

HYPERHOMOCYSTÉINÉMIE ET POLYMORPHISME C677T DE LA MTHFR CHEZ LES SUJETS PRÉSENTANT UNE ARTÉRIOPATHIE OBLITÉRANTE DES MEMBRES INFÉRIEURS : *Etude cas-témoins.*

HANACHI S⁽¹⁾, ABADI N⁽²⁾, SIFI K⁽¹⁾, KEROUAZ N⁽³⁾, BOUDAOU D K⁽²⁾, ROULA D⁽³⁾, BENLATRECHE C⁽¹⁾.

1) Laboratoire de Biochimie, CHU de Constantine.

2) Service d'Endocrinologie, CHU de Constantine.

3) Service de Médecine Interne, CHU de Constantine.

RÉSUMÉ :

L'hyperhomocystéinémie constitue un facteur de risque émergent des maladies cardiovasculaires dues à l'athérosclérose. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans cet effet délétère. La pathogénicité de l'hyperhomocystéinémie serait notamment liée à son action délétère sur la fonctionnalité des Cellules Endothéliales (CE). L'hyperhomocystéinémie modérée est causée par une variété de facteurs dont le plus évoqué est le polymorphisme C677T du gène de la méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR). Notre objectif était d'étudier la relation entre le taux plasmatique de l'homocystéine (Hcy) et la présence du polymorphisme C677T du gène de la MTHFR chez un groupe de malades atteints d'artériopathie oblitérante des membres inférieurs de l'Est algérien et de les comparer à un groupe témoin. Notre étude est de type cas-témoin. Elle a concerné 302 sujets repartis en deux groupes, 112 malades présentant une artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) et 190 témoins en bonne santé apparente. Le polymorphisme C677T a été identifié par PCR-RFLP. Nos résultats ont révélé une fréquence de distribution du génotype homozygote TT du polymorphisme C677T MTHFR de 20.7% chez les malades vs 13.7% chez les témoins. La fréquence de l'allèle muté T était de 29.51% chez les témoins alors qu'elle était de 38.74% chez les malades. L'Odds ratio pour le risque d'AOMI associée avec le génotype TT était de 1.63 IC (0.84-3.16) p : NS. La concentration plasmatique moyenne de l'homocystéine était significativement plus élevée chez les malades que chez les témoins (p<0.001). De plus, la fréquence de l'hyperhomocystéinémie (> 15µmol/l) était significativement plus marquée chez les malades ; soit 44.64% vs 28.9 % avec p< 0.001. Aucune différence statistique significative entre le polymorphisme C 677 T du gène de la MTHFR et l'AOMI n'a été observée entre les deux populations.

Mots clés : Homocystéine, Polymorphisme C677T de la MTHFR, Artériopathie oblitérante des membres inférieurs.

ABSTRACT : *HYPERHOMOCYSTEINEMIA AND C677T POLYMORPHISM OF MTHFR IN PATIENTS WITH PERIPHERAL ARTERY DISEASE: A case control study.*

Hyperhomocysteinemia is an emerging risk factor for cardiovascular disease may due to atherosclerosis. Several mechanisms are involved in this harmful effect. The pathogenicity of hyperhomocysteinemia particularly be related to its deleterious effects on the functionality of endothelial cells (EC). Moderate hyperhomocysteinemia is caused by a variety of factors, the most mentioned is the C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene .Our aim was to study the relationship between plasma homocysteine (Hcy) levels and the presence of the C677T polymorphism in the MTHFR gene in a group of patients suffering from peripheral artery disease from Eastern Algeria and to compare them with a control group. Our study is a case-control. It included 302 subjects divided into two groups, 112 patients with peripheral artery disease (PAD) and 190 healthy controls. The C677T polymorphism was identified by PCR-RFLP. Our results revealed that the genotype homozygous polymorphism TT was 20.7% in patients vs 13.7% in controls. The frequency of the mutant allele T was 29.51% in control while it was 38.74% in patients. The odds ratio for the risk of PAD associated with the TT genotype was 1.63 IC (0.84-3.16) p: NS. The average plasma concentration of homocysteine was significantly higher in patients than in controls (p <0.001) .In addition, the frequency of hyperhomocysteinemia (> 15µmol / L) was significantly greater in patients; 44.64% vs 28.9% p <0.001. No significant difference between the polymorphism C 677 T of MTHFR gene and PAD was observed between the two populations.

