

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

Université Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Animale

N° de série : 261/ Mag/ 2008  
N° d'ordre : 016/ SN/ 2008

# Mémoire

En vue d'obtention du diplôme de magistère  
En génétique des pathologies humaines

Présenté par: **Mr Mechri adem**

**Etude de la mutation C677T de la  
méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR)  
dans les accidents thromboemboliques veineux**

Présenté et soutenu le : 30/ 06/ 2008

Membres du jury:

<b>Président :</b>	<b>Mr ABADI N</b>	<b>Prof.</b> C. H. U. de Constantine
<b>Rapporteur :</b>	<b>Melle BENLATRECHE C</b>	<b>Prof.</b> C. H. U. de Constantine
<b>Examineurs:</b>	<b>Mme SATT A D</b>	<b>Prof.</b> Université Mentouri
	<b>Mr ROULA D</b>	<b>Prof.</b> C. H. U. de Constantine

*Année universitaire : 2007/ 2008*

# Remerciement

*Je tiens à remercier toutes personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire :*

*Professeur Belatreche C du CHU de Constantine, pour sa disponibilité à encadrer ce travail à travers ses critiques et ses propositions d'améliorations.*

*Professeur Satta D de l'université de Constantine par sa générosité et son aide, son orientation et sa disponibilité.*

*Professeur Abadi N du CHU de Constantine par sa prise en charge au laboratoire de génétique et biologie moléculaire du CHUC au cours de notre cycle d'étude.*

*Je remercie tous les membres du comité pédagogique du magistère Pr Belatreche C, Pr Abadi N, Pr Satta D et Pr Naimi D.*

*Docteur Samra K et docteur Sifi K du CHU de Constantine  
qui ont été toujours a notre besoin.*

*Ainsi que tout le personnel du laboratoire de génétique et  
biologie moléculaire du CHU de Constantine : Mlle Abla, Mme  
Manel, Mme yasmina, Mme Yamina, Mme Zbeida , Mr hamed,  
Mr Zouhir.*

*Sans oublier toute l'équipe du laboratoire de biochimie du  
CHU de Constantine et les infirmiers du service de cardiologie  
du CHU de Constantine.*

# *Dédicace*

*Je dédie ce mémoire à mes très chers parents.*

*A mes très chers frères et sœurs, nièces et neveux.*

*Ainsi qu'à toute la famille Mechri.*

*A toutes les équipes de recherche scientifique du monde  
entier.*

# Sommaire

Abréviation.....	
Intitulé des figures.....	
Intitulé des tableaux.....	
Introduction.....	11
Partie Théorique.....	14
I. Les maladies thromboemboliques veineuses.....	15
I.1. Le système veineux.....	15
I.2. Physiologie de l'hémostase.....	16
I.2.1. Hémostase primaire.....	16
I.2.2. Coagulation.....	17
I.2.3. La fibrinolyse.....	17
I.3. La physiopathologie de l'hémostase.....	18
I.4. La thrombose veineuse.....	19
I.5. Les facteurs de risques des thrombose veineuse.....	19
I.5.1. Les anomalies biologiques au cours des thrombose veineuse.....	19
I.5.1.1. Déficits en inhibiteurs physiologiques de la coagulation.....	20
I.5.1.2. Taux élevé des facteurs de coagulation.....	21
I.5.1.3. Lupus anticoagulant ou anticorps antiphospholipidiques.....	22
I.5.1.4. L'hyperhomocystéinémie.....	22
I.5.1.5. Le fibrinogène.....	23
I.5.2. Les facteurs de risque thrombotique acquis ou circonstanciels.....	23
I.5.2.1. Le facteur ethnique.....	23
I.5.2.2. Le groupe sanguin.....	23
I.5.2.3. L'âge.....	23
I.5.2.4. L'obésité.....	24
I.5.2.5. Contraception hormonal.....	24
I.5.2.6. Substitution hormonale.....	25
I.5.2.7. La grossesse.....	25
I.5.2.10. Pathologies sous jacentes.....	25

I.6. Complication.....	26
I.6.1. L'embolie pulmonaire.....	26
I.6.2. Syndrome post-thrombotique.....	26
I.6.3. La maladie post-phlébitique et l'insuffisance veineuse profonde.....	26
I.6.4. La récidivité de la TVP.....	26
I.7. Traitement et prévention.....	27
I.8. Epidémiologie.....	27
II. L'homocystéine.....	28
II.1. Introduction.....	28
II.2. Métabolisme.....	28
II.3. Anomalies du métabolisme de l'homocystéine.....	29
II.3.1. Les facteurs génétiques.....	29
II.3.2. Les facteurs nutritionnels.....	30
II.3.3. D'autres facteurs.....	30
II.4. Les mécanismes pathologiques potentiels de l'hyperhomocystéinémie.....	30
III. La MTHFR.....	31
III.1. Protéine MTHFR.....	21
III.2. Le gène de la MTHFR.....	32
III.2.1. Localisation du gène.....	32
III.2.2. Séquence du gène.....	32
III.2.3. Les mutations de la MTHFR.....	32
III.2.3.1. La mutation C677T.....	32
III.2.3.2. La mutation A1298C.....	33
III.2.3.3. Autres variants du gène MTHFR.....	34
Partie Pratique.....	35
Patients et méthodes.....	36
I. Population étudiées.....	37
I.1. Population témoin.....	37
I.2. Population malade.....	37
II. Techniques employées.....	38
II.1. Le prélèvement sanguin.....	38
II.2. Le recueil des données.....	38

II.3. Dosage de l'homocystéine.....	38
II.3.1. Recueil des échantillons.....	38
II.3.2. Principe du test.....	39
II.4. Extraction d'ADN.....	40
II.5. La PCR.....	41
II.5.1.Préparation du milieu réactionnel de la PCR.....	41
II.5.2. Déroulement des cycles de la PCR.....	41
II.5.3.Préparation du gel d'agarose du contrôle de PCR.....	42
II.5.4. Les produits de la PCR.....	42
II.5.5. Préparation du gel d'agarose pour digestion.....	43
II.6. Digestion par l'enzyme de restriction Hinf I.....	43
III Les paramètres statistiques.....	45
III.1. Moyenne.....	45
III.2. Ecart-type et variance.....	45
III.3. Calcul de l'odds ratio.....	45
III.4. Les intervalles de confiances.....	46
III.5. P value.....	46
Résultats et discussion.....	48
I. La répartition selon le sexe et l'age.....	49
I.1. La répartition selon le sexe.....	49
I.2. La répartition selon l'age.....	51
II. Etude du taux d'homocystéine.....	52
III. Etude de la mutation C677T du gène de la MTHFR.....	55
Conclusion.....	59
Références bibliographiques.....	61
Annexes.....	76

# Abréviation

**MTEV** : Maladie thromboembolique veineuse.

**MTHFR** : Méthylènetetrahydrofolate réductase.

**EP** : Embolie pulmonaire.

**TVP** : Thrombose veineuse profonde.

**TV** : Thrombose veineuse.

**AT** : Antithrombine.

**RS**: Reactive Site.

**HBS**: Heparin Binding Site.

**PE** : Pleiotropic Effect.

**PC** : Protéine C.

**PCa** : Protéine C activé.

**PS** : Protéine S.

**DD** : D-Dimères.

**HNF** : Héparine non fractionné

**HBPM** : Héparine de bas poids moléculaire

**AVK** : Antivitamine K.

**SAM** : S-adenosyl-L-méthionine.

**SAH** : S-adenosyl-homocystéine.

**5-M-THF** : 5-méthyl-tétrahydrofolate.

**CBS** : Cystathionine- $\beta$ -synthase.

**BET**: Bromure d'éthidium.



## Intitulé des figures

**Figure 1:** Schéma simplifié montrant le système du retour veineux.

**Figure 2 :** Formation d'un clou hémostatique.

**Figure 3:** Incidence annuelle de la thrombose embolique veineuse chez des sujets résidents a Worcester MA 1986, par age et sexe.

**Figure 4:** Métabolisme de l'homocystéine.

**Figure 5 :** localisation du gène de la MTHFR au niveau du premier chromosome humain.

**Figure 6 :** Structure schématique du gène et de la protéine MTHFR.

**Figure 7:** Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR.

**Figure 8:** Site de coupure de l'enzyme de restriction HinfI.

**Figure 9:** Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments obtenus après digestion par HinfI (M: Marqueur de taille).

**Figure 10:** Sexe ratio de la population témoin.

**Figure 11:** Sexe ratio les sujets malades.

## Intitulé des tableaux

**Tableau I :** Répartition du sexe dans la population témoin.

**Tableau II :** Répartition du sexe chez les sujets malades.

**Tableau III:** Répartition en tranche d'age dans la population témoins et chez les sujets malades.

**Tableau IV:** moyenne et écart-type du taux d'homocystéine répartie selon différents tranche d'age.

**Tableau V :** pourcentage des sujets malades ayant un taux d'homocystéine supérieur à 15  $\mu\text{mol/l}$ .

**Tableau VI:** Fréquence génotypique de la mutation C677T du gène de la MTHFR dans la population témoins.

**Tableau VII:** La fréquence alléliques dans la population témoin.

**Tableau VIII :** Les fréquences génotypiques et alléliques dans différents pays et groupes ethniques.

**Tableau IX :** Fréquence génotypique de la mutation C677T du gène de la MTHFR chez les sujets malades.

**Tableau X:** La fréquence allélique chez les sujets malades.

# Introduction

La maladie thromboembolique veineuse (MTEV) regroupe dans son entité la thrombose veineuse profonde (TVP) et l'embolie pulmonaire (EP), elle demeure une cause de morbidité et de mortalité fréquente dont l'incidence se situe en moyenne autour de 1/1000 par an toute confondus. La MTEV survient lors d'une obstruction d'une veine suite à un déséquilibre hémostatique conduisant à la formation d'un thrombus. De nombreux facteurs favorisent la survenue d'un tel accident et qui se potentialisent pour induire un état instable d'activation de l'hémostase. Deux éléments majeurs participent directement à cet accident: l'anatomie du système vasculaire, dont les valvules favorisent dans leurs concavité une stase sanguine relative, et un déséquilibre du système de la coagulation conduisant à un excès de la formation de la thrombine (1).

Les facteurs de risque de la MTEV peuvent être d'ordre génétique (déficits en antithrombine, déficit en protéine C, déficit en protéine S, résistance à la protéine C activée), et notons en particulier les facteurs acquis qui jouent également un rôle important qu'il soit circonstanciels (immobilisation prolongées, chirurgie, grossesse) ou iatrogènes (contraceptif oraux ou hormonothérapie substitutive) ou liés à certaines pathologies tel que le cancer et le syndrome néphrotique (2).

Au cours de cette dernière décennie des progrès considérables ont été apportés à l'étude des facteurs de risque de MTEV (3), en particulier ceux liés à certaines voies métaboliques fortement corrélées à cette maladie. Parmi ces facteurs la MTHFR constitue l'enzyme clé qui catalyse la conversion du 5,10 méthylènetetrahydrofolate en 5, méthyltetrahydrofolate, et qui assure le cycle des folates ce qui permet à l'homocystéine d'être reméthylée en méthionine et d'être épurée de l'organisme (4). La MTHFR est codée par un gène localisé au niveau du chromosome 1 en position 1p36 et dont la mutation la plus fréquente est la C677T, une telle mutation crée une enzyme thermolabile qui possède une activité réduite d'environ 50 % à 37°C et une perte complète d'activité à 46°C. La mutation a lieu en position 677 et transforme la base C en T, ceci a pour conséquence la formation d'un acide aminé : valine au lieu d'alanine en position 222 de la chaîne protéique (5). Cette mutation est reconnue dans plusieurs études comme étant un facteur important dans l'augmentation du taux d'homocystéine plasmatique. Cette hyperhomocystéinémie représenterait l'un des facteurs de risque des MTEV avéré (6).

A fin de mettre en évidence une éventuelle corrélation entre l'hyperhomocystéinémie d'une part et la mutation C677T d'autre part et les MTEV nous nous sommes proposés à travers une étude cas témoins:

- ▼ Déterminer le pourcentage des cas des thromboses veineuses liées à la mutation C677T du gène de la MTHFR.
- ▼ Etablir la relation entre la mutation C677T du gène de la MTHFR et le taux sérique de l'homocystéine.

# Partie Théorique

## Partie Théorique

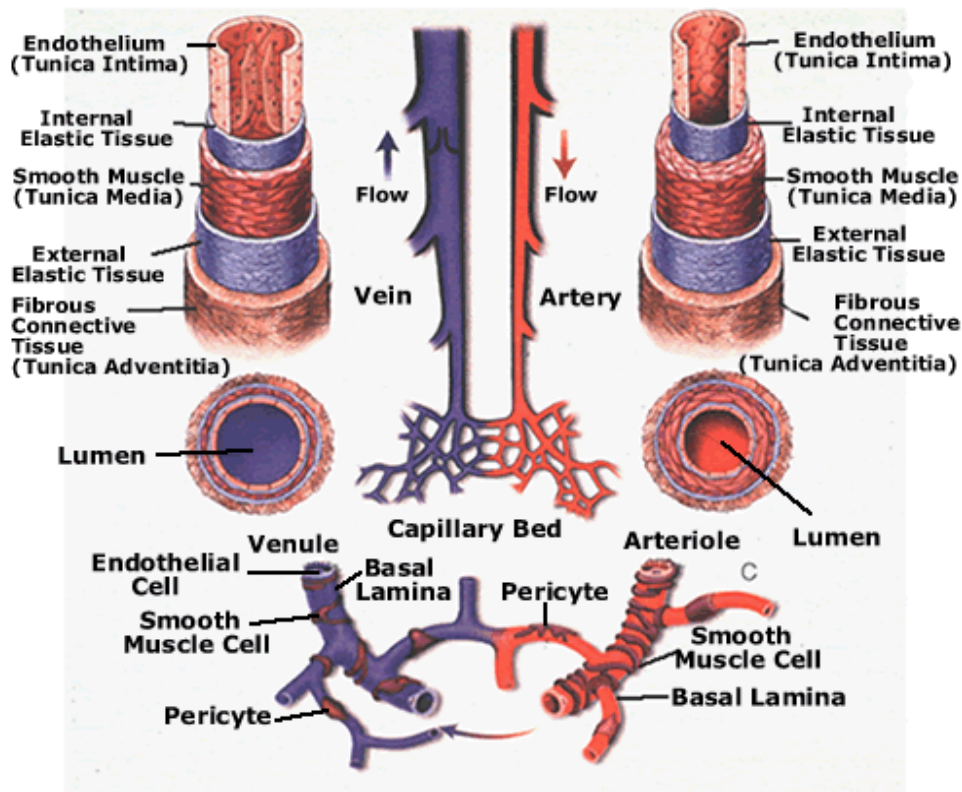
# I. Les maladies thromboemboliques veineuses :

## I.1. Le système veineux:

Le système vasculaire sanguin est formé par un circuit de vaisseaux dans lequel le courant sanguin est entretenu par le mouvement continu de la pompe cardiaque. Le système veineux assure le retour de sang des capillaires vers le cœur (figure 1) (7).

Les veines sont constituées de trois couches:

- L'intima est constitué d'un revêtement endothélium qui repose sur une lame basale. On distingue des valvules qui sont l'expansion de l'intima dans la lumière, recouverte de cellule endothéliales et renforcée par des fibres élastiques et de collagènes.
- La média est une mince couche, contient des cellules musculaires lisses et des fibres élastiques.
- L'adventice est constituée de fibres de collagène, de fibroblastes et de quelque fibres nerveuses (8).



**Figure 1:** Schéma simplifié montrant le système du retour veineux (9).

## **I.2. Physiologie de l'hémostase :**

A l'état normal, le sang circule dans des conditions hémodynamiques variées au contact de l'endothélium, des cavités du cœur, des artères, des veines et de la microcirculation. Le phénomène d'hémostase à l'état physiologique a pour but de colmater une brèche vasculaire, par la formation d'un caillot fibrinoplaquettaire et d'éliminer ce caillot une fois qu'il a cessé d'être utile (10).

