. Consistently, a recent report showed that folate deficiency was not a predictor of homocysteine level in case of increased oxida-

tive stress, underscoring the implication of other nutritional determinants, such as vitamin B12, under pathological conditions [27]. Taken together, these results are in agreement with our findings indicating that *methionine synthase* A2756G polymorphism, a vitamin B12-dependent enzyme, may predict ulcerative colitis. The data are also difficult to compare among contrasted populations since the frequency of these gene polymorphisms and their influence on homocysteine fluctuate greatly, worldwide [18,19]. The prevalence of the homozygous T allele seems to be influenced by folate status, the prevalence being the highest in Mexicans, Chinese and Italians and the lowest in West Africans [18,19]. It would be therefore useful to revisit the studies on IBD and *MTHFR* that have been published in Europe by evaluating also the association with the other gene variants related with the remethylation pathway. Finally, the discrepancies observed in previous studies on association between *MTHFR* and IBD may also correspond in part to differences in the proportion of cases with extensive colitis, as suggested by our observation that *MTHFR* is a predictor of pancolitis, at least in UC. This observation was in agreement with our previous study of a smaller series of UC patients [16]. In addition, the association with severity of the disease may be related with a deficit in folate and vitamin B12, as previously observed by us in Caucasians with Crohn's disease [26]. Vitamin B12 metabolism influenced Crohn's disease activity by modulating oxidative stress, measured by superoxide dismutase activity [26]. Homocysteine levels were recently correlated with activity, number of flares and duration of the disease [28]. Unfortunately, we could not determine the blood level of these determinants in the present series as no serum or plasma sample was available. Furthermore, we recently found that azathioprine therapy decreased plasma homocysteine level [26], suggesting interactions between azathioprine and homocysteine metabolisms. Genetic variation in the *MTHFR* gene may result in reduced S-adenosylmethionine concentrations, leading to enhanced TPMT enzyme degradation and possibly modulating azathioprine efficacy [29].

Over the past decade, hyperhomocysteinemia and *MTHFR* C677T polymorphism have been regarded solely as potential contributors to the greater risk of thrombosis in IBD [14,15,30-32]. Our data indicated clearly that it influenced the severity of UC, independently of the risk of thrombosis, as none of the case from our series underwent a thrombosis episode.

Conclusion

MTR and *MTHFR* are two genes of vitamin B12 and folate cellular metabolism associated respectively with the primary risk and the severity of UC, at least in central China. These findings might open new insights into the patho-

genesis and assessment of UC, particularly for the potential interest in treating the patients presenting with the 677TT MTHFR genetic trait and a deficit in folate. However, our results await confirmation in a large cohort of patients with UC.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

J-LG was the guarantor and supervisor of the study. MC, LP-B, BX and J-LG contributed to conception and design, recruitment of patients, analysis and interpretation of data and drafting of the manuscript. R-MG-R carried out the biological and genetics analyses, interpretation of data, statistical analyses, revising of the manuscript. BX and MC recruited the patients and M-AB and J-PB contributed in interpreting the data. LP-B and J-LG revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

Institutional funding was received from Region Lorraine and Inserm (France) and a grant of international collaboration was supported from China Hubei provincial science & technology department (2007CA003). No private sponsor was involved in the study. Min Chen was recipient of a fellowship grant from Chinese service center for scholarly exchange, PR of China, and from Region Lorraine, France.

References

1. Stipanuk MH: Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu Rev Nutr* 2004, 24:539-77.
2. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluftmans LAJ, van den Heuvel LP, Rozan R: A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995, 10:111-113.
3. Put NM van der, Gabraels F, Stevens EM, Smeltink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, Heuvel LP van den, Blom HJ: A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998, 62:1044-1051.
4. Chen J, Stampfer MJ, Ma J, Selhub J, Malinow MR, Hennekens CH, Hunter DJ: Influence of a methionine synthase (D919G) polymorphism on plasma homocysteine and folate levels and relation to risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2001, 154:667-672.
5. Leclerc D, Wilson A, Dumas R, Gafuk C, Song D, Watkins D, Heng HH, Rommens JM, Scherer SW, Rosenblatt DS, Gravel RA: Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:3059-3064.
6. Namour F, Olivier J, Abdelmoutaleb I, Adjalla C, Debarb R, Salvat C, Guéant 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, 97:1092-1098.
7. den Heijer M, Rosendaal FR, Blom HJ, Gerrits WB, Bos GM: Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb Haemostasis* 1998, 80:874-877.
8. Parry LJ, Refsum H, Morris RW, Ebrahim SB, Ueland PM, Shaper AG: Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet* 1995, 346:1395-1398.
9. Peyrin-Biroulet L, Rodriguez-Gutierrez RM, Chamallard M, Desreux 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, 102:1-8.
10. 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, 45:389-394.
11. Papa A, De Stefano V, Danese S, Chiusolo P, Parsichilli S, Casorali 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, 96:2677-2682.
12. Romagnuolo J, Fedorak RN, Dias VC, Barnforth F, Teltscher M: Hyperhomocysteinemia and inflammatory bowel disease: prevalence and predictors in a cross-sectional study. *Am J Gastroenterol* 2001, 96:2143-2149.
13. Portela E, Lertus C, Palmeiro A: Homocysteine and MTHFR C677T variant in inflammatory bowel disease. *Gut* 1999, 45(Suppl):A15.
14. Guédon C, Le Cam-Duchez V, Lalaude O, Ménard 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, 96:1448-1454.
15. Vecchi M, Sacchi E, Salenti 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, 45:1465-1469.
16. Chen M, Xia B, Rodriguez-Gutierrez RM, Bigard M, Guéant JL: Genotypes 677TT and 677CT+1298AC of methylenetetrahydrofolate reductase are associated with the severity of ulcerative colitis in central China. *Gut* 2005, 54:733-734.
17. Magro F, Dinis-Ribeiro M, Araujo FM, Pereira P, Fraga MC, Cunha-Ribeiro LM, Tomé-Ribeiro A: High prevalence of combined thrombophilic abnormalities in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003, 15:1157-1163.
18. Guéant-Rodriguez RM, Guéant JL, Debarb 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, Harbath B, Gulland JC, Mutchnick OM: Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study among Mexican, West African and West European populations. *Am J Clin Nutr* 2006, 83:701-707.
19. Guéant JL, Chabi N, Guéant-Rodriguez RM, Mutchnick O, Debarb R, Payet C, Lu X, Villama C, Bronowicki JP, Quadros EV, Sanni A, Amouzou E, Xia B, Chen M, Anello G, Bosco P, Romano C, Arrieta HR, Sanchez BE, Romano A, Harbath B, Anwar W, Namour F: Environmental influence on the world-wide prevalence of a 776C>G variant in the transcobalamin gene (TCN2). *J Med Genet* 2007, 44:363-7.
20. Satsangi J, Silverberg MS, Vermaire S, Colombel JF: The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006, 55:749-753.
21. Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE: Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 2001, 22:195-201.
22. 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.
23. Guéant JL, Guéant-Rodriguez RM, Anello G, Bosco P, Brunaud L, Romano C, Ferri R, Romano A, Candito M, Namour B: Genetic determinants of folate and vitamin B12 metabolism: a common pathway in neural tube defect and Down syndrome? *Clin Chem Lab Med* 2003, 41:1473-1477.
24. Lawls SJ, Ebrahim S, Smith GD: Meta-analysis of MTHFR 677C>T polymorphism and coronary heart disease: does totality of evidence support causal role for homocysteine and preventive potential of folate? *Br Med J* 2005, 10:1136.
25. Bjarregard LT, Naderby NJ, Fredholm L, Brandskjold I, Munkholm P, Hey H: Hyperhomocysteinemia, coagulation pathway activation and thrombophilia in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2002, 37:62-67.

26. Payrin-Broulet 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.
27. Rogers EJ, Chen S, Chan A: Folate deficiency and plasma homocysteine during increased oxidative stress. *N Engl J Med* 2007, 357:421-2.
28. Drzewoski J, Gasiorowska A, Malacka-Panas E, Bald E, Czupryniak L: Plasma total homocysteine in the active stage of ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006, 21:739-43.
29. Aranas M, Simpson G, Lewis CM, Shobowale-Bakre al-M, Escurodo E, Fairbanks LD, Duley JA, Ansari A, Sanderson JD, Martinaki AM: Genetic variation in the MTHFR gene influences thiopurine methyltransferase activity. *Clin Chem* 2005, 51:2371-4.
30. Cattaneo M, Vecchi M, Zighetti ML, Salbani S, Martinelli I, Omedal P, Mannucci PM, de Franchis R: High prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with inflammatory bowel disease: a pathogenic link with thromboembolic complications? *Thromb Haemostasis* 1998, 80:542-545.
31. Oldenburg B, Rijnhoer R, Griend R van der, vanBerge-Henegouwan GP, Koningsberger JC: Homocysteine in inflammatory bowel disease: a risk factor for thromboembolic complications? *Am J Gastroenterol* 2000, 95:2825-2830.
32. Danese S, Papa A, Salbani S, Rapici A, Malaszi A, Vecchi M: Inflammation and Coagulation in Inflammatory Bowel Disease: The Clot Thickens. *Am J Gastroenterol* 2007, 102:174-186.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:

<http://www.biomedcentral.com/1471-2350/9/78/prepub>

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Association of MTRR 66A>G Polymorphism With Superoxide Dismutase and Disease Activity in Patients With Crohn's Disease

Laurent Peyrin-Biroulet,^{1,2} Rosa-Maria Guéant-Rodriguez,¹ Min Chen,¹ Jean-Pierre Bronowicki,^{1,2} Marc-André Bigard,^{1,2} and Jean-Louis Guéant, M.D., D.Sc.^{1,2}

¹Inserm, U724, Laboratory of Cellular and Molecular Pathology in Nutrition, Faculty of Medicine, Vandoeuvre-les-Nancy, France; and ²Department of Hepato-Gastroenterology, University Hospital of Nancy, Vandoeuvre-les-Nancy, France

OBJECTIVES: The aim of this study was to evaluate the association of nutritional (folate, vitamin B₁₂) and genetic (*MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *TCN*) determinants of homocysteine metabolism and of superoxide dismutase with Crohn's disease (CD).

METHODS: One hundred forty patients with CD were compared with 248 matched healthy controls.

RESULTS: Plasma homocysteine levels were higher in CD patients than controls (11.8 vs 10.4 $\mu\text{mol/L}$, $P = 0.0004$). Vitamin B₁₂ and folate levels were lower in CD subjects compared to controls (207 vs 255 pmol/L, $P = 0.0082$, and 8.6 vs 11 nmol/L, $P = 0.036$, respectively). Patients with a personal history of ileal resection, ileitis, or colectomy had significantly lower vitamin B₁₂ levels. 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). 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 (CDAI) scores (P for trend = 0.0276) in patients carrying *MTRR* AA genotype.

CONCLUSIONS: Vitamin B₁₂ and *MTHFR* 677 TT genotype are the main determinants of hyperhomocysteinemia in CD patients. The association of *MTRR* 66A>G polymorphism with oxidant stress and disease activity provides rationale for screening vitamin deficiencies in these patients.

(Am J Gastroenterol 2007;102:1–8)

INTRODUCTION

Homocysteine is a nonprotein forming, sulphur amino acid that results from the demethylation of the essential amino acid methionine (Fig. 1). Plasma total homocysteine (t-Hcy) is influenced by nutritional factors, mainly folates and vitamin B₁₂ (cobalamin), as well as genetic polymorphisms of key enzymes of its metabolism: methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) (1), methionine synthase (*MTR*) (2), and methionine synthase reductase (*MTRR*) (3). *MTHFR* catalyses the synthesis of methyltetrahydrofolate, the methyl donor of homocysteine, and *MTR* and *MTRR* are the two key enzymes of the synthesis of methionine by remethylation of homocysteine. The C677T genetic polymorphism in the *MTHFR* gene was found to be associated with a thermo-labile variant enzyme that showed reduced activity (4). A genetic polymorphism in the transcobalamin gene (*TCN2*) is another genetic trait that may influence homocysteine metabolism (5).

Hyperhomocysteinemia is recognized as a risk factor for both venous and arterial thrombosis in the general population (6, 7). In this regard, homocysteine metabolism has received increasing attention over the past decade as a potential contributor to the greater risk of thrombosis in inflammatory bowel disease (IBD) subjects. Mahmud and colleagues were the first to report a higher prevalence of hyperhomocysteinemia and of *MTHFR* 677T allele in IBD patients, compared to controls (8). Nevertheless a number of subsequent studies have produced conflicting results, suggesting complex interactions between environmental and genetic factors (9). In addition, polymorphisms of other homocysteine metabolism-related enzymes may contribute to high t-Hcy usually found in IBD patients. Overall, the influence of homocysteine on secondary events of IBD, particularly thromboembolic manifestations, remains controversial (10).

Furthermore, genotype-phenotype correlations are poorly documented in most of the already published case-control

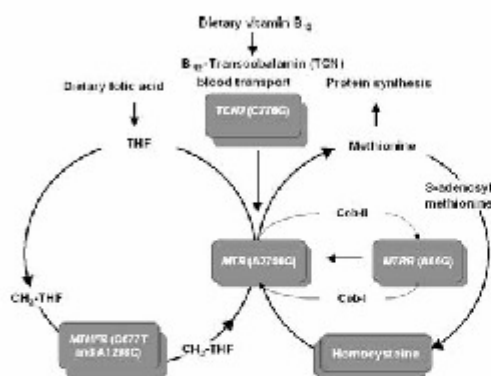


Figure 1. Metabolic chart of homocysteine cycle and the genetic variants of the enzymes involved in this metabolism. Homocysteine is remethylated into methionine by methionine synthase (MTR) with 5-methyltetrahydrofolate as a methyl donor and vitamin B₁₂ (cobalamin) as a coenzyme. MTRR is the enzyme needed to maintain vitamin B₁₂ in a reductive state in the catalytic cycle of MTR dependent remethylation of homocysteine. 5-methyltetrahydrofolate is produced by the FAD-dependent enzyme 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). Methionine is further transformed into S-adenosylmethionine, the universal methyl donor for methylation of nucleic acids, proteins, polysaccharides, phospholipids...etc. After release of the methyl group, S-adenosylmethionine is converted into S-adenosylhomocysteine, which is reversibly hydrolyzed into homocysteine.

studies, and the combined and respective influence of *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, and *TCN* polymorphisms on the primary and secondary risks of IBD has never been evaluated in a same sample population. Finally, growing evidence suggests that hyperhomocysteinemia may promote chronic intestinal mucosa inflammation, mainly through oxidative stress (9, 11, 12). Elevated homocysteine levels were shown to enhance superoxide dismutase (SOD) activity, a well-established marker of oxidative stress (13–15). Recently, plasma levels of SOD activity were found to be increased in patients with IBD (16).

The aims of this study were therefore to evaluate the complex influence of genetic and nutritional determinants of homocysteine metabolism on the primary risk and phenotype of patients with Crohn's disease (CD), and their potential interaction with SOD.

METHODS

Study Subjects

Eligible patients were men or women who were at least 18 yr of age, with established CD. One hundred forty patients recruited from the Department of Hepato-Gastroenterology (University Hospital of Nancy, France) were prospectively enrolled in a case-control study. Information regarding clinical characteristics and concomitant medications were collected at study entry. The disease location was defined accord-

ing to the Montreal classification (17). These subjects were compared to 248 healthy volunteers from a center of preventive medicine. Controls matched the individuals of the CD group for age and sex. None of the subjects from the control or the CD patient group received any treatment and/or vitamin B supplementation that could influence vitamin B₁₂, folate, or homocysteine metabolism. All individuals were French of European origin. The study protocol was approved by the local ethics committee, and the included subjects gave a written consent.

Assays and DNA Genotyping Procedures

Fasting venous blood was collected in EDTA-containing tubes, immediately centrifuged, and stored at -80°C until analysis. Plasma t-Hcy was assayed by FPIA (fluorescence polarization immunoassay) using the Abbott IMX automated Benchtop analyzer system (Abbott Diagnostic, Rome, Italy). Serum folate and vitamin B₁₂ levels were measured by radio assay (Ciba-Corning, Medfield, MA). The SOD activity assay was carried out with the Ransod kit (Ransod, Crumlin, UK) according to the manufacturer's instructions.

DNA was isolated from a lymphocyte-enriched fraction of whole blood with NUCLEON BACC3 for extraction of genomic DNA kit (Amersham Pharmacia Biotech, Milan, Italy). The procedures for detecting the C677T and A1298C polymorphisms of *MTHFR*, as well as the A2756G *MTR* and the A66G *MTRR* polymorphisms, were based on polymerase chain reaction amplification, restriction cleavage, and separation of the DNA fragments by 15% nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), as previously described (18). Genotyping of the *TCN* C776G polymorphism was performed by the amplification-refractory mutation system, as described recently by us (5). DNA samples corresponding to amplified DNA of the *MTHFR*, *MTR*, and *MTRR* genotypes were sequenced and subsequently used as controls in all series of genotype determination.

Statistical Analysis

Categorical variables are reported as counts and percentages, and continuous variables as mean $\pm$ SD, median, 25th and 75th interquartiles. For categorical variables, a continuity-corrected χ^2 test was used to assess differences. For continuous variables, a Mann-Whitney U-test or a Kruskal-Wallis test were employed. A multiple linear regression analysis was used to evaluate the significant independent determinants of t-Hcy and a Cox regression analysis was used for evaluating the association between quartiles of Crohn's Disease Activity Index (CDAI) and SOD activity. The significance, odds ratio, and 95% confidence interval of independent categorical and continuous variables regarding the risk of CD were determined by multivariate stepwise logistic regression analysis using a model that included age, sex, and the variables that had a *P* value <0.10 in univariate analyses. The stepwise model considered only the variables with a *P* value <0.10 as residual independent determinants. A *P* value lower than 0.05 indicated statistical significance. Data were prospectively

Table 1. Clinical and Genetic Characteristics of the 140 CD Patients and Their Association With Plasma t-Hcy Level

Characteristic	Number of Cases	Percentage (95% Confidence Interval)	Homocysteine $\mu\text{mol/L}$: Median (25th–75th Quartiles)		P Value
			With Characteristic	Without Characteristic	
Male sex	53	37.9 (30.2–46.1)	14.24 (9.8–16.3)	11.06 (8.97–14.50)	0.0143
Familial history of digestive neoplasia	15	10.7 (6.6–16.9)	12.4 (9.4–16.6)	11.4 (9.4–14.6)	0.7163
Familial history of thrombosis	16	11.4 (7.2–17.8)	10.8 (9.1–12.3)	11.9 (9.4–14.9)	0.3021
Personal history of thrombosis	8	5.7 (2.9–10.8)	12.3 (8.4–16.2)	12.0 (9.5–14.9)	0.9579
Current smoker	54	38.6 (30.9–46.8)	12.6 (9.7–16.1)	11.8 (9.2–14.6)	0.2760
Alcohol consumption >20 g/day	3	2.1 (0.1–6.0)	15.1 (10.6–22.6)	11.9 (9.5–14.7)	0.4115
Concomitant medications					
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
Methotrexate	7	5.0 (2.5–10.0)	16.5 (10.7–17.2)	11.9 (9.4–14.6)	0.1123
Disease location					
Ileal (L1)	22	15.7 (10.6–22.7)	11.9 (9.6–16.6)	12.0 (9.1–14.6)	0.4539
Colonic (L2)	60	42.8 (34.9–51.1)	12.4 (9.1–14.6)	11.9 (9.9–17.2)	0.1649
Ileocolonic (L3)	57	40.7 (32.9–49.0)	13.7 (10.8–16.5)	11.7 (9.1–14.6)	0.1080
Isolated upper disease (L4)	0	—	—	—	—
Perianal disease	45	32.1 (25.0–40.3)	11.21 (9.1–15.1)	12.3 (9.7–15.1)	0.6282
Personal history of surgery					
Ileal resection	18	12.9 (8.3–19.4)	15.8 (11.2–18.2)	11.8 (9.2–14.5)	0.0133
Colectomy	12	8.6 (5.0–14.4)	14.6 (11.3–16.7)	11.8 (9.3–14.6)	0.0603
Perianal surgery	21	15.0 (10.0–21.9)	11.8 (9.5–14.0)	12.3 (9.5–15.3)	0.4927
Genotypes					
MTHFR 677 TT	13	9.2 (5.5–15.3)	17.1 (9.0–22.3)	11.3 (9.5–14.5)	0.0219
MTHFR 1298 CC	12	8.6 (5.0–14.4)	10.9 (8.9–13.9)	10.7 (9.0–13.5)	0.9331
MTR 2756 GG	6	4.2 (2.0–9.0)	11.3 (8.0–12.6)	10.7 (9.0–13.5)	0.1516
MTR 66 GG	29	20.7 (14.8–28.2)	10.2 (8.5–15.5)	11.8 (9.6–14.7)	0.2629
TCN 776 GG	27	19.3 (13.6–26.6)	11.9 (9.4–14.7)	11.9 (9.4–12.9)	0.5568

collected and analyzed using the Statview 5 software for Windows (SAS Institute, Berkeley, CA) and the SPSS 10.0 software for Windows (SPSS, Paris, France).

RESULTS

Clinical and Biological Characteristics of CD Patients and Controls

The mean age was 39 (23–45) and 35 (30–45) yr in CD patients and controls, respectively ($P = 0.1452$). Plasma t-Hcy levels were significantly higher in the CD group than in the control group (11.8, 4.05–30.61 vs 10.4, 5.5–21.6 $\mu\text{mol/L}$, respectively, $P = 0.0004$). In addition, as much as 24% of patients had a moderate hyperhomocysteinemia (>15 $\mu\text{mol/L}$), compared with 8% reported in controls. Conversely, vitamin B₁₂ and folate levels were lower in IBD subjects compared to controls: 207 (79–783) vs 255 (93–1,480) pmol/L, respectively, $P = 0.0082$ and 8.6 (1.8–48) vs 11 (2.9–34) nmol/L, respectively, $P = 0.036$.

Predictors of Hyperhomocysteinemia in CD Patients

In CD individuals, male subjects had higher homocysteine levels than female subjects ($P = 0.0143$) (Table 1), while plasma t-Hcy levels were not influenced by sex in controls. The plasma t-Hcy level was slightly lower in CD subjects treated with azathioprine than in those not receiving this medication (Table 1). The influence of steroids and aminosaliculates was not evaluable, because, respectively, three and two

CD patients were treated with such medications. Similarly, only one patient had a personal history of digestive neoplasia (colon adenoma). *MTHFR* 677 TT was the only genetic determinant that was significantly associated with an increased t-Hcy in both controls (10.2, 8.6–12.1 vs 12.5, 9.9–17.0, $P = 0.0030$) and CD patients (Table 1). The plasma t-Hcy level was slightly higher in CD subjects carrying the *MTR* 2756 AA genotype, but the difference did not reach statistical significance ($P = 0.0910$).

Vitamin B₁₂ and folate levels were significantly associated with t-Hcy in univariate analysis (Fig. 2). Age, vitamin B₁₂, and folate levels independently influenced plasma t-Hcy, in multiple regression analysis ($P < 0.0001$, $P = 0.0014$, $P = 0.0005$, respectively).

We investigated whether the clinical characteristics of the 140 CD patients may influence their serum folate and vitamin B₁₂ status. CD patients with a personal history of ileal resection (median 156 vs 208 pmol/L, $P = 0.0389$), ileitis (median 159 vs 219 pmol/L, $P = 0.0261$), or colectomy (median 155 vs 206 pmol/L, $P = 0.0246$) had significantly lower vitamin B₁₂ levels than CD subjects without these characteristics. Active smoking was the single factor negatively associated with serum folate level in CD subjects (median 6.6 vs 9.2 nmol/L in nonsmoking CD patients, $P = 0.0123$).

In multivariate analysis, vitamin B₁₂ and *MTHFR* 677 TT carriage were the two significant independent predictors of plasma t-Hcy > 15 $\mu\text{mol/L}$ (Table 2).