Key words: Homocysteine, MTHFR C677T polymorphism, Peripheral artery disease.

INTRODUCTION

L'hyperhomocystéinémie constitue un facteur de risque émergent des maladies cardiovasculaires. De nombreuses études ont mis en évidence une association statistiquement significative entre une concentration plasmatique élevée d'homocystéine totale et les maladies cardiovasculaires dues à l'athérosclérose [1]. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans cet effet délétère. La pathogénicité de l'homocystéine (Hcy) serait notamment liée à son action délétère sur la fonctionnalité des cellules endothéliales (CE). En effet, elle altère les propriétés antithrombotiques des cellules endothéliales via probablement une diminution de la production et/ou la biodisponibilité des médiateurs vasoactifs endothéliaux tels que la prostacycline, l'endothéline-1 (ET-1) et le monoxyde d'azote [2]. Ce dernier joue un rôle primordial dans la régulation de la pression sanguine et de la motilité microvasculaire. Il inhibe l'agrégation plaquettaire et l'adhésion des globules blancs sur les parois des vaisseaux, réduisant ainsi le risque de formation du thrombus [3].

Ainsi, une hyperhomocystéinémie, même modérée, est corrélée à l'existence de lésions anatomiques d'athérosclérose et à leur importance (et leur diffusion dans plusieurs territoires vasculaires), au niveau carotidien [4,5] ou des membres inférieurs [6,7]. Elle est causée par une variété de facteurs dont le plus évoqué est le polymorphisme C677T du gène de la méthyltétrahydrofolate réductase (MTHFR) [8-10]. Ce polymorphisme, à l'état homozygote est corrélé avec une réduction de l'activité de l'enzyme de 70% par rapport à son fonctionnement de base chez les homozygotes de la forme sauvage C [11]. Alors que les sujets hétérozygotes conservent environ 65% de l'activité normale avec une augmentation de sa thermolabilité [11]. Les individus homozygotes pour ce polymorphisme ont une élévation très significative de la concentration de l'homocystéine plasmatique [11], associée à une baisse du taux des folates. En revanche, des taux élevés de folates plasmatiques semblent neutraliser les effets dus au polymorphisme C677T MTHFR [12]. Plusieurs études ont montré qu'il existe une hyperhomocystéinémie chez les sujets adultes soumis à une carence en vitamines du groupe B [13-16]. Et qu'environ deux tiers des hyperhomocystéinémies modérées sont dues à des déficits vitaminiques, principalement chez les sujets âgés [17].

La supplémentation vitaminique entraîne une réduction des taux plasmatiques d'homocystéine ; cependant, l'effet bénéfique de la supplémentation vitaminique, notamment en acide folique, sur la prévention d'événements cardiovasculaires n'est pas encore confirmé [18].

L'objectif de notre travail est d'étudier la relation entre le taux plasmatique de l'homocystéine et la présence du polymorphisme C677T du gène de la MTHFR chez un groupe de malades atteints d'artériopathie oblitérante des membres inférieurs de l'Est algérien et de les comparer à un groupe témoin.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. MATÉRIEL

Notre étude est de type cas témoin, elle a duré 2 ans (2012-2014). Le recrutement a concerné 302 sujets répartis en deux groupes, une population malade représentée par 12 patients (81 hommes et 31 femmes) âgés entre 27 et 90 ans avec une moyenne d'âge de 62.63 ± 11.15 ans ayant une artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) sélectionnés parmi les patients admis au service de médecine interne du Centre Hospitalier Universitaire de Constantine (CHU C) et au service de médecine interne de l'hôpital El Bir. Les critères d'inclusion étaient l'absence de cancer, d'insuffisance rénale, de transfusion

sanguine et de supplémentation vitaminique.