On distingue classiquement trois temps:

- § L'hémostase primaire ferme la brèche vasculaire par un "thrombus blanc" (clou plaquettaire) (figure 2).
- § La coagulation consolide ce premier thrombus en formant un réseau de fibrine emprisonnant des globules rouges "thrombus rouge" (figure 2).
- § La fibrinolyse, permet la destruction des caillots, ou la limitation de leur extension.

### **I.2.1. Hémostase primaire:**

Dès qu'une brèche vasculaire se constitue, le processus d'hémostase primaire se met en jeu, il comprend trois étapes essentielles:

- **Le temps vasculaire :** correspond à la première réaction de l'organisme qui est une vasoconstriction localisée qui peut arrêter les hémorragies soit au moins réduire le flux sanguin et modifier les conditions hémodynamiques, favorisant le processus d'interaction molécules et cellules.
- **L'adhésion plaquettaire :** les plaquettes dès leur sortie du vaisseau adhèrent à la structure sous endothéliale mise à nu par la brèche vasculaire. L'adhésion se produit en grande partie par la GP Ib qui se colle au sous endothélium grâce au facteur de Willebrand qui sert de ciment.
- **L'agrégation plaquettaire :** les plaquettes adhérentes s'activent et recrutent d'autres plaquettes circulantes. Les GP IIbIIIa de surface, lors de l'activation plaquettaire subissent une modification conformationnelle qui leur permet de fixer le fibrinogène en présence de calcium. L'agrégation plaquettaire se fait ainsi grâce au fibrinogène qui établit des ponts entre les plaquettes, créant un premier thrombus fragile (agrégation réversible). Grâce à la libération des enzymes et contenu granulaire des plaquettes, le caillot se solidifie (agrégation irréversible), constituant le thrombus blanc (11).



### **1.2.2. Coagulation:**

Le thrombus plaquettaire est fragile, il doit donc être consolidé. La coagulation comme l'hémostase primaire met en jeu des cellules et des facteurs plasmatiques. La coagulation est une cascade de réactions enzymatiques aboutissant à la formation de fibrine. L'enzyme central permettant de transformer le fibrinogène en fibrine est la thrombine, le processus de formation de la thrombine est complexe avec une série d'activations enzymatiques qui surviennent à la surface des phospholipides membranaires des plaquettes, cellules endothéliales ou monocytes (12).

### **1.2.3. La fibrinolyse:**

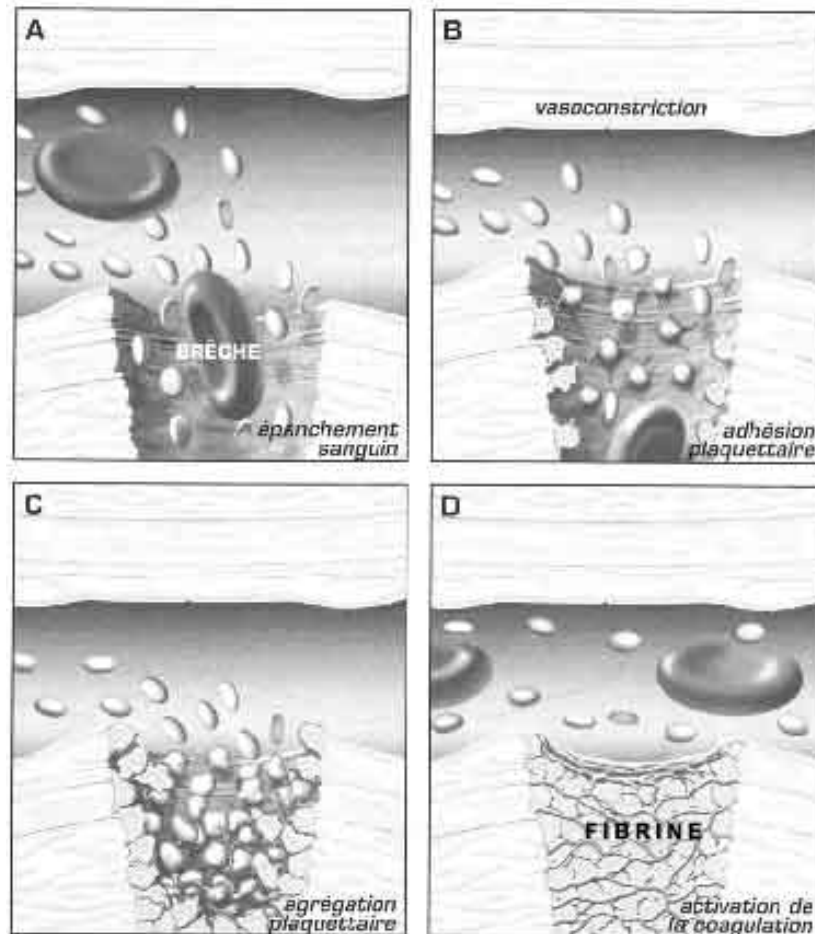
La fibrinolyse est le troisième temps de l'hémostase, elle tend à empêcher l'installation mais surtout l'extension du caillot en déterminant les polymères de fibrine. Lorsque le caillot est formé, la fibrinolyse physiologique permet de le reperméabiliser. Elle fait intervenir une substance circulante sous forme inactive dans le plasma qui est le plasminogène, synthétisée par le foie. Sous l'influence d'activateurs, le plasminogène se transforme en plasmine qui est une enzyme protéolytique très puissante, capable de dégrader le caillot de fibrine mais aussi de détruire le fibrinogène, voire d'autres facteurs de coagulation (12).

L'activation du plasminogène en plasmine se fait grâce à des activateurs de deux types :

- La voie de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA). Cette substance est synthétisée de façon quasi exclusive par la cellule endothéliale qui la libère sur le site du caillot lors de tout phénomène d'agression.
- La voie de pro-urokinase-urokinase (U-PA) la forme circulante est la pro-urokinase synthétisée par les cellules rénales et d'autres cellules parenchymateuses. La pro-urokinase s'active en urokinase essentiellement au contact du caillot de fibrine.

Le système fibrinolytique est régulé par deux types d'inhibiteurs :

- Inhibiteurs de la plasmine : alpha 2 antiplasmine, alpha 2 macroglobuline.
- Inhibiteurs des activateurs du plasminogène : PAI-1 est l'inhibiteur surtout du t-PA et le PAI-2, présent essentiellement chez la femme enceinte, est inhibiteur de l'urokinase (12).



**Figure 2 :** Formation d'un clou hémostatique (10).

### **I.3. La physiopathologie de l'hémostase :**

La thrombose veineuse est induite par trois facteurs principaux la triade de Virchow :

- § **facteur pariétal :** Les lésions de l'endothélium vasculaire sont nécessaires à l'agrégation plaquettaire, il entraînent des phénomènes réactionnels locaux de thrombose, considéré comme un facteur mineur, sauf dans certaines situations (cathéter veineux central, foyers septiques locorégionaux...etc).
- § **altération du flux sanguin :** Le ralentissement du flux sanguin ou stase joue un rôle essentiel en favorisant l'accumulation des facteurs de la coagulation. La stase veineuse est liée à l'alitement ou l'immobilisation prolongée, à l'insuffisance veineuse chronique, aux compressions extrinsèques (adénopathies, cancers digestifs ou pelviens).
- § **modification du sang circulant :** l'apparition d'un déséquilibre hémostatique, fait pencher la balance de coagulation, par diminution des facteurs de fibrinolyse (13).

## **I.4. La thrombose veineuse :**

Lorsque se forme un caillot sanguin, dans un vaisseau et qu'il provoque une occlusion, on parle de thrombose. Une thrombose peut se produire dans les artères mais, beaucoup plus souvent, ce sont les veines qui sont touchées et on parle dans ce cas là de thrombose veineuse (TV). Elle survient généralement dans une veine des membres inférieurs, au niveau des jambes ou des hanches, rarement au niveau des membres supérieurs. La TV peut être superficielle lorsqu'elle touche une veine proche de la surface de la peau ou profonde lorsqu'elle est localisée à l'intérieur d'un muscle (14, 15).

Si le thrombus ou une partie de celui-ci se détache (embolie), il part dans le flux sanguin et entraîne une embolie dès qu'il atteint un segment de vaisseau plus étroit où il se coince et il l'obstrue. Les thrombus qui se détachent des veines de la jambe ou du bassin migrent souvent à travers le cœur droit et provoquent une obstruction au niveau de la circulation pulmonaire, pouvant ainsi entraîner une embolie pulmonaire qui est une complication grave et souvent fatale (16).

## **I.5. Les facteurs de risque des thromboses veineuses :**

La MTEV est reconnue comme étant une maladie multifactorielle dans la quelle une seule anomalie n'est pas suffisante pour déclencher une thrombose veineuse, mais une accumulation d'anomalies, constitutionnelles et/ou acquises est nécessaire.

### **I.5.1. Les anomalies biologiques au cours des Thromboses veineuses :**

Un certain nombre d'anomalies biologiques de l'hémostase sont associées aux thromboses veineuses, permettant d'évoquer leur responsabilité dans la survenue de ces thromboses :

- Déficits en inhibiteurs physiologiques de la coagulation.
- Hyperhomocystéinémie.
- élévation du taux des facteurs de coagulation.
- Lupus anticoagulant ou anticorps antiphospholipidiques.
- Fibrinogène.

#### **I.5.1.1. Déficits en inhibiteurs physiologiques de la coagulation :**

La prévalence d'un déficit en inhibiteur de la coagulation est estimée à moins de 10% des patients avec MTE. Elle augmente dans les cas de thrombose idiopathique récidivante ou d'antécédent familial (16).

- **Déficit en antithrombine (AT) :**

C'est un majeur inhibiteur du mécanisme de la coagulation et un déficit en AT est considéré comme un facteur de prédisposition à MTEV (17). La première publication de déficit en AT date de 1965 par Egeberg (15). Le gène de l'AT a été identifié et localisé au niveau du chromosome 2 (2q23-25), plusieurs types de déficits ont été identifiés.

§ **Déficit de type I :** La protéine présentée est normale mais en quantité diminuée.

§ **Déficit de type II :** La protéine présentée est dans ce cas là anormale, cette classe est répartie en trois sous classes :

- **Type II RS** (Reactive Site).
- **Type II HBS** (Heparin Binding Site).
- **Type II PE** (Pleiotropic Effect) (18).

- **Déficit en protéine C :**

La PC est découverte en 1976 par Stenflo. C'est une protéine vitamine K dépendante qui inhibe les facteurs Va et VIIIa, qui permet de freiner efficacement la cascade de coagulation. Le gène de la PC est localisé au niveau du chromosome 2 (2q13-14).

L'association de déficience en PC et la TV a été rapportée pour la première fois en 1981, l'hétérozygote en PC a été identifié chez 1,5 à 11,5% des patients avec TV et seulement chez 0,2 à 0,4% des sujets sains.

Les déficits en PC sont divisés en deux types :

§ **Type I :** C'est un déficit quantitatif, le plus fréquent.

§ **Type II :** C'est un déficit qualitatif de la PC, le moins fréquent (19).

- **Déficit en protéine S :**

La protéine S (PS) est une glycoprotéine dépendante de la vitamine K, principalement produite au niveau du foie.

Une association entre la déficience en PS et la TV a été établie en 1984. La déficience en PS dans la population générale est entre 0,2 et 0,5% et la prévalence de la déficience hétérozygote est de l'ordre de 1 à 3%.

Le déficit en PS est autosomique dominant présent dans 2 à 6% de patient ayant un accident thrombotique (20).

- **Résistance à la PC activée (mutation du facteur V Leiden):**

Dahlbäck a identifié en 1993 une résistance plasmatique à l'activité anticoagulante de la PC activée (PCa). Cette résistance est due à la présence d'une mutation du facteur V, qui correspond à la substitution de l'Arg 506 par une glutamine. Ce facteur V muté devient un obstacle à une inhibition efficace de la cascade de coagulation par la PCa (21).

La transmission de cette anomalie est autosomique dominante. La population porteuse de cette mutation a un risque de survenue d'une MTE multiplié par 5 à 10 par rapport à une population témoin et ce risque atteint 50 à 100 chez les patients homozygotes, sa prévalence est estimée entre 0,06 et 0,25% (16).

#### **I.5.1.2. Taux élevé des facteurs de coagulation :**

- **Mutation du gène du facteur II (prothrombine):**

Le changement d'un nucléotide en position 20210 du gène de la prothrombine a été identifié par Poort et al en 1996, il est la conséquence d'une transition en position 20210 du gène codant la prothrombine avec remplacement d'une guanine par une adénine (21).

La prévalence de cette mutation G20210A est comprise entre 1 à 4 % dans la population Européenne générale et de 5,5 % en UK, mais elle est rare en Afrique et en Asie (21).

La prothrombine mutante semble associée à un risque de thrombose 2 à 3 fois plus élevé (15).

- **Elévation du taux plasmatique du facteur VIII :**

Selon une étude en 1995, le facteur VIII apparaît comme un facteur de risque indépendant de TVP. Un taux supérieur à 150 UI/dl majore le risque de TVP par 5 en comparaison d'un taux de référence de 100 UI/dl. Cependant, 25 % des patients et 11 % des témoins ont un taux supérieur à 150 UI/dl et les auteurs estiment donc que ce facteur de risque est fréquent et ne peut à lui seul entraîner un épisode thrombotique. Par contre, associé à un autre facteur de risque, il expose à un risque comparable à celui des déficits en inhibiteurs de la coagulation ou à celui de la résistance de PCa (22). Une augmentation de la concentration plasmatique du facteur VIII accroît le risque de MTEV dont la valeur du risque est corrélé au degré d'élévation du facteur VIII (22, 23).

- **Elévation du taux plasmatique du facteur IX:**

L'équipe de Leiden a montré qu'un taux du facteur IX supérieur à 129UI/dl (90ème percentile de la population témoin) multiplie le risque de thrombose veineuse par 2,3 que les sujets ayant des taux du facteur IX inférieur à 129 UI/dl.

Cette élévation est présente dans 10 % de la population (23).

### **I.5.1.3. Lupus anticoagulant ou anticorps antiphospholipidiques:**

La présence de cette anomalie acquise augmente le risque de thrombose veineuse, de fausse couche, d'accidents vasculaire cérébral et d'hypertension artérielle pulmonaire. Il s'agit d'une affection acquise, qui est plutôt la manifestation d'un trouble auto-immunitaire (15).

### **I.5.1.4. L'hyperhomocystéinémie:**

On a associé un haut taux d'homocystéine dans le sang avec les maladies cardiovasculaires athérosclérotiques (blocage des artères du cœur, du cerveau et/ou dans les membres inférieurs) et thrombotiques veineuses (4).

L'hyperhomocystéinémie est la conséquence d'un déficit constitutionnel en cystationine Bétasyntase (CBS), ou en méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR) ou d'un déficit acquis en folates, vitamine B12 ou B6 (4).

#### **I.5.1.5. Le fibrinogène :**

Le fibrinogène est bien connu pour être un facteur de risque des maladies coronariennes et aussi de mortalité cardio-vasculaire. Le rôle que pourrait jouer le fibrinogène dans la MTEV a été envisagé en 1994 par Koster et Rosendaal dans leur étude cas témoin. Leur conclusion est que le fibrinogène constitue un véritable facteur de risque de thrombose veineuse dont le risque relatif est doublé lorsque la concentration est comprise entre 4 et 5 g/L et multiplié par 4 si elle est supérieure à 5 g/L (24).