Table 1. Clinical and Genetic Characteristics of the 140 CD Patients and Their Association With Plasma t-Hcy Level

Characteristic	Number of Cases	Percentage (95% Confidence Interval)	Homocysteine $\mu\text{mol/L}$: Median (25th–75th Quartiles)		P Value
			With Characteristic	Without Characteristic	
Male sex	53	37.9 (30.2–46.1)	14.24 (9.8–16.3)	11.06 (8.97–14.50)	0.0143
Familial history of digestive neoplasia	15	10.7 (6.6–16.9)	12.4 (9.4–16.6)	11.4 (9.4–14.6)	0.7163
Familial history of thrombosis	16	11.4 (7.2–17.8)	10.8 (9.1–12.3)	11.9 (9.4–14.9)	0.3021
Personal history of thrombosis	8	5.7 (2.9–10.8)	12.3 (8.4–16.2)	12.0 (9.5–14.9)	0.9579
Current smoker	54	38.6 (30.9–46.8)	12.6 (9.7–16.1)	11.8 (9.2–14.6)	0.2760
Alcohol consumption >20 g/day	3	2.1 (0.1–6.0)	15.1 (10.6–22.6)	11.9 (9.5–14.7)	0.4115
Concomitant medications					
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
Methotrexate	7	5.0 (2.5–10.0)	16.5 (10.7–17.2)	11.9 (9.4–14.6)	0.1123
Disease location					
Ileal (L1)	22	15.7 (10.6–22.7)	11.9 (9.6–16.6)	12.0 (9.1–14.6)	0.4539
Colonic (L2)	60	42.8 (34.9–51.1)	12.4 (9.1–14.6)	11.9 (9.9–17.2)	0.1649
Ileocolonic (L3)	57	40.7 (32.9–49.0)	13.7 (10.8–16.5)	11.7 (9.1–14.6)	0.1080
Isolated upper disease (L4)	0	—	—	—	—
Perianal disease	45	32.1 (25.0–40.3)	11.21 (9.1–15.1)	12.3 (9.7–15.1)	0.6282
Personal history of surgery					
Ileal resection	18	12.9 (8.3–19.4)	15.8 (11.2–18.2)	11.8 (9.2–14.5)	0.0133
Colectomy	12	8.6 (5.0–14.4)	14.6 (11.3–16.7)	11.8 (9.3–14.6)	0.0603
Perianal surgery	21	15.0 (10.0–21.9)	11.8 (9.5–14.0)	12.3 (9.5–15.3)	0.4927
Genotypes					
MTHFR 677 TT	13	9.2 (5.5–15.3)	17.1 (9.0–22.3)	11.3 (9.5–14.5)	0.0219
MTHFR 1298 CC	12	8.6 (5.0–14.4)	10.9 (8.9–13.9)	10.7 (9.0–13.5)	0.9331
MTR 2756 GG	6	4.2 (2.0–9.0)	11.3 (8.0–12.6)	10.7 (9.0–13.5)	0.1516
MTR 66 GG	29	20.7 (14.8–28.2)	10.2 (8.5–15.5)	11.8 (9.6–14.7)	0.2629
TCN 776 GG	27	19.3 (13.6–26.6)	11.9 (9.4–14.7)	11.9 (9.4–12.9)	0.5568

collected and analyzed using the Statview 5 software for Windows (SAS Institute, Berkeley, CA) and the SPSS 10.0 software for Windows (SPSS, Paris, France).

RESULTS

Clinical and Biological Characteristics of CD Patients and Controls

The mean age was 39 (23–45) and 35 (30–45) yr in CD patients and controls, respectively ($P = 0.1452$). Plasma t-Hcy levels were significantly higher in the CD group than in the control group (11.8, 4.05–30.61 vs 10.4, 5.5–21.6 $\mu\text{mol/L}$, respectively, $P = 0.0004$). In addition, as much as 24% of patients had a moderate hyperhomocysteinemia (>15 $\mu\text{mol/L}$), compared with 8% reported in controls. Conversely, vitamin B₁₂ and folate levels were lower in IBD subjects compared to controls: 207 (79–783) vs 255 (93–1,480) pmol/L, respectively, $P = 0.0082$ and 8.6 (1.8–48) vs 11 (2.9–34) nmol/L, respectively, $P = 0.036$.

Predictors of Hyperhomocysteinemia in CD Patients

In CD individuals, male subjects had higher homocysteine levels than female subjects ($P = 0.0143$) (Table 1), while plasma t-Hcy levels were not influenced by sex in controls. The plasma t-Hcy level was slightly lower in CD subjects treated with azathioprine than in those not receiving this medication (Table 1). The influence of steroids and aminosaliculates was not evaluable, because, respectively, three and two

CD patients were treated with such medications. Similarly, only one patient had a personal history of digestive neoplasia (colon adenoma). MTHFR 677 TT was the only genetic determinant that was significantly associated with an increased t-Hcy in both controls (10.2, 8.6–12.1 vs 12.5, 9.9–17.0, $P = 0.0030$) and CD patients (Table 1). The plasma t-Hcy level was slightly higher in CD subjects carrying the MTR 2756 AA genotype, but the difference did not reach statistical significance ($P = 0.0910$).

Vitamin B₁₂ and folate levels were significantly associated with t-Hcy in univariate analysis (Fig. 2). Age, vitamin B₁₂, and folate levels independently influenced plasma t-Hcy, in multiple regression analysis ($P < 0.0001$, $P = 0.0014$, $P = 0.0005$, respectively).

We investigated whether the clinical characteristics of the 140 CD patients may influence their serum folate and vitamin B₁₂ status. CD patients with a personal history of ileal resection (median 156 vs 208 pmol/L, $P = 0.0389$), ileitis (median 159 vs 219 pmol/L, $P = 0.0261$), or colectomy (median 155 vs 206 pmol/L, $P = 0.0246$) had significantly lower vitamin B₁₂ levels than CD subjects without these characteristics. Active smoking was the single factor negatively associated with serum folate level in CD subjects (median 6.6 vs 9.2 nmol/L in nonsmoking CD patients, $P = 0.0123$).

In multivariate analysis, vitamin B₁₂ and MTHFR 677 TT carriage were the two significant independent predictors of plasma t-Hcy > 15 $\mu\text{mol/L}$ (Table 2).

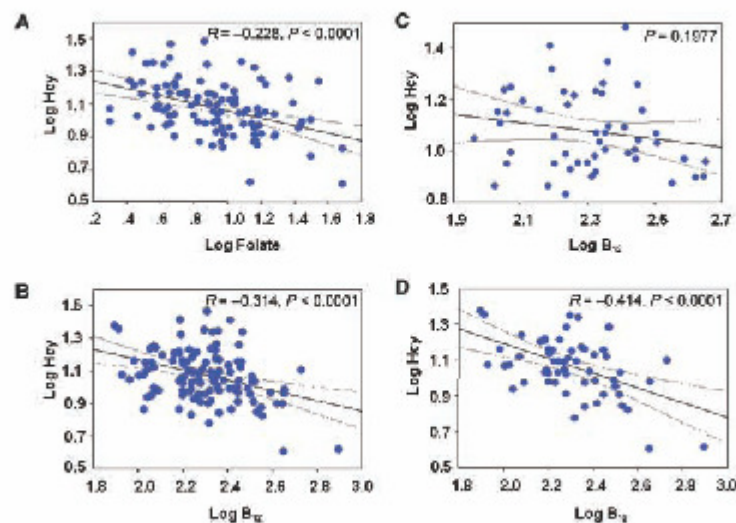


Figure 2. Homocysteine concentrations are correlated with folate (A) and vitamin B₁₂ (B) levels in CD patients. The association between homocysteine and vitamin B₁₂ remains significant in CD patients with a concentration of superoxide dismutase (SOD) higher than 1,100 U/L hemoglobin (median) (D) and not in those with a lower SOD activity (C).

Genetic Determinants of Plasma Homocysteine Level in CD Patients and Controls

The genotype distributions of *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, and *TCN* polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium (data not shown). The allele distributions of *MTHFR*, *MTR*, and *TCN* polymorphisms did not differ between controls and CD patients. In contrast, the frequency of the A allele for *MTRR* genotype was 1.34-fold higher in CD subjects than in controls (Table 3).

The same conclusion was reached when considering the genotypes instead of alleles, with *MTRR* 66AA that was 3-fold more frequent in CD patients (Table 3).

The association of polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes with the risk of CD was estimated by stepwise logistic regression analysis using a model that retained age, sex, and the variables that had a *P* value < 0.10. We confirmed that the only significant independent predictor of CD risk was *MTRR* AA carriers, with an odds ratio for CD risk estimated at 3.77 (Table 4).

Homocysteine Metabolism, Disease Activity, and Oxidant Stress

We examined the association of polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes with SOD level. The

Table 2. Factors Associated With Hyperhomocysteinemia (>15 μmol/L) in CD Patients (Multiple Logistic Regression Analysis)

Variable	Initial			Residual		
	OR	95% CI	P Value	OR	95% CI	P Value
CDAI score	0.99	(0.98–1.00)	0.0981	—	—	NS
Serum folate	0.95	(0.87–1.03)	0.2263	—	—	NS
Vitamin B ₁₂	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
Albumin	1.04	(0.89–1.21)	0.5923	—	—	NS
C-reactive protein	1.02	(0.97–1.07)	0.4795	—	—	NS
Azathioprine use	1.12	(0.26–4.76)	0.8768	—	—	NS
Infliximab use	1.96	(0.27–14.37)	0.5092	—	—	NS
Methotrexate use	3.26	(0.14–75.79)	0.4609	—	—	NS
<i>MTHFR</i> 677 TT	16.35	(1.09–244.97)	0.0430	6.40	(1.76–23.31)	0.0048
<i>MTHFR</i> 1298 CC	5.55	(0.52–59.33)	0.1562	—	—	NS
<i>MTR</i> 66 GG	2.46	(0.36–16.94)	0.3591	—	—	NS
<i>MTR</i> 2756 AG/GG	1.26	(0.35–4.56)	0.7239	—	—	NS

OR = odds ratio; CI = confidence interval; NS = not significant.

Table 3. Genotype Frequencies and Minor Allele Frequencies of Genetic Polymorphisms in CD Patients and Controls

	Controls: Percentage (95% CI)	CD Patients: Percentage (95% CI)	P Value
<i>MTHFR 677</i>			
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)	
Allele T	0.36 (0.32–0.40)	0.33 (0.28–0.39)	0.4151
<i>MTHFR 1298</i>			
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)	
Allele C	0.34 (0.30–0.38)	0.36 (0.31–0.42)	0.6010
<i>MTR 2756</i>			
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)	
Allele G	0.17 (0.14–0.21)	0.22 (0.17–0.27)	0.1273
<i>MTRR 66</i>			
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)	
Allele G	0.62 (0.56–0.68)	0.49 (0.43–0.55)	0.0019
<i>TCN 776</i>			
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)	
Allele G	0.43 (0.39–0.48)	0.45 (0.39–0.51)	0.3839

CI = confidence interval.

latter was significantly higher in CD subjects carrying *MTRR* AA genotype, compared with those carrying GG genotype (Fig. 3), while the other polymorphisms, *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, and *TCN2*, had no significant influence on this biological parameter (data not shown).

The relation between oxidant stress and disease severity and *MTRR* polymorphism was next investigated. There was a significant association between the distribution in quartiles of CDAI scores and the level of SOD in patients with the *MTRR* AA genotype (Fig. 3), but not in those with the AG/GG genotypes. Finally, we investigated the association between t-Hcy and vitamin B₁₂ (the substrate of *MTRR*), according to SOD activity, in CD patients. There was a significant association only in patients who had a SOD activity higher than the median (Fig. 3). In contrast, there was no influence of SOD activity on the association between t-Hcy and folate.

DISCUSSION

Patients with CD have significantly higher blood levels (9) with one-fourth of them who presented with moderate hyperhomocysteinemia in our study. As previously reported by other groups, folate and vitamin B₁₂ levels were significantly lower in IBD subjects compared to healthy controls (9). While homocysteine concentration was associated with both vitamin B₁₂ and folate levels in univariate analysis, the multivariate analysis revealed that only vitamin B₁₂, but not folate, was an independent predictor of hyperhomocysteinemia in our population of CD patients. As recently demonstrated by Rogers *et al.* (19), plasma homocysteine may be an accurate predictor of folate deficiency under physiological conditions, but may not reflect folate deficiency in cases of increased oxidative stress. A personal history of ileal

Table 4. Stepwise Logistic Regression of the Association of Genetic Determinants of Homocysteine Metabolism With the Risk of CD

Variable	Initial Multivariate Model			Residual Determinant		
	OR	95% CI	P Value	OR	95% CI	P Value
<i>MTHFR 677</i> CT carriers	1.231	(0.491–3.087)	0.6576	–	–	NS
<i>MTHFR 677</i> TT carriers	1.770	(0.450–6.970)	0.4141	–	–	NS
<i>MTHFR 1298</i> AC carriers	2.159	(0.845–5.519)	0.1080	–	–	NS
<i>MTHFR 1298</i> CC carriers	2.946	(0.676–12.849)	0.1504	–	–	NS
<i>MTRR</i> AA carriers	4.132	(1.299–13.149)	0.0163	3.77	(1.22–11.65)	0.0213
<i>MTR 2756</i> AG carriers	1.401	(0.609–3.223)	0.4275	–	–	NS
<i>MTR 2756</i> GG carriers	8.064	(1.023–63.593)	0.475	–	–	NS
<i>TCN 776</i> CG carriers	1.362	(0.463–4.007)	0.5742	–	–	NS
<i>TCN 776</i> GG carriers	1.207	(0.466–3.123)	0.6984	–	–	NS

OR = odds ratio; CI = confidence interval; NS = not significant.

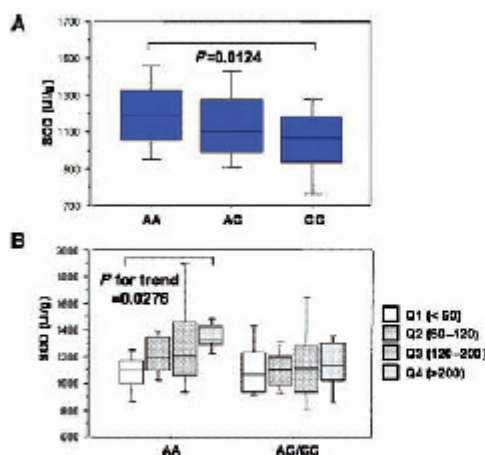


Figure 3. Association between superoxide dismutase (SOD) activity and *MTHFR* polymorphism (A). A significant association between SOD activity and the quartile distribution of Crohn's Disease Activity Index (CDAI, Q1–Q4) was found in the patients with *MTHFR* AA genotype, but not in those with the AG/GG genotypes (B).

resection or colectomy, but also pure ileitis, were risk factors for B₁₂ deficiency and hyperhomocysteinemia in this cohort of CD patients, through deficient absorption capacity of the ileum and also probably through bacterial colonization leading to malabsorption of vitamin B₁₂ (20, 21). Active smoking was associated with significantly lower folate levels, confirming previous reports in non-IBD patients (22). Taken as a whole, these findings underscore the relevance of screening CD patients for folate and vitamin B₁₂ deficiencies, particularly those with ileal disease, active smoking, and/or history of intestinal resection. Azathioprine was the single drug that appeared to decrease t-Hcy, suggesting interactions between azathioprine and homocysteine metabolisms. Consistently, thiopurine methyltransferase (TPMT) inactivates 6-mercaptopurine, the azathioprine active metabolite, by transferring a methyl group from S-adenosylmethionine to 6-mercaptopurine, forming S-adenosylhomocysteine that is subsequently hydrolyzed into homocysteine (Fig. 1) (23). Genetic variation in the *MTHFR* gene may result in reduced S-adenosylmethionine concentrations, leading to enhanced TPMT enzyme degradation and possibly modulating azathioprine efficacy (23).

We also evaluated the influence of genetic determinants on homocysteine level in CD patients. There was a significant association of *MTHFR* 677 TT genotype with t-Hcy as in the general population, but this polymorphism had no influence on CD risk. These results are in agreement with four studies in Southern Europe (two Italian, one French, one Portuguese) that found no association between *MTHFR* TT genotype and IBD (24–27), whereas two studies in Northern Europe re-

ported a significantly increased frequency of the *MTHFR* TT genotype in IBD patients (8, 28). Ethnic and geographical variations in the distribution of *MTHFR* variants may explain such discrepancy between genetic studies in IBD, since *MTHFR* has a lower phenotypic influence on homocysteine metabolism in white populations from South Europe than in those from North Europe (29). In a small series of IBD patients, no change in frequency of *MTHFR* A1298C genotype was seen when compared to controls (30), while the possible implication of *MTR* and *MTRR* polymorphisms in CD pathogenesis had never been investigated so far. The gene variants *MTHFR* 1298 A>C, *MTR* 2756 A>G, *MTRR* 66A>G, and *TCN2* 677C>G did not influence homocysteine level in the present study. Gender was also a genetic determinant that influenced t-Hcy in CD patients, in univariate analysis. However, it was not retained as an independent determinant of t-Hcy, in multivariate analysis. The difference did not reach statistical significance in controls, probably because of the limited sample size. Indeed, differences between men and women in t-Hcy have been documented in larger samples of healthy populations and may be partially explained by differences in rates of homocysteine remethylation (31).

Moderate hyperhomocysteinemia was not associated with an increased risk of thrombosis in our study, confirming recent reports (32). More interestingly, a growing body of evidence indicates that homocysteine may induce a cellular and vascular stress that could contribute to the maintenance of a chronic mucosal inflammatory state in IBD patients (9, 33). Consistently, homocysteine levels may be correlated with activity, number of flares, and duration of the disease (34), underscoring the potential implication of homocysteine metabolism in IBD pathogenesis.

In this context, the finding that *MTRR* AA was associated with an increased risk of CD as well as an increased activity of SOD may yield a better understanding of the role of homocysteine metabolism in IBD pathogenesis. Extensive experimental data have revealed a central role for oxidative stress in atherogenesis (35). Interestingly, *MTRR* AA genotype was recently found to be an independent predictor of coronary artery disease risk, another chronic inflammatory disease (36). *MTRR* catalyzes the regeneration of methylcobalamin in a reduced form, during the catalytic cycle (Fig. 1). Therefore, the association of the *MTRR* A allele with CD may be considered in function of the increased need for cobalamin reduction in cells challenged by oxidative stress. Indeed, the metabolic function of *MTRR*, e.g., to maintain vitamin B₁₂ in a reduced form, may be critical in cellular conditions where oxidant stress is increased. This could explain why vitamin B₁₂ was associated with homocysteine level only in the CD patients who had a high SOD activity (exceeding the median value). Indeed, vitamin B₁₂ concentration in bowel mucosa could specifically depend on oxidative stress in these patients, and hyperhomocysteinemia viewed as a consequence of vitamin B₁₂ deficiency. Recently, Rogers et al. showed that folate deficiency had no influence on homocysteine concentration in mice with a genetically determined increase of oxidant

stress (19). Consistently with this observation, we found that increased homocysteine plasma level was depending on vitamin B₁₂, but not on folate, in the CD patients who had the highest SOD activity. MTRR needs NADPH as a coenzyme, and the cellular oxidant stress (11,12), including the increased production of hydrogen peroxide by increased activity of SOD in intestinal mucosa of IBD patients, may be a condition that increases the cellular consumption in NADPH. An increase of glutathione synthesis by the transsulfuration pathway may be also expected in cases of deficient remethylation of homocysteine, and the reduction of glutathione, in a context of oxidant stress, is catalyzed with NADPH as co-substrate (11, 12). Another condition that may reduce the cellular content in NADPH is the increased activity of NOX1 reported in the intestinal mucosa of IBD patients (37). The link between MTRR and oxidant stress in CD pathogenesis was also illustrated by an association between disease severity (as measured by CDAI scores) and the SOD activity that was restricted to CD patients carrying *MTRR* 66AA genotype. These findings are consistent with experimental data from animal studies showing that SOD transgenic mice exhibit a more severe colitis after dextran sulfate sodium administration than their wild-type littermates (38).

The association of *MTRR* A allele with CD needs to be confirmed in large independent cohorts. The identification of a link between oxidant stress, vitamin B₁₂ metabolism, and disease severity in patients with CD may open new avenues for intervention and follow-up studies. The relationship between vitamin B₁₂ metabolism and homocysteine in colonic inflammation is illustrated by the recent finding that homocysteine upregulates *in vitro* the expression levels of transcobalamin (a plasma transporter of vitamin B₁₂) and its receptor (39). The authors also showed high expression levels of transcobalamin and its receptor in inflamed colon mucosa of 6-trinitrobenzene sulfonate-treated rats and CD patients (39). For translating these data into clinical management, the benefit of vitamin supplementation in CD patients with evidenced B₁₂ deficit will need to be assessed in intervention studies, using SOD activity as a marker and *MTRR* A allele as a predictor. B-group vitamin supplementation may have antioxidant and antiinflammatory effects independently of a homocysteine-lowering effect (40), suggesting that these intervention studies will aim at normalizing vitamin B₁₂ levels instead of homocysteine concentrations.

STUDY HIGHLIGHTS

What Is Current Knowledge

- Hyperhomocysteinemia is commonly found in patients with inflammatory bowel disease.
- The implication of genetic determinants other than *MTHFR* remains unknown.
- Hyperhomocysteinemia is associated with increased oxidant stress.

What Is New Here

- *MTRR* AA genotype may be an independent predictor of Crohn's disease risk.
- *MTRR* 66A>G polymorphism is associated with oxidant stress and disease activity.

Reprint requests and correspondence: Professor Jean-Louis Gueant, M.D., D.Sc., Inserm, U724, University Henri Poincaré and CHU of Nancy, Allée du Morvan, 54511 Vandœuvre-les-Nancy Cedex, France.

Received June 19, 2007; accepted August 21, 2007.

REFERENCES

1. Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10:111-3.
2. Chen J, Stampfer MJ, Ma J, et al. Influence of a methionine synthase (D919G) polymorphism on plasma homocysteine and folate levels and relation to risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2001;154:667-72.
3. Leclerc D, Wilson A, Dumas R, et al. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3059-64.
4. Goyette P, Christensen B, Rosenblatt DS, et al. Severe and mild mutations in cis for the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene, and description of five novel mutations in *MTHFR*. *Am J Hum Genet* 1996;59:1268-75.
5. Namour F, Olivier J, Abdelmoutaleb I, et al. 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.
6. den Heijer M, Rosendaal FR, Blom HJ, et al. Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: A meta-analysis. *Thromb Haemostasis* 1998;80:874-7.
7. Perry IJ, Refsum H, Morris RW, et al. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet* 1995;346:1395-8.
8. Mahmud N, Molloy A, McPartlin J, et al. Increased prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase C677T variant in patients with inflammatory bowel disease, and its clinical implications. *Gut* 1999;45:389-94.
9. Peyrin-Biroulet L, Rodriguez-Gueant RM, Chamaillard M, et al. Vascular and cellular stress in inflammatory bowel disease: Revisiting the role of homocysteine. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1108-15.
10. Danese S, Papa A, Saibeni S, et al. Inflammation and coagulation in inflammatory bowel disease: The clot thickens. *Am J Gastroenterol* 2007;102:174-86.
11. McKenzie SJ, Baker MS, Buffinton GD, et al. Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1996;98:136-41.
12. Middleton SJ, Shorthouse M, Hunter JO. Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. *Lancet* 1993;341:465-6.
13. 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.

14. Wang XL, Duarte N, Cai H, et al. 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.
15. Moat SJ, Bonham JR, Cragg RA, et al. Elevated plasma homocysteine elicits an increase in antioxidant enzyme activity. *Free Radic Res* 2000;32:171–9.
16. Dincer Y, Erzin Y, Himmetoglu S, et al. Oxidative DNA damage and antioxidant activity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2007;52:1636–41.
17. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, et al. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: Controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;55:749–53.
18. Barbe F, Abdelmoutaleb I, Chango A, et al. Detection of moderate hyperhomocysteinemia: Comparison of the Abbott fluorescence polarization immunoassay with the Bio-Rad and SBD-F high-performance liquid chromatographic assays. *Amino Acids* 2001;20:435–40.
19. Rogers EJ, Chen S, Chan A. Folate deficiency and plasma homocysteine during increased oxidative stress. *N Engl J Med* 2007;357:421–2.
20. Vasilopoulos S, Saiean K, Emmons J, et al. Terminal ileum resection is associated with higher plasma homocysteine levels in Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol* 2001;33:132–6.
21. Oostenbrug LE, van Dullemen HM, te Meerman GJ, et al. 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.
22. Gabriel HE, Crott JW, Ghandour H, et al. 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.
23. Arenas M, Simpson G, Lewis CM, et al. Genetic variation in the MTHFR gene influences thiopterine methyltransferase activity. *Clin Chem* 2005;51:2371–4.
24. Papa A, De Stefano V, Danese S, et al. Hyperhomocysteinemia and prevalence of polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2677–82.
25. Guedon C, Le Cam-Duchez V, Lalaude O, et al. 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.
26. Vecchi M, Sacchi E, Saibeni S, et al. Inflammatory bowel diseases are not associated with major hereditary conditions predisposing to thrombosis. *Dig Dis Sci* 2000;45:1465–9.
27. Magro F, Dinis-Ribeiro M, Araujo FM, et al. High prevalence of combined thrombophilic abnormalities in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:1157–63.
28. Bjerregaard LT, Norderby NJ, Fredholm L, et al. Hyperhomocysteinemia, coagulation pathway activation and thrombophilia in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:62–7.
29. Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Debarb R, et al. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: A comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr* 2006;83:701–7.
30. Fernandez-Miranda C, Martinez Prieto M, Casis Herce B, et al. Hyperhomocysteinemia and methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T and 1298A→C mutations in patients with inflammatory bowel disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2005;97:497–504.
31. Fukagawa NK, Martin JM, Wurthmann A, et al. Sex-related differences in methionine metabolism and plasma homocysteine concentrations. *Am J Clin Nutr* 2000;72:22–9.
32. Bernstein CN, Sargent M, Vos HL, et al. Mutations in clotting factors and inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2007;102:338–43.
33. Danese S, Sgambato A, Papa A, et al. Homocysteine triggers mucosal microvascular activation in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2005;100:886–95.
34. Drzewoski J, Gasiorowska A, Malecka-Panas E, et al. Plasma total homocysteine in the active stage of ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:739–43.
35. Madamanchi NR, Runge MS. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res* 2007;100:460–73.
36. Gueant-Rodriguez RM, Juilliere Y, Candito M, et al. Association of MTRRA66G polymorphism (but not of MTHFR C677T and A1298C, MTR2756G, TCN C776G) with homocysteine and coronary artery disease in the French population. *Thromb Haemostasis* 2005;94:510–5.
37. Szanto I, Rubbia-Brandt L, Kiss P, et al. Expression of NOX1, a superoxide-generating NADPH oxidase, in colon cancer and inflammatory bowel disease. *J Pathol* 2005;207:164–76.
38. Kriegelstein CF, Cerwinka WH, Laroux FS, et al. 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.
39. Kalra S, Ahuja R, Binion DG, et al. Upregulation of transcobalamin (TC) and its receptor in colonic inflammation: Effect of homocysteine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007 Jul 19; [Epub ahead of print].
40. Ullegaddi R, Powers HJ, Gariballa SE. B-group vitamin supplementation mitigates oxidative damage after acute ischaemic stroke. *Clin Sci (Lond)* 2004;107:477–84.