Une population témoin représentée par 190 volontaires en bonne santé apparente (90 hommes et 100 femmes) âgés entre 21 et 85 ans avec une moyenne d'âge de 54.48 ± 13.31 ans; les sujets sous traitement vitaminique ainsi que les femmes enceintes ont été exclus de l'étude.

2. Prélèvements

Les prélèvements sanguins ont été collectés après 12 heures de jeun dans deux tubes contenant de l'EDTA pour l'extraction de l'ADN et un tube contenant de l'héparinate de lithium pour le dosage de l'homocystéine.

Les tubes contenant de l'héparinate de lithium ont été immédiatement centrifugés et stockés à -80°C jusqu'à analyse. Le plasma a été rapidement séparé des cellules, car la synthèse de l'homocystéine peut avoir lieu dans les hématies après prélèvement.

Un consentement éclairé a été obtenu de tous les patients et témoins.

3. Dosage de l'homocystéine

L'homocystéine totale a été dosée sur analyseur de type IMMULITE 1000 des laboratoires Siemens selon la technique d'immuno-chimiluminescence.

Une valeur de l'Hcy supérieure à $15 \mu\text{mol/l}$ est considérée comme pathologique.

4. Analyse génétique

L'ADN génomique a été isolé par la méthode de salting out. La technique de PCR/RFLP inspirée des travaux de Frost et al [11] a permis la mise en évidence du polymorphisme C677T par l'amplification d'un fragment de 198 pb du gène MTHFR à l'aide des amorces suivantes:

- Sens (forward): 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3'

- Antisens (reverse): 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'

Le programme PCR comporte une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes, suivie de 30 cycles de PCR, comprenant chacun une dénaturation à 94°C , une hybridation à 65°C et une élongation à 72°C et enfin une élongation finale à 72°C pendant 10 minutes.

Les amplifiants sont soumis à une digestion enzymatique par l'enzyme de restriction *HinfI* à 37°C pendant 3 heures ou over night. Les produits de digestion sont analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 3% en présence d'un marqueur de taille. La révélation est réalisée sous la lumière ultraviolette (UV) sur un trans-illuminateur après coloration au bromure d'éthidium (figure 1).

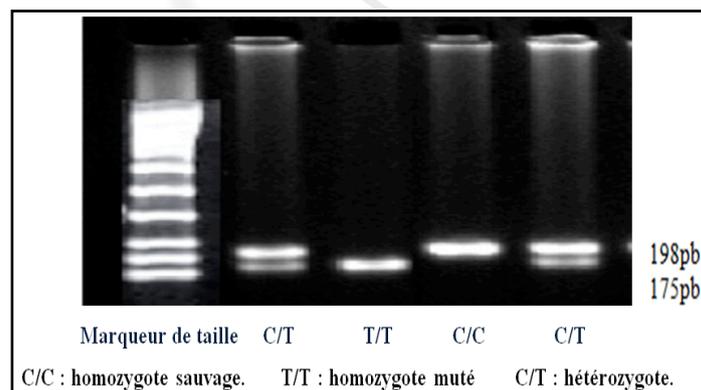


Figure 1. Profil d'électrophorèse des fragments obtenus après digestion par *HinfI*.

Les génotypes du polymorphisme C677T du gène MTHFR sont déterminés selon les bandes obtenues. Le génotype homozygote normal (CC677) est représenté par une seule bande de 198 pb, le génotype homozygote muté TT est représenté par deux bandes de 175 et 23 pb et le génotype hétérozygote CT est caractérisé par trois bandes de 198 pb, 175 pb et 23 pb.

La bande de 23 pb n'est pas visible sur le gel d'agarose à cause de sa petite taille et ainsi on ne visionne qu'une seule bande de 175 pb pour le génotype homozygote muté TT et deux bandes pour le génotype hétérozygote CT.

5. Analyse statistique

L'analyse statistique des données a été effectuée à l'aide du logiciel Epi Info version 6.0.

Les paramètres quantitatifs sont présentés sous forme de moyenne ± écart-type et les paramètres qualitatifs par l'effectif suivi du pourcentage.