### **I.5.2. Les facteurs de risque thrombotique acquis ou circonstanciels :**

Parmi ces facteurs on a :

#### **I.5.2.1. Les facteurs ethniques :**

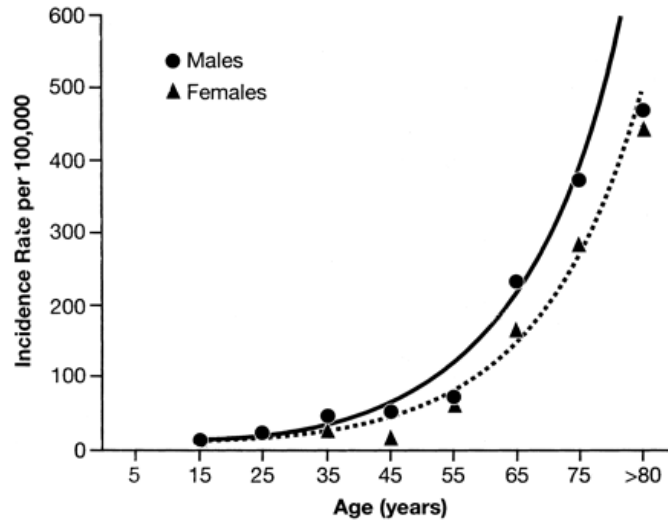
Une prévalence de d'EP est de 15% en Amérique du nord alors qu'au Japon elle de 0,7%. White et al, a montré que l'incidence annuelle de MTEV idiopathique en Californie est de 23 pour 100 000 pour des sujet d'origine caucasienne, 29 pour 100 000 des sujets Africo-Américains, 14 pour 100 000 chez les Hispaniques et 6 pour 100 000 pour les Asiatiques du Pacifique en Island (25).

#### **I.5.2.2. Le groupe sanguin :**

L'étude cas témoin de Koster et coll. fait apparaître une diminution du groupe O chez les sujets de MTEV par rapport aux témoins (25 % contre 43 %). Une analyse univariée corrèle positivement les groupes non-O, des taux de facteur VIII et de facteur Von Willebrand élevés à la thrombose veineuse (22).

#### **I.5.2.3. L'âge :**

Des études ont montré qu'une incidence d'une MTEV pour la première fois est inférieure à 5 pour 100 000 par an pour des enfants de moins de 15 ans, devant une incidence de 450 à 600 pour 100 000 par an chez des individus de plus de 80 ans (figure 3) (25, 26).



**Figure 3:** Incidence annuelle de la thrombose embolique veineuse chez des sujets résidents a Worcester MA 1986, par age et sexe (27).

#### I.5.2.4. L'obésité :

C'est un facteur de risque de maladie veineuse thromboembolique post opératoire, Les patients obèses (indice de masse corporelle  $\geq 27$ ) nécessitant une attention particulière. L'obésité est un facteur de risque de MTEV chez les patients hospitalisés en milieu médical ou devant subir une chirurgie bariatrique. L'obésité semble jouer un rôle potentialisant, à côté des autres facteurs de risque, dans le développement d'une MTEV chez les patients hospitalisés. Le faible nombre d'essais prospectifs dans cette population interdit aujourd'hui de porter des conclusions définitives quant à la méthode thromboprophylactique la plus efficace et la moins dangereuse pour les patients obèses ; c'est pourquoi des essais cliniques randomisés comparant les différentes méthodes chez ces patients sont plus que jamais justifiés (28).

#### I.5.2.5. Contraception hormonale :

Le risque de MTEV est de 0,8 pour 10 000 chez des femmes qui n'utilisent pas de contraception hormonale alors qu'elle est de 3 pour 10 000 chez des femmes qui utilisent la contraception hormonale (29).

Une autre étude faite en Bretagne montre un risque de 2 pour 10 000 pour des femmes qui utilisent une contraception hormonale (30).



#### **I.5.2.6. Substitution hormonale :**

Le risque de thrombose veineuse des femmes recevant une substitution oestrogénostative de la ménopause est trois fois supérieur à celui des femmes ne prenant pas de telles substitutions (31).

#### **I.5.2.7. La grossesse :**

La grossesse provoque un état d'hypercoagulabilité physiologique dont le rôle essentiel est de prévenir les hémorragies de la délivrance (32, 33). Les femmes ayant une thrombophilie ont un risque élevé pour les MTEV (34).

#### **I.5.2.8. Pathologies sous jacentes :**

- Antécédents de maladie thromboembolique veineuse
- Lupus érythémateux (15).
- Insuffisance cardiaque et cardiopathies ischémiques à la phase aiguë
- Affections neurologiques avec paralysies des membres inférieurs (28).
- Insuffisance cardiaque (28).
- La chimiothérapie et tumeurs malignes (35, 36).
- Le syndrome néphrotique (37).
- Syndrome de Behcet (28).
- Traumatisme ou intervention chirurgicale, en particulier du bassin, des hanches ou des membres inférieurs (28, 38).
- Au cours des infections graves (39).

## **I.6. Complication :**

### **I.6.1. L'Embolie pulmonaire :**

C'est une complication la plus fréquente et la plus grave des TVP, qui résulte de la migration d'un caillot provenant d'une thrombose veineuse profonde. La thrombose causale est le plus souvent située sur le réseau cave inférieur, pour des raisons anatomiques évidentes l'embolie s'arrête dans la circulation pulmonaire et peut entraîner ainsi une EP (40).

### **I.6.2. Syndrome post-thrombotique :**

Il consiste en un ensemble de symptômes et de signes. Suite à une destruction des valvules par le thrombus, celles-ci deviennent incontinentes, il se développe alors une hypertension veineuse secondaire en amont avec comme conséquences : douleur, crampes, lourdeur, prurit, paresthésies, œdèmes, induration, varices, pigmentation de la peau et ulcère cutané.

L'apparition du syndrome post-thrombotique chez le tiers des sujets ayant une TVP. L'incidence de syndrome post-thrombotique est de 22,8 après deux ans, 28% après 5 ans et 29,1% après 8 ans (41).

### **I.6.3. la maladie post-phlébitique et L'insuffisance veineuse profonde :**

La persistance d'une obstruction veineuse nécessite le développement d'une circulation collatérale de suppléance sans fonction valvulaire, engendrant un reflux veineux responsable de stase à l'origine de l'hyperpression veineuse génératrice d'œdèmes des membres inférieurs, eux mêmes majorant la stase veineuse.

Dans d'autre cas, la recanalisation du vaisseau se fait avec une destruction des valvules veineuses, à l'origine de l'insuffisance veineuse (42).

### **I.6.4. La récidivité de la thrombose veineuse profonde :**

L'incidence la récidivité d'une TVP est de 17,5% après 2 ans, 24,6% après 5 ans et 30,3% après 8 ans (41).

## **I.7. Traitement et prévention :**

Il permet de prévenir l'extension du thrombus veineux avec une perméabilisation maximale, prévient à la récurrence des TV et lutte contre le syndrome post-thrombotique (43).

- **Les anticoagulants :** Les héparines non fractionnées (HNF) et les héparines de bas poids moléculaires (HBPM) sont les seuls anticoagulants à posséder une activité anticoagulante rapide (44).
- **Les antivitamines K (AVK) :** est un traitement curatifs et préventif secondaire, est un relais précoce des héparines par les AVK qui permettent de réduire le coût de la maladie tout en limitant le risque de thrombopénie à l'héparine (45).
- **La contention élastique :** réduit la douleur et l'oedème ; elle permet de plus, grâce à une diminution du calibre des veines profondes et superficielles d'améliorer le retour veineux dans les veines saines et de fixer le thrombus à la paroi, évitant son extension et son embolisation. La contention doit être portée au moins pendant l'année suivant l'épisode de thrombose aiguë car elle limite à long terme le développement d'une maladie post-phlébitique (46, 47, 48).

## **I.8. Epidémiologie :**

Au Etat Unis, le nombre de sujets Présentant de MTEV pour la première fois, est d'environ 100 cas pour 100 000 chaque année, approximativement le tiers des sujets ayant une EP alors que les deux tiers ont une thrombose veineuse profonde (TVP) (25).

En 1999, une étude faite en Angleterre, sur les habitants de Worcester a donné une statistique de thrombose embolique veineuse (TEV) avec approximativement 128 cas par 100 000 (49).

En France, 547 patients ayant une MTEV dans une période comprise entre juillet 1992 et Décembre 1994, dans 446 ayant une TVP et 387 ayant une EP (50).

## **II. L'homocystéine :**

## **II.1. Introduction:**

L'homocystéine est un acide aminé soufré. Il est formé durant le cycle métabolique de la méthionine, un cycle très important de l'organisme qui aboutit à la formation de donneurs de méthyle et à la réparation cellulaire. Dans le plasma 80% de l'homocystéine est liée aux protéines, l'homocystéine non liée existe essentiellement sous forme de dissulfide mixte homocystéine-cystéine. De petites quantités existent sous forme de dimère homocystéine-homocystéine encore appelés homocystine ou sous la forme d'homocystéine libre vraie. Cette dernière fraction constitue environ 1 % de toute l'homocystéine circulante mesurée. L'homocystéine totale représente la somme de toutes les fractions libres ou liées de l'homocystéine (51).

## **II.2. Métabolisme:**

La méthionine est initialement transformée en S-adénosyl-L-méthionine (SAM), une réaction catalysée par la méthionine-adénosyl transférase puis en S-adénosyl-homocystéine (SAH) qui est par la suite hydrolysée pour produire de l'adénosine et de l'homocystéine.

L'homocystéine est ensuite métabolisée soit par reméthylation pour produire méthionine, soit par la transsulfuration pour produire la cystathionine et puis enfin de la cystéine (figure 4).

La reméthylation de l'homocystéine en méthionine se produit lors d'un déficit en méthionine, le 5-méthyl-tétrahydrofolate (5-M-THF) cède son groupement méthyle à l'homocystéine sous l'action de la méthionine synthase (5-méthyl THF-Homocystéine méthyl-transférase) et de son coenzyme, la cobalamine ou vitamine B12. Le produit déméthylé, le THF reçoit, en présence de vitamine B6, un groupement méthylène de la sérine, formant le 5,10-méthylène-tétrahydrofolate. Ce dernier est réduit en 5-méthyl-tétrahydrofolate (5-CH<sub>3</sub>-T4HF) sous l'action de la 5,10-méthylènetétrahydrofolate réductase, dont le fréquent déficit constitue une cause possible d'hyperhomocystéinémie.

La transsulfuration de l'homocystéine est une voie alternative comportant une sulfoconjugaison de l'homocystéine en cystathionine à partir de la sérine, sous l'action de la cystathionine- $\beta$ -synthase (CBS) dont la vitamine B6 ou pyridoxal-5'-phosphate (pyridoxine) est le cofacteur, sous l'action de la gamma-cystathionase et de la vitamine B6, la cystathionine est dégradée en cystéine (28).

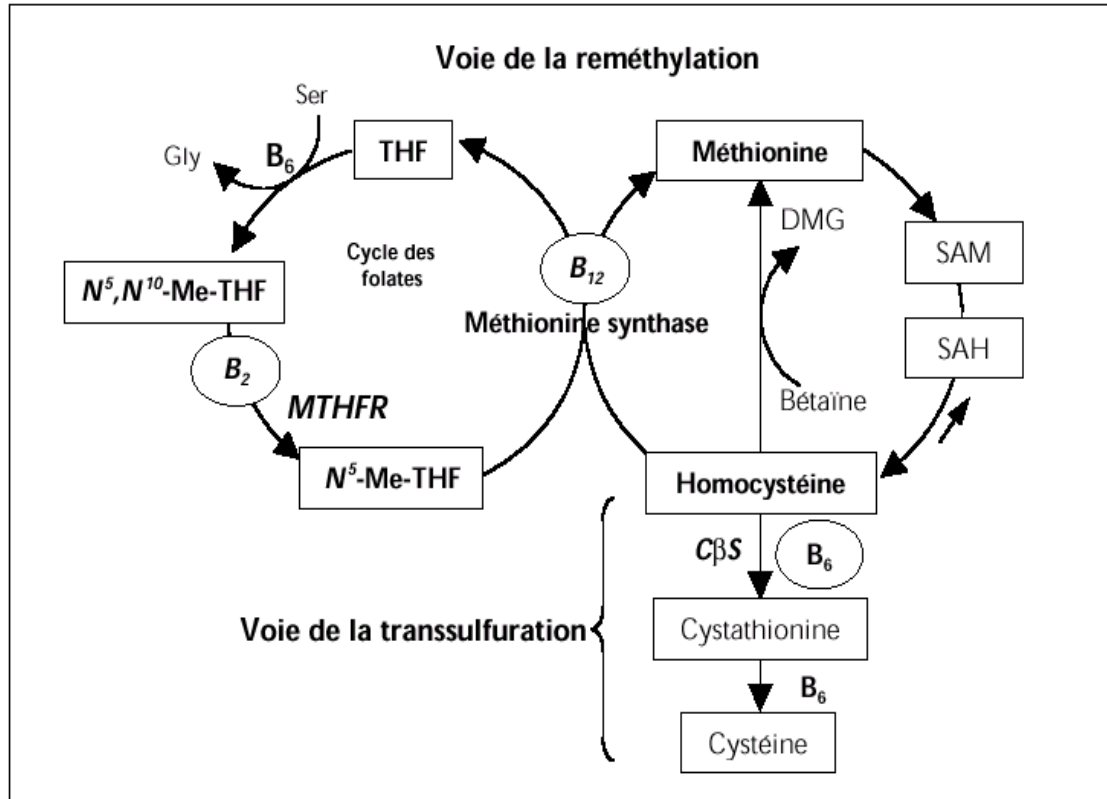


Fig. 1: Voies biochimiques du métabolisme de l'homocystéine. Ser = serine; Gly = glycine; Me-THF = méthylène-tétrahydrofolate; MTHFR=  $N^5,N^{10}$ -méthylène-tétrahydrofolate réductase; THF = tétrahydrofolate; SAM = S-adosylméthionine; SAH = S-adosylhomocystéine; DMG = diméthylglycine; CBS = cystathionine- $\beta$ -synthase.

Figure 4: Métabolisme de l'homocystéine (28).

### II.3. Anomalies du métabolisme de l'homocystéine:

Les dysfonctionnements du métabolisme de l'homocystéine dépendent de déficits congénitaux en enzyme impliqués dans ce métabolisme ou de déficiences dans l'apport, le transport et le métabolisme des folates et des vitamines B12 et B6 ou encore d'un apport excessive en méthionine (52).

#### II.3.1. Les facteurs génétiques:

- Altération de la voie de transsulfuration correspond à un déficit en CBS.
- Altération de la voie de reméthylation secondaire soit à un défaut d'activité de la MTHFR, soit à une déficience fonctionnelle en méthionine synthase.

### **II.3.2. Les facteurs nutritionnels:**

De nombreuses études ont montré que des déficiences nutritionnelles en B12 ou en B9 conduisent à une élévation modérée ou intermédiaire de l'homocystéine dans les conditions basales, seule une déficience sévère et prolongée en vitamine B6 aurait une incidence sur l'homocystéine basale (53).

### **II.3.3. D'autres facteurs:**

- **L'âge** : la concentration plasmatique de l'homocystéine augmente progressivement avec l'âge dans les deux sexes (54).
- **Le sexe** : la concentration plasmatique de l'homocystéine est d'environ 10 % supérieure chez les hommes par rapport aux femmes (54).
- **Le tabac** : la concentration plasmatique de l'homocystéine augmente chez les fumeurs par rapport aux non fumeurs (54).

## **II.4. Les mécanismes pathogéniques potentiels de l'hyperhomocystéinémie:**

La concentration de l'homocystéine pourrait favoriser l'athérosclérose et/ou la thrombose par les mécanismes suivants (55, 56):

- Effet cytotoxique direct sur les cellules endothéliales, en partie lié à la formation de radicaux libres lors de l'oxydation de l'homocystéine réduite (57, 58).
- Stimulation de la prolifération des cellules musculaires vasculaires lisses comme en témoignent l'augmentation de la synthèse d'ADN et l'augmentation de l'expression de l'ARNm à la cycline A dans ce modèle cellulaire. La cycline-kinase associée à la cycline A est à la fois un initiateur et un marqueur de mitose (59).
- Effet prothrombotiques divers, comprenant l'atténuation des sites de liaisons endothéliaux au tPA, l'activation du facteur V, l'inhibition de la PC, et une diminution de l'activité antithrombotique endothéliale liée à des modifications de la fonction thrombomoduline (60, 61).
- L'homocystéine modifie directement l'expression de nombreux gènes dans un modèle de cellules endothéliales humaines de cordon ombilical ; au moins 6 gènes sont surexprimés dont l'un codant pour la protéine de stress GRP 78/BIP et un autre codant pour un enzyme bi fonctionnel ayant des propriétés de types MTHFR (62).