CONFLICT OF INTEREST

Guarantor of the article: Professor Jean-louis Guéant, M.D., D.Sc.

Specific author contributions: Laurent Peyrin-Biroulet and Jean-Louis Guéant, conception and design, recruitment of patients, analysis and interpretation of data, and drafting of the manuscript. Rosa-Maria Guéant-Rodríguez, biological and genetics analyses, interpretation of data, statistical analyses, revising of the manuscript. Marc-André Bigard and Jean-Pierre Bronowicki, recruitment of patients, interpretation of data, and revising of the manuscript. Min Chen, biological and genetics analyses and interpretation of data, statistical analyses. Jean-Louis Guéant, supervision of the study.

Financial support: The work was funded by grants from the Institut de Recherche des Maladies de l'Appareil digestif (IRMAD) to Laurent Peyrin-Biroulet.

Potential competing interests: None.

Discussion

Nous avons tout d'abord confirmé qu'une hyperhomocystéinémie modérée est fréquente au cours des MICI puis qu'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.* (2007) 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 oxydant 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 oxydant élevé (reflété dans notre étude par une activité de la SOD > 1100 UI/gd'hémoglobine), sont donc en accord avec ceux de Rogers *et al.* (2007). Dans les conditions pathologiques où est présent un stress oxydant 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 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 (Vasilopoulos *et al.* 2001, Ostenbrug *et al.* 2006). Un tabagisme actif était associé à des taux de folates significativement plus bas, confirmant les résultats d'études 87 menées chez des sujets sains (Gabriel *et al.* 2006). Cependant, contrairement à l'étude de Maire *et al.* (2001), 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 (TPMT) 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 homocystéine (Arenas *et al.* 2005). 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'azathioprine (Arenas *et al.* 2005).

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 générale (Brattstrom *et al.* 1998), 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 oxydant 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 (Guedon *et al.*

2001, Bernstein *et al.* 2007). 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 (Peyrin-Biroulet *et al.* 2007, Danese *et al.* 2005). 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 (Drzewoski *et al.* 2006). Ces données sont donc en faveur d'une implication directe du métabolisme de l'homocystéine dans la pathogénie des MICI, probablement via un stress oxydant accru. En effet, un stress oxydant 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 (Krieglstein *et al.* 2001). 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 oxydant et l'activité de la maladie. Le génotype *MTHFR* 677TT 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 *MTHFR* 677TT et le risque de MICI (Papa *et al.* 2001, Guedon *et al.* 2001, Vecchi *et al.* 2000, Magro *et al.* 2003). Deux études en Europe du Nord ont rapporté une fréquence significativement plus élevée du génotype *MTHFR* 677TT chez les patients MICI par rapport à des témoins (Bjerregaard *et al.* 2002, Mahmud *et al.* 1999). 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'Europe (Gueant-Rodriguez *et al.* 2006). Dans une petite série de patients avec une MICI, aucune variation de la fréquence du génotype *MTHFR* 1298C n'a été observée par rapport à des sujets témoins (Fernandez-Miranda *et al.* 2005). La possible implication des polymorphismes *MTR* et *MTRR* dans la pathogénie des MICI n'avait quant à elle jamais été étudiée. La découverte d'une association entre génotype *MTRRAA*, 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 oxydant anormalement élevé (Madamanchi *et al.* 2007, Gueant-Rodriguez *et al.* 2005). 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 (*MTRR*) régénère la forme fonctionnelle de la cobalamine (Brown *et al.* 2000). 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 oxydant 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 oxydant 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 Wuhan (Jiang *et al.* 2006) 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 2003 (Jiang *et al.* 2006). 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 (Leong *et al.* 2003, Guo *et al.* 2004). 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 RCH (Duerr *et al.* 2006). 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 oxydant, 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 récepteur (Kalra *et al.* 2007). 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 trinitrobenzènesulfonique (TNBS) ainsi que chez des patients avec une MC (Kalra *et al.* 2007). 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 plasmatique.

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-vasculaire (Bonaa *et al.* 2006)

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 folates (Phelip *et al.* 2008). Enfin,

le risque de complications osseuses et notamment d'ostéoporose pourrait être augmenté en cas d'hyperhomocystéinémie au cours de la MC (Roblin *et al.* 2007).

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.

Partie II : modèle animal des maladies inflammatoires chroniques intestinales chez le raton carencé

Matériels et Méthodes

1. Modèles d'étude

1.1 Entretien des animaux

Animaux: les animaux utilisés dans les expérimentations sont des rats Wistars (Charles River, l'Arbresle, France). Cinq mâles et Cinq femelles sont maintenus à une température ambiante de 23°C (± 3°C), avec un cycle jour/nuit de 12hrs, et un libre accès à la nourriture et à la boisson. Les animaux ont été traités en accord avec les recommandations du National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Régime alimentaire: Un régime carencé en groupement méthyles (Special Diet Service, Saint-Gratien, France) et un régime standard (Maintenance diet M20, Scientific Animal Food and Engineering, Villemoisson-sur-Orge, France) ont été utilisés. La composition du régime carencé est la suivante: vitamine B12 (0 µg/kg), B2 (0.34 mg/kg), folates (10 µg/kg) et choline (60 µg/kg). Le régime standard est un régime normal complet: vitamine B12 (0,04 mg/kg), B2 (13 mg/kg), folates (0,9 mg/kg), méthionine (4800 mg/kg) et choline (2100 mg/kg). Pour les animaux concernés, la carence a été maintenue jusqu'au moment du sacrifice des rats, tout au long de la gestation, de l'allaitement maternel et de l'alimentation postnatale.

Boisson: à J23 après la naissance, les rats sont soit traités avec de l'eau contenant du *Dextran sulfate sodium* (DSS) pour induire une colite inflammatoire, soit avec de l'eau sans DSS. Le DSS a un poids moléculaire de 10 000 kDa (MP Biomedicals, Strasbourg, France) et il est utilisé dilué à 5% dans l'eau du robinet.

Protocole: Un mois avant l'accouplement, les rats sont nourris avec une alimentation normale ou avec une alimentation carencée en groupements méthyles. Le DSS est administré à partir du vingt-troisième jour de vie (J23), au moment du sevrage des rats. Les rats reçoivent la même nourriture que leur mère, c'est-à-dire les rats issus d'une mère carencée ont une

alimentation carencée en vitamine B9, B12 et choline après leur sevrage, les rats issus de mère non carencés ont une alimentation normale après leur sevrage. Quatorze rats du groupe non carencé (n=26) et 16 rats du groupe carencé (n=29) reçoivent du DSS chaque jour jusqu'au sacrifice à J27. Les autres rats reçoivent de l'eau du robinet.

En fonction du régime alimentaire et de la présence ou non de DSS dans l'eau de boisson, 55 rats sont répartis en 4 groupes:

- 1) le groupe «non carencé/ sans DSS» (NC DSS-, n=12), comprenant les rats dont la mère a reçu une nourriture standard;
- 2) le groupe «non carencé/avec DSS» (NC DSS+, n=14), comprenant les rats dont la mère a reçu une nourriture standard mais traités avec le DSS ;
- 3) le groupe «carencé/sans DSS» (C DSS-, n=13), comprenant les rats dont la mère a reçu une nourriture carencée;
- 4) le groupe «carencé/avec DSS» (C DSS+, n=16), comprenant les rats dont la mère a reçu une nourriture carencée et qui ont été traités avec le DSS.

1.2 Recueil des prélèvements

Les rats sont anesthésiés sous halothane à l'âge de 27 jours. Le sang est prélevé par ponction dans la cavité cardiaque et transféré dans des tubes héparinés aussitôt centrifugés à 1000g/4°C /10min pour séparer le plasma et les globules rouges. Le plasma est ensuite conservé à -20°C et décongelé au moment de la mesure des concentrations plasmatiques des folates, vitamine B12 et homocystéine.

L'animal est sacrifié par décapitation puis le côlon entier est prélevé (avec le rectum), ouvert sur sa longueur et rincé dans du PBS1X (2,7 mmol/L KCl, 140 mmol/L NaCl, 6,8mmol/L Na₂HPO₄·2H₂O , 1,5mmol/L KH₂ PO₄, pH 7,4).

Les prélèvements de côlon destinés aux études d'immunohistofluorescence sont immergés dans une solution de méthylbutane froid (-30°C). Le côlon destiné aux analyses biochimiques

et de biologie moléculaire sont congelés dans de l'azote liquide. Tous les prélèvements sont ensuite conservés au congélateur à -80°C jusqu'à utilisation.

2. Evaluation de l'inflammation

2.1 Index d'activité de la maladie (DAI)

Le poids des rats, l'aspect des selles et la présence de sang dans les selles sont notés quotidiennement à partir de J22 jusqu'au jour du sacrifice à J27. L'index d'activité de la maladie (DAI) est calculé chaque jour, selon la méthode proposée par Kihara *et al.* (2003).

Calcul d'index d'activité de la maladie (D'après Kihara *et al.* 2003)

Score	Perte de poids	Consistance des selles	Présence de sang dans les selles
0	0%	Normale	Hémocult négatif
1	1-5%		
2	5-10%	Molle	Hémocult positif, absence de rectorragies
3	10-20%		
4	>20%	Liquide	Rectorragies

Une moyenne est calculée sur la base des scores de chacune des trois catégories

2.2 Etude histopathologique

Des coupes de côlon de $5\mu\text{m}$ d'épaisseur sont obtenues à l'aide d'un cryostat et sont colorées à l'Hématoxyline-Eosine-Safran (HES).

3. Dosages sanguins

3.1. Vitamines B12 et B9 (folates)

Les dosages ont été effectués sur des échantillons de plasma après centrifugation (1000g/4°C/10min) à l'aide du coffret commercial SimulTRAC-SNB (ICN Pharmaceuticals). Il s'agit d'un dosage radio-isotopique. La vitamine B12 et les folates non marqués entrent en compétition avec leurs homologues marqués (vitamine B12 [⁵⁷Co] et folates [¹²⁵I]) vis-à-vis d'un nombre restreint et constant de sites de fixation. Par conséquent, le taux de radioactivité liée est inversement proportionnel à la concentration de l'échantillon. Grâce à cette technique, les taux de vitamine B12 et de folates sont déterminés simultanément dans un seul tube, et la radioactivité de rayonnement gamma est mesurée par un compteur COBRA-IITM autogamma (Packard) à double canal.

Le coffret SimulTRAC-SNB renferme du facteur intrinsèque de porc purifié, disponible pour la liaison avec la vitamine B12, et fixé de manière covalente sur un support solide. Le même principe est appliqué pour les folates, en fixant sur un support un réactif de liaison lacté produit à partir du lait de vache. Le protocole utilisé est celui décrit par le fabricant : une droite d'étalonnage en 6 points est faite pour la vitamine B12 (0, 74, 148, 296, 740 et 1480pM) et pour les folates (0, 2.3, 4.5, 9.1, 23 et 45 nM).

3.2 Homocystéine

Les taux plasmatiques de l'homocystéine totale ont été déterminés par une technique de dosage immunoenzymatique par polarisation de fluorescence (FPIA) utilisant le système Imx Homocysteine system des laboratoires ABBOTT. Le dosage nécessite au moins 100 µL de plasma obtenu par centrifugation des tubes de sang à 1000g/10min/4°C.

Toutes les formes oxydées de l'homocystéine sont réduites par un traitement au dithiotréitol (DTT). L'homocystéine est ensuite transformée en S-adénosylhomocystéine (SAH)

par une SAH hydrolase bovine, en présence d'adénosine qui est l'autre substrat de la réaction. Un anticorps primaire monoclonal de souris anti-SAH est ajouté au mélange et le complexe SAH-anticorps anti-SAH sera détecté par un anticorps secondaire marqué à la fluorescéine. Le mélange réactionnel est aussi incubé avec la S-adénosylcystéine qui entrera en compétition avec la SAH sur les sites de liaison de l'anticorps primaire anti-SAH. L'intensité de la fluorescence est mesurée par le système FPIA, tandis qu'une droite d'étalonnage est établie pour six valeurs d'homocystéine (0, 2.5, 5, 10, 20 et 50 μ M).

4. Marqueur du stress oxydant, apoptose et inflammation

4.1 Superoxyde dismutase (SOD)

Il existe une forme cytoplasmique cuivre et zinc dépendante (SOD Cu/Zn) et une forme mitochondriale homotétramérique manganèse dépendante (SOD Mn). Ces deux isoformes de la SOD sont mesurées dans le même temps grâce à un système automatisé Ransod (Randox).

Principe: La xanthine et la xanthine oxydase (XOD) génèrent des radicaux O_2^- qui réagissent avec le chlorure de iodophényl-nitrophénol-phényltétrazolium (INT) pour former un colorant rouge, le formazan. L'activité de la SOD est mesurée par le degré d'inhibition de la réaction. La SOD mitochondriale utilise le manganèse comme co-facteur. L'activité de la SOD Mn est mesurée par la même technique après blocage de la SOD Cu/Zn par du cyanure.

Protocole: La procédure de dosage se fait selon les indications données par le fabricant (randox). Le mélange réactionnel contient un mélange de substrats (xanthine et INT), un tampon CAPS-EDTA, la xanthine oxydase purifiée (80U/L) et un étalon qui permet de constituer une gamme de dilution du standard (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/24). Le mélange réactionnel est incubé à 37°C puis l'absorbance à 505 nm est mesurée et servira de point initial pour la cinétique enzymatique. L'incubation est maintenue 3 minutes supplémentaires et l'absorbance

à 505 nm est de nouveau relevée. Le diluant sans solution étalon (S1) est considéré comme le 100% de réaction non inhibée. Tous les taux réactionnels des étalons et des échantillons dilués doivent être convertis en pourcentage du taux réactionnel de la solution de S1 puis soustraits à 100% pour donner un pourcentage d'inhibition. Les unités enzymatiques de la SOD sont calculées à partir de la gamme étalon et les résultats sont exprimés en U/mg de protéine.

4.2 Glutathion peroxydase (GPX)

Principe: oxydation du glutathion (GSH) par H_2O_2 , est une réaction catalysée par la GPX présente dans l'hémolysat. La quantité de glutathion oxydé (GSSG) formé est mesurée en dosant le nombre de micromoles de β -nicotinamide-adenine-dinucléotide-phosphate (NADPH) oxydés par minute et par gramme d'hémoglobine. La mesure du glutathion peroxydase est basée sur la méthode décrite par Yasuhara *et al.* (1998) qui repose sur une coloration des groupements thiols réducteurs par le réactif de Ellman.

Préparation du mélange réactionnel :

	C réaction	C stock	Volume
Homogénat tissulaire			100 μ l
DTT (pour glutathion total uniquement)	0,2mM	10mM	2 μ l
DTNB* (Ethanol)	1,8mM	25mM	8 μ l
<i>Mélanger et laisser 1min à température ambiante</i>			
Ajouter au mélange : $HClO_4$ (Ac. perchlorique)	3%	60%	5,5 μ l

*DTNB : réactif de Ellman, acide dithionitrobenzoïque.

Le mélange est agité au vortex, laissé 5min dans la glace, centrifugé à 12000g/4°C/10min et le culot éliminé. Le surnageant est filtré avec un filtre PVDF de 4mm de diamètre et de porosité 0.45 μ m. L'échantillon (8 μ l) est injecté dans un système de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) constitué d'une pompe à haute pression (TSP, P10000XR), un injecteur d'échantillon automatisé (TSP, AS100), une colonne contenant une résine de silice greffée en groupements octadécyls maintenu à 50°C à un débit constant de 0.8ml/min (générant

une pression d'environ 105 bar). Le gradient continu appliqué par la pompe consiste en un mélange de tampon A (phosphate de sodium 50mM, pH 3,5, tetrabutylammonium bromide 5mM) et de tampon B (phosphate de sodium 50mM, pH 3,5, tetrabutylammonium bromide 5mM, acétonitrile 30%) selon la procédure suivante:

Temps (min)	Proportion A	Proportion B
0	100%	0%
3	100%	0%
18	50%	50%
18.5	0%	100%
23.5	0%	100%
24	100%	0%
30	100%	0%

Le signal est mesuré par absorbance des groupements phényles du thionitrobenzoate à l'aide d'un spectrophomètre à 280nm (TSP, UV2000-ultraviolets). Les quantités de glutathion total et réduit sont calculées à partir d'une gamme de standards et les résultats sont exprimés en nmol/g tissu. Le glutathion total correspond aux valeurs mesurées après traitement de l'échantillon au DTT et le glutathion réduit aux valeurs mesurées sans traitement. Par déduction il est possible de calculer le glutathion oxydé et le rapport GSH/GSSG. Le glutathion total donne une indication sur les processus de synthèse de cette molécule tandis que le rapport GSH/GSSG donne une indication sur le statut redox cellulaire et le stress oxydant éventuel.

4.3 Immunohistologie

1) Les coupes de tissu réalisées à l'aide d'un cryostat (20 μ m) et disposées sur une lame de verre sont incubées à température ambiante successivement pendant 45 minutes dans de l'HCl (2 N), pendant 30 minutes du borate de sodium (0,1 mol/L) et rincées dans du PBS pendant 30 minutes ;

2) Chaque coupe est ensuite recouverte de BSA à 10% pour la saturation des sites non spécifiques ;

- 3) l'anticorps primaire est préparé extemporanément (Anti-cPLA2: AcI 1/200, souris; AcII 1/1000, Alexa Fluor 488, cell signaling), dilué dans 10% (v/v) de PBS-BSA et déposé sur les coupes. L'incubation est réalisée à 4°C pendant une nuit dans une chambre humide. à l'abri de la lumière et après lavages au PBS ;
- 4) l'anticorps secondaire, couplé à un fluorochrome, préparé extemporanément dans du PBS-BSA (10%), est déposé sur chaque coupe à température ambiante pendant 30 minutes ;
- 5) Afin de visualiser la cellule complète les coupes sont incubées en présence de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 0,5 µg/µl au maximum) après lavage au PBS, pendant 5 minutes à température ambiante ;
- 6) Les lames sont ensuite montées avec une lamelle et un milieu de montage (PBS-Glycérol, 50% ou Eukitt).

4.4 Western Blotting

Principe: La technique de marquage des protéines par immuno-empreinte permet de détecter les variations d'expression de certaines protéines à condition qu'il existe un anticorps capable de les complexer. La technique utilisée ici est la plus couramment employée et fait appel à une migration électrophorétique dans des conditions dénaturantes et un transfert sur membrane en milieu liquide.

Préparation des extraits protéiques

Extraction: Les tissus sont broyés dans l'azote liquide, puis mis en suspension dans un tampon de lyse (Tris-HCl 50mM; NaCl 250mM; Triton X100 1%; Deoxycholate 0.2%; SDS 0.1%; vanadate 0.5mM; EDTA 0.2mM; PMSF 1mM; et *protease inhibitor cocktail* 5%). Les échantillons sont agités au vortex, centrifugés à 20000g/4°C/30min et le culot éliminé.

Dosage: Le dosage des protéines totales s'effectue avec le kit BCA protein assay (Pierce) qui permet la coloration et la quantification des protéines avec l'acide bicinchonique. Une quantité de 20-100µg de protéines est utilisée par essai pour le western-blotting.

Electrophorèse sur gel en polyacrylamide

Le gel de polyacrylamide est préparé à l'aide d'un système mini-protean II (Bio-Rad) à une concentration de 12% pour des protéines de 20-40 kDa. Deux gels peuvent être migrés simultanément : les proportions ci-dessous correspondent donc à 2 gels préparés extemporanément.

Gel de séparation (10% ou 12%):

Agent	Volume(10%Gel)	Volume(12%Gel)
Mélange acry/bisacry 30%	6,16mL	8mL
Tampon Tris-Hcl(1,5M pH8,8), SDS 0,4%	5mL	5mL
Eau milliQ	4,16mL	7mL
Persulfate d'ammonium (APS) 10%	160µL	160µL
TEMED	48µL	48µL

Le mélange est remué à la main puis environ 7ml de solution sont déposés entre les 2 plaques de verre du système miniprotean (épaisseur 1,5mm). Un ml d'isopropanol est déposé à la surface du gel le temps de la polymérisation puis l'isopropanol est éliminé et le gel rincé avec une pissette d'eau distillée et séché à l'aide d'un papier Whatman. Le gel de concentration (4%) permet de concentrer les protéines au début de la migration électrophorétique et il est préparé selon les conditions suivantes :

Agent	Volume
Mélange acry/bisacry 30%	1,48mL
Tampon Tris-Hcl(1,5M pH6,8), SDS 0,4%	2,5mL
Eau milliQ	6,4mL
Persulfate d'ammonium (APS) 10%	80µL
TEMED	24µL

La migration est effectuée à voltage constant de 50V pendant 30min (générateur PowerPac-3000 Bio-Rad.) puis à 120V pendant au moins 2h, dans un tampon Tris 25mM, SDS 0,1%, glycine 192mM, pH 8,3.

Transfert sur membrane PVDF

Le transfert des protéines vers la membrane PVDF est effectué dans une cuve contenant du tampon de transfert (Tris 48mM, SDS 1,3mM, glycine 39mM, méthanol 20%, pH 9,2) à un ampérage constant de 350mA durant 45min.

Blocage de la membrane

La membrane PVDF contenant les protéines transférées est lavée 3x5min avec un tampon TBST (Tris-Hcl 20mM, pH7,4, NaCl 150mM, Tween-20 0,1%) à température ambiante et sous agitation douce. La membrane est bloquée en incubant 1h sous agitation douce dans un tampon TBST contenant 5% de lait écrémé puis lavée de nouveau 3x5min avec un tampon TBST.

Marquage anticorps primaire

Les anticorps primaires sont préparés à différentes dilutions selon leur spécificité mais toujours dans le tampon TBST-NFM (non fat milk 5%). Les membranes sont mises en présence de l'anticorps et incubées toute la nuit à 4°C sous agitation douce.

Marquage anticorps secondaire

La membrane est lavée 5x5min et 1x10min avec le tampon TBST à température ambiante et sous agitation moyenne. L'anticorps secondaire, dirigé contre le primaire, est de type HRP, i.e. possédant une activité peroxydase. Cet anticorps est dilué dans le tampon TBST-NFM (*non fat milk* 5%) à 1/1,000ème ou 1/10,000ème selon le cas. La membrane préalablement marquée avec l'anticorps primaire est incubée avec l'anticorps secondaire durant 1h à température ambiante et sous agitation douce.

Cible d'anticorps	Poids Moléculaire (KDa)	Dilution Anticorp I	Dilution Anticorp II	Source
Caspase 3	17/19	1/1000	1/10 000	Lapin
Bcl ₂	29	1/1000	1/1000	Chèvre
Bax	23	1/10 000	1/10 000	Lapin
p38	43	1/1000	1/1000	Lapin
cPLA ₂	110	1/1000	1/1000	Lapin
COX1	70	1/400	1/2000	Souris
COX2	72	1/1000	1/2000	Lapin
LOX	78	1/1000	1/2000	Lapin
Actin	45	1/1000	1/4000	Chèvre

Révélation des protéines immunomarquées

La membrane est lavée 2x10min à température ambiante et sous agitation moyenne avec un tampon TBST tandis que le réactif de révélation (ECL-plus, Amersham) est laissé à température ambiante. La membrane est égouttée à l'aide de papier absorbant et la préparation du réactif se fait selon les recommandations du fournisseur (à l'abri de la lumière). Le mélange réactionnel est incubé sur la membrane pendant 2 min à température ambiante puis la membrane est égouttée légèrement, placée entre deux films « Saran » et déposée dans une cassette de révélation de film photographiques. La révélation se fait en chambre noire à l'aide de liquides de révélation et de fixation photographique. Le film est lavé à l'eau distillée et mis à égoutter jusqu'à ce qu'il soit complètement sec.

4.5 RT-PCR

Principe: L'étude de l'expression des gènes a été réalisée par RT-PCR en temps réel (*real-time Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction*) afin de détecter la concentration des ARNm. Le principe de cette technique consiste à extraire les ARN totaux des tissus à analyser et de les copier in vitro en ADNc (ADN complémentaire) simple brin grâce à l'action de la transcriptase inverse, étape obligatoire avant la polymérisation en chaîne qui met en oeuvre une ADN polymérase. Les molécules d'ADNc obtenues servent de matrice pour cette réaction et un

fragment de l'ADNc cible est amplifié en utilisant un couple d'amorces spécifiques correspondant à la séquence de l'ARN d'intérêt. Le principe de l'amplification in vitro repose sur la répétition de trois processus: 1) La dénaturation des 2 brins d'ADN à 94°C ; 2) L'hybridation d'oligonucléotides (amorces) complémentaires d'une séquence cible d'ADN monocaténaire à une température d'hybridation spécifique ;3) La réaction d'élongation par une ADN polymérase thermostable (Taq DNA polymerase) à partir des oligonucléotides, réalisée à la température optimale de 72°C.

Préparation des extraits ARN

Extraction: Les échantillons de tissu colique sont broyés dans l'azote liquide, les ARN totaux ont été isolés du tissu colique par le kit RNeasy mini plus (Qiagen) en suivant scrupuleusement les instructions du fabricant.