- La comparaison des variances a été réalisée par le test d'ANOVA en cas de distribution normale. Dans le cas d'inégalité des variances objectivées par le test d'homogénéité des variances de Bartlett, le test non paramétrique de Mann-Whitney est utilisé.

- Le calcul des Odds ratios a été utilisé pour déterminer la relation épidémiologique entre le facteur d'exposition et la survenue de la maladie.

Le seuil de significativité a été fixé à 0,05. Si la valeur de p calculée est inférieure à ce seuil, la différence entre les paramètres est déclarée statistiquement significative pour le seuil choisi.

RÉSULTATS

1. Les caractéristiques démographiques et biologiques de la population d'étude

Le tableau I montre les caractéristiques démographiques et biologiques des patients et des témoins dans la présente étude. Le nombre de malades de sexe masculin est significativement supérieur à celui de sexe féminin avec un sexe ratio H/F de 2.61 (p<0.001). Nos témoins sont en surpoids par rapport à nos malades et l'obésité abdominale est plus prévalente chez les malades. Les fumeurs actifs sont significativement plus fréquents chez les artériopathes (71%) que chez les témoins (44%) (p<0.001). La concentration plasmatique moyenne de l'homocystéine est plus élevée chez les malades que chez les témoins, cette élévation est significative (p<0.001). De plus, la fréquence de l'hyperhomocystéinémie (> 15µmol/l) est significativement plus élevée chez les malades que chez les témoins ; soit 44.64% vs 28.9 % avec p< 0.001.

Tableau I. Caractéristiques démographiques biologiques des patients et des témoins.

	Témoins (n=190)	Malades (n=112)	p
Age (année, moyenne ±DS)	54.48 ± 13.31	62.63 ± 11.15	<0.001
Sexe (%)			
Masculin	47.4	72.3	<0.001
Féminin	52.6	27.7	NS
IMC (kg/m2, moyenne ±DS)	26.81 ± 4.13	25.39 ± 4.47	NS
Tour de taille (cm, moyenne ±DS)			
Hommes	90.59 ± 10.81	98.01 ± 10.78	<0.001
Femmes	91.4 ± 11.06	95.84 ± 12.85	<0.05
Tabac (%)	44	71	<0.001
Homocystéinémie (µmol/l, moy±DS)	13.68±7.85	17.45±9.14	<0.001

IMC= indice de masse corporelle ; Odds ratio de l'hyperhomocystéinémie (OR) de 1.95; IC (1.09-3.5) ; p<0.05.

2. La distribution génotypique et allélique du polymorphisme C677T de la MTHFR chez les malades et les témoins

La distribution des génotypes du polymorphisme C677T de la MTHFR est représentée sur le tableau II. Les fréquences des génotypes TT, CT, CC sont respectivement chez les témoins de 13.7%, 31.7% et 54.6 %, et chez les patients artériopathes de 20.7%, 36.0% et 43.2%.

Le génotype homozygote muté TT est plus fréquent chez les malades (20.7% vs 13.7%) mais de manière non significative. La fréquence de l'allèle muté T est de 29.51% chez les témoins alors qu'elle est de 38.74% chez les malades. L'Odds ratio pour le risque d'AOMI associée avec le génotype TT est de 1.63 IC (0.84-3.16) p : NS (tableau II).

Tableau II. Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme 677C/T du gène de MTHFR chez les malade et les témoins.

	Patients n 112	Témoins 190	p	Odds	IC 95%	p
TT	23(20.7%)	26(13.7%)	0.11	1.63	0.84-3.16	ns
CT	40(36%)	60(31.7%)	0.46	1.20	0.71-2.03	ns
CC	49(43.2%)	104(54.6%)	0.046	0.64	0.39-1.06	ns
T	86(38.7%)	112(29.5%)	0.11	1.49	1.04-2.14	<0.05
C	138(61.3%)	268(70.4%)	0.11	0.67	0.47-0.96	<0.05

3. Comparaison des concentrations moyennes de l'homocystéine en fonction du génotype 677 C/T du gène de la MTHFR entre malades et témoins

Le tableau III montre les moyennes de l'homocystéine chez les malades et les témoins selon les trois génotypes du gène de la MTHFR.