La signification de ces constatations est encore imprécise mais suggère que l'homocystéine est impliquant dans un système complexe dynamique de lésions et de réparations vasculaires.

### **III. La MTHFR:**

#### **III.1. Protéine MTHFR:**

La MTHFR est une enzyme catalysant la réduction du 5,10-méthylène-tetrahydrofolate en 5-méthyl-tetrahydrofolate. Cette réaction est irréversible dans les conditions physiologiques normales (63). La MTHFR utilise comme donneur d'électron le NADPH.

La MTHFR a été isolé pour la première fois au niveau du foie de cheval en 1962, et par la suite au niveau du foie de porc, l'analyse de la MTHFR issu du foie de porc a montrer que l'enzyme est un homodimère de 77 KDa (64, 65).

La protéine humaine à deux isoforme de PM de 77 KDa et 70KDa (66). Ce dernier a été retrouvé qu'au niveau du tissu hépatique et qu'au niveau du tissu rénal que chez l'enfant (67).

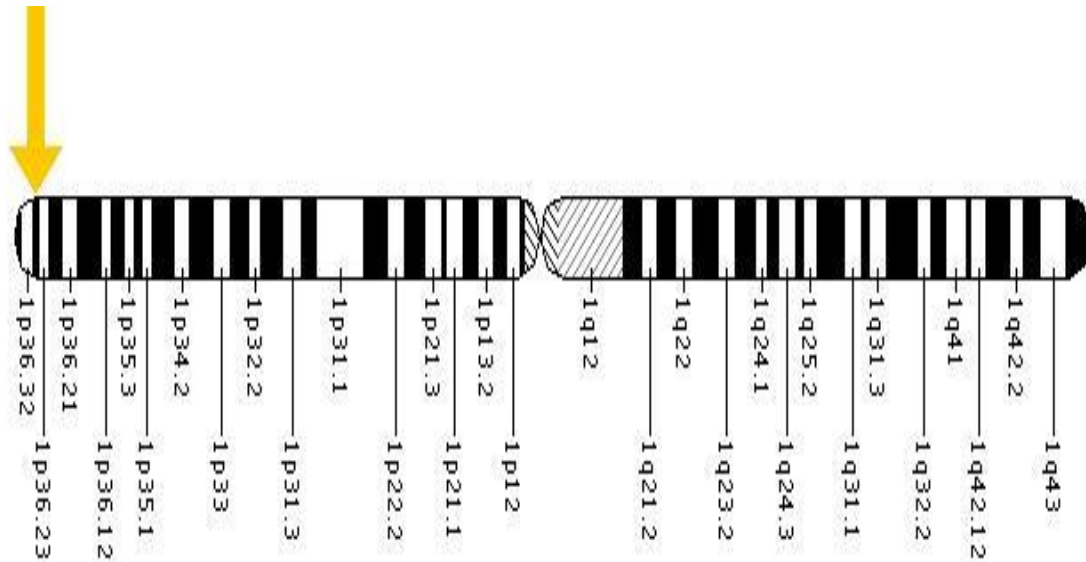
La structure protéique de la MTHFR est subdivisée en deux domaines l'un catalytique (N terminal) de PM 40 KDa et l'autre régulateur (C terminale) de PM 37 KDa. A l'union de ces deux domaine se trouve une région hydrophobe avec séquence d'AA : Lys-Arg-Arg-Glu-Glu, qui représente le site de clivage de la trypsine.

La digestion de la MTHFR par la trypsine n'a pas d'effet sur sa fonction catalytique mais la rend plutôt insensible a sa régulation par la S-adenosylmethionine (SAM). La SAM a un rôle inhibiteur de la MTHFR, alors que la S-adenosylhomocystéine (SAH) est régulateur de l'activité de la MTHFR.

## III.2. Le gène de la MTHFR :

### III.2.1. Localisation du gène :

Le gène de la MTHFR se localise au niveau du bras court du chromosome 1 (1P36.3) (Figure 5) (63, 66).



**Figure 5 :** localisation du gène de la MTHFR au niveau du premier chromosome humain (76).

### III.2.2. Séquence du gène :

L'ADNc de la MTHFR humain est de 2.2 Kb de longueur, répartie en 11 exons de taille comprise entre 102 Pb à 432 Pb, chevauché par 10 introns de taille comprise entre 25 Pb à 1.5 Kb avec une seule exception 4.2 Kb (63) (Voire annexe).

### III.2.3. Les mutations de la MTHFR :

#### III.2.3.1. La mutation C677T :

En 1995, Frosst et al, a identifier une mutation commune au niveau du gène de la MTHFR (68), cette mutation correspond à une substitution du gène de la MTHFR de la base cytosine en thymine en position 677, qui se traduit au niveau de la protéine par la conversion de l'acide aminé alanine en valine en position 222, cette mutation rend l'enzyme thermostable et diminue son activité (66). Cette



mutation est associée à une augmentation du risque aux maladies cardiovasculaires et au déficit du tube neurale (69, 70) .

**Allèle normal :**

Séquence génétique : GCG GGA GCC G **CC** GAT

Séquence protéique : Ala Gly Ala **Ala** Asp

**Allèle muté :**

Séquence génétique : GCG GGA GCC G **TC** GAT

Séquence protéique : Ala Gly Ala **Val** Asp

La fréquence allélique de l'allèle muté T du gène de la MTHFR dans la population générale est estimée à environ 19 à 30 % et la fréquence de l'homozygote muté T/T est d'environ 7 à 12 % (71, 72).

Des études récentes montrent la relation entre le phénotype MTHFR thermolabile et la concentration de l'homocystéine plasmatique, les individus homozygotes T/T tendent à avoir une élévation de leurs taux d'homocystéine mais ceci concerne essentiellement les sujets ayant des taux de folate plasmatique anormal (73).

**III.2.3.2. La mutation A1298C :**

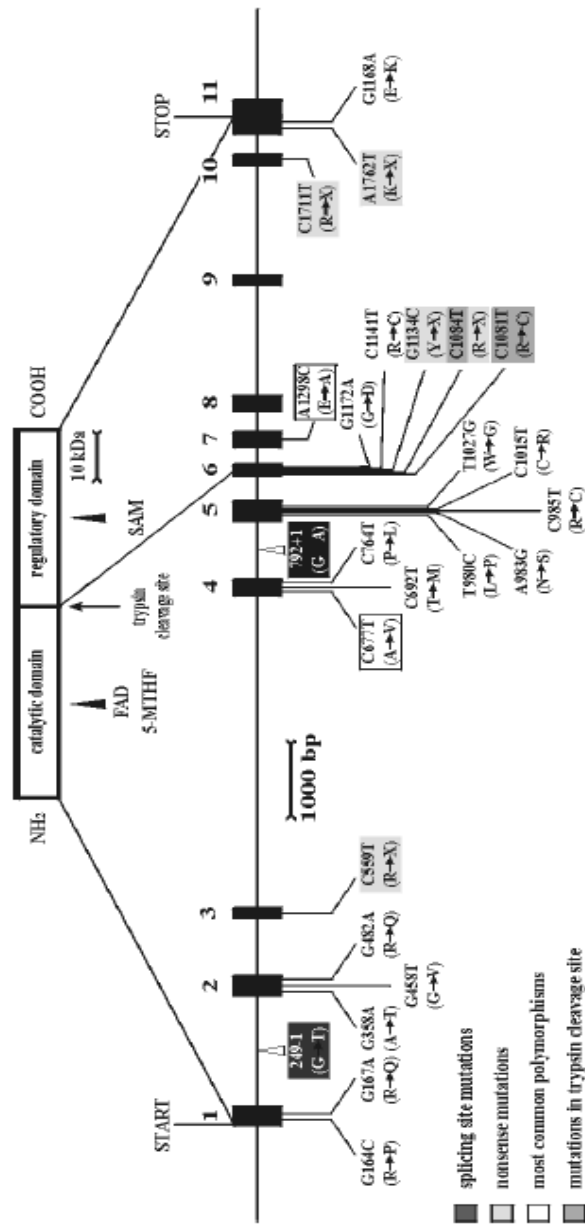
La mutation A1298C a été identifiée pour la première fois en 1995 durant des études faites sur des patients ayant un cancer ovarien, elle se localise dans la région régulatrice du gène au niveau de l'exon 7 du gène de la MTHFR (74), et qui n'a pas d'effet sur l'activité de la MTHFR, elle correspond à une substitution d'une adénine par une cytosine en position 1298 dans la séquence nucléotidique et qui se traduit dans la séquence protéique, par la substitution d'un acide glutamique par une alanine au niveau du codon 429.

Cette mutation est associée à une diminution de l'activité enzymatique (79), mais qui n'entraîne pas une thermolabilité de l'enzyme (80).

Plusieurs études considèrent que la mutation A1298C comme un facteur de risque des MTEV (81).

### III.2.3.3. Autres variants du gène MTHFR:

D'autres mutations ont été régulièrement découvertes, certains d'entre eux correspondent à des mutations missens, tel que la G167A au niveau de l'exon 1, la C692T au niveau de l'exon 4 ainsi que des mutation non sens comme la mutation C559 T au niveau de l'exon 3 (figure 6) (77, 78, 79, 80).



**Figure 6 :** Structure schématique du gène et de la protéine MTHFR (81).

# Partie Pratique

# Patients et Méthodes

## **I. Populations étudiées :**

Notre étude est de type cas témoins, faite sur deux types de populations l'une témoin et l'autre malade.

### **I.1. Population témoin :**

Elle représente la population témoin apparemment saine de différentes tranches d'âge et des deux sexes, habitant essentiellement à Constantine.

Cette population est prise en fonction de certains critères :

#### **Critère d'inclusion :**

- Les sujets sains.

#### **Critères d'exclusions :**

- Les sujets ayant un antécédent avec pathologie cardiovasculaire (MTEV, IDM, HTA...).
- Les sujets ayant un cancer.
- Les fumeurs.

### **I.2. Population malade :**

Elle correspond à des sujets présentant une MTEV pour la première fois ou récidivante, admis essentiellement au niveau du service de cardiologie au CHU de Constantine et qui réfère à nos critères d'exclusions et d'inclusions.

#### **Critère d'inclusion :**

- Les malades ayant une MTEV.

#### **Critères d'exclusions :**

- Les malades qui sont sous traitement vitaminique (folate, vitamine B12, vitamine B6)
- Les malades qui se traitent par des médicaments qui interfèrent avec le métabolisme des folates, B12, B6.
- Les sujets ayant une transfusion sanguine.
- Les sujets ayant une insuffisance rénale.

## **II. Techniques employées :**

### **II.1. Le prélèvement sanguin :**

Le prélèvement sanguin est fait dans un tube vacutenaire à EDTA au niveau du service concerné, une quantité d'environ 10 ml est prélevé le matin à jeun de préférence et conservés directement dans la glace entre le prélèvement et la centrifugation (condition du dosage de l'homocystéine).

### **II.2. Le recueil des données :**

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

Le questionnaire est relié à notre malade par une numérotation appropriée et les tubes de prélèvement sont étiquetés par la suite par la même numérotation, et tous cela est mentionné dans un cahier d'enregistrement pour assurer une bonne organisation du travail.

### **II.3. Dosage de l'homocystéine :**

#### **II.3.1. Recueil des échantillons :**

Des échantillons hémolysés peuvent être révélateurs d'une préparation inadéquate du prélèvement avant son envoi au laboratoire il faudra donc interpréter les résultats avec prudence.

Les plasmas héparine ou EDTA sont particulièrement recommandés, mais le sérum est également utilisable. Il est important de séparer le plasma ou sérum des cellules dès que possible après prélèvement, car la synthèse d'homocystéine peut avoir lieu dans les hématies après le prélèvement. Les échantillons doivent être conservés dans la glace entre le prélèvement et la centrifugation. Noter que la conservation sur glace rend particulièrement difficile l'utilisation d'échantillons sériques.

La centrifugation des échantillons sériques avant la formation complète du caillot peut entraîner la présence de fibrine. Pour éviter les résultats erronés dus à la présence de fibrine, s'assurer de la formation complète du caillot avant de centrifuger les échantillons, en particulier ceux provenant de patients sous anti-coagulants, peuvent nécessiter un temps plus long pour la formation du caillot.

Les condition de conservation est de 14 jours à 2 à 8 °C ou 6 mois à -20 °C.

### **II.3.2. Principe du test :**

Représente un dosage quantitatif de la L-homocystéine dans le plasma ou sérum dans un analyseur qui est l'IMMULITE 2000, et qui est fait par un immunodosage par compétition.

Le test IMMULITE homocystéine inclut une étape de préliminaire manuelle de prétraitement des échantillons.

La solution de travail de prétraitement est préparé comme suit :

On fait une dilution de la solution B de prétraitement (dithiothreitol )au 1/10 dans l'eau distillée ou désionisée, la solution obtenues est mélangé a une quantité égale avec la solution A de prétraitement (S-adénosyl-L-homocystéine).

La quantité de la solution de travail de prétraitement est préparée en fonction du nombre d'échantillons à analysés

**Exemple :** 1 ml de solution A avec 1 ml de solution B suffit pour 6 échantillons.

On ajoute par la suit 300 µl de solution de travail de prétraitement avec 15 µl du serum.

L'homocystéine des échantillons plasmatique ou sériques de patients est séparée des protéines de liaison et convertie en S-adénosyl homocystéine (SAH) après un incubation de 30 minutes à 37°C en dehors du système et en présence des deux solutions de prétraitement A et B.

L'échantillon prétraité et l'anticorps anti-SAH marqué à la phosphatase alcaline sont induits simultanément dans l'unité test qui contient une bille de polystyrène recouverte de SAH. Pendant une incubation de 30 minutes, le SAH provenant de l'échantillon prétraité entre en compétition avec le SAH fixé pour se lier à l'anticorps anti-SAH marqué à la phosphatase alcaline. Le conjugué non lié est éliminé par le lavage et séparé par centrifugation.

## **II.4. Extraction d'ADN :**

Toutes les études génétiques nécessitent la disposition d'échantillons d'acide nucléique, les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN, les autres sources cellulaires peuvent être des biopsies (biopsie de villosités chorales ...). Dans la grande majorité des cas la technique d'extraction des acides nucléiques doit être adaptée à l'échantillon, à la nature du génome, au nombre de copies et de méthode de biologie moléculaire utilisée ultérieurement (PCR).

Il existe plusieurs techniques utilisées pour l'extraction d'ADN, celle employée dans notre étude est la technique au NaCl.

### **Principe :**

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

L'ADN est solubilisé en phase aqueuse par le rapport de la DO à 260 nm sur DO à 280nm (longueur d'onde d'absorption des protéines) qui doit être compris entre 1.8 à 2.

### **Détermination de la pureté :**

La contamination de l'ADN extrait par des protéines a été appréciée en mesurant la densité optique des extraits à 260 et 280 nm et en effectuant le rapport DO 260 nm/DO 280

On considère que

- L'ADN est suffisamment pur lorsque le rapport  $R = DO_{260}/DO_{280}$  est compris entre 1.6 et 2 ( $1.6 < R \leq 2$ ).
- L'ADN est contaminé par les protéines si :  $DO_{260}/DO_{280} < 1.6$ .
- L'ADN est contaminé par les ARN si :  $DO_{260}/DO_{280} > 2$ .

La pureté de l'ADN est essentielle pour une action efficace des enzymes de restriction utilisées par la suite. Dans le cas où l'ADN est contaminé, ce dernier ne laisserait pas aboutir à un bon résultat dans les étapes suivantes de son analyse par PCR. Il est donc indispensable de procéder par la réextraction de la pelote de l'ADN afin d'obtenir la pureté souhaitée. Les ADN purs sont conservés à + 4°C jusqu'à utilisation.