Dosage: Les concentrations en ARN sont mesurées par spectrophotométrie à 260 nm, sachant qu'une unité de DO correspond à 40 µg/mL d'ARN. Une autre mesure à 280 nm permet d'estimer la contamination des ARN par des protéines résiduelles. Les expériences ont été entreprises sur les échantillons ayant un rapport d'absorbance 260nm/280nm entre 1.8 et 2.0. L'intégrité des ARN est finalement estimée par électrophorèse en gel d'agarose 1% préparé dans un tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) contenant du bromure d'éthidium (BET) à 1% (Invitrogen).

La RT-PCR en temps réel

La RT-PCR est faite avec le Kit RT Quanti Tec Reverse Transcription conformément aux recommandations du fabricant (Qiagen). Les amorces suivantes sont utilisées pour l'amplification des ARN du TNF- α et RP 29 (*Ribosomal protein 29*, gène de référence).

TNF- α :

Sens: 5'ATG GGC TCC CTC TCA TCA GT 3'

Anti-Sens: 5' GCT TGG TGG TTT GCT ACG AC 3'

RP 29:

Sens: 5'ATG GGT CTA CAG CAG CTC TA 3'

Anti-Sens : 5'GCC CGT ATT TAC GGA TCA GA 3'

Le mélange réactionnel (20µl en total) contient: deux amorces (0,6µl), cDNA (1µl), 10X Quanti Tec SYBR Green Master Mix (10µl), de l'eau MillQ (7,8µl)

Le programme d'amplification PCR: dénaturation (90°C 15min), PCR (90°C 10s, 58°C 15s, 72°C 10s, 46 cycle), courbe de fusion (94°C 5s, 67°C 15s, 94°C 0s, 1 cycle), refroidissement (40°C 30s).

Résultats

1. Observations générales

1.1 la mortalité

Cinq rates femelles sont incluses dans notre étude, deux reçoivent un régime non carencé et trois un régime carencé. Il y a eu 27 ratons nés de 2 mères non carencées et le taux de mortalité à l'issue du sevrage est de 3,7% (soit 1 décès). Il y a eu 34 ratons nés de 3 mères carencées et le taux de mortalité à l'issue du sevrage est de 14,7% (soit 5 décès). Le taux de mortalité est plus élevé dans le groupe carencé par rapport au groupe non carencé ($P < 0,05$).

Le DSS augmente le taux de mortalité même si cette augmentation n'est pas significative. Après 4 jours de traitement le nombre de décès dans le groupe NCDSS+ est égal à 6 /14 ratons alors que dans le groupe CDSS+ il est égal à 8/16 ratons soit (42,9% vs. 50%, $P > 0,05$). A l'inverse, aucun décès n'a été constaté dans les groupes ne recevant pas de DSS (NC DSS- et C DSS-).

1.2 Etudes morphologiques

De grandes différences morphologiques ont été observées parmi les ratons dès la naissance. Les ratons issus d'une mère carencée sont nettement plus petits à la naissance que les ratons nés de mère non carencée. La différence de taille persiste avec l'âge : au 21^e jour postnatal, le raton carencé présente une taille significativement inférieure à celle du raton témoin ($19,1 \pm 1,2$ vs. $12,8 \pm 1,5$ cm, $P < 0,01$).

Par ailleurs, la pilosité des ratons carencés est très peu développée au 13^e jour postnatal. Concernant le système sensoriel, l'ouverture des yeux a lieu pour les ratons non carencés entre le 12^e et le 14^e jour, tandis qu'elle apparaît plus tardivement chez les ratons carencés (entre les 15^e et 17^e jours).

Les ratons carencés présentent différentes altérations. Ainsi, l'ensemble des ratons carencés présente une stéatose hépatique dès la naissance, une pilosité irrégulière. Une partie

des rats (environ 1/10) présente une altération du système squelettique comme une queue tordue ou une syndactylie. La morphologie particulière de la queue laisse supposer un défaut dans le processus de fermeture du tube neural (spina bifida). Pour la syndactylie, il est possible que la carence puisse perturber le cycle cellulaire et le programme d'apoptose physiologique (Figure 1).

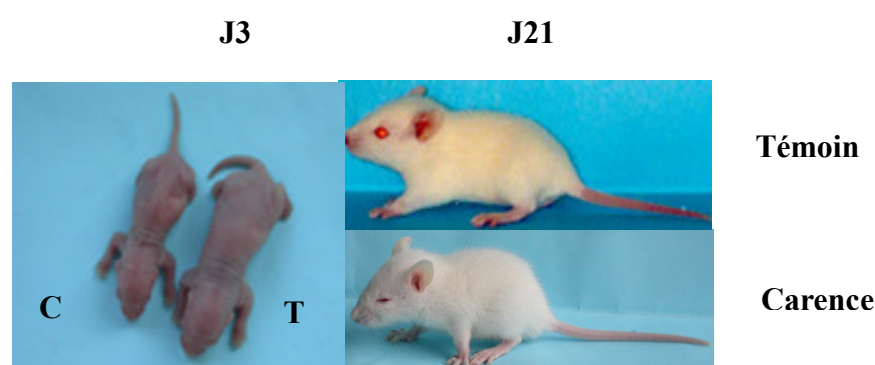


Figure 1: Effets de la carence sur le développement des jeunes rats.

Les images montrent différents stades du développement des rats à J3, J21.

Cette différence de taille s'accompagne d'une différence de poids entre la naissance et le sevrage. En effet, au premier jour les rats carencés pèsent en moyenne $5,3 \pm 0,3$ g alors que les rats témoins pèsent $6,8 \pm 0,7$ g ($P < 0,05$). Cet écart s'accroît avec le temps. Au 21^e jour postnatal, les rats carencés présentent un poids très nettement inférieur à celui des rats témoins ($17,7 \pm 4,3$ vs. $44,7 \pm 3,0$ g, $P < 0,0001$) (Figure 2). Enfin, il existe une corrélation entre les paramètres poids et taille ($z = 6.113$, $P < 0,0001$).

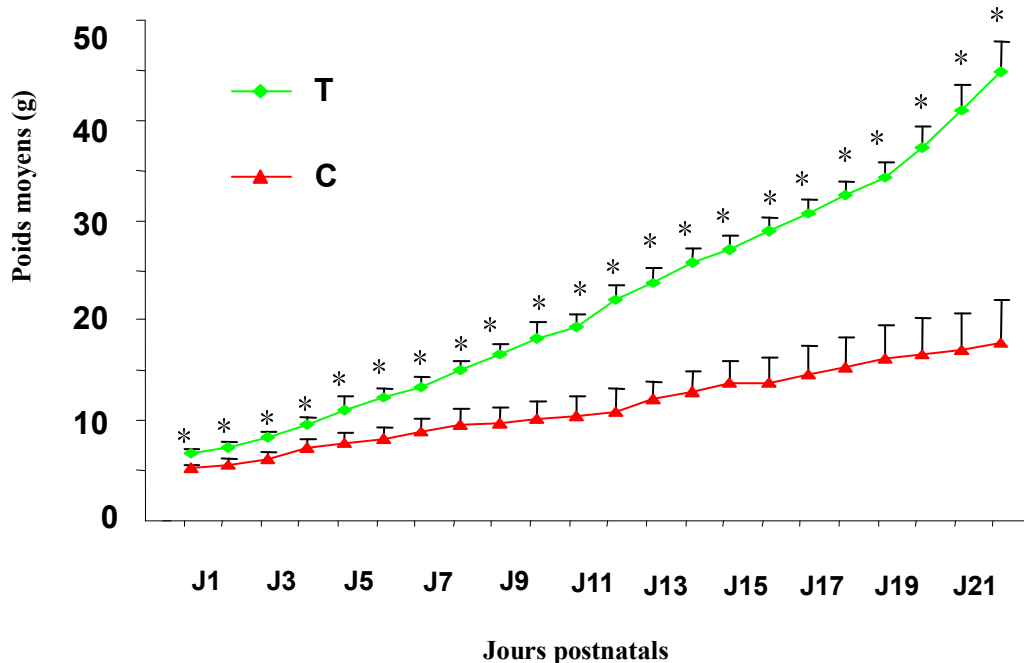


Figure 2: Représentation de l'évolution de la masse corporelle des rats entre la naissance et le sevrage (J21). Différence statistiquement significative, * C DSS- vs NC DSS-, $P < 0,05$, ANOVA, test de Fisher.

L'analyse statistique des courbes de croissance retrouve un effet significatif du régime alimentaire avec un ralentissement de la croissance pondérale chez les animaux C par rapport aux animaux NC qu'ils soient ou non traités par DSS ($P < 0,001$). La prise de DSS ne modifie pas significativement la taille ou la prise de poids (Figure 3).

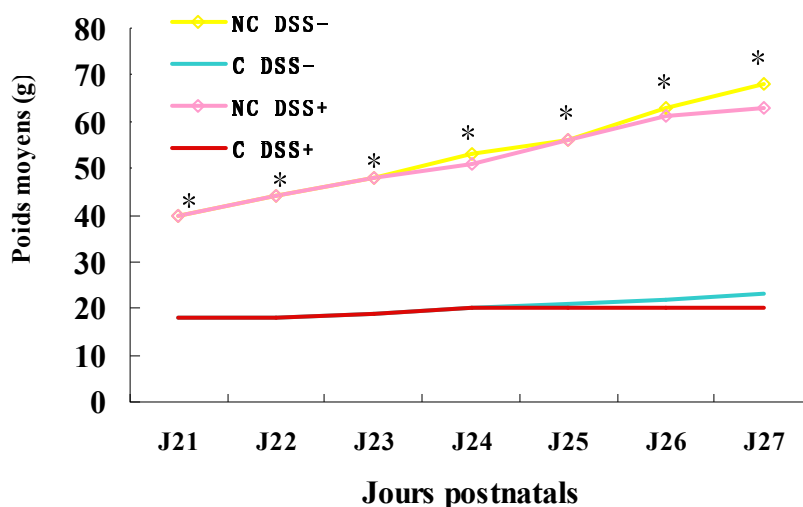


Figure 3: Représentation de l'évolution de la masse corporelle des rats entre J21 et J27. Différence statistiquement significative, * C DSS -/+ vs NC DSS -/+, $P < 0,05$, ANOVA, test de Fisher.

1.3 Index d'activité de la maladie (DAI)

Des signes cliniques de colite inflammatoire sont recherchés. Le poids, la consistance des selles et la présence de sang dans les selles ont été observés quotidiennement pour chaque rat. Une moyenne de DAI est calculée pour chacun des groupes.

Dès le deuxième jour de traitement les animaux traités par DSS (DSS+) montrent des signes de souffrance, une colite inflammatoire avec anorexie, rectorragie ou présence de sang dans les selles. Ces syndromes de colite inflammatoire s'aggravent avec le temps.

Les rats du groupe C DSS+ présente un DAI supérieur à celui des rats du groupe NC DSS+ au deuxième jour ($0,239 \pm 0,333$ vs. $0,084 \pm 0,229$, $P=0,047$), troisième jour ($2,179 \pm 0,897$ vs. $0,215 \pm 0,484$, $P < 0,01$) et au quatrième jour de traitement ($2,900 \pm 0,684$ vs. $0,668 \pm 0,849$, $P < 0,01$). En revanche, il n'y a aucun signe clinique en faveur de manifestations inflammatoires dans les groupes qui ne reçoivent pas de DSS (NC DSS- et C DSS-). Leurs selles de ces rats sont de consistance normale sans présence, il n'y a pas de sang et leur prise de poids est satisfaisante, le DAI est à 0 (Figure4).

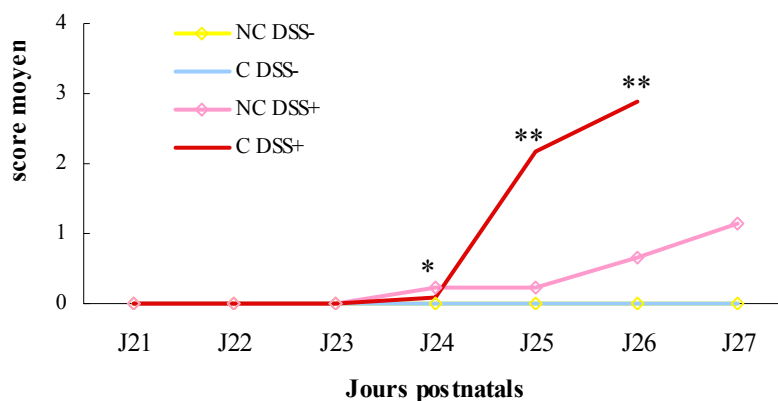


Figure 4: Représentation graphique d'index d'activité de la maladie (DAI) moyen quotidien des rats entre J21 et J27. Différence statistiquement significative, * C DSS+ vs. NC DSS+, $P < 0,05$; ** C DSS+ vs. NC DSS+, $P < 0,01$, ANOVA, test de Fisher.

1.4 Etudes histopathologiques

Les analyses histologiques sont effectuées sur un échantillon de côlon distal pour chacun des groupes. Il existe une colite inflammatoire chez les animaux DSS+ par rapport aux animaux DSS- (Figure 5). Les glandes digestives sont nécrosées, la sous-muqueuse est œdématiée, elle présente un infiltrat inflammatoire de cellules mononuclées, les vaisseaux sont dilatés et des thromboses vasculaires sont identifiées. La carence en donneurs de méthyle ne semble pas avoir d'effet inflammatoire sur le côlon.

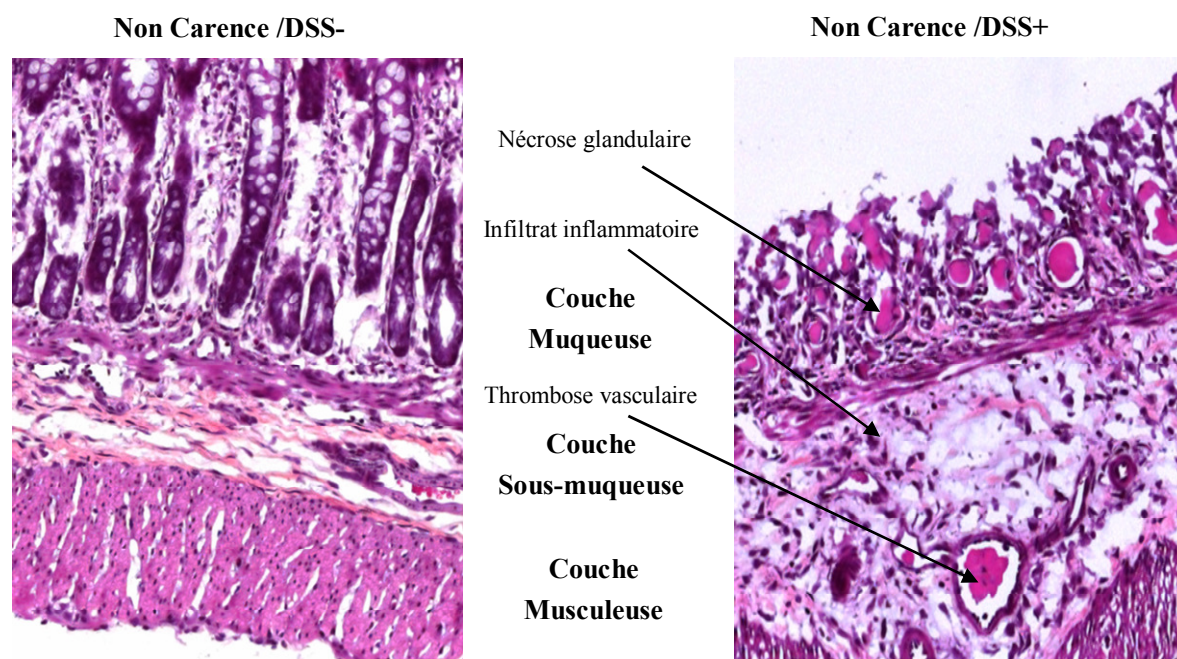


Figure 5 : Observation d'une inflammation dans le côlon de rat du groupe NC / DSS+.
Examen histologique de coupes de côlon de rat, coloration Hematoxyline-Eosine-Safrà (HES) grossissement X100.

2. Concentrations plasmatiques en vitamine B12, folates et homocystéine

Par rapport au groupe normal, le groupe carencé présente une réduction des taux plasmatiques en vitamine B9 et B12. La carence en précurseurs de méthyles (folate et vitamine B12) induit une élévation de l'Hcy comparable à celle observée chez des patients malnutris ou ayant des désordres génétiques conduisant à des réduction d'activité enzymatique.

Tableau 1 Concentrations plasmatiques en folate, vitamine B12 et homocystéine

	NC/DSS- (n=12)	C/DSS- (n=13)
Vitamine B9 (folate) (nmol/L)	99±38	13±2*
Vitamine B12 (pmol/L)	919±54	489±27*
Homocystéine (μmol/L)	7,83±0,90	22.58±12,00*

* C DSS- vs. NC DSS-, $P < 0,01$, ANOVA, test de Fisher

3. Evaluation du stress oxydant : Superoxyde dismutase (SOD) et Glutathion peroxydase (GPX)

L'activité de la superoxyde dismutase (SOD), mitochondriale (Mn dépendante) ou cytoplasmique (Cu/Zn dépendante), est augmentée significativement chez les rats C DSS- par rapport aux rats NC DSS-. Cependant après traitement avec le DSS, cette différence disparaît.

Il existe une augmentation de l'activité Glutathion peroxydase (GPX) chez les rats C DSS- par rapport aux rats NC DSS-, mais la différence n'est pas significative. L'activité Glutathion peroxydase ne varie pas significativement entre les rats des quatre groupes.

Tableau 2. Activités Superoxyde dismutase (SOD) et Glutathion Peroxydase (GPX) mesuré à partir d'homogénats coloniques de rats

	NC/DSS-	C/DSS-	NC/DSS+	C/DSS+
SOD totale (UI/mg)	7,98±1,85	13,46±7,01*	8,11±2,41	7,65±1,08**
SOD Mn (UI/mg)	0,76±0,23	1,05±0,27*	0,53±0,12	0,74±0,17**
SOD Cu/Zn (UI/mg)	7,22±1,73	12,42±6,77*	7,58±2,3	6,91±1,01**
GPX (μmol/min/g)	64,86±6,95	84,55±31,77	66,97±15,33	69,03±14,88**

*C DSS- vs. NC DSS-, $P < 0,05$ ** C DSS+ vs. NC DSS+, $P > 0,05$ ANOVA, test de Fisher

4. Effet apoptotique: expression de caspase3, Bax et Bcl2

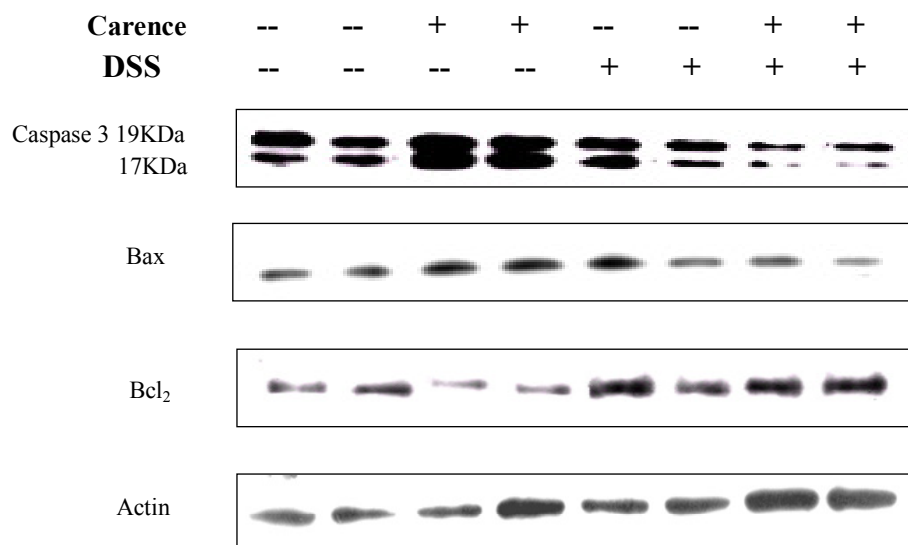
L'apoptose dans la muqueuse colique est analysée par « Western-Blotting ». Nous avons étudié l'expression des protéines de la famille Bcl2 et la caspase 3. La protéine Bcl2 est une protéine anti-apoptotique, la protéine Bax a des propriétés pro-apoptotiques de même que la protéine caspase 3. L'anticorps utilisé anti-caspase 3 détecte la forme activée de la caspase et génère deux fragments, dont les tailles sont de 17 et 19kDa.

Un effet sur l'apoptose est observé dans le groupe carencé traité par le DSS uniquement. Dans ce groupe il est noté une diminution de l'expression de la caspase 3 (C DSS+ vs. C DSS-,

$0,131 \pm 0,100$ vs. $0,696 \pm 0,370$, $P=0,012$, $n=6$) et de Bax (C DSS+ vs. C DSS-, $0,354 \pm 0,196$ vs. $0,715 \pm 0,196$, $P=0,015$, $n=6$) alors que l'expression de Bcl2 est augmentée (C DSS+ vs. C DSS-, $0,932 \pm 0,047$ vs. $0,578 \pm 0,117$, $P=0,044$, $n=6$).

Ces résultats suggèrent que la carence en groupements méthyles favorise un effet anti-apoptotique si les rats sont traités avec le DSS. La carence en groupements méthyles n'entraîne pas d'augmentation de l'apoptose par rapport aux à des rats contrôle. Le traitement du DSS ne modifierait pas l'expression de caspase3, Bax et Bcl2.

(A)



(B)

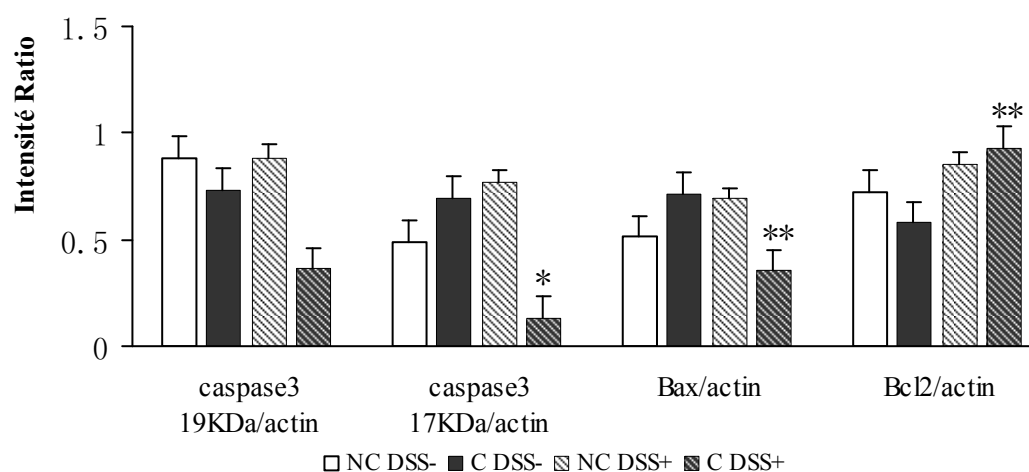


Figure 6 : Etude de l'expression de Caspase 3, Bax et Bcl₂ par Western blotting dans la muqueuse colique des rats (A) Image représentative de trois analyses (B) Analyse statistique de l'expression de Caspase 3, Bax et Bcl₂, * C DSS+ vs. C DSS- et C DSS+ vs. NC DSS+, $P < 0,05$ ** C DSS+ vs. C DSS-, $P < 0,05$

5. Effet sur l'inflammation

5.1 L'expression colique de TNF- α mRNA

Le TNF- joue un rôle central dans la cascade inflammatoire des MICI, notamment la MC (Reinecker *et al.* 1993, Schreiber *et al.* 1999).

Nous avons analysé l'effet de la carence sur les taux d'ARN messagers de TNF-alpha (Figure 7). L'analyse par RT-PCR réel, montre une augmentation des ARNm de TNF- α en situation de régime carencé par rapport à un régime normal (C DSS- vs. NC DSS- = $1,983 \pm 1,6$ vs. $0,887 \pm 0,26$, $P < 0,05$, $n=5$). PR29 (*Ribosomal protein 29*) est utilisé comme un gène de référence.