Tableau III. Comparaison des concentrations moyennes de l'homocystéine en fonction du génotype 677 C/T du gène de la MTHFR entre malades et témoins.

Génotype 677 C/T de la MTHFR	Concentration moyenne de l'homocystéine (µmol/l)		
	Malades	Témoins	p
CC	16.69 ± 8.9	12.15 ± 6.55	<0.001
CT	17.40 ± 8.30	14.21 ± 7.07	<0.05
TT	18.90 ± 10.89	17.55 ± 10.44	NS
p	NS	<0.001	

Aussi bien dans le groupe des malades que dans le groupe des témoins, la moyenne de l'homocystéine est plus élevée chez les sujets avec le génotype homozygote muté TT (soit 18.90±10.89µmol/l et 17.55±10.44 µmol/l respectivement) par rapport aux sujets avec le génotype hétérozygote CT et ho-

mozygote normal CC (respectivement $17.40 \pm 8.30 \mu\text{mol/l}$ et $14.21 \pm 7.07 \mu\text{mol/l}$) et $16.69 \pm 8.9 \mu\text{mol/l}$ et $12.15 \pm 6.55 \mu\text{mol/l}$). Une variation des taux plasmatique de l'homocystéine en fonction du polymorphisme C677T de la MTHFR est notée.

Cette différence du taux moyen de l'homocystéine en fonction des génotypes est significative dans le groupe des témoins ($p < 0.001$) alors qu'elle ne l'est pas dans le groupe des malades.

DISCUSSION

La concentration moyenne à jeun de l'homocystéine chez nos sujets malades est de $17.45 \pm 9.14 \mu\text{mol/L}$; elle est significativement supérieure à celle du groupe témoin $13.68 \pm 7.85 \mu\text{mol/L}$ ($p = 0,001$). De plus, 44.64% des sujets atteints d'AOMI ont une hyperhomocystéinémie, contre 28.9 % dans le groupe témoin ($p < 0,001$) avec un Odds ratio (OR) de 1.95; IC (1.09-3.5); $p < 0.05$.

Nos résultats rejoignent ceux de plusieurs études :

Clarke et al. [19] étaient les premiers à annoncer que l'hyperhomocystéinémie pourrait être un facteur de risque indépendant de l'athérosclérose. Chez les sujets ayant une hyperhomocystéinémie, différents Odds ratios ont été trouvés selon le territoire artériel étudié: 1,40 pour l'artère coronaire et 1,13 pour les artères périphériques.

En effet, l'hyperhomocystéinémie a été associée à l'AOMI avec, dans une méta-analyse d'études cas témoins [20-22], un Odds ratio (OR) de 6,8 (2, 9-15, 8) pour une augmentation de l'homocystéinémie de $5 \mu\text{mol/l}$. Une telle augmentation accroît autant le risque coronarien qu'une augmentation du cholestérol total de $0,5 \text{ mmol/l}$ (200 mg/l) [23].

Khandanpour et al. [24] ont montré, dans une méta-analyse de 14 études épidémiologiques de plus de 3000 patients, que les sujets atteints d'AOMI avaient des niveaux d'Hcy significativement plus élevés par rapport aux témoins. Leurs résultats étaient cohérents avec les résultats d'une étude cas-témoins multicentrique [25] effectuée dans neuf pays européens sur des patients atteints d'AOMI, de maladies cérébrovasculaires et maladies coronariennes. L'étude multicentrique a trouvé que les concentrations de Hcy plasmatique supérieures au 80^{ème} percentile pour les sujets témoins ont été associées à une augmentation du risque de maladies vasculaires indépendamment de tous les facteurs de risque traditionnels. Il a également été démontré que l'homocystéine plasmatique était plus élevée chez les patients atteints de l'AOMI avec plusieurs localisations de plaques d'athérome par rapport aux sujets ayant une localisation unique soit supra-inguinale ou sous-inguinale [22]. En outre, les personnes ayant hyperhomocystéinémie développaient une AOMI à un âge plus jeune. [26]

Des niveaux d'homocystéine plus élevés ont été également associés à un plus faible IPS indépendamment de facteurs de risque classique dans l'étude allemande GET-ABI, étude prospective de 6880 patients. [26]

Sofi et al., dans une étude cas-témoins (280 cas et 280 témoins), ont constaté que les niveaux d'homocystéine étaient plus élevés chez les patients en cours d'évaluation pour une revascularisation que chez les témoins [27].