## **Détermination de la concentration de l'ADN :**

La densité optique à 260 nm permet de calculer la concentration de l'ADN sachant que :

1 unité de  $DO_{260\text{ nm}} = 50\ \mu\text{g/ml}$  d'ADN double brin.

Sachant que l'ADN obtenu est dilué à 1/100, la quantité obtenue est multipliée par 100.

## **II.5. La PCR :**

En 1985, Kary Mullis et une équipe de chercheurs à Cetus corporation ont met en évidence une technique de biologie moléculaire appelée PCR (Polymerase Chain Reaction), c'est une technique moléculaire qui permet l'amplification d'un segment d'ADN compris entre deux régions de séquences connues par un procédé d'extension d'amorce. Elle consiste à utiliser deux amorces oligonucléotidiques de synthèse de 20 à 25 nucléotides complémentaires des extrémités 3' des deux brins d'ADN encadrant la séquence à amplifier. Une de ces amorces est une copie du brin codant et l'autre, une copie du brin non codant. Sous l'action d'une enzyme (l'ADN polymérase), chaque amorce est allongée dans le sens 5' à 3' d'une séquence exactement complémentaire du brin recopié. La répétition des cycles aboutit à une amplification exponentielle de la séquence cible considérée (82, 83).

La technique de PCR comprend trois étapes :

- § La dénaturation (séparation des brins).
- § L'hybridation.
- § L'élongation.

### **II.5.1. Préparation du milieu réactionnel de la PCR :**

Le milieu réactionnel de PCR comprend tous les constituants nécessaires à la réalisation d'une PCR (voire annexe).

### **II.5.2. Déroulement des cycles de la PCR :**

Suite a la préparation du Mix on met dans des tubes nuques 49  $\mu\text{l}$  du Mix et 2  $\mu\text{l}$  de l'ADN soluble, le mélange ainsi obtenus est mis dans un thermocycleur qui est programmé au préalable pour la réalisation d'une PCR comprenant les étapes suivante:

Un premier cycle de 5 minutes et a une température de 94°C

30 cycles d'une minute et de 40 secondes subdivisé en 30 seconde à une température de 94°C ( dénaturation), 30 sec à une température de 65°C (hybridation) et finalement pendant 40 sec à une température de 72°C ( élongation).

A la fin et pendant 10 minutes à une température de 72°C.

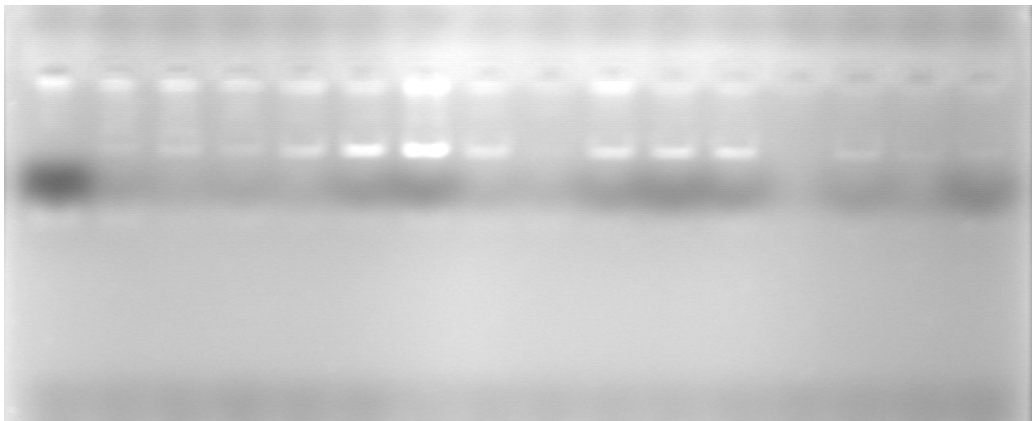
### **II.5.3. Préparation du gel d'agarose du control de PCR:**

A la suite de notre PCR un gel d'agarose à 1.5 % sera préparé comme suit :

- Mélanger tampon TBE 1 X et l'agarose à raison de 1.5 g d'agarose pour 100 mL de tampon.
- Faire fondre l'agarose au four à micro-ondes en surveillant pour éviter les projections ou au bain marie. Agiter de temps à autre pour homogénéiser le mélange. On laisse le quelque seconde et en lui rajoute 10 µl de BET (bromure d'éthidium)
- Préparer la cuve et en coule lentement le gel, on met le peigne à 1 mm du fond et à environ 1 cm de l'extrémité du support.
- Laisser refroidir, enlever le peigne. Le gel sera prêt ainsi pour le dépôt des échantillons.

### **II.5.4. Les produits de la PCR :**

Les produits obtenus de la PCR sont contrôlés par une électrophorèse horizontale sur gel d'agarose (1.5 %) déjà préparé. Cette migration d'une partie de notre produit de PCR a pour bute de confirmé l'amplification de notre ADN et d'exclure toute contamination d'ADN.



**Figure 7:** Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR

### II.5.5. Préparation du gel d'agarose pour la digestion:

- Mélanger tampon TBE 1 X et l'agarose à raison de 3 g d'agarose pour 100 mL de tampon.
- Faire fondre l'agarose au four à micro-ondes en surveillant pour éviter les projections ou au bain marie. Agiter de temps à autre pour homogénéiser le mélange. On laisse le quelque seconde et en lui rajoute 10 µl de BET (bromure d'éthidium)
- Préparer la cuve et en coule lentement le gel, on met le peigne à 1 mm du fond et à environ 1 cm de l'extrémité du support.
- Laisser refroidir, enlever le peigne. Le gel sera prêt ainsi pour le dépôt des échantillons.

### II.6. Digestion par l'enzyme de restriction Hinf I :

L'enzyme de restriction HinfI « Haemophilus influenzae » reconnaît la séquence :

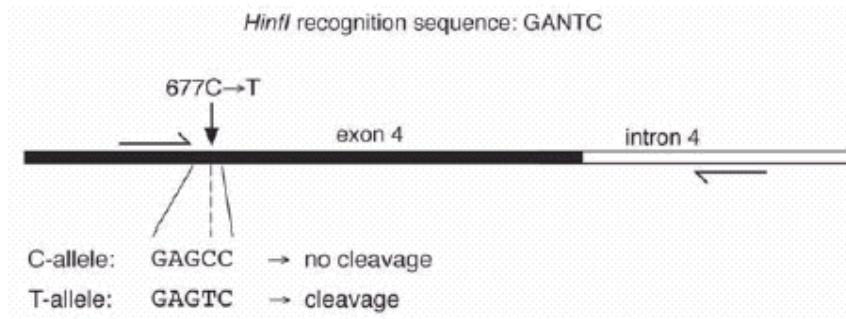


Un milieu de digestion de l'enzyme HinfI est préparé (voire annexe).

On prenant 30 µl du produit de PCR et on rajoute 10 µl du milieu de digestion et on l'incubés dans un bain marie à 37°C pendant une nuit, le lendemain et a fin de concentré notre quantité d'ADN digéré par l'enzyme HinfI on la met dans un speed-vac. Par la suite on les dépose on lui rajoutant du bleu, dans les puits et les soumis des un courant électrique et on augmentant progressivement le voltage.

Après environ deux heures et demi le gel et mis dans une chambre noire et visualisé sur ultra violet.

La présence d'une mutation C677T crée un site de coupure pour l'enzyme de restriction Hinf I (figure 10), les fragments d'ADN obtenu seront de 176 bases s'il y a mutation soit des fragment de 198 bases en cas d'absence de mutation, et par conséquent on peut faire la différence entre des sujets porteurs ou homozygotes (figure 8).



**Figure 8:** Site de coupure de l'enzyme de restriction *HinfI*.



**Figure 9:** Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments obtenus après digestion par *HinfI* (M: Marqueur de taille)

### III. Les paramètres statistiques :

Tous ces paramètres ont été calculés par l'Excel.

#### III.1. Moyenne :

Le calcul de la moyenne du taux d'homocystéine dans les deux populations ainsi que par tranche d'âge de 10 ans d'intervalle est fait par la formule suivante :

$$\bar{X}_a = \frac{\sum x}{n_a}$$

#### III.2. Ecart-type et variance :

Le calcul de la variance ainsi que l'écart-type pour les taux d'homocystéine a été réalisé par les deux formules suivantes :

**La variance :**

$$S_a^2 = \frac{\sum (x - \bar{x}_a)^2}{n_a - 1}$$

**L'écart-type :**

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

#### III.3. Calcul de l'odds ratio :

Pour calculer l'odds ratio nous avons établi un tableau de contingence :

Il est présenté sous forme de tableau croisé 2x2. Le statut malade/non malade des sujets de l'étude est présenté en colonne et le caractère exposé/non exposé en ligne.

	Malades	Témoins	
Exposée (E+)	A	b	<b>a + b</b>
Non exposés (E-)	C	d	<b>c + d</b>
	<b>a+c</b>	<b>b+d</b>	<b>Total</b>

Le calcul du odds ratio se fait par la formule suivante :

$$\text{OR} = \frac{a*d}{b*c}$$

L'Odds ratio représente une mesure d'association épidémiologique entre un facteur et une maladie, en particulier lorsque la maladie est rare parmi la population (Prévalence <5%). Dans ce cas l'Odds ratio peut être une bonne approximation du risque relatif que donnerait une enquête de cohorte pour la population.

#### **III.4. Les intervalles de confiance:**

L'approche estimative de l'analyse statistique vise à quantifier l'effet étudié et le degré de certitude de cette estimation grâce à un intervalle de confiance, qui identifie généralement une fourchette de valeurs situées de part et d'autre de l'estimation et l'on peut être sûr à 95% de trouver la valeur réelle .

La notion d'un intervalle de confiance repose sur l'idée suivante : Si la même étude était réalisée sur un échantillon différent de patients, les résultats ne seraient pas identiques, mais seraient proches du résultat véritable qui reste inconnu .l'intervalle de confiance estime cette variation due à l'échantillon (100).

Il a été calculé selon la méthode de Woolf (méthode des logits) pour la probabilité = 0.05 :

$$\text{Intervalle de confiance Odds Ratio} = (e)^{\text{LN}(\text{OR}) \pm 1,96(1/A+1/B+1/C+1/D)1/2}$$

$$(e) = 2.71828182845904$$

#### **III.5. P value :**

Le seuil critique a priori est de 0.05 (risque  $\alpha$ ) .Si la valeur de p calculée à posteriori est inférieure à ce seuil, la différence entre les paramètres est déclarée statistiquement significative pour apparemment arbitraire est nécessaire pour l'homogénéité de la présentation des résultats.

L'usage a retenu de manière consensuelle l'ensemble des seuils (0.05, 0.01, 0.001) qui représentent des risques raisonnables pour prendre une décision.

Le seuil 0.01 doit d'être choisi lorsqu'en complément d'une étude épidémiologique descriptive; on teste le lien entre deux variables sans que l'on puisse a priori argumenter quand il existe une relation logique entre ces variables.

# Résultats et discussion



## I. La répartition selon le sexe et l'age:

Notre étude inclus 71 patients hospitalisés et correspond aux critères présentés dans le chapitre matériels et méthodes. Les patients ont été subdivisés en tranches d'âge de 10 ans allant de 10 ans à 60 ans et plus, ainsi qu'une distribution selon le sexe a été établie. Les sujets témoins supposés sains sont répartis selon l'âge et le sexe de la même façon que celles des malades.

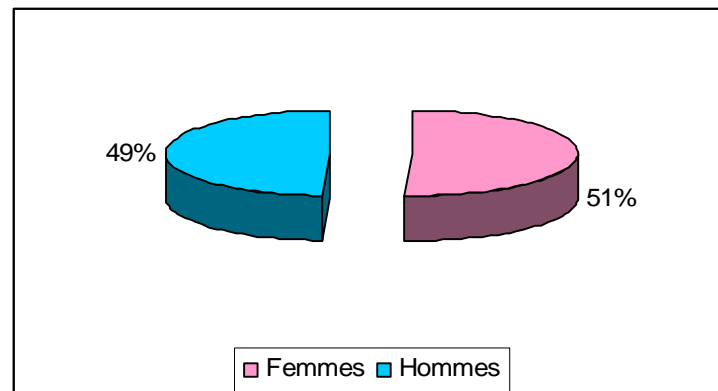
### I.1. La répartition selon le sexe:

#### \* La population témoin:

Notre population témoins comprend 118 sujets apparemment sains dans 58 hommes et 60 femmes (Tableau I, Figure 10).

**Tableau I :** Répartition du sexe dans la population témoin.

Sexe	Effectifs
Hommes	58
Femmes	60



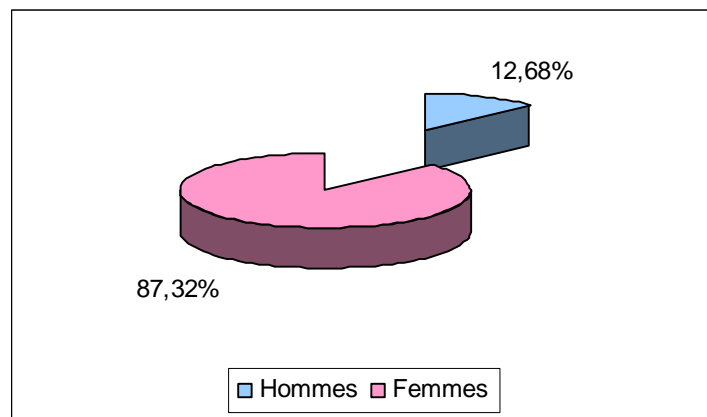
**Figure 10:** sexe ratio de la population témoin.

**\* Les sujets malades:**

Les sujets malades sont au nombre de 71 dans 9 hommes et 62 femmes (Tableau II, Figure 11).

**Tableau II : Répartition du sexe chez les sujets malades.**

Sexe	Effectifs
Hommes	9
femmes	62



**Figure 11:** Sexe ratio les sujets malades.

On remarque un nombre important des femmes (87.32 %) par rapport aux hommes (12.68 %). Dans notre cas les patients correspondaient en grande partie à des femmes enceintes ou en post-partum présentant des complications et retenues à l'hôpital ce qui explique ce sexe ratio de 0.15. Il a été montré que les femmes ont un risque plus élevé que les hommes (84). De plus, les femmes enceintes ou en post-partum augmentent leurs risques de développer une MTEV (34, 85, 86). Plusieurs études ont montré que les femmes enceintes ou en post-partum ont un risque élevé d'avoir une maladie thromboembolique veineuse (87, 88, 89).

## I.2. La répartition selon l'age:

La population témoin et sujets malades sont regroupée en tranche d'age de 10 ans jusqu'à 59 ans, puis un groupe de 60 et au delà (Tableau III).

**Tableau III:** Répartition en tranche d'age dans la population témoins et chez les sujets malades.

Tranches d'age	Population témoins	Sujets malades
10 - 20	0 %	4.35 %
20 - 29	28.81 %	30.44 %
30 - 39	24.58 %	15.94 %
40 - 49	23.73 %	20.29 %
50 - 59	13.56 %	17.39 %
≥ 60	9.32 %	11.59 %

Il est à noter que l'incidence de la maladie est particulièrement importante dans la tranche d'age 20 à 29 ans avec un taux de malades de 30.44 % ce taux baisse au-delà de 60 ans.

D'après notre enquête menée auprès des malades nous avons observé que la majorité d'entre eux sont des femmes hospitalisées pour complications en cours de grossesse ou après accouchement (34).

## II. Etude du taux d'homocystéine:

Le tableau ci-dessous comprend les moyennes et l'écart type de l'homocystéine chez la population témoins et chez les sujets malades (Tableau IV).