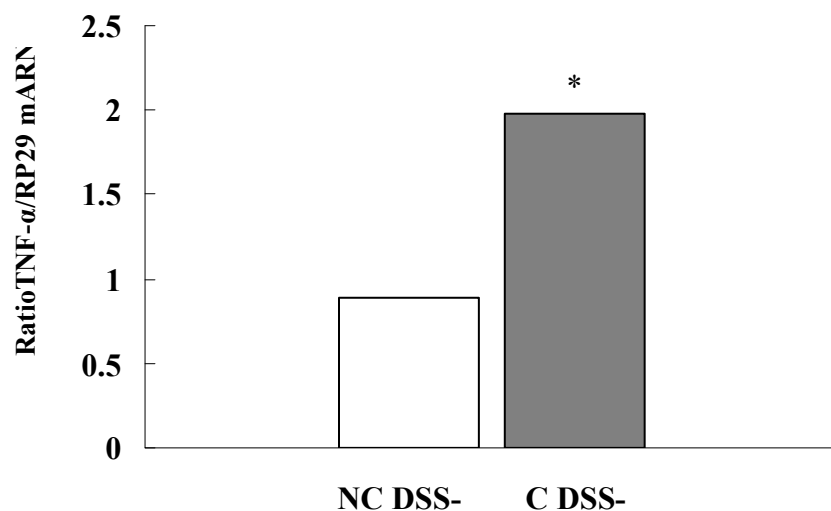
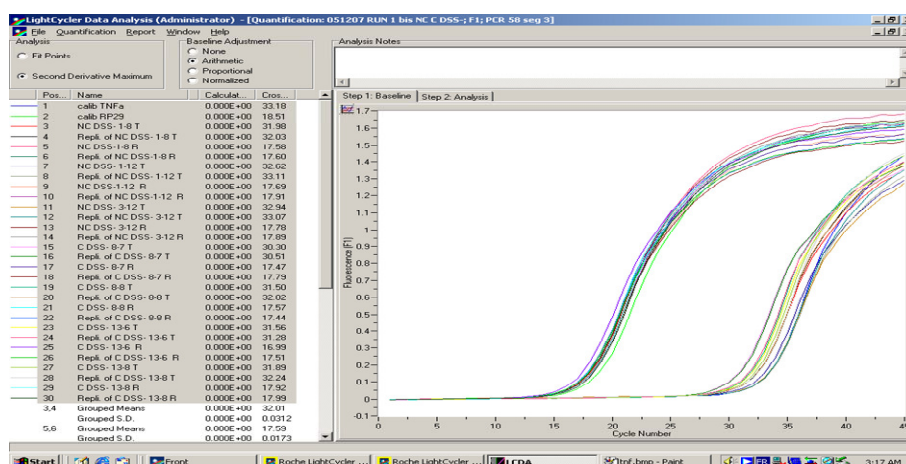
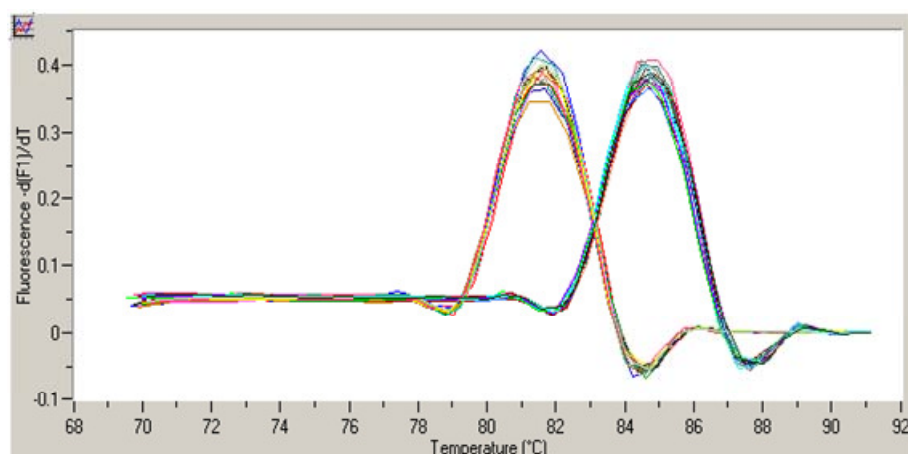


Figure 7. Influence du régime carencé sur l'expression des ARN messagers de TNF- α . RP29 est utilisé comme un gène de référence, * C DSS- vs. NC DSS-, $P < 0,05$, ANOVA

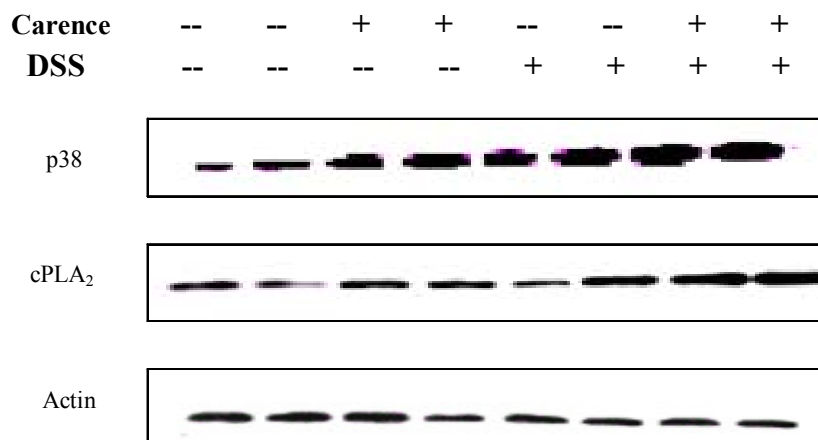
5.2 L'expression colique des protéine p38 et cPLA2

p38 est un membre de la famille *Mitogen-Activated-Protein-Kinase* (MAPK). p38 est impliqué dans le processus inflammatoire. p38 régule la réponse inflammatoire par phosphorylation ou par l'activation de facteurs de transcription comme ATF-2.

L'expression de p38 est augmentée chez les rats carencés par rapport aux rats non carencés. (C DSS- vs. NC DSS- = $0,734 \pm 0,182$ vs. $0,559 \pm 0,209$, $P=0,0073$, $n=6$). Quand les rats sont traités avec DSS, la carence favorise ainsi l'augmentation de la protéine p38 (C DSS+ vs. NC DSS+ = $0,802 \pm 0,110$ vs. $0,667 \pm 0,090$, $P=0,047$, $n=6$).

p38 active cPLA2 par la phosphorylation en Ser⁵⁰⁵ (Börsch-Haubold *et al.* 1999). Au vu de l'augmentation de la protéine p38, nous avons donc étudié l'expression de la protéine cPLA2. Le résultat montre une augmentation significative de la protéine cPLA2 chez les rats carencés par rapport aux rats non carencés (C DSS- vs. NC DSS- = $0,578 \pm 0,223$ vs. $0,315 \pm 0,279$, $P=0,005$, $n=6$). La carence augmente ainsi la protéine cPLA2 chez les rats traité avec DSS (C DSS+ vs. NC DSS+ = $0,792 \pm 0,159$ vs. $0,589 \pm 0,281$, $P=0,028$, $n=6$) (Figure 8).

(A)



(B)

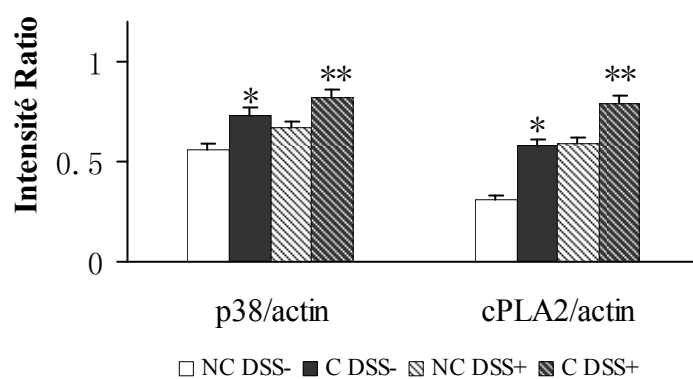


Figure 8. Etude de l'expression de p38 et cPLA₂ par Western blotting dans la muqueuse colique des rats. (A) Image représentative de trois manipulations (B) Analyse statistique de l'expression de p38 et cPLA₂, * C DSS- vs. NC DSS-, $P < 0,05$ ** C DSS+ vs. NC DSS+, $P < 0,05$.

5.1 Immunohistologie de l'expression de cPLA2

En complément, nous avons étudié la présence de cPLA2 dans le côlon des rats. L'analyse immuno-histochimique montre une expression plus importante de cPLA2 dans le côlon des rats carencés (Figure 9).

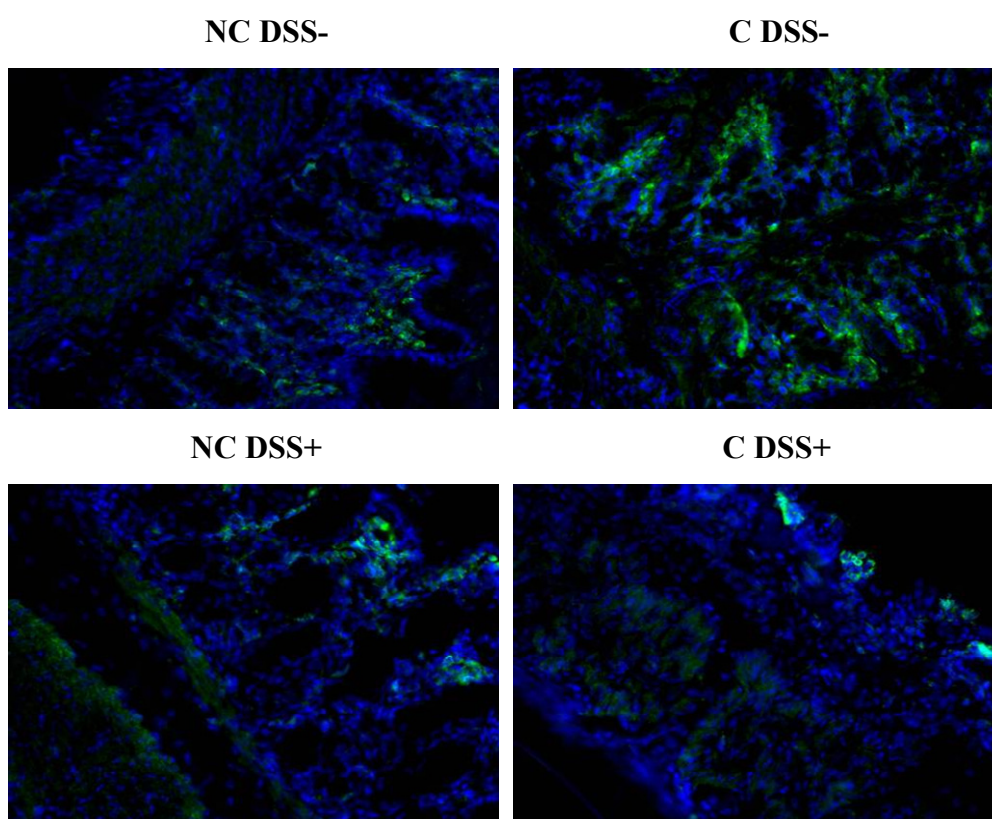


Figure 9 : Expression de cPLA₂ (vert) dans la muqueuse du côlon des rats.
Le contre-marquage au Dapi (bleu) permet de colorer les noyaux, grossissement X20.

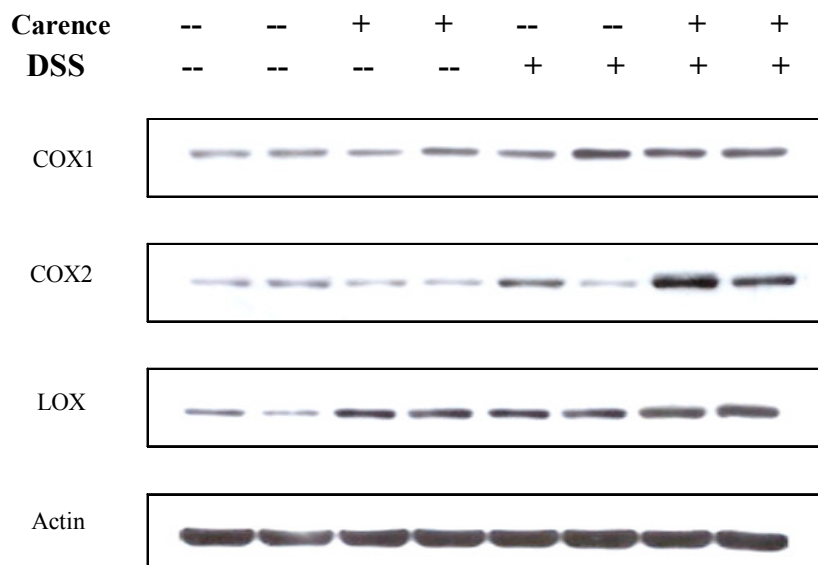
5.2 L'expression colique du protéine COX1, COX2 et 5-LOX

La phospholipase A2 (PLA2) dégrade les phospholipides membranaires en acide arachidonique et en lysoPAF (*platelet activating factor*). Ensuite, l'acide arachidonique est métabolisé par les cyclo-oxygénases (COX) et la lipooxygénase (LOX). Il existe deux types des cyclo-oxygénases: COX1 et COX2.

Pour documenter l'augmentation de phospholipase A2 cytotique (cPLA2) induite par la carence en groupements méthyles et le DSS, nous avons étudié l'expression de COX1, COX2 et LOX dans le côlon des rats.

L'analyse par Western-Blotting montre une augmentation très significative de COX2 dans le côlon des rats C DSS+ par rapport aux rats NC DSS+ (C DSS+ *vs.* NC DSS+ = $0,793 \pm 0,531$ *vs.* $0,177 \pm 0,148$, $p < 0,001$, $n=15$). Par contre, l'expression de COX1 n'est pas modifiée. L'expression de 5-LOX montre la même tendance que celle de cPLA2, avec une expression de la protéine plus élevée dans le côlon des rats carencés (traités ou non avec DSS), mais la différence n'est pas significative (C DSS- *vs.* NC DSS- = $1,588 \pm 2,021$ *vs.* $0,813 \pm 0,736$, $P=0,366$, $n=15$; C DSS+ *vs.* NC DSS+ = $2,046 \pm 3,023$ *vs.* $1,218 \pm 1,529$, $P=0,315$, $n=15$) (Figure 10).

(A)



(B)

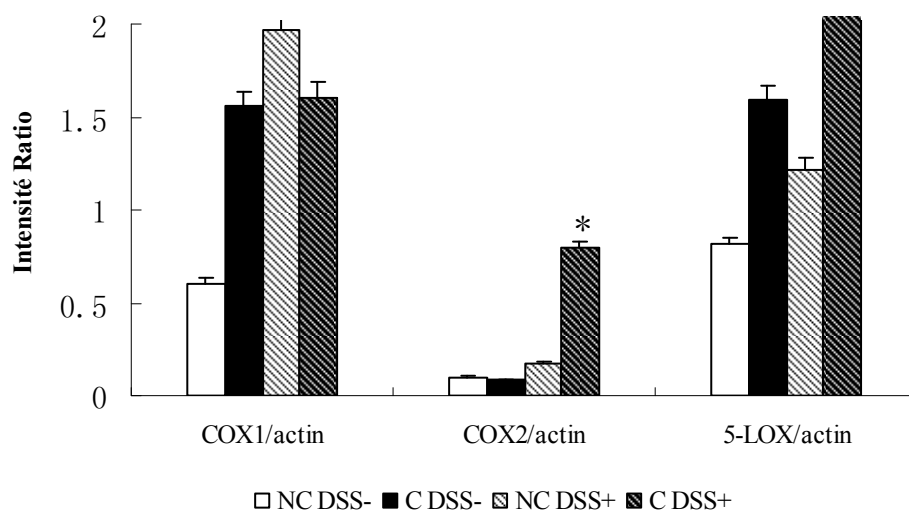


Figure 10. Etude de l'expression de COX1, COX2 et 5-LOX par Western blotting dans la muqueuse colique des rats. (A) Image représentative de trois manipulations (B) Analyse statistique de l'expression de p38 et cPLA₂, * C DSS+ vs. NC DSS+, $P < 0,001$.

Discussion

Une hyperhomocystéinémie modérée est fréquente chez les sujets atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (Papa *et al.* 2001, Danese *et al.* 2005, Zazos *et al.* 2005, Peyrin-Biroulet *et al.* 2008). 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 une association entre cette augmentation du risque secondaire et l'hyperhomocystéinémie. Cependant, aucune étude n'a pu à ce jour montrer une association entre métabolisme de l'homocystéine et thrombose au cours des MICI (Papa *et al.* 2001, Oldenburg *et al.* 2000).

En revanche, l'homocystéine pourrait favoriser le développement et le maintien d'une inflammation de la muqueuse intestinale via une augmentation de la production de cytokines proinflammatoires comme le TNF- α (Danese *et al.* 2005). Dans une étude récente, le niveau d'homocystéine plasmatique était corrélé au nombre de poussées, à la sévérité et à la durée de la maladie (Drzewoski *et al.* 2006). D'après des données récentes de la littérature, l'homocystéine pourrait promouvoir une inflammation muqueuse chronique par le biais d'un stress oxydant, d'un stress du réticulum endoplasmique, et d'une activation de facteurs pro-inflammatoires, (Peyrin-Biroulet *et al.* 2007). 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. A notre connaissance, notre travail est le premier à avoir étudié l'influence de la carence des donneurs de groupements méthyles sur la maladie inflammatoire chronique des intestins dans un modèle expérimental.

1. les modèles animaux

Des régimes déficients en groupements méthyles ont été employés sur des rats adultes afin d'induire une hyperhomocystéinémie (Burke *et al.* 1992). De tels régimes ne contiennent pas de choline et contiennent de faibles concentrations de vitamine B12, folates et méthionine (Brunaud *et al.* 2003). Dans notre modèle, un régime semblable a été utilisé caractérisé en plus par de faibles concentrations vitamine B2 (Blaise *et al.* 2005). Dans les conditions utilisées, les

jeunes rats ont développé une hyperhomocystéinémie atteignant un niveau comparable à celui rapporté chez l'adulte dans d'autres études (Brunaud *et al.* 2003). Le DSS est utilisé sur les rats pour générer une MICI expérimentale.

1.1 Effet de la carence sur la progéniture

1.1.1 Altérations morphologiques

De façon similaire à ce qui a été décrit à partir du modèle de souris transgénique *CBS*^{-/-} (Watanabe *et al.* 1995), nous avons observé un retard de croissance, des altérations squelettiques (queue tordue) et des modifications du système pileux. Les souris *CBS*^{-/-} (Robert *et al.* 2003, Watanabe *et al.* 1995) ainsi que le modèle de souris *MTHFR*^{-/-} décrit par Seller *et al.* (1981) présentent les mêmes caractéristiques morphologiques. Une étude récente (Robert *et al.* 2004) rapporte également que les souris *CBS*^{-/-} présentent une hyperkératisation qui confère à la souris une pilosité irrégulière.

1.1.2 Métabolisme de l'homocystéine

Les ratons nés de mères carencées présentent une forte baisse de la concentration plasmatique en folates et en vitamine B12. Un régime déficient en groupements méthyles *in utero* puis au cours de l'allaitement engendre une hyperhomocystéinémie significative comparable à celle enregistrée chez l'être humain carencé en vitamine B (15-100µM) (Burke *et al.* 1992) En plus, nous avons observé ainsi une accumulation de l'homocystéine dans la muqueuse colique de rats par l'analyse histopathologique.

La carence en groupement méthyles induit une hyperhomocystéinémie via une diminution de l'activité enzymatique impliquée dans la voie de reméthylation de l'homocystéine. La vitamine B12 est un co-facteur important pour la *MTR*. Dans les études précédentes de notre laboratoire, il a été observé chez les ratons, que la carence se traduit par

une baisse de l'activité de la *MTR* dans le cas d'une carence en groupements méthyles. (Blaise *et al.* 2005), qui est en accord avec l'étude de Yamada *et al.* (2000).

1.2 Influence de DSS associé à la carence

1.2.1 Le protocole

Le Dextran sulfate sodium (DSS) est un produit utilisé souvent pour induire une maladie inflammatoire chronique chez les rats. Le Trinitrobenzene sulfonate (TNBS) est un autre produit utilisé pour produire le modèle de MICI chez les rats.

Dans notre étude, les animaux traités par DSS présentent des signes cliniques d'inflammation digestive avec une prédominance des signes digestifs, diarrhées et rectorragies. L'analyse histologique effectuée par un anatomo-pathologiste expérimenté a ainsi révélé l'existence d'une colite inflammatoire chez les animaux traité par DSS.

Le protocole d'induction de la colite inflammatoire par le DSS est comporte des paramètres variables (durée de traitement, poids moléculaire et dose de DSS) suivant les auteurs. Le protocole que nous avons choisi est le plus fréquemment utilisé (Kihara *et al.* 2003, Tham *et al.* 2002, Melgar *et al.* 2005). Nous avons testé ce protocole (5% DSS pendant 7 jours) chez des rats adultes non carencés dans une étape préliminaire de notre étude. Il a induit une colite inflammatoire légère sans mortalité, ce qui nous a conduit à renouveler ce même protocole chez les rats carencés. Cela montre donc que le jeune âge des rats et la carence en groupements méthyles aggrave la maladie. Devant le taux élevé de mortalité au cours de la prise de DSS, nous avons dû interrompre le protocole au quatrième jour de DSS et sacrifier les animaux à J27 de vie.

1.2.2 L'inflammation

L'Index d'activité de la maladie (DAI) est un bon indice pour quantifier la sévérité de la maladie et correspond bien à l'inflammation mise en évidence par l'analyse histologique (Murthy *et al.* 1993). Dans notre étude, le DAI des rats non traités pas DSS est à 0, Ainsi, une hyperhomocystéinémie produite par la carence en groupements méthyles ne peut pas induire à elle seule une inflammation chez le côlon des rats. En revanche, elle augmente l'expression de médiateurs clés de l'inflammation muqueuse comme cPLA2 et COX2. C'est probablement pour cette raison que la carence en groupements méthyles aggrave l'inflammation colique induite par le DSS, comme ceci est montré par le DAI du groupe CDSS+, significativement plus élevé que celui du groupe NC DSS+. Les mécanismes cellulaires possibles par lesquels l'élévation de l'homocystéine favorise l'inflammation colique peuvent potentiellement être de différentes natures: stress oxydant, stress du réticulum endoplasmique, apoptose, ou activation des facteurs pro-inflammatoires. Nous avons analysé chacun de ces mécanismes.

2. Effet du DSS et de la carence sur le stress oxydant

Le Superoxyde dismutase (SOD) et la Glutathion peroxydase (GPX) sont deux enzymes anti-oxydantes dont l'action combinée permet de lutter efficacement contre le stress oxydant. La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme catalysant la réduction de l'anion superoxyde (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Il existe une forme mitochondriale tétramérique manganèse dépendante ainsi qu'une forme cytoplasmique cuivre et zinc dépendante également tétramérique. La glutathion peroxydase (GPX) est une enzyme cytoplasmique qui catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en H_2O par oxydation du GSH en GSSG.

Dans notre travail, nous avons montré que l'activité de la SOD est augmentée chez les rats du groupe C DSS- par rapport aux rats du groupe NC DSS-. L'activité de la GPX est aussi augmentée chez le groupe carencé par rapport au groupe non carencé, mais la différence n'est pas significative. Ces résultats sont en accord avec ceux de Moat *et al.* (2000). Ils ont montré que les activités de SOD et GPX sont plus élevées chez les sujets ayant une hyperhomocystéinémie modéré ($>20\mu\text{mol/L}$) par rapport au groupe contrôle. D'autres études ont rapporté que l'hyperhomocystéinémie pourrait diminuer les activités des différentes

enzymes impliquées dans la réduction des espèces oxygénées, comme la superoxyde dismutase (SOD) (Nonaka *et al.* 2001, Jiang *et al.* 2008) et la glutathion peroxydase (GPX) (Durmaz *et al.* 2007, Handy *et al.* 2005 et Weiss *et al.* 2002). Ces divergences de résultats peuvent être liées aux différences entre les modèles d'étude (humains, animaux ou culture cellulaire) ou à la concentration de l'homocystéine. L'augmentation de l'activité de SOD observée dans notre étude peut-être une manière de s'adapter au stress oxydant induit par une hyperhomocystéinémie modérée. Nihei *et al.* (2004) ont rapporté que l'augmentation de l'homocystéine est inversement corrélée au ratio [SOD extra cellulaire (EC-SOD) liée à l'endothélium/ SOD extra cellulaire (EC-SOD) basique], ce qui suggère que l'homocystéine pourrait augmenter la concentration de EC-SOD dans le plasma. C'est peut-être une autre façon de s'adapter au stress oxydant généré par l'hyperhomocystéinémie. Plus l'hyperhomocystéinémie est sévère, plus l'activité de l'enzyme anti-oxydative diminue. De même, Nishio et Watanabe (1997) ont observé sur des cellules vasculaires de muscle lisse une diminution de l'activité GPX en fonction de doses croissantes d'homocystéine (0-500µM).

Le stress oxydant est impliqué dans la pathogénie des MICI. De nombreuses études ont mis en évidence le rôle majeur joué par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la survenue des lésions de la muqueuse colique (D'Inca *et al.* 2004, McKenzie *et al.* 1996, Kruidenier *et al.* 2003). De plus, plusieurs études ont montré que la thérapie anti-oxydative est efficace dans le modèle MICI de rat (Carroll *et al.* 2007, Han *et al.* 2006, Tamaki *et al.* 2006, Oku *et al.* 2006).

Dans notre travail, il semblerait que les activités SOD et GPX ne soient pas modifiées par le DSS. Bhaskar *et al.* (1995) et Durak *et al.* (2000) n'ont pas trouvé de modification de l'activité de la SOD et GPX chez les patients atteints de RCH, ce qui est en accord avec nos résultats. Cependant, les données de la littérature sont controversées. Certaines études ont rapporté que l'activité de la SOD (Mulder *et al.* 1991, Lih-Brody *et al.* 1996, Kruidenier *et al.* 2003) et de la GPX (Reimund *et al.* 2000) sont diminuées dans la muqueuse colique des patients ayant des MICI. Mais l'interprétation de ces divergences est tempérée par la différence des méthodes qui incluent l'utilisation des prélèvements biopsiques ou des prélèvements chirurgicaux, les méthodes d'analyse ou la phase de recrutement de l'étude. Par exemple, Korenaza *et al.* (2002) ont démontré que l'activité de la SOD était augmentée pendant la phase

aiguë de l'inflammation et diminuée en cas d'inflammation chronique dans un modèle animal de colite inflammatoire au DSS.