Dans une étude cas-témoins incluant 849 femmes ayant un âge moyen de 48 ans, une association significative a été mise en évidence entre l'hyperhomocystéinémie modérée et l'AOMI : l'Odds ratio était de 2,5 (1,7-3,9) et l'Odds ratio ajusté sur les facteurs de risque vasculaire classiques de 2,1 (1,3-3,2). L'homocystéinémie était élevée chez 22 % des patientes et 10 % des sujets témoins [28].

La Progression of Atherosclerosis Study [29] a conclu qu'une

élévation de l'homocystéine sérique de 1 mmol/L augmentait le risque de mortalité de 3,6% chez les malades ayant une AOMI. Dans la présente étude, la prévalence du génotype muté TT chez les malades (20.7%) est plus élevée que celle des témoins (13.7%). Cependant, cette augmentation reste non significative. L'Odds ratio calculé pour du génotype muté TT versus CT+ CC est de 1.63 ; IC (0.84-3.16) $p : \text{ns}$, celui des génotypes CC versus CT +TT est de 0.64 ; IC (0.39-1.06) $p : \text{ns}$.

Concernant la relation de la concentration plasmatique de l'homocystéine avec les différents génotypes du polymorphisme étudié, nous avons identifié une augmentation plus prononcée de l'homocystéine associée aux génotypes mutés TT du polymorphisme C677T de la MTHFR aussi bien chez les malades que les témoins. Cette augmentation est plus marquée chez les malades. Ainsi, la différence entre les moyennes du taux plasmatique de l'homocystéine entre malades et témoins de génotype TT est de $1.35 \mu\text{mol/l}$.

Dans plusieurs études épidémiologiques de cohortes et cas-témoin l'hyperhomocystéinémie a été confirmée être un facteur de risque indépendant pour les maladies coronariennes et l'artériopathie périphérique [30, 31] et le polymorphisme C677 T a été corrélé avec les niveaux élevés d'homocystéine dans le plasma [32].

Veronika et al. [33] dans leur étude ont conclu que l'hyperhomocystéinémie et le polymorphisme C677T de la MTHFR étaient positivement associés à la maladie thrombotique artérielle et veineuse dans la population du Nord-Ouest de la Russie. L'étude de Sofi et al. [27], après analyse univariée, ont montré une association significative entre les symptômes de l'AOMI et la présence de paramètres modifiés (Odds ratio de l'homozygotie TT de la MTHFR = 1,4 (IC à 95%, 1.03 à 1.09) $P = 0,03$; Odds ratio de l'Hcy = 3,1 (IC à 95%, 1.09 à 4.07 $P < 0,0001$) et celui du variant de la prothrombine = 3,8 (IC à 95%, 1.02 à 12.04) $P = 0,02$). Après ajustement pour les facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels, la MTHFR a perdu son association avec l'AOMI. D'autre part, des niveaux élevés de l'Hcy ($n = 32$) ont augmenté la probabilité d'apparition des symptômes de l'AOMI (OR 37.7 (95% CI, 3.7 à 381,5) $P < 0,0001$).

Cependant, plusieurs études [8, 34, 27] n'ont pas observé un rôle indépendant de ce polymorphisme de la MTHFR comme facteur de risque d'apparition des symptômes de la maladie artérielle périphérique.

De même, les résultats de la LIPAD study [35] ont montré que l'AOMI n'est pas associée à une prévalence élevée du polymorphisme C677T MTHFR. La prévalence des mutations dans les deux populations (malade et témoin) était similaire à celle décrite dans les rapports épidémiologiques antérieurs sur la population blanche [36].