**Tableau IV:** moyenne et écart-type du taux d'homocystéine répartie selon différents tranche d'age.

Tranche d'age	population témoins	sujets malades
<b>20 – 29</b>	11,74 ± 3.64	<b>15,11 ± 9,22</b>
<b>30 – 39</b>	12,36 ± 3,82	<b>18,42 ± 12,51</b>
<b>40 – 49</b>	12,92 ± 4.10	<b>19,76 ± 11,72</b>
<b>50 – 59</b>	13.80 ± 2,67	10,95 ± 2,89
<b>≥ 60</b>	<b>15,82 ± 4,27</b>	<b>13,97 ± 4,67</b>
<b>Total</b>	12.83 ± 3.87	<b>16,02 ± 9,71</b>

D'après la littérature le taux d'homocystéine est considéré normal s'il est compris entre 5  $\mu\text{mol/l}$  et 15  $\mu\text{mol/l}$ , une hyperhomocystéinémie est déclarée au delà de 15  $\mu\text{mol/l}$ , elle est considérée mineur (15 – 20  $\mu\text{mol/l}$ ), modérée (26 – 50  $\mu\text{mol/l}$ ), intermédiaire (50 – 100  $\mu\text{mol/l}$ ), ou sévère (100 – 400  $\mu\text{mol/l}$ ) (4).

Nous n'avons pas rapporté les résultats observés chez les malades de moins de 20 ans dans le tableau IV, du fait de l'absence de cas-témoins d'une part et d'autre part par rapport au nombre de malades qui demeurent rares. Sur les trois malades recensé durant deux années deux malades présentaient un taux relativement élevé d'homocystéine soit 32.9  $\mu\text{mol/l}$  et 22.18  $\mu\text{mol/l}$  et le troisième a un taux normal de 14.5  $\mu\text{mol/l}$ .

La moyenne du taux d'homocystéine dans la population témoin est normale alors que dans la population malade une légère élévation du taux d'homocystéine a été observée avec une moyenne de 16.02.

La répartition par tranche d'age montre une fluctuation du taux d'homocystéine, car au niveau de la population témoin une légère élévation dans la tranche d'age supérieur a 60 ans, ce taux élevé de l'homocystéine chez ses sujets témoins peut être expliquée

probablement soit par le facteur age dont il a été montré dans certaines études que l'avancement d'age augmente le taux d'homocystéine (54), soit par la présence d'autre pathologie qui peuvent influencer le taux d'homocystéine tel que le diabète type 2 (90, 91, 92), HTA, dépression et autres. Ce groupe de témoins pouvant être uniquement indemnes de la maladie thromboembolique veineuse étudiée (93).

Alors que chez les sujets malades le taux d'homocystéine par tranche d'age montre une élévation remarquable dans presque toute les tranche d'age sauf au niveau de la tranche d'age comprise entre 50 et 59 ans où ont a pas eu de sujets malades présentant un taux d'homocystéine supérieur à 15  $\mu\text{mol/l}$  (tableau V).

**Tableau V :** pourcentage des sujets malades ayant un taux d'homocystéine supérieur à 15  $\mu\text{mol/l}$ .

<b>Tranche d'age</b>	<b>Pourcentage</b>
<b>10 – 20</b>	2.82 %
<b>20 – 29</b>	7.04 %
<b>30 – 39</b>	4.23 %
<b>40 – 49</b>	8.45 %
<b>50 – 59</b>	0 %
<b>≥ 60</b>	5.63 %
<b>Total</b>	<b>28.17%</b>

Dans la population malade les sujets présentant des hyperhomocystéinémie étant soit des taux mineurs ou bien modérés et ont a trouvés des taux d'homocystéine modérées ou intermédiaires ou encore sévères.

La fluctuation du taux d'homocystéine semble être relié à l'interaction gènes-facteurs alimentaires. Le contenu alimentaire en acide folique est un facteur important, car les sujets qui incluent dans leurs alimentation les végétaux verts et céréales et qui ne présentent pas de mal absorption intestinal augmente par conséquent leur apport en acide folique et donc règle leurs taux d'homocystéine (94, 95).

On a trouvé que parmi les 71 malades 20 d'entre eux présente un taux d'homocystéine supérieur à la normale qui a été rapporté sur le tableau VI.

Un odds ratio avec un intervalle de confiance ont été calculés a fin de déterminé un lien possible entre l'hyperhomocystéinémie et la MTEV, le taux des sujets malades présentant une hyperhomocystéinémiques est de 28.17 % (OR 1.15; 95% CI : 0.59-2.23).

Ce résultat ne maintient pas de corrélation significative entre l'hyperhomocystéinémie et le risque thromboembolique veineux. D'autres facteurs peuvent intervenir favorisant la survenu d'une telle pathologie.

Dans l'étude Ducros V et al, semble que l'hyperhomocystéinémie n'est pas un majeur déterminant dans la maladie thromboembolique veineuse, ainsi que dans l'étude de Den Heijer M et al en 2005, montre une modeste corrélation entre l'homocystéine et la thrombose veineuse (96, 97).

De nombreux auteurs s'accordent sur l'aspect multifactoriel de la maladie (19, 23, 24).

Par contre, dans d'autres études l'hyperhomocystéinémie est considérée comme étant un facteur de risque a la maladie thromboembolique veineuse (4, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106).

### III. Etude de la mutation C677T du gène de la MTHFR:

Notre analyse moléculaire a permis de mettre en évidence la mutation C677T du gène de la MTHFR et la fréquence allélique des différentes formes dans l'ensemble de nos échantillon, les fréquences génotypiques de la MTHFR concernant les homozygotes C/C (val/val), les hétérozygotes C/T (val/ala) et les homozygotes T/T (ala/ala) ont été rapportés dans la population témoins et chez les patients dans le tableau VI et VII.

#### \* Les sujets témoins :

Les fréquences génotypes ainsi qu'alléliques chez la population témoin sont apportés dans le tableau VI et VII.

**Tableau VI:** Fréquence génotypique de la mutation C677T du gène de la MTHFR dans la population témoins.

Génotypes	Effectifs	Fréquences (%)
C/C	52	47.27
C/T	50	45.45
T/T	8	7.27
<b>Total</b>	<b>110</b>	<b>100</b>

**Tableau VII:** La fréquence alléliques dans la population témoin.

L'allèle	Effectifs	Pourcentage
Allèle T	87	30 %
Allèle C	189	70 %
<b>Total</b>	<b>276</b>	<b>100</b>

La distribution mondiale de la C677T est très hétérogène. Elle correspond géographiquement à une répartition croissante Nord-Sud, notamment en Europe et en Amérique du Nord. En Europe, la fréquence du génotype T/T est faible au nord de 4 à 7 % en Finlande et en Russie, intermédiaire au centre de 8 à 10 % en France et 12 à 15 % en Espagne et au nord de l'Italie et élevé au sud 20 à 26 % en Sicile. Un gradient similaire a été trouvé en Amérique du Nord, où la fréquence du génotype T/T

augmente de l'ouest du Canada (Alberta) au sud-est des Etats-Unis, pour atteindre un pic au Mexique (tableau VIII).

La fréquence du génotype T/T dans notre population témoin est de 7.27 % se rapporte à celle retrouvée en France en Rotterdam et en Turquie, et elle est très différente de celle retrouvée en Mexique et en Italie (107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117).

**Tableau VIII :** Les fréquences génotypiques et alléliques dans différents pays et groupes ethniques.

Pays	Fréquence génotypique			Fréquence allélique	
	T/T	C/T	C/C	Allèle T	Allèle C
Bretagne	12.1	47.2	40.7	35.7	64.3
London	13.7	39.1	47.2	33.2	66.8
<b>Rotterdam</b>	<b>7.0</b>	<b>48.0</b>	<b>45.0</b>	<b>31.0</b>	<b>69.0</b>
<b>France</b>	<b>9.77</b>	<b>52.6</b>	<b>37.6</b>	<b>36.1</b>	<b>63.9</b>
Nord de l'Italie	21.0	47.0	32.0	44.5	55.5
Centre de l'Italie	30.2	45.3	24.5	52.8	47.2
Sud de l'Italie	18.7	51.3	30.0	44.3	55.7
Yémen	2.2	30.4	67.4	17.4	82.6
<b>Turquie</b>	<b>7.5</b>	<b>41.9</b>	<b>50.6</b>	<b>28.5</b>	<b>71.5</b>
Saoudite Arabie	2.1	23.1	74.8	27.3	72.7
Mexique	32.2	49.6	18.2	57.0	43.0
Tunisie	5.4	24.9	69.7	17.8	82.2
Maroc	12.3	34.7	53.0	29.6	85.0
<b>Algérie</b>	<b>7.27</b>	<b>45.45</b>	<b>47.27</b>	<b>30.0</b>	<b>70.0</b>



### \* Les sujets malades :

Les fréquences génotypes ainsi qu'alléliques chez les sujets malades sont apportés dans le tableau IX et X.

**Tableau IX :** Fréquence génotypique de la mutation C677T du gène de la MTHFR chez les sujets malades.

<b>Génotypes</b>	<b>Effectifs</b>	<b>Fréquences (%)</b>
C/C	28	45.90
C/T	28	45.90
T/T	5	8.20
<b>Total</b>	<b>61</b>	<b>100</b>

**Tableau X:** La fréquence allélique chez les sujets malades.

	<b>Effectifs</b>	<b>Fréquence (%)</b>
<b>Allèle T</b>	38	31,15
<b>Allèle C</b>	84	68,85
<b>Total</b>	122	100

Une fréquence du génotype T/T est de 8.20 % et de 31.15 % de l'allèle T a été trouvé chez les sujets malades.

Cette fréquence est très variable selon les différents groupes ethniques (118).

### **III.1. Relation entre l'homozygote T/T et la maladie thromboembolique veineuse :**

On a trouvé que la fréquence du génotype T/T est de 8.20 % chez les malades et de 7.27 %, et que la fréquence allélique de l'allèle T est de 31.15 % chez les malades et de 30 % chez les témoins. Ce résultat montre qu'il y a pas une grande différence entre les deux population témoin et malade. Un Odds ratio a été calculé, a fin de montré une corrélation possible entre la C677T et la maladie thromboembolique veineuse. On a trouvé (OR = 1.16, IC 95 % [0.35-3.88]) avec  $P > 0.05$  c'est-à-dire qu'il n'y a pas de corrélation entre la mutation C677T et les maladies thromboemboliques veineuses.

Une méga analyse a été faite a fin de mettre en évidence une corrélation entre l'homozygote T/T et les maladies thromboemboliques veineuses montre qu'il n'y a pas d'association entre C677T et les maladie thromboemboliques veineuses (119).

### **III.2. Relation entre l'hétérozygote C/T et la maladie thromboembolique veineuse :**

On a trouvé que la fréquence du génotype C/T est de 45.9 % chez les malades et de 45.45 %. Ce résultat montre qu'il y a pas une grande différence entre les deux population témoin et malade. Un Odds ratio a été calculé, a fin de montré une corrélation possible entre l'hétérozygote C/T et la maladie thromboembolique veineuse. On a trouvé (OR = 1.04, IC 95 % [0.54-2]) avec  $P > 0.05$  et donc pas de corrélation entre l'hétérozygote C/T et les maladies thromboemboliques veineuses.

### **III.3. Relation entre l'homozygote T/T et l'hyperhomocystéinémie :**

OR = 1.66 IC 95% [0.74-3.72] avec un  $P > 0.05$  et donc il n'y a pas de corrélation entre l'hyperhomocystéinémie et l'homozygote T/T.

Alors qu'il a été montré dans plusieurs études que l'hyperhomocystéinémie et associer au variant thermolabile de la méthylènetetrahydrofolate reductase C677T (120, 121)

# Conclusion

De nombreux facteurs favorisant la survenue de la maladie thromboembolique veineuse, dans notre étude cas-témoin on s'est intéressé à trouver un lien possible entre un facteur génétique qui la mutation C677T de la MTHFR et la maladie thromboembolique veineuse ainsi qu'un facteur biologique qu'un taux sérique élevé d'homocystéine et la maladie.

Suite aux résultats obtenus nous n'avons pas observé d'association entre la mutation C677T du gène de la MTHFR et la risque de maladie thromboembolique veineuse.

Aucune relation entre le génotype homozygote T/T et le génotype hétérozygote C/T et l'affection n'a pu être montrée.

Nos résultats suggèrent que cette mutation ne représente pas un facteur de risque important pour la maladie thromboembolique veineuse.

Bien que l'hyperhomocystéinémie soit considérée comme un facteur de risque dans beaucoup de la maladie cardiovasculaire, dans la thrombose veineuse aucune interaction n'a pu être mise en évidence. De plus aucune corrélation entre le taux élevé d'homocystéine et la mutation C677T du gène de la MTHFR n'est relevée dans notre population. Cependant il serait intéressant d'explorer un possible intervention de ce polymorphisme génétique en parallèle avec d'autres facteurs de risque des maladies cardiovasculaires en évaluant la possibilité de prévention et le rapport coût/rendement

Dans la continuité de ce travail de recherche décrit dans ce mémoire, il serait intéressant d'explorer ce polymorphisme génétique en parallèle avec d'autres facteurs de risque génétiques (Leiden V, Prothrombine) ainsi que biologiques (Protéine S, Protéine C...)

# Référence Bibliographique

1. **Oger E.** Incidence of venous thromboembolism. A community based study in western France. EPI-GETBP study group. Group d'étude de la thrombose de Bretagne occidentale. *Thrombo Haemost* 2000; 83 (5): 657-660.
2. **Bertina RM.** Genetic approach to thrombophilia. *Thromb Haemost* 2001; 86 (1): 92-103.
3. **Martinelli I.** Risk factor in venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001; 86 (1): 395-403.
4. **David JL.** L'hyperhomocystéinémie facteur du risque thrombo-embolique veineux. *Louvain Med* 2000; 119: S191-S196.
5. **Andritsos L.** *Haematology Grand Rounds* 2003.
6. **Couturaud F, Oger E, Abalain JH, et al.** Methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype venous thromboembolic disease. *Respiration* 2000; 67 (6): 657-661.
7. **DeSimone DW.** *Histology of blood and blood vessels. Physiology/CTS* 2006.
8. **Wheater PR, Young B, Wheeler J.** *Histologie fonctionnelles. De Boeck and Lancer* 2001.
9. **Harvey. R.P, Rosenthal N.** *Heart Development. Academic Press, San Diego,1999, P* 240.
10. **Boneu B, Cazenave J P.** *Introduction à l'étude de l'Hémostase et de la thrombose* 1997.
11. **Levy JP, Varet B et coll.** *Physiologie de l'hémostase primaire. Hématologie et transfusion. Collection Abrégés Masson, Edition, Paris, 2001 : 297-300*
12. **Trzeciak MC, Denninger MH.** *Hémostase en question* 2003. p 10-17.

13. **Hirsh J, Hoak J.** Management of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. A statement for healthcare professionals. Council on Thrombosis (in consultation with the Council on Cardiovascular Radiology), American Heart Association. *Circulation* 1996; 93: 2212-2245.
14. **Bertina RM, Rosendaal FR.** Venous thrombosis- The interaction of genes and environment 1998 ; 338 : 1839-1841.
15. **Baele G.** Le dépistage de la tendance aux thromboses par la biologie sanguine. *Folia Diagnostica* 1999; 8 (2): 23-30.
16. **Jacq F.** Quel bilan étiologique réaliser au décours d'embolies pulmonaires récidivantes?  
*Rev Mal Respir*1999 ; 16: 1018-1025.
17. **Winter JH, Fenech A, Ridley W,** et al. Familial antithrombin III deficiency. *Q J Med* 1982; 51: 373-395.
18. **Lane DA, Olds RJ, Thein SL.** Antithrombin III: summary of first database update. *Nucleic Acids Res* 1994; 22(17): 3556–3559.
19. **Marie-Josée C.** Thrombose et déficience en protéine C et S. *Ann Biol Clin Qué* 2003; 40(1): 4-9.
20. **Espinosa-Parrilla Y, Yamazaki T, Sala N, et al.** Protein S secretion differences of missense mutants account for phenotypic heterogeneity. *Blood* 2000; 95 (1): 173-179.
21. **Sykes TCF, Fegan C, Mosquera D, et al.** Thrombophilia polymorphisms and vascular disease. *J Clin Pathol: Med Pathol* 2000; 53: 300-306.