3. Effets du DSS et de la carence sur l'apoptose

La carence en groupements méthyles est connue pour générer une apoptose. Vijayalakshmi *et al.* (2005) ont rapporté qu'une carence multi-vitaminique augmente l'index apoptotique et l'activité de la caspase 3 dans la muqueuse colique tandis que le rapport Bax/Bcl2 est diminué. Une hyperhomocystéinémie pourrait favoriser l'apoptose des cellules comme les cellules endothéliales vasculaires (Zhang *et al.* 2001), les cellules neuronales (Kruman *et al.* 2002, Blaise *et al.* 2007) et les cellules du trophoblaste (Di Simone *et al.* 2003). Le mécanisme par lequel l'homocystéine conduit à l'apoptose n'est pas encore clairement élucidé. Il est possible que l'Hcy induise la mort cellulaire par un mécanisme unfolded protein reponse (UPR)-dépendant (Zhang *et al.* 2001). L'Hcy pourrait aussi induire l'apoptose via la voie mitochondrial. En effet, le stress oxydant provoqué par une hyperhomocystéinémie produit une perte du potentiel de membrane mitochondrial et favorise la libération du cytochrome C. La libération du cytochrome C contribue à l'activation des caspase 3 et 9, ce qui entraîne la dégradation des protéines du noyau et de l'ADN (Tyagi *et al.* 2006).

Néanmoins, Robert *et al.* (2005) n'ont pas trouvé de cellules apoptotiques, ni d'activation de la caspase 3 ni de fragmentation de l'ADN dans le foie chez la souris *CBS*^{-/-}. De même, Mangiagalli *et al.* (2004) ont montré qu'il n'y a pas de modification de l'expression de caspase 3, Bax et Bcl2 dans les lymphocytes humaines incubé avec l'homocystéine. En accord avec ces travaux, nous n'avons pas observé d'augmentation de la caspase 3, ni de Bax ni de baisse de Bcl₂ dans le côlon du rat carencé.

L'étude d'immunohistochimie a démontré que l'expression de p53 est augmentée dans la muqueuse inflammatoire des patients de RCH (Krishna *et al.* 1995). La protéine p53 pourrait induire l'apoptose en augmentant Bax et diminuant Bcl2. Cependant, il existe une augmentation de Bcl2 chez les rats C DSS⁺. Nous avons aussi observé une diminution de caspase 3 et Bax dans le côlon chez les rats carencés après traitement avec le DSS, ce qui

suggère qu'il existe un mécanisme protecteur anti-apoptotique. Vetuschi *et al.* (2002) ont trouvé une augmentation de l'apoptose associée à une augmentation de la prolifération des cellules épithéliales coliques chez les rats non carencés traités avec le DSS. Une accélération du renouvellement de l'épithélium colique est aussi observée chez les patients atteints de RCH (Arai *et al.* 1999, Serafini *et al.* 1981). Le déséquilibre entre prolifération et apoptose pourrait être impliqué dans la genèse de l'inflammation digestive et du cancer colique. Une apoptose augmentée entraîne une fragilité de l'épithélium colique et facilite l'invasion des microorganismes ou des antigènes. Une augmentation de la prolifération pourrait être associée au développement du cancer (Yamada *et al.* 1992).

La diminution de caspase 3, Bax et l'augmentation de Bcl2 dans le côlon des rats carencés après traitement avec le DSS peuvent être expliquées par l'hyperhomocystéinémie. En effet l'homocystéine est capable d'activer le facteur de transcription *Necrosis Factor kappa B* (NF-kB) (Au-Yeung *et al.* 2004, Carluccio *et al.* 2007) qui est un régulateur des cytokines pro-inflammatoires et un inhibiteur important de l'apoptose (Barinaga *et al.* 1996). Imura *et al.* (2000) ont trouvé que l'expression de Bax est diminuée non seulement dans la muqueuse des patients porteurs de MICI, mais également dans la muqueuse des patients ayant une inflammation « non-MICI », suggérant ainsi que l'expression de Bax est probablement régulée par des médiateurs inflammatoires. De plus, d'autres études ont retrouvé que le système Fas/ Fas Ligand, mais pas Bax/Bcl₂, est impliqué dans l'induction de l'apoptose de l'épithélium colique chez les patients RCH (Iwamoto *et al.* 1996, Strater *et al.* 1997, Karamanolis *et al.* 2007).

4. Effets du DSS et de la carence sur l'inflammation

Le TNF- α joue un rôle central dans la cascade inflammatoire des MICI, notamment la MC (Reinecker *et al.* 1993, Schreiber *et al.* 1999). L'anticorps monoclonal anti-TNF- α (infliximab) induit la rémission clinique chez plus de 50% des patients atteints de MICI (Targan SR *et al.* 1997). La protéine p38 est ainsi impliquée dans la pathogénie des MICI (Waetzig *et al.* 2003). Des études ont montré que dans la muqueuse inflammatoire intestinale des patients atteints de

MICI, p38 est la MAPK qui est la plus activée (Waetzig *et al.* 2002, Hommes *et al.* 2002). TNF- α est régulée par p38 (Kyriakis *et al.* 2001) et l'inhibition de p38 supprime la synthèse de TNF- α chez les souris (Kontoyiannis *et al.* 2001). Danese *et al.* (2005) ont montré que l'homocystéine et TNF- α peuvent promouvoir une inflammation muqueuse par l'activation de p38 *in vitro* et que la combinaison de l'homocystéine et TNF- α exerçaient un effet synergique.

Compte tenu des résultats obtenus pour p38, nous avons déterminé si la carence en groupements méthyles augmente la production de TNF- α et aggrave ainsi l'inflammation chez les rats traités avec DSS. Nous avons trouvé que l'expression des ARNm de TNF- α est augmentée dans le côlon des rats carencés par rapport aux témoins. En accord avec notre travail, Peracchi *et al.* (2001) et Scalabrino *et al.* (2004) ont rapporté que la concentration de TNF- α est inversement proportionnelle à la concentration de vitamine B12 chez des patients qui ont une déficience en vitamine B12. Le mécanisme par lequel la carence en vitamine B12 stimule la production de TNF- α n'est pas encore élucidé. Il est possible que la voie de signalisation de p38 soit impliquée, comme le suggèrent nos résultats qui mettent en évidence une augmentation de la protéine p38 dans le côlon des rats carencés. Cependant, nous n'avons pas pu isoler les ARNm de TNF dans le côlon des rats traités avec DSS peut-être pour 2 raisons au moins : 1) les ARNm de TNF- α des rats traités avec le DSS (qu'ils soient carencés ou non carencés) sont dégradés ; 2) le DSS influence l'extraction et/ou l'amplification des ARNm et/ou cDNA.

L'activation de la cPLA2 est également sous l'influence de p38, par phosphorylation sur la Ser⁵⁰⁵ (Börsch-Haubold *et al.* 1999). La cPLA2 dégrade les phospholipides membranaires en acide arachidonique, qui est le substrat des cyclo-oxygénases (COX) et de la lipooxygénase (LOX). Les COX sont de deux types: la COX1 est constitutivement présente et active dans presque toutes les cellules. Elle induit la synthèse des prostaglandines physiologiques qui jouent un rôle dans le maintien de l'intégrité intestinale (Eberhart *et al.* 1995). La COX2 est synthétisée et induite par les cytokines pro-inflammatoires, comme IL-1 β et TNF- α (Maier *et al.* 1990, Masferrer *et al.* 1992). Elle favorise la synthèse des prostaglandines impliquées dans l'inflammation (Mitchell *et al.* 1995). La lipo-oxygénase (LOX) produit les leucotriènes (LTB4, C4, D4, E4) qui augmentent la perméabilité capillaire et le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles. Ces médiateurs de l'inflammation (PGs et LTs) sont augmentés dans la muqueuse colique des patients souffrants de MICI et jouent un rôle très important dans la pathogénie de

ces maladies (Sharon *et al.* 1984, Lauritsen *et al.* 1986). Récemment, Leoncini *et al.* (2006) ont trouvé que l'incubation des plaquettes avec l'homocystéine stimule la production de TXB2 via l'activation de P38/cPLA2. Ces données suggèrent qu'une hyperhomocystéinémie pourrait aggraver les MICI en modifiant la production de PGs et LTs via la voie p38/cPLA2.

En résumé, dans notre étude, nous avons mis en évidence une augmentation importante de cPLA2 consécutive à la carence en groupements méthyles. L'augmentation de cPLA2 pourrait être liée à l'augmentation de la protéine p38, qui est un régulateur de cPLA2. Il existe trois types de phospholipase A2: la phospholipase A2 sécrétée (sPLA2), la phospholipase A2 cytosolique (cPLA2) et la phospholipase A2 calcium-indépendante (iPLA2). Nous avons choisi d'étudier la phospholipase A2 cytosolique (cPLA2) parce qu'elle est l'acteur principal de la synthèse des eicosanoides. Des travaux ont montré que l'activité de la phospholipase A2 est plus augmentée chez les rats traités avec DSS (Tomita *et al.* 2003) et les patients ayant des MICI (Haapamaki *et al.* 1999, Minami *et al.* 1994), que chez les témoins. Les inhibiteurs de PLA2 comme la mépacrine, l'auinacrine et la p-bromophenacylbromide ont un effet favorable sur l'inflammation intestinale dans les modèles de rat MICI (Woodruff *et al.* 2005, Krimsky *et al.* 2003, Tomita *et al.* 2003, Hoshino *et al.* 1992) et les patients atteints de MICI (Minami *et al.* 1997).

Ensuite, nous avons étudié l'expression de COX1, COX2 et 5-LOX dans le côlon des rats. Les résultats des Western Blots montrent que la protéine COX2 est augmentée dans le côlon des rats C DSS+ comparativement aux rats NC DSS+. Par contre, il n'y a pas de modification de l'expression de COX1 ni 5-LOX. Ainsi, l'aggravation de la réaction inflammatoire en cas de carence pourrait être expliquée par l'augmentation de l'expression de cPLA2 et COX2.

Des études ont montré que l'hyperhomocystéinémie ou la carence en folates pourrait stimuler la libération de thromboxane (Leoncini *et al.* 2006, Signorello *et al.* 2002, Durand *et al.* 1996, Graeber *et al.* 1982), mais aucune étude n'a exploré l'association entre la carence en groupements méthyles et l'expression de COX1, COX2 et 5-LOX. Plusieurs études ont montré que COX1 est exprimé de façon similaire dans le côlon des sujets sains et des patients MICI (Singer *et al.* 1998). Par contre, COX2 n'est pas exprimé dans le côlon des sujets sains et les patients atteints de MICI en rémission (Deborah *et al.* 2001). La protéine COX2 est aussi

détectée dans les plexus nerveux (Roberts *et al.* 2001) et les artères mésentériques (Tabernero *et al.* 2003) du côlon chez les patients atteints des MICI. La protéine COX2 est aussi exprimée dans le côlon inflammatoire des patients atteints de MICI active. Conformément à nos résultats, Hendel *et al.* (1997) ont rapporté qu'il y a une corrélation positive entre les ARNm de COX2 et la sévérité des MICI. De plus, ils ont montré que les concentrations des ARNm de 5-LOX dans la muqueuse colique n'étaient pas différentes entre les sujets sains et les sujets atteints de MICI, et qu'elles ne dépendaient pas de la sévérité de la maladie (Hendel *et al.* 2002).

L'expression de COX2 est régulée par plusieurs facteurs de transcription, notamment NF- κ B (Beasley *et al.* 1999, Abate *et al.* 1998). Il est donc possible que l'augmentation de ROS ou TNF- α , qui sont tous activateurs de NF- κ B, contribue à l'élévation de l'expression de COX2.

Le traitement des rats MICI par des agents anti-inflammatoires a produit des résultats divergents. Une étude a montré que le traitement par inhibiteur de COX2 est efficace (Karmeli *et al.* 2000) tandis que d'autres travaux ont rapporté que l'inhibition de COX2 exacerbe la maladie (Reuter *et al.* 1996, Singh *et al.* 2004). L'explication serait que le PGE2 induit par COX2 est à la fois un médiateur qui amplifie l'inflammation, et un agent protecteur qui peut promouvoir la prolifération de l'épithélium colique et donc sa réparation (Uribe *et al.* 1992).

Conclusion générale et perspectives

Notre travail reposait sur deux objectifs, évaluer l'influence des déterminants génétiques et nutritionnels du métabolisme des monocarbones et de l'homocystéine avec le risque primaire et la sévérité de la maladie dans deux populations dont l'une, recrutée en Chine centrale, était constituée de patients atteints de RCH et l'autre, recrutée dans l'est de la France, était constituée de patients porteurs de maladie de Crohn. En effet, dans chacun de ces deux pays, la prévalence de chacune des deux maladies est symétrique. Une limite de notre étude était l'absence de phénotypage métabolique de la population recrutée en Chine.

En Chine, il existait une association du gène de la *méthionine synthase (MTR)* avec le risque primaire de RCH avec un Odd ratio de 1,8. Par comparaison, nous avons retrouvé une association du gène de la *méthionine synthase réductase (MTRR)* avec le risque primaire de maladie de Crohn, dans la population de l'est de la France, avec un Odd ratio de 3,7. Il existait par ailleurs une concentration d'homocystéine plus élevée chez les patients et une diminution de la concentration en vitamine B12 et folates. Dans les deux populations, nous avons observé une association des déterminants génétiques avec la sévérité de la maladie. Les deux études menées en Chine, sur respectivement 72 patients et 168 patients, ont permis de montrer une association des polymorphismes de *MTHFR* avec le risque de lésion étendue, notamment de pancolite.

L'étude menée en France a permis de trouver une association avec l'atteinte iléale, liée au statut en vitamine B12 et avec le score de sévérité CDAI. La vitamine B12 était un déterminant significativement associée à l'homocystéine et cette association variait en fonction de l'activité en SOD des patients. De plus, il existait une association entre le score de sévérité et l'activité de la SOD, influencée par le polymorphisme de *MTRR*.

Ces résultats suggèrent que le statut en vitamine B12 participe au mécanisme d'association entre la maladie et le métabolisme de l'homocystéine, avec deux mécanismes possibles, l'un lié à la diminution de l'absorption, en rapport avec les lésions iléales, et l'autre lié à la capacité intra-cellulaire de réduction de la vitamine B12 en fonction du niveau du stress oxydant et du polymorphisme *MTRR A66G*. L'ensemble de ces résultats suggère que le métabolisme de l'homocystéine peut avoir des effets au niveau de la muqueuse iléo-colique en lien avec les

facteurs étiopathogéniques des MICI. C'est pourquoi nous avons réalisé parallèlement une étude expérimentale sur des rats carencés en donneurs de méthyles, exposés au DSS.

Les résultats obtenus qui montrent un effet limité de la carence sur le stress oxydant, mettent en évidence un lien fort entre la carence et la voie cPLA2/p38/COX2 de la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires. On peut donc, en fonction de ces résultats, proposer une relation intriquée cause/conséquence entre le métabolisme de l'homocystéine et les MICI. La carence en donneurs de méthyles peut prédisposer à la maladie en augmentant l'expression d'acteurs clé de l'inflammation muqueuse. Dans les circonstances où un facteur d'exposition, tel que bactérien, intervient sur ce terrain prédisposant, il existe une potentialisation de la réponse inflammatoire. Réciproquement, l'inflammation de la muqueuse a deux conséquences en lien avec le métabolisme des monocarbones. Le stress oxydant se traduit notamment par une augmentation de la SOD et une augmentation du potentiel oxydatif intramuqueux de la vitamine B12 qui pourrait dépasser les capacités de la cellule à assurer sa réduction par la méthionine synthase réductase, condition nécessaire pour que la vitamine B12 puisse jouer son rôle de cofacteur de la méthionine synthase. La deuxième conséquence de la maladie concerne l'atteinte iléale possible qui se traduit par une diminution de la concentration de la vitamine B12 plasmatique et une augmentation du risque de carence. On peut dans ces conditions imaginer que la diminution de la reméthylation de l'homocystéine assurée par le couple méthionine synthase / méthionine synthase réductase produise des effets sur l'expression des gènes liés à la voie p38/cPLA2/COX2.

Nos travaux ouvrent donc des perspectives sur la recherche d'interactions gène-gène entre les variants génétiques du métabolisme des monocarbones et ceux des gènes de la voie p38/cPLA2/COX2. Ils suggèrent également de poursuivre l'étude du modèle expérimental en testant l'effet inhibiteur de COX2, mais aussi en recherchant l'implication possible de PPAR γ dont l'un des ligands, PGE2, est un produit de synthèse de cette voie. A plus long terme, se pose la question du dépistage systématique du statut en B12 et en folates, dans les MICI. En effet, s'il est très peu probable qu'une supplémentation systématique présente un intérêt dans la prise en charge de cette maladie, il sera parallèlement nécessaire d'évaluer si le traitement d'une sub-carence dépistée par une approche biologique systématique pourra avoir un effet sur l'évolution de la maladie, et notamment sur l'étendue des lésions. Par contre, notre travail

confirme que l'augmentation de l'homocystéine observée dans les MICI n'est pas associée à un risque augmenté de manifestations thrombo-embolique.

Références

- Abate A, Schröder H.** Protease inhibitors protect macrophages from lipopolysaccharide-induced cytotoxicity: possible role for NF-kappaB. *Life Sci* 1998, 62:1081-8.
- Abraham C, Cho JH.** Functional consequences of NOD2 (CARD15) mutations. *Inflamm. Bowel Dis* 2006, 12: 641–650.
- Aimone-Gastin I, Cable S, Keller JM, Bigard MA, Champigneulle B, Gaucher P, Gueant JL, Dauça M.** Studies on peroxisomes of colonic mucosa in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1994, 39: 2177–85.
- Aghazadeh R, Reza Zali M, Bahari A, Amin K, Ghahghaie F, Firouzi F.** Inflammatory bowel disease in Iran: a review of 457 cases. *J Gastroenterol Hepatol* 2005, 20: 1691–5.
- Amouzou EK, Chabi NW, Adjalla CE, Rodriguez-Guéant RM, Feillet F, Villaume C, Sanni A, and Guéant JL.** High prevalence of hyperhomocysteinemia related to folate deficiency and the 677 CT mutation of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase in coastal West Africa. *Am J Clin Nutr* 2004, 79: 619-624.
- Amre DK, D'Souza S, Morgan K, Seidman G, Lambrette P, Grimard G, Israel D, Mack D, Ghadirian P, Deslandres C, Chotard V, Budai B, Law L, Levy E, Seidman EG.** Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn's disease in children. *Am J Gastroenterol* 2007, 102: 2016-25.
- Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A.** Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2001, 344: 808-14.
- Au-Yeung KK, Woo CW, Sung FL, Yip JC, Siow YL, OK.** Hyperhomocysteinemia activates nuclear factor-kappaB in endothelial cells via oxidative stress. *Circ Res* 2004, 94: 28-36.
- Arai N, Mitomi H, Ohtani Y, Igarashi M, Kakita A, Okayasu I.** Enhanced epithelial cell turnover associated with p53 accumulation and high p21WAF1/CIP1 expression in ulcerative colitis. *Mod Pathol* 1999, 12: 604-11.
- 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.
- Bargen JA, Barker NW.** Extensive arterial and venous thrombosis complicating chronic ulcerative colitis. *Arch Intern Med* 1936, 58: 17–31.
- Barinaga M.** Apoptosis—life-death balance with the cell. *Science* 1996, 274:724.
- Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, et al.** Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* 2008, 40: 955-62.
- Baumgart DC, Carding SR.** Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007, 369: 1627–40.
- Beasley D, Cooper AL.** Constitutive expression of interleukin-1alpha precursor promotes human vascular smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol* 1999, 276: H901-12.
- Behr MA, Schurr E.** Mycobacteria in Crohn's disease: a persistent hypothesis. *Inflamm Bowel Dis* 2006, 12: 1000–04.
- Bernstein CN, Nayar G, Hamel A, Blanchard JF.** A pursuit of animal borne infections in the mucosa of subjects with inflammatory bowel disease and populationbased controls. *J Clin Microbiol* 2003, 41: 4986–90.

- Bernstein CN, Sargent M, Vos HL, Rosendaal FR.** Mutations in clotting factors and inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2007, 102: 338-43.
- Bernstein CN, Shanahan F.** Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Gut* 2008, 57: 1185-91.
- Bhaskar L, Ramakrishna BS, Balasubramanian KA.** Colonic mucosal antioxidant enzymes and lipid peroxide levels in normal subjects and patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1995, 10: 140-3.
- Bjerregaard LT, Nederby NJ, Fredholm L, Brandslund I, Munkholm P, Hey H.** Hyperhomocysteinaemia, coagulation pathway activation and thrombophilia in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2002, 37: 62-7.
- Blaise S, Alberto JM, Nédélec E, Ayav A, Pourié G, Bronowicki JP, Guéant JL, Daval JL.** Mild neonatal hypoxia exacerbates the effects of vitamin-deficient diet on homocysteine metabolism in rats. *Pediatr Res* 2005, 57: 777-82.
- Blaise SA, Nedelec E, Schroeder H, Alberto JM, Bossenmeyer-Pourie C, Gueant JL, Daval JL.** Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *Am J Pathol* 2007, 170: 667-79.
- Boger RH, Bode-Boger SM, Sydow K, Heistad DD, Lentz SR.** Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20: 1557-64.
- 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.
- Börsch-Haubold AG, Ghomashchi F, Pasquet S, Goedert M, Cohen P, Gelb MH, Watson SP.** Phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 in platelets is mediated by multiple stress-activated protein kinase pathways. *Eur J Biochem* 1999, 265: 195-203.
- 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.
- 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.
- Brosnan JT, Jacobs RL, Stead LM, Brosnan ME.** Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism. *Acta Biochim Pol* 2004, 51: 405-13.
- 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.
- Brunaud L, Alberto J, Ayav A, Gerard P, Namour F, Antunes L, Braun M, Bronowicki JP, Bresler L, Gueant JL.** Vitamin B12 is a strong determinant of low methionine synthase activity and DNA hypomethylation in rats. *Digestion* 2003, 68:133-140.
- Bull TJ, McMinn EJ, Sidi-Boumedine K, Skull A, Durkin D, Neild P, Rhodes G, Pickup R, Hermon-Taylor J.** Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp.

paratuberculosis in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J Clin Microbiol* 2003, 41: 2915–23.

Burke G, Robinson K, Refsum H, Stuart B, Drumm J, Graham I. Intrauterine growth retardation, perinatal death, and maternal homocysteine levels. *N Engl J Med* 1992, 326: 69-70.

Cai Y, Zhang C, Nawa T, Aso T, Tanaka M, Oshiro S, Ichijo H, Kitajima S. Homocysteine-responsive ATF3 gene expression in human vascular endothelial cells: activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase and promoter response element. *Blood* 2000, 96: 2140-8.

Carluccio MA, Ancora MA, Massaro M, Carluccio M, Scoditti E, Distante A, Storelli C, De Caterina R. Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF-kappaB and NAD(P)H oxidase activation: protective role of Mediterranean diet polyphenolic antioxidants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293: H2344-54.

Carroll IM, Andrus JM, Bruno-Barcena JM, Klaenhammer TR, Hassan HM, Threadgill DS. Anti-inflammatory properties of *Lactobacillus gasseri* expressing manganese superoxide dismutase using the interleukin 10-deficient mouse model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007, 293: G729-38.

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.

Cattaneo M, Franchi F, Zighetti ML, Martinelli I, Asti D, Mannucci PM. Plasma levels of activated protein C in healthy subjects and patients with previous venous thromboembolism: relationships with plasma homocysteine levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998, 18: 1371-5.

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

Chamberlin ME, Ubagai T, Mudd SH, Thomas J, Pao VY, Nguyen TK, Levy HL, Greene C, Freehauf C, Chou JY. Methionine adenosyltransferase I/III deficiency: novel mutations and clinical variations. *Am J Hum Genet* 2000, 66: 347-55.

Chambers JC, Obeid OA, Kooner JS. Physiological increments in plasma homocysteine induce vascular endothelial dysfunction in normal human subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999, 19: 2922–2927.

Chan I, Liu L, Hamada T, Sethuraman G, McGrath JA. The molecular basis of lipoid proteinosis: mutations in extracellular matrix protein 1. *Exp Dermatol.* 2007, 16: 881-90.

Chen J, Stampfer MJ, Ma J, Selhub J, Malinow MR, Hennekens CH, Hunter DJ. Influence of a methionine synthase (D919G) polymorphism on plasma homocysteine and folate levels and relation to risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2001, 154: 667-72.

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.

Chen M, Peyrin-Biroulet L, Xia B, Rodriguez-Gueant RM, Bronowicki JP, Bigard MA, Gueant JL. Methionine synthase A2756G polymorphism may predict ulcerative colitis and

methylenetetrahydrofolate reductase C677T pancolitis, in Central China. *BMC Med Genet* 2008, 9: 78.

Chen YT, Meyer CF, Tan TH. Persistent activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in gamma radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1996, 271: 631-4.

Chowers Y, Sela BA, Holland R, Fidder 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.

Cho JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2008, 8: 458-66.

Copper HS, Murthy S, Kido K, Yoshitake H, Flanigan A. Dysplasia and cancer in dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: A study of histopathology, β catenin and P53 expression and the role of inflammation. *Carcinogenesis* 2000, 21: 757-768.

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.

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: 2060-2073.

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* 2007, 102: 174-86.

Dayal S, Bottiglieri T, Arning E, Maeda N, Malinow MR, Sigmund CD, Heistad DD, Faraci FM, Lentz SR. Endothelial dysfunction and elevation of S-adenosylhomocysteine in cystathionine b-synthasedeficient mice. *Circ Res* 2001, 88: 1203-9.