Les études portant sur l'association de l'AOMI avec hyperhomocystéinémie et le polymorphisme C677T de la MTHFR soulèvent des doutes quant à la relation de causalité entre la mutation C677T de la MTHFR et l'artériopathie [37-42]. Ces six études, diffèrent considérablement par leurs tailles et par la sélection des patients et des contrôles [34]. En conséquence, sur la base de ces publications, une déclaration définitive relative à l'association de l'AOMI avec le polymorphisme C677T MTHFR n'a pas été possible jusqu'à présent.

CONCLUSION

Notre étude retrouve une prévalence élevée de l'hyperhomocystéinémie: 44.64% pour les sujets avec AOMI contre 28.9% pour les témoins. La différence de distribution du polymorphisme C677T entre malades et témoins est non significative

(la fréquence du génotype muté TT est de 20.7% et 13.7 % respectivement). De plus, la moyenne de l'homocystéine est plus élevée chez les sujets ayant le génotype homozygote muté TT par rapport aux sujets ayant les génotypes hétérozygote CT et homozygote normal CC. Il sera cependant intéressant de réaliser des études prospectives sur un grand échantillon avec des critères de sélection bien définis en prenant en compte l'ethnie des patients, leur âge, l'association à d'autres thrombophilies et leur statut vitaminique en particulier pour les folates.

RÉFÉRENCES

- Rigaud D.** Hyperhomocystéinémie et maladies cardiovasculaires dues à l'athérosclérose. *La Lettre du Cardiologue*. mars 1999 ; 309 .
- Drunat S, Moatti N, Paul JL, Cogny A, Benoit MO, Demuth K.** Homocysteine-Induced decrease in endothelin-1 production is initiated at the extracellular level and involves oxidative products. *Eur J Biochem*.2001; 268, 20: 5287–5294.
- Lentz SR.** Homocysteine cardiovascular physiology. Cambridge University Press, Cambridge. 2001: 441–50.
- Malinow MR, Nieto FJ, SzkloM, Chambless LE, Bong G.** Carotid arterial intimal-medial wall thickening and plasma homocysteine in asymptomatic adults. The Atherosclerosis Risk In Communities Study. *Circulation*.1993; 87: 1107–1113.
- Montalescot G., A. Ankri, B. Chadeaux-Vekemans & Al.** Plasma Homocysteine And The Extent Of Atherosclerosis In Patients With Coronary Artery Disease. *Int J Cardiol*. 1997; 60: 295–300.
- De Jaegera C, Fraoucenea N, Voronskaa E, Cherinb P.** Role of homocysteine in pathology. *Institut européen de médecine et physiologie*. *Medecine & Longevite*. 2010 ; 2: 73-86.
- Van Den Berg M, Stehouwer CD, Bierdrager E, Rauwerda JA.** Plasmahomocysteine and severity of atherosclerosis in young patients with lower-limb atherosclerotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.1996; 16: 165-171.
- Brattstrom L, Wilcken De, Ohrvik J, Brudin L.** Common methylenetetrahydrofolatereductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease; the result of a meta-analysis. *Circulation*. 1998; 98: 2520-6.
- Leclerc D, Rozen R.** Génétique moléculaire de MTHFR :Les polymorphismes ne sont pas tous bénins. *Médecine/Sciences*. 2007; 23: 297-302.
- Sibani S, Christensen B, O'Ferrall E, Saadi I, Hiou-Tim F & Al.** Characterization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofolatereductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria. *Hum Mutat*. 2000; 15: 280–287.
- Frost P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG & Al.** A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolatereductase. *Nat Genet*. 1995; 10 : 111-113.
- Jacques Pf, Bostom Ag, Williams Rr, Ellison Rc, Eckfeldt J H, Rosenberg Ih & Al.** Relation between folate status, a common mutation in MethylenetetrahydrofolateReductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation*.1996; 93: 7-9.
- Smach MA, Naffeti S, Charfeddine B, Ben Abdallah J, Othmen LB, Letaef A, Limem K.** Homocysteine, vitamin B-12, folic acid and the cognitive decline in the elderly. *Pathologie Biologie*. 2013; 61: 184–192.
- Hustad S, Ueland PM, Vollset SE, Zhang Y, Bjorke-Monsen AL, Schneede J.** Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine: effect modification by the methylenetetrahydrofolatereductase C677T polymorphism. *Clin Chem*. 2000; 46: 1065–1071.
- De Bree A, Verschuren WM, Blom HJ, Kromhout D.** Association between B vitamin intake and plasma homocysteine concentration in the general dutch population aged 20–65 y. *Am J Clin Nutr*. 2001; 73: 1027–1033.
- Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J.** Determinants of plasma total homocysteine concentration in The Framingham Offspring Cohort. *Am J Clin Nutr*. 2001; 73: 613–621.
- Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH.** Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *J Am Med Assoc*.1993; 270: 2693–2698.
- Martin-Dupan RC, Dany Mercan D.** Effets de l'acide folique sur les risques cérébrovasculaires et oncologiques liés a l'homocystéine. *Rev Med Suisse*. 2012 ; 8: 375-9.
- Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Naughten E, Cahalane S, & Al.** Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med*. 1991; 324: 1149–55.
- Brattström L, Israelsson B, Norrving B, Bergqvist D, Thörne J, Hultberg B, & Al.** Impaired homocysteine metabolism in early-onset cerebral and peripheral occlusive arterial disease - effects of pyridoxine and folic acid treatment. *Atherosclerosis*. 1990; 81: 51–60.
- Molgaard J, Malinow MR, Lassvik C, Holm A- C, Upson B, Olsson AG.** Hyperhomocysteinemia : an independent risk factor for intermittent claudication. *J Intern Med* .1992; 231: 273–9.
- Bergmark C, Mansoor MA, Swedenborg J, de Faire U, Svardal AM, Ueland PM.** Hyperhomocysteinemia in patients operated for lower extremity ischemia below the age 50: effect of smoking and extent of disease. *Eur J Vasc Surg*. 1993; 7: 391.
- Boushey Cj, Beresford Saa, Omenn Gs, Motulsky Ag.** A quantitative assessment of plasma homocysteinemia as a risk factor for vascular disease. *Jama*.1995; 274: 1049–57.
- Khandanpour N, Loke Y.K, Meyer F.J, Jennings B, Armon M.P.** Homocysteine and Peripheral Arterial Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2009; 38: 316-322.
- Robinson K, Arheart K, Refsum H, Brattström L, Boers G, Ueland P, & Al.** Low circulating folate and vitamin B6 concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease. European COMAC Group. *Circulation*. 1998 Feb 10; 97, 5: 437e43.
- Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, Fitzgerald LA, Rodgers GM.** Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb*.1993; 13:1327–1333.