22. **Koster T, Blann AD, Biet E.** Role of clotting factor VIII in effect of von willebrand factor on occurrence of deep vein thrombosis. *Lancet* 1995; 345: 152-155.
23. **Dominique H.** Facteur de risque de TV, la liste continue de s'agrandir. *Hématologie* 2000; 6(5).
24. **Koster T, Rosendaal FR, Reisma PH, et al.** Facteur VII and fibrinogen levels as risk factors for thrombosis. A case control of plasma levels and DNA polymorphisms- the Leiden thrombophilia study (LETS). *Thromb Haemost* 1994; 71: 719-22.
25. **Richard HW.** The epidemiology of venous thromboembolism. *Circulation* 2003; 107: 1-4.
26. **Stein PD, Hull RD, Kayali F, et al.** Venous thromboembolism according to age. The impact of an aging population. *Arch Intern Med* 2004; 164: 2260-5.
27. **Anderson FA, et al.** *Arch Intern Med* 1991; 151: 933-938.
28. **Lamotte M, Debel H, Dodion P.** Prophylaxie des pathologies thrombo-emboliques veineuses à l'aide d'une héparine de bas poids moléculaire en chirurgie orthopédique: résultats et analyse complémentaire d'un registre de surveillance épidémiologique. *Louvain Med* 2000; 119: 67-77.
29. **Vandenbroucke JP, Koster T, Briet E, et al.** Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet* 1994; 344(9): 1453-1457.
30. **Jick H, Kaye JA, Vasilakis-Scaramozza C, et al.** Risk of venous thromboembolism among users of third generation oral contraceptives compared with users of oral contraceptives with levonorgestrel before and after 1995; Cohort and case-control analysis. *BMJ.* 2000; 321(10): 1190-1195.
31. **Koster T, Small RA, Rosendaal FR, et al.** Oral contraceptives and venous thromboembolism: A quantitative discussion of the uncertainties. *J Intern Med* 1995; 238(8):31-37.



32. **Dahlman T, Hellgren M, Blomback M.** Changes in blood coagulation and fibrinolysis in the normal puerperium. *Gynecol Obstet Invest* 1985; 20: 37-44.
33. **Schneider D, Von Tempelhoff GF, Heilman L.** Retrospective evaluation of the safety and efficacy of low molecular weight heparin as thromboprophylaxis during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 1567-8.
34. **Walker I. Thrombophilia in pregnancy.** *J Clin Pathol* 2000 ; 53(8): 573-580.
35. **Tufia CH, Edward WG.** Chemotherapy-induced thrombosis. *Thrombosis Research* 2006 :118(5); 555-568.
36. **Gloria AP, Nick RL, Ajay KK.** Mechanisms of Disease: the impact of antithrombotic therapy in cancer patients. *Nature Clinical Practice Oncology* 2005: 2; 356-363
37. **Rajni S, Scott BK.** Thromboembolic complications in the nephrotic syndrome: Pathophysiology and clinical management. *Thrombosis Research* 2006; 118(3): 397-407.
38. **Karanjit SM.** Venous thromboprophylaxis in trauma. *Trauma.* 2006; 8(4): 233-247.
39. **Smeeth L, Cook C, Thomas S, et al.** Risk of deep vein thrombosis and pulmonary embolism after acute infection in a community setting. *Lancet.* 2006; 367: 1075-1079.
40. **James DD, Clive K, Shannon B, et al.** Risk of fatal pulmonary embolism in patients with treated venous thromboembolism. *JAMA* 1998; 279(6): 458-462.
41. **Prandoni P, Lensing AW, Cogo A, et al.** The long-term clinical course of acute deep venous thrombosi. *Ann Intern Med* 1996; 125: 1-7.
42. **Kahn SR.** The post-thrombotic syndrome: current knowledge, controversies, and directions for future research. *Blood Rev* 2002; 16:155-65.

43. **Wai KH, Graeme JH, Clindy HL, et al.** Venous thromboembolism: diagnosis and management of deep venous thrombosis. *The Medical Journal of Australia* 2002; 182(9): 476-481.
44. **Demange C, Disandro I, Coince F, et al.** Observation des prescriptions des héparines de bas poids moléculaire en médecine. *Journal of Pharmacie Clinique* 1999; 18( 2); 156-160.
45. **Matthew TR, Robert CP, Michelle W, et al.** The treatment of venous thromboembolism in special populations. *Thrombosis Research* 2007; 119(4) : 391-402.
46. **Gosselin J, Barrelier MT, Derlon A.** Pour une meilleure utilisation des méthodes physiques de prévention des thromboses veineuses profondes des membres. *Phlébologie* 1995; 48(3): 371-375.
47. **Vin F.** Compression et thrombose veineuse profonde. *Phlébologie* 1994; 1:35-9.
48. **Coleridge-Smith, et al.** Deep vein thrombosis: effect of graduated compression stockings on distension of deep veins of the calf. *Br J Surg* 1991; 78: 721-6.
49. **Spencer FA, Emery C, Lessard D, et al.** The Worcester venous thromboembolism study: A population- Based study of the clinical epidemiology of venous thromboembolism. *J Gen Intern Med.* 2006: 21(7); 722-7.
50. **Ferrari E, Boudouy M, Creboni P.** Clinical epidemiology of venous thromboembolic disease. Results of a French multicentre registry. *European Heart Journal* 1997; 18(4): 685-691.
51. **Mudd SH, Levy HZ, Skouby F.** Disorders of transsulphuration. New York: McGraw-hill 1995; 1279-1327.
52. **Durand P, et al.** Altération du métabolisme de l'homocystéine et maladies cardiovasculaires. *RFL* 1998 ; 307 : 33-44.

53. **Malinow MR, Nie FJ, Kruger WD, et al.** The effects of folic acid supplementation on plasma total homocysteine are modulated by multivitamin use and methylenetetrahydrofolate reductase genotypes. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 1997; 17(6):1157-1162.
54. **Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, et al.** Total homocysteine in plasma or serum : methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993 ; 39 :1964-79.
55. **Caillaud D, Arnal JF.** Homocystéine et dysfonction endothéliale. *Annales de biologie clinique* 2001 ; 59(3) : 339-53.
56. **Zitton J.** Homocystéine et pathologie vasculaire. *Haematologie* 1998 ; 4 : 7-16.
57. **Berman RS, Martin W.** Arterial endothelial barrier dysfunction : actions of homocysteine and the hypoxanthine-xanthine oxidase free radical generating system. *Br J Pharmacol* 1993 ; 108 : 920-6.
58. **Mansoor MA., Bergmark C, Svardsdal AM, et al.** Redox status and protein binding of plasma homocyst(e)ine and other aminothiols in patients with early-onset peripheral vascular disease. *Arterio Thromb Vasc Biol* 1995 ; 15: 232-240
59. **Tsai JC, Wang H, Perrella MA, et al.** Induction of cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1996 ; 97 : 146-53.
60. **Lentz SR, Sadler JE.** Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest* 1991; 88(6):1906-1914.
61. **Hayashi T, Honda G, Suzuki K.** An atherogenic stimulus homocysteine inhibits cofactor activity of thrombomodulin and enhances thrombomodulin expression in human umbilical vein endothelial Cells. *Blood* 1992; 79(11): 2930-2936.
62. **Kokame K, Kato H, Miyata T.** Homocysteine-responsive genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis. GRP78/BiP and novel genes. *J Biol Chem* 1996; 271(47):29659-29665.

63. **Goyette P, Pai A, Milos R, et al.** Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome* 1998; 9(8): 652-666.
64. **Daubner S C, Matthews R G.** Purification and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from pig liver *J Biol Chem* 1982; 257(1): 140-145.
65. **Matthews E G, Vanoni M A, Hainfeld J F, et al.** Methylenetetrahydrofolate reductase. Evidence for spatially distinct subunit domains obtained by scanning transmission electron microscopy and limited proteolysis. *J Biol Chem* 1984 ; 259:11647-11640.
66. **Lorenzo D B, Quanhe Y.** 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene variants and congenital anomalies. *Am J Epidemiol* 2000 ; 151(9) : 862-877.
67. **Rozen R.** Methylenetetrahydrofolate reductase in vascular disease, neural tube defects and colon cancer. *Europharma, SA* 1998.
68. **Frosst P, Blom H J, Milos R, et al.** A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10(1): 111-3.
69. **Kluijtmans L A J, van den Heuvel L P, Boers G H J, et al.** Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 35-41.
70. **Van der Put N M J, Steegers-Theunissen R P M, Frosst P, et al.** Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995; 346: 1070-1071.

71. **Guttormsen AB, Ueland PM, Nesthus I, et al.** Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocystenemia ( $\geq 40 \mu\text{mol/l}$ ): The Holland homocysteine study. *J Clin Invest* 1996; 98: 2174-83.
72. **Gallagher PM, Meleady R, Shields DC, et al.** Homocysteine and risk of premature coronary heart disease: evidence for a common gene mutation. *Circulation* 1996; 94: 2154-8.
73. **Rozen R.** Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thromb Haemost* 1997; 78: 523-6.
74. **Weisberg I, Trand P, Christensen B, et al.** A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998; 64(3): 169-172.
75. **Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, et al.** The A1298C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis* 2001; 156(2): 409-15.
76. **Franco RF, Morelli V, Lourenço D, et al.** A second mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of venous thrombotic disease. *British Journal of Haematology* 1999; 105(2): 556-559.
77. **Sahar S, Benediete C, Erin O, et al.** Six novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria. *Human Mutation* 2000; 15: 280-287.
78. **Tonetti C, Amiel J, Munnich A, et al.** Impact of new mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene assessed on biochemical phenotypes: a familial study. *J Inher Metab Dis* 2001; 24(8): 833-42.

79. **Yano H, Nakaso K, Yasui k, et al** . Mutations of the MTHFR gene (428C>T and [458G>T+459C>T]) markedly decrease MTHFR enzyme activity. *Neurogenetics* 2004; 5(2):135-140.
80. **Goyette P, Frosst P, Rosenblatt D S, et al** . Seven Novel Mutations in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and Genotype/Phenotype Correlations in Severe Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency. *American Journal of Human Genetics* 1995 ;56 : 1052-1059.
81. **Gos M, Szpecht-Potocka A** . Genetic basis of neural tube defects. II. Genes correlated with folate and methionine metabolism. *J Appl Genet* 2002; 43(4): 511-524.
82. **Mullis K** . The unusual origin of polymerase chain reaction. *Scientific American*. 1990 ; 56-65.
83. **Mullis K, Faloona F** . Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods enzymol*. 1987 ; 155 : 335-350.
84. **Ray JG, Langman LJ, Versmeulen MJ** . Genetics university of toronto thrombophilia study in women (GUTTSI): genetic and other risk factors for venous thromboembolism in women. *Curr Control Trials Cardiovasc Med* 2001; 2(3): 141-179.
85. **Bonnar J, Green R, Norris L** . Inherited thrombophilia and pregnancy: the obstetric perspective. *Semin Thromb Hemost* 1998; 24(1): 49-53.
86. **Gerbasi FR et coll** . Increased intravascular coagulation associated with pregnancy. *Obstet Gynecol*, 1990; 75: 385-9.
87. **Gerhardt A, Scharf RE, Beckmann MW, et al** . Prothrombin and factor V mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium. *N Engl J Med* 2000; 342(6): 374-80.
88. **Martinelli I, Legnani C, Bucciarelli P, et al** . Risk of pregnancy-related venous thrombosis in carriers of severe inherited thrombophilia. *Thromb Haemost* 2001; 86(3): 800-3.

89. **Marc L, et al.** Venous thromboembolism in young woman with combined homozygosity for Factor V Leiden and Prothrombin G20210A mutations. *Hematology journal* 2005; 90:86.
90. **Vangelder E, Delecourt F, Gardozo MB, et al.** Hyperhomocystéinémie et diabète de type 2. *Annales de Biologie Clinique* 2006 ; 64(5) : 485-9.
91. **Essais O, Bouzid C, Ouni Z, et al.** Facteurs modifiant l'homocystéine chez un groupe de diabétiques de type 2. *Tunisie Medicale* 2006 ; 84(5) : 279-289.
91. **Hoogeveen E K, Kostense P J, Beks P J, et al.** Stehouwer CD. Hyperhomocysteinaemia is associated with an increased risk of cardiovascular disease, especially in non-insulin-dependent diabetes mellitus: a population-based study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18: 133-8.
92. **Davies L, Wilmshurst EG, McElduff A, et al.** The relationship among homocysteine, creatinine clearance, and albuminuria in patients with Type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24: 1805-9.
93. **Ducros V, Barro C, Yver J, et al.** Homocystéine et maladie thromboembolique veineuse une étude cas-témoin. *Annales de Biologie Clinique* 2002 ; 60(3) : 356-369.
94. **Ubbink J B, Vermaak W J H, Van der Merwe A, et al.** Vitamin B12, vitamin B6 and folate nutritional states in men with hyperhomocysteinemia. *Am J Clin Nutr* 1993 ; 57 : 4753
95. **Dalery K., Lussier-Cacan S., Selhub J. et al.** Homocysteine and coronary artery disease in French canadian subjects relation with vitamins B12, B6, pyridoxal phosphate and folate. *Am J Cardiol* 1995; 75: 1107-11.

96. **Ducros V, Barro C, Yver J, et al.** Homocystéine et maladie thromboembolique veineuse une étude cas-témoin. *Annales de Biologie Clinique* 2002 ; 60(3) : 356-69.
97. **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(2): 292-9.
98. **Kang SS, Wong PWK, Malinow MR.** Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr.* 1992; 12: 279-298
99. **Cattoneo M, Martinelli I.** Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis 1996; 335(13) : 974-976.
100. **Den Heijer M, Rosendaal F R, Blom H J, et al.** Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 1998; 80 (6): 874-877.
101. **Quéré I, Chassé JF, Dupuy E, et al.** Homocysteine, 5,10-méthylentetrahydrofolate reductase and deep venous thrombosis. Survey of 120 patients in internal medicine. *Rev Med Interne* 1998; 19(1): 29-33.
102. **Cacoub et al.** Hyperhomocystéinémie: nouveau facteur de risque de thrombose artérielle et veineuse. *Médecine Thérapeutique* 1999 ; 5(9) : 738-341.



103. **Markis M.** Hyperhomocysteinemia and thrombosis. *Clinical and laboratory Haematology* 2000; 22 (3): 133.
104. **Den Heijer M, Keijzer Miranda B A J.** Hyperhomocysteinemia as a risk factor for venous thrombosis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2001; 39 (3): 710-713.
105. **Hainaut P, Jaumotte C, Verhelst C, et al.** Hyperhomocysteinemia and venous thromboembolism : a risk factor more prevalent in the elderly and in idiopathic cases. *Thrombo Res* 2002; 106 (2): 121-125.
106. **Edrinsinghe SP.** Homocysteine-induced thrombosis. *Br J Biomed Sci* 2004; 61(1): 41-7.
107. **Markus HS, Ali N, Swaminathan R , et al.** A common polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene, homocysteine, and ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 1997; 28: 1739-43.
108. **Abbate R, Sardi I, Pepe G, et al.** The high prevalence of thermolabile 5-10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) In Italians is not associated to an increase risk for coronary artery disease (CAD). *Thromb Haemost* 1998; 79: 727-30.
109. **Sacchi E, Tagliabue L, Duca F, et al.** High frequency of the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in Northern Italy. *Thromb Haemost* 1997; 78: 963-4.
110. **Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, et al .** Presence of FV Leiden and MTHFR mutation in a patient with complicated pregnancies. *Thromb Haemost* 1997; 77: 1036-7.