Dayal S, Brown KL, Weydert CJ, Oberley LW, Arning E, Bottiglieri T, Faraci FM, Lentz SR. Deficiency of glutathione peroxidase-1 sensitizes hyperhomocysteinemic mice to endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002, 22: 1996-2002.

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.

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.

Demuth K, Atger V, Borderie D, Benoit MO, Sauvaget D, Lotersztajn S, Moatti N. Homocysteine decreases endothelin-1 production by cultured human endothelial cells. *Eur J Biochem* 1999, 263: 367-376.

Den Heijer M, Lewington S, Clarke R. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. *J Thromb Haemost* 2005, 3: 292-9.

D'Inca R, Cardin R, Benazzato L, Angriman I, Martines D, Sturniolo GC. Oxidative DNA damage in the mucosa of ulcerative colitis increases with disease duration and dysplasia. *Inflamm Bowel Dis* 2004, 10: 23-7.

- 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.
- Di Simone N, Maggiano N, Caliandro D, Riccardi P, Evangelista A, Carducci B, Caruso A.** Homocysteine induces trophoblast cell death with apoptotic features. *Biol Reprod* 2003, 69: 1129-34.
- Drunat S, Moatti N, Paul JL, Cogny A, Benoit MO, Demuth K .** Homocysteine-induced decrease in endothelin-1 production is initiated at the extracellular level and involves oxidative products. *Eur J Biochem* 2001, 268: 5287–5294.
- 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.
- Duan J, Murohara T, Ikeda H, Sasaki K, Shintani S, Akita T, Shimada T, Imaizumi T.** Hyperhomocysteinemia impairs angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20: 2579-85.
- Dubuquoy L, Jansson EA, Deeb S, Rakotobe S, Karoui M, Colombel JF, Auwerx J, Pettersson S, Desreumaux P.** Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2003, 124 : 1265-1276.
- Dubuquoy L, Rousseaux C, Thuru X, Peyrin-Biroulet L, Romano O, Chavatte P, Chamailard M, Desreumaux P.** PPARgamma as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. *Gut* 2006, 55: 1341-9.
- Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, *et al.*** A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006, 314: 1461-3.
- Durak I, Yasa MH, Bektas A, Kaçmaz M, Cimen MY, Oztürk HS.** Mucosal antioxidant defense is not impaired in ulcerative colitis. *HepatoGastroenterology* 2000, 47: 1015–7.
- Durand P, Prost M, Blache D.** Prothrombotic effects of a folic acid deficient diet in rat platelets and macrophages related to elevated homocysteine and decreased n-3 polyunsaturated fatty acids. *Atherosclerosis* 1996, 121: 231-43.
- Durmaz A, Dikmen N.** Homocysteine effects on cellular glutathione peroxidase (GPx-1) activity under in vitro conditions. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2007, 22: 733-8.
- Eberhardt RT, Forgione MA, Cap A, Leopold JA, Rudd MA, Tolliet M, Heyrick S, Stark R, Klings ES, Moldovan NI, Yaghoubi M, Goldschmidt-Clermont PJ, Farber HW, Cohen R, Loscalzo J.** Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 2000,106:483–91.
- Edwards FC, Truelove SC.** The course and prognosis of ulcerative colitis. *Gut* 1964, 32:1–22.
- Eberhart CE, Dubois RN.** Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1995, 109: 28-301.
- Fabia R, Ar'Rajab A, Willen R, Andersson R, and Bengmark S.** Effect of putative phospholipase A2 inhibitors on acetic acid-induced acute colitis in the rat. *Br J Surg* 1993, 80: 1199-204.
- Faraci FM, Lentz SR.** Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction. *Stroke* 2004, 35: 345-7.
- Farrokhyar F, Swarbrick ET, Irvine EJ.** A critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2001, 36: 2Y15.

- 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.
- Fisher SA, Tremelling M, Anderson CA, et al.** Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nat Genet* 2008, 40: 710-2.
- Fossiez F, Banchereau J, Murray R, Van Kooten C, Garrone P, Lebecque S.** Interleukin-17. *Int Rev Immunol* 1998, 16: 541-551.
- Franchimont, D. Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, Quertinmont E, Abramowicz M, Van Gossum A, Devière J, Rutgeerts P.** Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 2004: 53, 987-992 .
- Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Hedderich J, May S, Lu T, Schuldt D, Nikolaus S, Rosenstiel P, Krawczak M, Schreiber S.** Replication of signals from recent studies of Crohn's disease identifies previously unknown disease loci for ulcerative colitis. *Nat Genet* 2008, 40: 713-5.
- Franken DG, Boers GHJ, Blom HJ, Trijbels FJM, Kloppenborg PW.** Treatment of mild hyperhomocysteinemia in vascular disease patients. *Arterioscler Thromb* 1994, 14: 465-70.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, van den Heuvel LP, Rozen R.** A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genet* 1995, 10: 111-3.
- 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: 1287-1292.
- 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.
- Graef V, Baggenstoss AH, Sauer WG, Spittell JAJ.** Venous thrombosis occurring in non-specific ulcerative colitis. A necropsy study. *Arch Intern Med* 1966, 117:377-82.
- 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.
- Gaustadnes M, Rudiger N, Rasmussen K, Ingerslev J.** Familial thrombophilia associated with homozygosity for the cystathionine beta-synthase 833T-->C mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20:1392-5.
- 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: 2300-2306.

- 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). *Mammalian Genome* 1998, 9: 652-6.
- Graeber JE, Slott JH, Ulane RE, Schulman JD, Stuart MJ.** Effect of homocysteine and homocystine on platelet and vascular arachidonic acid metabolism. *Pediatr Res* 1982, 16:490-3.
- Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S.** Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986, 320: 454-6.
- Gueant JL, Chabi NW, Gueant-Rodriguez RM, Mutchinick OM, Debard R, Payet C, Lu X, Villaume C, Bronowicki JP, Quadros EV, Sanni A, Amouzou E, Xia B, Chen M, Anello G, Bosco P, Romano C, Arrieta HR, Sanchez BE, Romano A, Herbeth B, Anwar W, Namour F.** Environmental influence on the worldwide prevalence of a 776C->G variant in the transcobalamin gene (TCN2). *J Med Genet* 2007, 44: 363-7.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G.** Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* 2003, 124:1767-73.
- Halsted CH, Gandhi G, Tamura T.** Sulfasalazine inhibits the absorption of folates in ulcerative colitis. *N Engl J Med* 1981, 305: 1513-7.
- Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, De La Vega FM, Briggs J, Günther S, Prescott NJ, Onnie CM, Häsler R, Sipos B, Fölsch UR, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M, Schreiber S.** A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007, 39: 207-11.
- Hanauer SB, Sandborn W, Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology.** Management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol.* 2001, 96: 635-643.
- Han W, Mercenier A, Ait-Belgnaoui A, Pavan S, Lamine F, van Swam II, Kleerebezem M, Salvador-Cartier C, Hisbergues M, Bueno L, Theodorou V, Fioramonti J.** Improvement

of an experimental colitis in rats by lactic acid bacteria producing superoxide dismutase. *Inflamm Bowel Dis* 2006, 12: 1044-52.

Handy DE, Zhang Y, Loscalzo J. Homocysteine down-regulates cellular glutathione peroxidase (GPx1) by decreasing translation. *J Biol Chem* 2005, 280: 15518-25.

Hao L, Ma J, Zhu J, Stampfer MJ, Tian Y, Willett WC, Li Z. High prevalence of hyperhomocysteinemia in Chinese adults is associated with low folate, vitamin B12, and vitamin B6 status. *J Nutr* 2007, 137: 407-13.

Harmon DL, Shields DC, Woodside JV, McMaster D, Yarnell JW, Young IS, Peng K, Shane B, Evans AE, Whitehead AS. Methionine synthase D919G polymorphism is a significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations. *Genet Epidemiol.* 1999, 17: 298-309.

Hajjar KA, Mauri L, Jacovina AT, Zhong FM, Mirza UA, Padovan JC, Chait BT. Tissue plasminogen activator binding to the annexin II tail domain direct modulation by homocysteine. *J Biol Chem* 1998, 273: 9987-93.

Hajjar KA. Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. *J Clin Invest* 1993, 91: 2873-9.

Heinecke JW, Rosen H, Suzuki LA, Chait A. The role of sulfur-containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1987, 262: 10098-103.

Hendel J, Nielsen OH. Expression of cyclooxygenase-2 mRNA in active inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1997, 92:1170-3.

Hendel J, Ahnfelt-Ronne I, Nielsen OH. Expression of 5-lipoxygenase mRNA is unchanged in the colon of patients with active inflammatory bowel disease. *Inflamm Res* 2002, 51: 423-6.

Heydrick SJ, Weiss N, Thomas SR, Cap AP, Pimentel DR, Loscalzo J, Keaney JF Jr. L-Homocysteine and L-homocystine stereospecifically induce endothelial nitric oxide synthase-dependent lipid peroxidation in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2004, 36: 632-40.

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.

Hoshino H, Sygiyama S, Ohara A, Goto H, Tsukamoto Y, Ozawa T. Mechanism and prevention of chronic inflammation with trinitrobenzene sulfonic acid in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1992, 19: 717-722.

Hommes D, van den Blink B, Plasse T, Bartelsman J, Xu C, Macpherson B, Tytgat G, Peppelenbosch M, Van Deventer S. Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002, 122:7-14.

Huang RFS, Huang SM, Lin BS, Wei JS, Liu TZ Homocysteine thiolactone induces apoptotic DNA damage mediated by increased intracellular hydrogen peroxide and caspase 3 activation in HL-60 cells. *Life Sci* 2001, 68: 2799-811.

Huang RF, Hsu YC, Lin HL, Yang FL. Folate depletion and elevated plasma homocysteine promote oxidative stress in rat livers. *J Nutr* 2001, 131: 33-8.

Hugot JP, Cézard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, Montague S, Gassull M, Christensen S, Finkel Y, Gower-Rousseau C, Modigliani R, Zouali H, Lesage S,

- Chamaillard M, Macry J, Thomas G, Victor JM, GETAID.** Clustering of Crohn's disease within affected sibships. *Eur J Hum Genet* 2003, 11: 179-84.
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard 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.
- Hustad S, Ueland PM, Vollset SE, Zhang Y, Bjorke-Monsen AL, Schneede J.** Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine: effect modification by the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Clin Chem* 2000, 46: 1065-71.
- Imura M, Nakamura T, Shinozaki S, Iizuka B, Inoue Y, Suzuki S, Hayashi N.** Bax is downregulated in inflamed colonic mucosa of ulcerative colitis. *Gut* 2000, 47: 228-35.
- Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP.** Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999, 99: 3092-5.
- Iwamoto M, Koji T, Makiyama K, Kobayashi N, Nakane PK.** Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis. *J Pathol* 1996, 180: 152-9.
- Jacobsen DW.** Hyperhomocysteinemia and oxidative stress: time for a reality check? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20: 1182-4.
- Jacobsen DW, Catanesu O, Dibello PM, Barbato JC.** Molecular targeting by homocysteine: a mechanism for vascular pathogenesis. *Clin Chem Lab Med* 2005, 43: 1076-83.
- Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J.** Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr* 2001, 73: 613-21.
- Jacques PF, Kalmbach R, Bagley PJ, Russo GT, Rogers G, Wilson PW, Rosenberg IH, Selhub J.** The relationship between riboflavin and plasma total homocysteine in the Framingham Offspring cohort is influenced by folate status and the C677T transition in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *J Nutr* 2002, 132: 283-8.
- James GK, Jones MW, Pudek MR.** Homocyst(e)ine levels in patients on phenytoin therapy. *Clin Biochem* 1997, 30: 647-9.
- Janosik M, Kery V, Gaustadnes M, Maclean KN, Kraus JP.** Regulation of human cystathionine beta-synthase by S-adenosyl-L-methionine: evidence for two catalytically active conformations involving an autoinhibitory domain in the C-terminal region. *Biochemistry* 2001, 40: 10625-33.
- Jakubowski H.** Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. *J Nutr* 2000, 130: 377S-381S.
- Jakubowski H.** Homocysteine is a protein amino acid in humans implications for homocysteine-linked disease. *J Biol Chem* 2002, 277: 30425-30428.
- Jakubowski H.** Anti-N-homocysteinylation protein autoantibodies and cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med* 2005, 43: 1011-4.
- Jakubowski H.** Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *J Nutr* 2006, 136: 1741S-1749S.

- Jiang L, Xia B, Li J , Mei Ye, Wenjuan Yan, Changsheng Deng, Yijuan Ding, Hesheng Luo, Wei Hou, Qiu Zhao, Nanzhi Liu, Hongyu Ren, Xiaohua Hou, Hualin Xu.** Retrospective survey of 452 patients with inflammatory bowel disease in Wuhan city, central China. *Inflamm Bowel Dis* 2006, 12: 212–17.
- Jiang XL, Cui HF.** An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002, 8: 158–61.
- Jiang Y, Jiang J, Xiong J, Cao J, Li N, Li G, Wang S.** Homocysteine-induced extracellular superoxide dismutase and its epigenetic mechanisms in monocytes. *J Exp Biol* 2008, 211: 911-20.
- 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: 724-730.
- Ka-Ho Lok, Hiu-Gong Hung, Chi-Ho Ng, Kuifa Chang Kwong, Wai-Man Yip, Siu-Fai Lau, Kin-Kong Li, Kam-Fu Li and Ming-Leung Szeto.** Epidemiology and clinical characteristics of ulcerative colitis in Chinese population: Experience from a single center in Hong Kong. *J Gastroenterol Hepatol* 2008, 23: 406-10.
- 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, 293: G918.
- Karamanolis DG, Kyrlagkisis I, Konstantinou K, Papatheodoridis GV, Karameris A, Mallas E, Ladas SD, Raptis S.** The Bcl2/Bax system and apoptosis in ulcerative colitis. *Hepatology* 2007, 44:1085-8.
- Karmeli F, Cohen P, Rachmilewitz D.** Cyclooxygenase2 inhibitors ameliorate the severity of experiment colitis in rats. *J Clin Invest* 1996, 98 :2076-2085.
- Kastelein, RA, Hunter, C.A, Cua, D. J.** Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2007, 25: 221–242.
- Kaufman RJ, Scheuner D, Schroder M, Shen X, Lee K, Liu CY, Arnold SM.** The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, 3: 411-21.
- Kihara N, De la Fuente SG, Fujino K, Takahashi T, Pappas TN, Mantyh CR.** Vanilloid receptor-1 containing primary sensory neurones mediate dextran sulphate sodium induced colitis in rats. *Gut* 2003, 52: 713-9.
- Kim DJ, Koh JM, Lee O, Lee YS, Kim YS, Park JY, Lee KU, Kim GS.** Homocysteine enhances apoptosis in human bone marrow stromal cells. *Bone* 2006, 39: 582-90.
- Klement E, Lysy J, Hoshen M, Avitan M, Goldin E, Israeli E.** Childhood hygiene is associated with the risk for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 2008, 103: 1775-82.
- Klingenstein G, Levy RN, Kornbluth A, Shah AK, Present DH.** Inflammatory bowel disease related osteonecrosis: report of a large series with a review of the literature. *Aliment Pharmacol Ther* 2005, 21: 243-9.
- Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nunez G, Flavell RA.** Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005, 307: 731-4.

- Kontoyiannis D, Kotlyarov A, Carballo E, Alexopoulou L, Blackshear PJ, Gaestel M, Davis R, Flavell R, Kollias G.** Interleukin-10 targets p38 MAPK to modulate ARE-dependent TNF mRNA translation and limit intestinal pathology. *EMBO J* 2001, 20: 3760-70.
- Korenaza D, Takesue F, Kido K, Yasuda M, Inutsuka S, Honda M, Nagahama S.** Antioxidant defense system of colonic tissue and cancer development in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *J Surg Res* 2002, 102:144-9.
- Kornbluth A, Sachar DB.** Ulcerative colitis practice guidelines in adults. American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol* 1997, 97: 204-211.
- 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.
- 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.
- Kraus JP.** Biochemistry and molecular genetics of cystathionine beta-synthase deficiency. *Eur J Pediatr* 1998, 157 Suppl 2: S50-3.
- Kriegelstein 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.
- Krimsky M, Yedgar S, Aptekar L, Schwob O, Goshen G, Gruzman A, Sasson S, Ligumsky M.** Amelioration of TNBS-induced colon inflammation in rats by phospholipase A2 inhibitor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003, 285: G586-92.
- Krishna M, Woda B, Savas L, Baker S, Banner B.** Expression of p53 antigen in inflamed and regenerated mucosa in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Mod Pathol* 1995, 8: 654-7.
- Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CB, Verspaget HW.** Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J Pathol* 2003, 201: 28-36.
- Kruman II, Kumaravel TS, Lohani A, Riccardi P, Evangelista A, Carducci B, Caruso A.** Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2002, 22: 1752-62.
- Kyriakis JM, Avruch J.** Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001, 81: 807-69.
- Lang D, Kredan MB, Moat SJ, Hussain SA, Powell CA, Bellamy MF, Powers HJ, Lewis MJ.** Homocysteine-induced inhibition of endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta: role for superoxide anions. *ArteriosclerThromb Vasc Biol* 2000, 20: 422-7.
- Lauritsen K, Laursen LS, Bukhave K, Rask-Madsen J.** Effects of topical 5-aminosalicylic acid and prednisolone on prostaglandin E₂ and leukotriene B₄ levels determined by equilibrium in vivo dialysis of rectum in relapsing ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1986, 91: 837-844.

- Lee BJ, Lin PT, Liaw YP, Chang SJ, Cheng CH, Huang YC.** Homocysteine and risk of coronary artery disease: Folate is the important determinant of plasma homocysteine concentration. *Nutrition* 2003, 19: 577-83.
- Lee KM, Yeo M, Choue JS, Jin JH, Park SJ, Cheong JY, Lee KJ, Kim JH, Hahm KB.** Protective mechanism of epigallocatechin-3-gallate against *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial cytotoxicity via the blockage of TLR-4 signaling. *Helicobacter* 2004, 9: 632-42.
- Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamailard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP.** CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002, 70: 845-857.
- Lentz SR, Erger RA, Dayal S, Maeda N, Malinow MR, Heistad DD, Faraci FM.** Folate dependence of hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction in cystathionine β -synthase-deficient mice. *Am J Physiol* 2000, 278: H970-H975.
- Lentz SR, Piegors DJ, Fernández JA, Erger RA, Arning E, Malinow MR, Griffin JH, Bottiglieri T, Haynes WG, Heistad DD.** Effect of hyperhomocysteinemia on protein C activation and activity. *Blood* 2002, 100: 2108-12.
- Lentz SR, Sobey CG, Piegors DJ, Bhopatkar MY, Faraci FM, Malinow MR, Heistad DD.** Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 1996, 98: 24-9.
- Leoncini G, Bruzzese D, Signorello MG.** Activation of p38 MAPKinase/ cPLA2 pathway in homocysteine-treated platelets. *J Thromb Haemost* 2006, 4: 209-16.
- 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.
- Leong RW, Lau JY, Sung JJ.** The epidemiology and phenotype of Crohn's disease in the Chinese population. *Inflamm Bowel Dis* 2004, 10: 646-51.
- Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP, Reddy GM, Cerchia R, Kahn E, Weissman GS, Katz S, Floyd RA, McKinley MJ, Fisher SE, Mullin GE.** Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1996, 41: 2078-86.
- Lim A, Sengupta S, McComb ME, Theberge R, Wilson WG, Costello CE, Jacobsen DW.** In vitro and in vivo interactions of homocysteine with human plasma transthyretin. *J Biol Chem* 2003, 278: 49707-13.
- Lim WC, Hanauer SB.** Emerging biologic therapies in inflammatory bowel disease. *Rev Gastroenterol Disord* 2004, 4: 66-85.
- Lindberg E, Jarnerot G, Huitfeldt B.** Smoking in Crohn's disease: effect on localization and clinical course. *Gut* 1992, 33: 779-82.
- Loftus CG, Loftus EV, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR.** Ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival. *Gut* 2000, 46: 336-343.

- Loftus EV, Jr, Schoenfeld P, Sandvorn WJ.** The epidemiology and natural history of Crohn's disease in population-based patient cohorts from North America: a systematic review. *Aliment Pharmacol Ther* 2002, 16:51-60.
- Madamanchi NR, Runge MS.** Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res* 2007, 100: 460-73.
- Mahmood A, Needham J, Prosser J, Mainwaring J, Trebble T, Mahy G, Ramage J.** Prevalence of hyperhomocysteinaemia, activated protein C resistance and prothrombin gene mutation in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005, 17: 739-44.
- 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.
- 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.
- Maier JAM, Hla T, Maciag T.** Cyclooxygenase is an immediate-early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1990, 265: 10805-10808.
- 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.
- Majors AK, Sengupta S, Willard B, Kinter MT, Pyeritz RE, Jacobsen DW.** Homocysteine binds to human plasma fibronectin and inhibits its interaction with fibrin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002, 22: 1354-9.
- Mangiagalli A, Samuele A, Armentero MT, Bazzini E, Nappi G, Blandini F.** Effects of homocysteine on apoptosis-related proteins and anti-oxidant systems in isolated human lymphocytes. *Eur J Biochem* 2004, 271: 1671-6.
- Marklund S, Marklund G.** Involvement of the superoxide anion radical in autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 1974, 47: 469-74.
- Masferrer JL, Seiber t K, Zweifel B, Needleman P.** Endogenous glucocorticoids regulate inducible cyclooxygenase enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89: 3917-3921.
- McDonald C, Chen FF, Ollendorff V, Ogura Y, Marchetto S, Lecine P, Borg JP, Nunez G.** A role for Erbin in the regulation of Nod2-dependent NF-kappaB signaling. *J Biol Chem* 2005, 280: 40301-40309.
- 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.
- McKinley MC, McNulty H, McPartlin J, Strain JJ, Pentieva K, Ward M, Weir DG, Scott JM.** Low dose vitamin B6 effectively lowers fasting plasma homocysteine in healthy elderly persons who are folate and riboflavin replete. *Am J Clin Nutr* 2001, 73: 759-64.
- Melgar S, Karlsson A et Michaëlsson E.** Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005, 288: 1328-38.
- Mitchell JA, Larkin S, Williams TJ.** Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. *Biochem Pharmacol* 1995, 50: 1535-1542.

- Minami T, Shinomura Y, Miyagawa J, Tojo H, Okamoto M, Matsuzawa Y.** Immunohistochemical localization of group II phospholipase A2 in colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1997, 92: 289-92.
- Minami T, Shinomura Y, Miyagawa J, Tojo H, Okamoto M, Matsuzawa Y.** Immunohistochemical localization of group II phospholipase A2 inhibitor, on human neutrophil arachidonic acid mobilization and lipid mediator formation. *J Pharmacol Exp Ther* 1994, 268: 709-717.
- Moat SJ, Ashfield-Watt PA, Powers HJ, Newcombe RG, McDowell IF.** Effect of riboflavin status on the homocysteine-lowering effect of folate in relation to the MTHFR (C677T) genotype. *Clin Chem* 2003, 49: 295-302.
- 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.
- 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.
- Mudd SH, Finkelstein JD, Refsum H, Ueland PM, Malinow MR, Lentz SR, Jacobsen DW, Brattstrom L, Wilcken B, Wilcken DE, Blom HJ, Stabler SP, Allen RH, Selhub J, Rosenberg IH.** Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested consensus terminology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20: 1704-6.
- Mulder TP, Verspaget HW, Janssens AR, de Bruin PA, Pena AS, Lamers CB** Decrease in two intestinal copper/zinc containing proteins with antioxidant function in inflammatory bowel disease. *Gut* 1991, 32:1146-50.
- Murthy SN, Copper HS, Shim H, Shah RS, Ibrahim SA and Sedergran DJ.** Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporine. *Dig Dis Sci* 1993, 38: 1722-1734.
- Namour F, Olivier J, Abdelmoutaleb I, Adjalla C, Debard R, Salvat C, Gueant JL.** 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.
- Nihei S, Tasaki H, Yamashita K, Ozumi K, Morishita T, Tsutsui M, Okazaki M, Nakashima Y, Adachi T.** Hyperhomocysteinemia is associated with human coronary atherosclerosis through the reduction of the ratio of endothelium-bound to basal extracellular superoxide dismutase. *Circ J* 2004, 68: 822-8.
- Nikolaus S, Raedler A, Kühbacker T, Sfikas N, Fölsch UR, Schreiber S.** Mechanisms in failure of infliximab for Crohn's disease. *Lancet*. 2000, 356: 1475-9.
- Nishinaga M, Ozawa T, Shimada K.** Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest* 1993, 92:1381-6.
- 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.
- Nonaka H, Tsujino T, Watari Y, Emoto N, Yokoyama M.** Taurine prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine:

- Amelioration of homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress by taurine. *Circulation* 2001, 104: 1165– 1170.
- 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, Nuñez G, Cho JH.** A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001, 411: 603-6.
- Okazaki K, Onodera H, Watanabe N, Nakase H, Uose S, Matsushita M, Kawanami C, Imamura M, Chiba T.** A patient with improvement of ulcerative colitis after appendectomy. *Gastroenterology* 2000, 119: 502-6.
- Oku T, Iyama S, Sato T, Sato Y, Tanaka M, Sagawa T, Kuribayashi K, Sumiyosi T, Murase K, Machida T, Okamoto T, Matsunaga T, Takayama T, Takahashi M, Kato J, Hamada H, Niitsu Y.** Amelioration of murine dextran sulfate sodium-induced colitis by ex vivo extracellular superoxide dismutase gene transfer. *Inflamm Bowel Dis* 2006, 12: 630-40.
- 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.
- O'Morain C, Smethurst P, Levi AJ, Peters TJ.** Organelle pathology in ulcerative and Crohn's colitis with special reference to the lysosomal alterations. *Gut* 1984, 25: 455–9.
- Ostenbrug 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.
- 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.
- Ouyang Q, Tandon R, Goh KL, Ooi CJ, Ogata H, Fiocchi C.** The emergence of inflammatory bowel disease in the Asian Pacific region. *Curr Opin Gastroenterol* 2005, 21: 408–13.
- 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.
- Papa A, Danese S, Gasbarrini G, Gasbarrini A.** Genetic and nutritional predictors of hyperhomocysteinemia in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2002, 97: 490-1.
- Papa A, Danese S, Urgesi R, Grillo A, Guglielmo S, Roberto I, Bonizzi M, Guidi L, De Vitis I, Santoliquido A, Fedeli G, Gasbarrini G, Gasbarrini A.** Early atherosclerosis in patients with inflammatory bowel disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2006, 10: 7-11.
- Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F, To W, Wagner J, O'Farrell AM, McClanahan T, Zurawski S, Hannum C, Gorman D, Rennick DM, Kastelein RA, de Waal Malefyt R, Moore KW.** A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12R β 1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol* 2002, 168: 5699–5708.