111. **Schneider JA, Rees DC, Liu YT, et al.** Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1258-60.
112. **Boduroglu K, Alikasifoglu M, Anar B, et al.** C677T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene is not a risk factor for neural tube defects in Turkey. *Arch Dis Chil Fetal Neonatal ED* 1998; 78: F235.
113. **Papapetrou C, Lynch SA, Burn J, et al.** Methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects. *Lancet* 1996; 348:58.
114. **Mornet E, Muller F, Lenvoise-Furet A, et al.** Screening of the C677T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene in French patients with neural tube defects. *Hum Genet* 1997; 100: 512-14.
115. **Jebri Z, Abdennebi M, Douik H, et al.** Etude du polymorphisme C677T du gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase dans la population tunisienne. *Ann Biol Clin* 2005 ; 63(5) : 487-91.
116. **Mathonnet F, Nadifi S, Le Moal V, et al.** Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphism (C677T) in the Moroccan population. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2003; 1(1): 12-18.

117. **Saour J, Mammo L.** Prevalence of FVL, Prothrombin G20210A and MTHFR C677T in Saudi Arabia: A preliminary report for the Saudi thrombosis and familial thrombophilia (S-TAFT) Registry. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005; 3(1).

118. **Suhair SE, Taisir S.** Prevalence of factor V Leiden, prothrombin G20210A , and MTHFR C677T among 594 thrombotic Jordanian patients. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2005; 16(6): 417-421.

119. **Bezemer ID, Doggen CJ, Vos HL, et al.** No association between the common MTHFR 677C->T polymorphism and venous thrombosis: results from the MEGA study. *Arch Intern Med* 2007; 167(5): 479-501.

120. **Kang SS, Zhou J, Wong PW, et al.** Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Gent* 1988; 43(4): 414-21.

121. **Meleady R, Ueland PM, Blom H, et al.** Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase, homocysteine, and cardiovascular disease risk: the European concerted action project. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 63-70.

# Annexes

## Séquence du gène de la MTHFR:

### Exon 1:

1 ggggtgtggct gcctgcccc tgatgctccc tgccccaccc tgtgcagtag gaaccagcc  
61 atggtgaacg aagccagagg aaacagcagc ctcaaccctt gcttggaggg cagtgccagc  
121 agtggcagtg agagctccaa agatagtctg agatgttcca ccccgggctt ggaccctgag  
181 cggcatgaga gactccggga gaagatgagg cggcgattgg aatctggtga caagtggttc  
241 tccctggaat tcttccctcc tcgaactgct gagggagctg tcaatctcat ctcaaggtaa  
301 actcatgcaa ggttaagggtg ggaggcggga gtggtggtgc ctgggg

### Exon 2:

1 acggatggta tttctcctgg aacctctctt cagaaacaaa cccctacag gtttgaccgg  
61 atggcagcag gtggccccct ctacatagac gtgacctggc acccagcagg tgaccctggc  
121 tcagacaagg agacctctc catgatgatc gccagcaccg ccgtgaacta ctgtggcctg  
181 gagaccatcc tgcacatgac ctgctgccgt cagcgcctgg aggagatcac gggccatctg  
241 cacaaagcta agcagctggg cctgaagaac atcatggcgc tgcggggagg tgtggagcca  
301 gactccccct acactctggg ttctggcttt cccggaggc

### Exon 3:

1 tctggagggtt ggggtgagacc cagtgactat gacctccacc aaccctgcag acccaatagg  
61 tgaccagtgg gaagaggagg agggaggctt caactacgca gtggacctgg tgaagcacat  
121 ccgaagtgag tttggtgact actttgacat ctgtgtggca ggtgagtggc tggatcatcc  
181 tggtaggggg gatggagcta gggaggctga

### Exon 4:

1 ccttgaacag gtggaggcca gcctctcctg actgtcatcc ctattggcag gttaccccaa  
61 aggccacccc gaagcaggga gctttgaggc tgacctgaag cacttgaagg agaaggtgtc  
121 tgcgggagcc gatttcatca tcacgcagct tttctttgag gctgacacat tcttccgctt  
181 tgtgaaggca tgcaccgaca tgggcatcac ttgccccatc gtccccggga tctttcccat  
241 ccaggtgagg ggcccaggag agcccataag ctccctccac cccactctca ccgc

### Exon 5:

1 gctggccagc agccgccaca gccctcatg tcttgacag ggctaccact cccttcggca  
61 gcttgtgaag ctgtccaagc tggagtgcc acaggagatc aaggactgga ttgagccaat  
121 caaagacaac gatgctgcca tccgcaacta tggcatcgag ctggccgtga gctgtgcca  
181 ggagcttctg gccagtggtc tggtagcagg cctccacttc tacaccctca accgcgagat  
241 ggctaccaca gaggtgctga agcgcctggg gatgtggact gaggaccca ggtgagggca  
301 gtggcccaga gatccccaga ggagggtcca agagcagccc c

### Exon 6:

1 tccctctagc caatcccttg tctcaattct ctgtcccat cctcaccag gcgtcccta

61 ccctgggctc tcagtgccca cccaagcgc cgagaggaag atgtacgtcc catcttctgg  
121 gcctccagac caaagagtta catctaccgt acccaggagt gggacgagtt ccctaacggc  
181 cgctggtgag ggccctgcaga ccttccttgc aaatacatct ttgttcttgg gagcg

**Exon 7:**

1 actgccctct gtcaggagtg tgcctgacc tctgggcacc cctctgccag gggcaattcc  
61 tcttcccctg cctttgggga gctgaaggac tactacctct tctacctgaa gagcaagtcc  
121 cccaaggagg agctgctgaa gatgtggggg gaggagctga ccagtgaagc aagtgtcttt  
181 gaagtctttg ttctttacct ctctggagaa ccaaaccgga atggtcacia agtgagtgat  
241 gctggaagtg gggaccctgg ttcatcccct gccctggcc t

**Exon 8:**

1 cagggtgcca aacctgatgg tcgccccagc cagctcaccg tctctcccag gtgacttgcc  
61 tgccttgaa cgatgagccc ctggcggctg agaccagcct gctgaaggag gagctgctgc  
121 ggtgaaccg ccagggcatc ctcacatca actcacagcc caacatcaac ggggaagccgt  
181 cctccgacct catcgtgggc tggggcccca gcgggggcta tgtcttccag aagggtgtgg  
241 agggaggcac ggggtgcccc cctctcttga ccggcaccg tgg

**Exon 9:**

1 gggcgtctgg cagggctggg gttggtgaca ggcacctgtc tctcccacag gcctacttag  
61 agtttttcac ttcccgcgag acagcgggag cacttctgca agtgctgaag aagtacgagc  
121 tccgggttaa ttaccacctt gtcaatgtga aggtaggcca ggccccacgg ttcccacaga  
181 gtaccaggcc cttcgttgaa ca

**Exon 10:**

1 actccagttg ttcttggccc aggtcttacc cccacccac atcccctcag ggtgaaaaca  
61 tcaccaatgc ccctgaactg cagccgaatg ctgtcacttg gggcatcttc cctgggcgag  
121 agatcatcca gccaccgta gtggatcccg tcagcttcat gttctggaag gtaaaggagc  
181 gggggcaagc ttgccccgcc cacctggaaa accgtgggga

**Exon 11:**

1 ctctgtgtgt gtgtgcatgt gtgcgtgtgt gcgggggtat gtgtgtgtag gacgaggcct  
61 ttgccctgtg gattgagcgg tgggaaaagc tgtatgagga ggagtccccg tcccgcacca  
121 tcatccagta catccacgac aactacttcc tggtaacct ggtggacaat gacttcccac  
181 tggacaactg cctctggcag gtggtggaag acacattgga gcttctcaac aggccacc  
241 agaatgagc agaaacggag gctccatgac cctgcgtcct gacgccctgc gttggagcca  
301 ctctgtccc gccttctctc tccacagtgc tgccttctct gggaaactcca ctctccttcg  
361 tgtctctccc acccggcct cactcccc acctgacaat ggcagctaga ctggagttag  
421 gcttccaggc tcttctctga cctgagtcgg cccacatgg gaacctagta ctctctgctc  
481 tagccaggag tctgtgctct tttggtgggg agcacttgcg tctgacagag gac

## Le questionnaire: Fiche de renseignements sur les thromboses veineuses

### I. Données relatives aux patients:

Numéro de dossier

Service:

Nom et prénom

Sexe:

Date de naissance ou age:

Adresse/ Tel:

Origine:

### II. données sur le mode de vie:

Tabagisme: oui/non

Grossesse en cours: oui/non

Post partum oui/non

Notion d'avortement: oui/non

Contraception/ oestroprogestatifs: oui/non

Présence de pathologies associées:

§ Maladies rénales: oui/non

§ Maladies cardiovasculaires: oui/non

§ Maladies neurodégénératives: oui/non

Prise actuelle de thérapeutiques:

• Antiepileptiques: oui/non

• Antilipémiants: oui/non

• Chimiothérapie: oui/non

• Antidiabétiques oraux: oui/non

• Traitement vitaminique: oui/non

• Autres (préciser): oui/non

### **III. Terrain pathologique:**

A Antécédents personnels de la maladie thromboembolique veineuse:

1. thrombose veineuse inaugurale:

Date ou age du premier épisode:

Localisation de la thrombose veineuse:

- Thrombose veineuse des membres:                    oui/non
  - Thrombose veineuse cérébrale:                    oui/non
  - Embolie pulmonaire:                    oui/non
2. Thrombose veineuse récidivante:                    oui/non

B. Antécédents thromboemboliques familiaux:    oui/non

### **IV. Bilan biologique:**

### **V. Traitement de la thrombose veineuse:**



## Séquence protéique du gène de la MTHFR:

MVNEARGNSSLNPCLEGSASSGSESSKDSSRCSTPGLDPERHER

LREKMRRRLESGDKWFSLEFFPRTAEGAVNLISRFDMAAGGPLYIDVTWHPAGDPG

SDKETSSMMIASTAVNYCGLETILHMTCCRQRLEEITGHLHKAKQLGLKNIMALRGDP

IGDQWEEEEGGFNYAVDLVKHIRSEFGDYFDICVAGYPKGHP EAGSFEADLKHLKEKV

SAGADFIITQLFFEADTFFRFVKACTDMGITCPIVPGIFPIQGYHSLRQLVKLSKLEV

PQEIKDVIPIKDNDAAIRNYGIELAVSLCQELLASGLVPGLHFYTLNREMATTEVLK

RLGMWTE DPRRPLPWALSAHPKRREEDVRPIFWASRPKSYIYRTQEWDEFNGRWGNS

SSPAFGELKDYYLFYLKSKSPKEELLKMWGEELTSEASVFEVFLYLSGEPNRNGHKV

TCLPWNDEPLAAETSLLKEELLRVNRQGILTINSQPNINGKPSDPIVWGPPSGGYVF

QKAYLEFFTSRETAEALLQVLKKYELRVNYHLVNVKGENITNAPELQPNVAVTWGIFPG

REIIQPTVVDPVSFMFWKDEAFALWIERWGKLYEEESPRTIIQYIHDNYFLVNLVDN

DFPLDNCLWQVVEDTLELLNRPTQNARETEAP

**Les primers :**

**5'- TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA -3'**

**5'- AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG -3'**

### **Préparation du Bleu de Bromophénol (BBP) :**

BBP 20mg

Tris 0.5 M :2ml

Glycérol : 5ml

PH 7.5

QSP 10 ml H<sub>2</sub>O

### **Préparation du TBE 10 X :**

Tris 108g

Acide borique 55g

Ajuster le PH à 8.3 avec l'acide acétique glacial

EDTA 9.3g

QSP 1L H<sub>2</sub>O

## **Préparation du milieu de digestion par l'enzyme Hinf I**

5  $\mu$ l du tampon.

1  $\mu$ l de l'enzyme de restriction HinfI.

4  $\mu$ l de l'eau distillé.

0.2  $\mu$ l de bovine sérum albumine

## **The study of the mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase in the thromboembolic disease**

### **Abstrat**

The tromboembolic disease is a major cause of morbidity and death with an incidence of 1 per 1000 every year, it's due to the obstruction of circulation by clots that have been formed locally in the veins.

The objectif of this study is to determinate the frequency of the mutation of MTHFR gene C677T in the population case-control to release the association with the thromboembolic disease and this mutation, the frequence of the homozygote T/T (val/val) is 7.27 % in the control and 8.20 % in the patient. The result was that there are no relation between this mutation and the thromboembolic disease.

The determination of the concentration of the plasmatique homocysteine was done to find any relation between high plasma homocysteine level and thromboembolic disease, the result demonstrate that high plasma homocysteine level not the lonely cause of the tromboembilc disease.

**Key words:** Thromboembolic disease, MTHFR, mutation C677T, homocysteine

## دراسة الطفرة الوراثية س677 ت للمورثة المسؤولة عن الإنزيم مثيلن رباعي هيدروفولات رذكتاز في مرض ترمبوز اومبوليك فينوز

### الملخص:

إن مرض تخثر الدم في الأوردة يعد من بين الأمراض الخطيرة و القاتلة حيث إن نسبة حدوثه هي 1 من 1000 في السنة لكل الأعمار. إن حدوث هذا المرض راجع إلى سداد كلي أو جزئي للوريد ناتج عن محدود داخل وريد دموي.

إن دراستنا التي قمنا بها هدفها تحديد نسبة الطفرة الوراثية س677 ت للمورثة المسؤولة عن الإنزيم مثيلن رباعي الفولات المرجعي في مجموعة من أشخاص السليمين و المرضى و ذلك لبحث ما اذا كان هناك رابط بين حدوث المرض و هذه الطفرة الوراثية, تم من خلال عملنا تحديد نسبة الأشخاص الحاملين للنمط الوراثي النقي ت/ت (فالين/فالين) و التي كانت تمثل 7.27 بالمائة في مجموعة الأصحاء و 8.2 بالمائة في مجموعة المرضى. لم نجد رابط بين المرض و هذه الطفرة الوراثية.

كما قمنا كذلك بتتبع قياس نسبة الأوموسستيين في الدم في المجموعتين و ذلك بغرض تحديد رابط بين المرض و نسبة الأوموسستيين, إن النتائج المتحصل عليها من خلال البحث ان ارتفاع نسبة الأوموسستيين لا تمثل لوحدها سبب حدوث مرض تخثر الدم في الأوردة

**الكلمات الدالة:** مرض ترمبوز اومبوليك فينوز, مثيلن رباعي هيدروفولات رذكتاز , الطفرة الوراثية س677 ت, الأوموسستيين

<b>Nom :</b> MECHRI	<b>Date de soutenance</b>
<b>Prénom :</b> ADEM	30 / 06 / 2008
<b>TITRE :</b> Etude de la mutation C677T de la méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR) dans les accidents thromboemboliques veineux	
<b>NATURE DU DIPLOME :</b> Magistère en génétique des pathologies humaines	
<p><b>RESUME :</b></p> <p>Les maladies thromboemboliques veineuses sont des causes importantes de morbidité et de mortalité dont l'incidence est de 1 pour 1000 tout age confondu. Elle est due à une oblitération plus ou moins complète d'une veine par un thrombus résultant d'une coagulation intravasculaire localisée.</p> <p>Notre étude a été portée sur la détermination de la fréquence de la mutation C677T du gène de la MTHFR dans une population cas-témoins à fin de déterminer un lien entre la maladie thromboembolique veineuse et la mutation C677T. le pourcentage de l'homozygote T/T (val/val) est de 8.20 % dans la population témoin et de 7.27 % dans la population malade. Une telle relation n'a pas été trouvée selon nos résultats obtenus.</p> <p>Le dosage du taux d'homocystéine plasmatique a été réalisé pour chercher un lien possible entre l'hyperhomocystéinémie et la maladie thromboembolique veineuse. Le résultat obtenu a montré que l'hyperhomocystéinémie ne représente pas à elle seule une cause de survenue d'une telle pathologie.</p>	
<b>Mots clés :</b> Maladies thromboemboliques veineuses, MTHFR, mutation C677T, Homocystéine.	
<p><b>Laboratoire de recherche :</b></p> <p>Laboratoire de recherche de biologie et de génétique moléculaire CHU de Constantine.</p>	