- Park JB, Yang SK, Byeon JS, Park ER, Moon G, Myung SJ, Park WK, Yoon SG, Kim HS, Lee JG, Kim JH, Min Y, Kim KY.** Familial occurrence of inflammatory bowel disease in Korea. *Inflamm Bowel Dis* 2006, 12: 1146–51.
- Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, Roberts RG, Nimmo ER, Cummings FR, Soars D, Drummond H, Lees CW, Khawaja SA, Bagnall R, Burke DA, Todhunter CE, Ahmad T, Onnie CM, McArdle W, Strachan D, Bethel G, Bryan C, Lewis CM, Deloukas P, Forbes A, Sanderson J, Jewell DP, Satsangi J, Mansfield JC, Wellcome Trust Case Control Consortium, Cardon L, Mathew CG.** Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nature Genet* 2007, 39: 830–832.
- Peracchi M, Bamonti Catena F, Pomati M, De Franceschi M, Scalabrino G.** Human cobalamin deficiency: alterations in serum tumour necrosis factor-alpha and epidermal growth factor. *Eur J Haematol*. 2001, 67: 123-7.
- Perla-Kaján J, Twardowski T, Jakubowski H.** Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids* 2007, 32: 561-72.
- Perna AF, Satta E, Acanfora F, Lombardi C, Ingrosso D, De Santo NG.** Increased plasma protein homocysteinylolation in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2007, 69: 869–876.
- Peyrin-Biroulet L, Barraud H, Ancel D, Petit-Laurent F, Bigard MA, Gueant JL, Bronowicki JP.** Métabolisme des folates et cancérogénèse colorectale. *Gastroenterol Clin Biol* 2004, 28: 582-92.
- Peyrin-Biroulet L, Gueant-Rodriguez RM, Bronowicki JP, Bigard MA, Gueant JL.** MTHFR, MTR, MTRR, TCH polymorphisms and homocysteine in a French Population with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2006, 130 (Suppl 2):A593.
- 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, 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.
- 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.
- Peyrin-Biroulet L, Desreumaux P, Sandborn WJ, Colombel JF.** Crohn's disease: beyond antagonists of tumour necrosis factor. *Lancet* 2008, 372: 67-81.
- 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.
- Pierik, M. Joossens S, Van Steen K, Van Schuerbeek N, Vlietinck R, Rutgeerts P, Vermeire S.** Toll-like receptor 1, 2, and 6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2006, 12: 1–8.
- Plat J, Mensink RP.** Food components and immune function. *Curr Opin Lipidol* 2005, 16: 31-7.

- Plowey ED, Cherra SJ, Liu YJ, Chu CT.** Role of autophagy in G2019SLRRK2-associated neurite shortening in differentiated SH-SY5Y cells. *J Neurochem* 2008, 105: 1048–1056.
- Podda G, Faioni EM, Zighetti ML, Cattaneo M.** No effect of fasting plasma total homocysteine on protein C activity in vitro. *Blood* 2003,101: 2446-7.
- Poddar R, Sivasubramanian N, Dibello PM, Robinson K, Jacobsen D.** 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.
- Poirier LA.** The effects of diet, genetics and chemicals on toxicity and aberrant DNA methylation: an introduction. *J Nutr* 2002, 132: 2336S-2339S.
- Pritchard KA Jr, Groszek L, Smalley DM, Sessa WC, Wu M, Villalon P, Wolin MS, Stemerman MB.** Native low density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ Res* 1995, 77: 510-8.
- Quinn CT, Griener JC, Bottiglieri T, Hyland K, Farrow A, Kamen BA.** Elevation of homocysteine and excitatory amino acid neurotransmitters in the CSF of children who receive methotrexate for the treatment of cancer. *J Clin Oncol* 1997, 15: 2800-6.
- 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.
- Reimund JM, Hirth C, Koehl C, Baumann R, Duclos B.** Antioxidant and immune status in active Crohn's disease. A possible relationship. *Clin Nutr* 2000, 19: 43-8.
- Ribardo DA, Crowe SE, Kuhl KR, Peterson JW, Chopra AK.** Prostaglandin levels in stimulated macrophages are controlled by phospholipase A2-activating protein and by activation of phospholipase C and D. *J Biol Chem.* 2001, 276: 5467-75.
- Robert K, Maurin N, Ledru A, Delabar J, Janel N.** Hyperkeratosis in cystathionine beta synthase-deficient mice: an animal model of hyperhomocysteinemia. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004, 280: 1072-6.
- Robert K, Nehmé 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.
- Roberts PJ, Morgan K, Miller R, Hunter JO, Middleton SJ.** Neuronal COX-2 expression in human myenteric plexus in active inflammatory bowel disease. *Gut* 2001, 48: 468-72.
- 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.
- Rosenstiel P, Fantini M, Brautigam K, Kuhbacher T, Waetzig GH, Seegert D, Schreiber S.** TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003, 124: 1001-1009.
- 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.
- Roubenoff R, Dellaripa P, Nadeau MR, Abad LW, Muldoon BA, Selhub J, Rosenberg IH.** Abnormal homocysteine metabolism in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997,40:718-22.

- 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: 14844-14852.
- Rasmussen LB, Ovesen L, Bulow I, Knudsen N, Laurberg P, Perrild H.** Folate intake, lifestyle factors, and homocysteine concentrations in younger and older women. *Am J Clin Nutr* 2000, 72: 1156-63.
- Registre EPIMAD.** Evolution de l'incidence de la maladie de Crohn et de la Rectocolite hémorragique (1988-1999) dans le nord de la France. Résultats non publiés.
- Reinecker HC, Steffen M, Witthoeft T, Pueger I, Schreiber S, MacDermott RP, Raedler A.** Enhanced secretion of tumour necrosis factor- α , IL-6, and IL-1 by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol*. 1993, 94: 174-181.
- Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, Green T, Kuballa P, Barmada MM, Datta LW, Shugart YY, Griffiths AM, Targan SR, Ippoliti AF, Bernard EJ, Mei L, Nicolae DL, Regueiro M, Schumm LP, Steinhart AH, Rotter JI, Duerr RH, Cho JH, Daly MJ, Brant SR.** Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat genet* 2007, 39: 596-604.
- 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.
- Robert K, Vialard F, Thierry E, Toyama K, Sinet PM, Janel N, London J.** Expression of the cystathionine beta synthase (CBS) gene during mouse development and immunolocalization in adult brain. *J Histochem Cytochem* 2003, 51: 363-71.
- Rogers EJ, Chen S, Chan A.** Folate deficiency and plasma homocysteine during increased oxidative stress. *N Engl J Med* 2007, 357: 421-2.
- 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: 14844-14852.
- Russel MG, Dorant E, Brummer RJ, van de Kruijs MA, Muris JW, Bergers JM, Goedhard J, Stockbrügger RW.** Appendectomy and the risk of developing ulcerative colitis or Crohn's disease: results of a large case-control study. South Limburg Inflammatory Bowel Disease Study Group. *Gastroenterology* 1997, 113: 377-82.
- Russel MG, Volovics A, Schoon EJ, van Wijlick EH, Logan RF, Shivananda S, Stockbrügger RW.** Inflammatory bowel disease: is there any relation between smoking status and disease presentation? European Collaborative IBD Study Group. *Inflamm Bowel Dis* 1998, 4: 182-6.
- Rutkowski DT, Kaufman RJ.** A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* 2004, 14: 20-8.

- Ryan P, Bennett MW, Aarons S, Lee G, Collins JK, O'Sullivan GC, O'Connell J, Shanahan F.** PCR detection of Mycobacterium paratuberculosis in Crohn's disease granulomas isolated by laser capture microdissection. *Gut* 2002, 51: 665-70.
- Saibeni S, Cattaneo M, Vecchi M, Zighetti ML, Lecchi A, Lombardi R, Meucci G, Spina L, de Franchis R.** Low vitamin B6 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.
- Sandborn WJ, Hanauer SB.** Infliximab in the treatment of Crohn's disease: a user's guide for clinicians. *Am J Gastroenterol* 2002, 97: 2962–2972.
- Sass JO, Nakanishi T, Sato T, Sperl W, Shimizu A.** S-homocysteinylation of transthyretin is detected in plasma and serum of humans with different types of hyperhomocysteinemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 310: 242–6.
- Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF.** The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006, 55: 749-53.
- Scalabrino G, Carpo M, Bamonti F, Pizzinelli S, D'Avino C, Bresolin N, Meucci G, Martinelli V, Comi GC, Peracchi M.** High tumor necrosis factor-alpha [corrected] levels in cerebrospinal fluid of cobalamin-deficient patients. *Ann Neurol* 2004, 56: 886-90.
- Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM.** Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000, 101: 1899-1906.
- Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J, Hamling J, Koop I, Groessner B, Lochs H, Raedler A.** Tumour necrosis factor and interleukin 1 in relapse of Crohn's disease. *Lancet* 1999, 353: 459-461.
- Seller MJ, Adinolfi M.** The curly-tail mouse: an experimental model for human neural tube effects. *Life Sci* 1981, 29: 1607-15.
- Sengupta S, Wehbe C, Majors AK, Ketterer ME, DiBello PM, Jacobsen DW.** Relative roles of albumin and ceruloplasmin in the formation of homocysteine, homocysteine-cysteinemixed disulfide and cystine in circulation. *J Biol Chem* 2001, 276: 46896– 904.
- Serafini EP, Kirk AP, Chambers TJ.** Rate and pattern of epithelial cell proliferation in ulcerative colitis. *Gut* 1981, 22: 648-52.
- Sharon P, Stenson WF.** Enhanced synthesis of leukotriene B4 by colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1984, 86: 453-460.
- Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M.** Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between North and South? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996, 39: 690-7.
- Simms LA, Doecke JD, Walsh MD, Huang N, Fowler EV, Radford-Smith GL.** Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut* 2008, 57: 903-10.
- Singh VP, Patil CS, Jain NK, Kulkarni SK.** Aggravation of inflammatory bowel disease by cyclooxygenase-2 inhibitors in rats. *Pharmacology* 2004, 72: 77-84.
- Singh SB, Davis AS, Taylor GA, Deretic V.** Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* 2006, 313: 1438–1441.

- Signorello MG, Pascale R, Leoncini G.** Effect of homocysteine on arachidonic acid release in human platelets. *Eur J Clin Invest* 2002, 32: 279-84.
- Singer II, Kawka DW, Schloemann S, Tessner T, Riehl T, Stenson WF.** Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998, 115: 297-306.
- Slot WB, van Kasteel V, Coerkamp EG, Seelen PJ, van der Werf SD.** Severe thrombotic complications in a postpartum patient with active Crohn's disease resulting in ischemic spinal cord injury. *Dig Dis Sci* 1995, 40: 1395-9.
- Sood A, Midha V, Sood N, Bhatia AS, Avasthi G.** Incidence and prevalence of ulcerative colitis in Punjab, North India. *Gut* 2003, 52: 1587-90.
- Stevceva L, Pavli P, Husband A, Ramsay A, Doe WF.** Dextran sulphate sodium-induced colitis is ameliorated in interleukin 4 deficient mice. *Genes Immun* 2001, 2: 309-16.
- Strater J, Wellisch I, Riedl S, Walczak H, Koretz K, Tandara A, Krammer PH, Moller P.** CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997, 113:160-7.
- Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS.** The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2002, 20: 495-549.
- Sunden SL, Renduchintala MS, Park EI, Miklasz SD, Garrow TA.** Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. *Arch Biochem Biophys*. 1997, 345: 171-4.
- Sunder-Plassmann G, Fodinger M.** Genetic determinants of the homocysteine level. *Kidney Int Suppl* 2003: S141-4.
- Tabernero A, Reimund JM, Chasserot S, Muller CD, Andriantsitohaina R.** Cyclooxygenase-2 expression and role of vasoconstrictor prostanoids in small mesenteric arteries from patients with Crohn's disease. *Circulation* 2003, 107: 1407-10.
- Tamaki H, Nakamura H, Nishio A, Nakase H, Ueno S, Uza N, Kido M, Inoue S, Mikami S, Asada M, Kiriya K, Kitamura H, Ohashi S, Fukui T, Kawasaki K, Matsuura M, Ishii Y, Okazaki K, Yodoi J, Chiba T.** Human thioredoxin-1 ameliorates experimental murine colitis in association with suppressed macrophage inhibitory factor production. *Gastroenterology* 2006, 131: 1110-21.
- Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, Rutgeerts PJ.** A short-term study of chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease Study Group. *N Engl J Med*. 1997, 337:1029-35.
- Tarlinton D, Light A, Metcalf D, Harvey RP, Robb L.** Architectural defects in the spleens of Nkx2-3 deficient mice are intrinsic and associated with defects in both B cell maturation and T cell-dependent immune responses. *J Immunol* 2003, 170, 4002-4010.
- Tawakol A, Omland T, Gerhard M, Wu JT, Creager MA.** Hyperhomocystinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation* 1997, 95: 1119-1121.
- Tham D, Whittin J, Cohen H.** Increased expression of extracellular glutathione peroxidase in mice with dextran sodium sulfate-induced experimental colitis. *Ped Res* 2002, 51: 641-6.

- The Homocysteine Studies Collaboration.** Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke a meta-analysis. *JAMA* 2002, 288: 2015–22.
- Tomita Y, Jyoyama H, Kobayashi M, Kuwabara K, Furue S, Ueno M, Yamada K, Ono T, Teshirogi I, Nomura K, Arita H, Okayasu I, Hori Y.** Role of group IIA phospholipase A2 in rat colitis induced by dextran sulfate sodium. *Eur J Pharmacol.* 2003, 472:147-58.
- Torok H. P. Glas J, Tonenchi L, Bruennler G, Folwaczny M, Folwaczny C.** Crohn's disease is associated with a toll-like receptor 9 polymorphism. *Gastroenterology* 2004: 127, 365–366.
- Tyagi N, Ovechkin AV, Lominadze D, Tyagi SC.** Mitochondrial mechanism of microvascular endothelial cells apoptosis in hyperhomocysteinemia. *J Cell Biochem* 2006, 98: 1150-62.
- Ueland PM.** Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin Chem* 1995, 41: 340 –342.
- Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE.** Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 2001, 22: 195-201.
- Ullegaddi R, Powers HJ, Gariballa SE.** B group vitamin supplementation mitigates oxidative damage after acute ischaemic stroke. *Clin Sci (Lond)* 2004, 107: 477-84.
- Undas A, Williams EB, Butenas S, Orfeo T, MannKG.** Homocysteine inhibits inactivation of Factor Va by activated protein C. *J Biol Chem* 2001, 276: 4389–97.
- 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: 17012–17017.
- Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D.** Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 2000, 287: 664-6.
- Uribe A, Alam M, Midtvedt T.** E2 prostaglandins modulate cell proliferation in the small intestinal epithelium of the rat. *Digestion* 1992, 52: 157-64.
- Van Beynum IM, den Heijer M, Thomas CM, Afman L, Oppenraay-van Emmerzaal D, Blom HJ.** Total homocysteine and its predictors in Dutch children. *Am J Clin Nutr* 2005, 81: 1110-6.
- Van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ.** A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube defects ? *Am J Hum Genet* 1998, 62: 1044-51.
- Van ede AE, Laan RF, Blom HJ, Boers GH, Haagsma CJ, Thomas CM, et al.** Homocysteine and folate status in methotrexate-treated patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2002, 41: 658-65.
- 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.
- 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.

- Vetuschi A, Latella G, Sferra R, Caprilli R, Gaudio E.** Increased proliferation and apoptosis of colonic epithelial cells in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci* 2002, 47: 1447-57.
- Vijayalakshmi B, Sesikera B, Udaykumar P, Kalyanasundaram S, Raghunath M.** Effects of vitamin restriction and supplementation on rat intestinal epithelial cell apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2005, 38: 1614-24.
- Waetzig GH, Rosenstiel P, Nikolaus S, Seegert D, Schreiber S.** Differential p38 mitogen-activated protein kinase target phosphorylation in responders and nonresponders to infliximab. *Gastroenterology* 2003, 125: 633-4.
- Waetzig GH, Seegert D, Rosenstiel P, Nikolaus S, Schreiber S.** p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease. *J Immunol* 2002, 168: 5342-51.
- Wang G, Siow YL, O K.** Homocysteine stimulates nuclear factor kappaB activity and monocyte chemoattractant protein-1 expression in vascular smooth-muscle cells: a possible role for protein kinase C. *Biochem J* 2000, 352: 817-826.
- Wang G and O K.** Homocysteine stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 receptor (CCR2) in human monocytes: possible involvement of oxygen free radicals. *Biochem J* 2001, 357: 233-40.
- Wang J, Dudman NP, Wilcken DE.** Effects of homocysteine and related compounds on prostacyclin production by cultured human vascular endothelial cells. *Thromb Haemost* 1993, 70: 1047-1052.
- 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.
- Warren S, Sommers SC.** Pathogenesis of ulcerative colitis. *Am J Pathol* 1949, 25: 657-74.
- Watanabe M, Osada J, Aratani Y, Kluckman K, Reddick R, Malinow MR, Maeda N.** Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocystinemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92: 1585- 1589.
- Weaver, CT, Hatton, RD, Mangan, PR, Harrington, LE.** IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol*. 2007, 25: 851-852.
- 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 USA* 2005, 102:18129-34.
- Weiss N, Heydrick S, Zhang YY, Bierl C, Cap A, Loscalzo J.** Cellular redox state and endothelial dysfunction in mildly hyperhomocysteinemic cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002, 22: 34-41.
- Weiss N, Zhang YY, Heydrick S, Bierl C, Loscalzo J.** Overexpression of cellular glutathione peroxidase rescues homocyst(e)ine-induced endothelial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001, 98: 12503-8.
- Welch GN, Loscalzo J.** Mechanisms of disease: homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 1998, 338: 1042-50.

- Widner B, Leblhuber F, Frick B, Laich A, Artner-Dworzak E, Fuchs D.** Moderate hyperhomocysteinaemia and immune activation in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2002 , 109: 1445-52.
- Wilcken DE, Wang XL, Adachi T, Hara H, Duarte N, Green K, Wilcken B.** Relationship between homocysteine and superoxide dismutase in homocystinuria: possible relevance to cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000, 20: 1199-202.
- Xavier RJ, Podolsky DK.** Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007, 448: 427-34.
- Yamada K, Kawata T, Wada M, Isshiki T, Onoda J, Kawanishi T, Kunou A, Tadokoro T, Tobimatsu T, Maekawa A, Toraya T.** Extremely low activity of methionine synthase in vitamin B-12-deficient rats maybe related to effects on coenzyme stabilization rather than to changes in coenzyme induction. *J Nutr* 2000, 130: 1894-900.
- Ymamda M, Ohkusa T, Okayasu I:** Occurrence of dysplasia and adenocarcinoma after experimental chronic ulcerative colitis in hamsters induced by dextran sulphate sodium. *Gut* 1992, 33: 521-527
- Yamamoto-Furusho JK, Barnich N, Xavier R, Hisamatsu T, Podolsky DK.** Centaurin betal down-regulates nucleotidebinding oligomerization domains 1 and 2 dependent NF kappaB activation. *J Biol Chem* 2006, 281: 36060-36070.
- Yamamoto M, Hara H, Adachi T.** Effects of homocysteine on the binding of extracellular-superoxide dismutase to the endothelial cell surface. *FEBS Lett* 2000,486:159-62.
- Yang SK, Loftus EV Jr, Sandborn WJ.** Epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Inflamm Bowel Dis* 2001, 7: 260-70.
- Yang X, GaoY, Zhou J, ZhenY,YangY,Wang J, Song L, LiuY, XuH, Chen Z, Hui R.** Plasma homocysteine thiolactone adducts associated with risk of coronary heart disease. *Clin Chim Acta* 2006, 364: 230–234.
- Yasuhara T, Nokihara K.** Quantitative determination of biological sulfhydryl groups by postcolumn derivatization and elucidation of microheterogeneity of serum albumins. *Anal Chem* 1998, 70: 3505-9.
- Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W, Murphy E, Sathe M, Cua DJ, Kastelein RA, Rennick D.** IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006, 116: 1310-1316.
- Zarychanski R, Houston DS.** Plasma homocysteine concentration is not associated with activated protein C resistance in patients investigated for hypercoagulability. *Thromb Haemost* 2004, 91: 1115-22.
- Zezos P, Papaioannou G, Nikolaidis N, Vasiliadis T, Giouleme O, Evgenidis N.** Hyperhomocysteinemia in ulcerative colitis is related to folate levels. *World J Gastroenterol.* 2005, 11: 6038-42.
- 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.
- Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B.** Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is

distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. Free Radic Biol Med 2003, 34:1359-68.

Résumé

Deux études de population, en Chine centrale et en Lorraine, ont mis en évidence une association des gènes *MTR*, *MTRR* et *MTHFR* avec la maladie de Crohn et la recto-colite hémorragique. De plus entre *MTRR* et stress oxydant il existe un lien qui dépend de la concentration de superoxyde dismutase et du degré de sévérité de la maladie. Par ailleurs dans la maladie de Crohn il existe une élévation importante de l'homocystéine, une diminution de la vitamine B12 liée à la résection iléale et à une influence du stress oxydant sur les capacités réductrices de la vitamine B12 par *MTRR*. Parallèlement, des rats exposés au DSS, qui est un agent inducteur de lésions inflammatoires de la muqueuse colique, présentent une potentialisation de la réaction inflammatoire s'il sont en plus carencés en donneurs de groupement méthyle. Paradoxalement, la carence en groupement méthyle chez ces rats n'entraîne pas d'effet ni sur l'apoptose ni sur le stress oxydant. Par contre, elle induit une augmentation de l'expression des acteurs de la voie p38/cPLA2/COX2 conduisant à une augmentation de la synthèse de PGE2 sans qu'il n'y ait d'influence sur COX1 ni 5-LOX. Ces résultats ouvrent des perspectives physiopathologiques très originales dans les maladies inflammatoires digestives. Ils décrivent des interactions causes-effets dans lesquelles la maladie provoque une malabsorption, donc une carence en donneurs de méthyle, le stress oxydant diminue les capacités de réduction de la vitamine B12 au niveau intra-muqueux et la carence en groupements méthyles exacerbe les mécanismes inflammatoires en réponse à l'agression par des agents exogènes comme les bactéries. Ainsi il peut être utile de dépister la carence en groupements méthyles et de la traiter dans les maladies inflammatoires digestives..

Mots clés : Rectocolite hémorragique, maladie de Crohn, homocystéine, folate, vitamine B12, Méthionine synthase, méthionine synthase réductase, méthylène-tétrahydrofolate-réductase.

Abstract

Studies in populations from Central China and Lorraine showed a correlation between *MTR*, *MTRR*, *MTHFR* and hemorrhagic colitis and Crohn disease. In addition there was a correlation between *MTRR* and oxidative stress depending on superoxyde dismutase concentration and disease severity. Besides, Crohn disease was characterized by elevated homocysteine and decreased vitamin B12 linked to ileal resection and the effect of oxidative stress on *MTRR* capacity to reduce vitamin B12. On the other hand, in rats exposed to DSS, which is a potent inducer of inflammatory lesions in colonic mucosa, the extent of inflammation was aggravated by additional exposure to a diet deficient in methyl group donors. Unexpectedly, methyl group donor deficiency in rats did not yield any effect on apoptosis nor oxidative stress. However methyl group donor deficiency induced elevated expression of actors in the p38/cPLA2/COX2 pathway that leads to PGE2 production without affecting neither COX1 nor 5-LOX. These results uncover new pathophysiological events in inflammatory bowel disease (IBD). They depict intricate relationships in which the disease may cause malabsorption, and therefore a deficiency in methyl donors, oxidative stress decreases the capacity to reduce vitamin B12 in the digestive epithelium and methyl group donors deficiency exacerbates inflammatory mechanisms triggered by exposure to exogenous agents such as bacteria. Thus drawing attention to the screening and treatment of methyl group donors deficiency may help to limit the severity of IBD

Key words: hemorrhagic colitis, Crohn disease, homocysteine, folate, vitamin B12, methionine synthase, methionine synthase reductase, methylene-tetrahydrofolate-reductase.