27. **Sofi F, Lari B, Rogolino A, Marcucci R, Pratesi G, Dorigo W, & Al.** Thrombophilic risk factors for symptomatic peripheral arterial disease. *J Vasc Surg.* 2005 ; 41: 255-260.
28. **Van den Bosch MA, Bloemenkamp DG, Mali WP, Kemmeren JM, Tanis BC, Algra A, & Al.** Hyperhomocysteinemia and risk for peripheral arterial occlusive disease in young women. *J Vasc Surg.* 2003; 38: 772-77.
29. **Taylor Lm, Moneta Gl, Sexton Gj, Schuff Ra, Porter Jm.** Prospective blinded study of the relationship between plasma homocysteine and progression of symptomatic peripheral arterial disease. *J Vasc Surg.* 1998; 29, 1: 8-21.
30. **Welch GN, Loscalzo J.** Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med.* 1998; 338: 1042-1050.
31. **Stampfer MJ, Malinow MR.** Can lowering homocysteine levels reduce cardiovascular risk? *New Engl J Med.* 1995; 332: 328-9.
32. **Kang Ss, Zhou J, Wong Pw, Kowalysyn J, Strokosch G.** Intermediate homocysteinemia; a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet.* 1988; 43: 414-21.
33. **Veronika M. Shmelevaa., Sergey I. Kapustina, Ludmila P & Al.** Prevalence of hyperhomocysteinemia and the MTHFR C677T polymorphism in patients with arterial and venous thrombosis from North Western Russia. *Thrombosis Research.* 2003; 111: 351-356.
34. **Murraygd I, Lee Aj, Rumley A, Lowe Gd, Fowkes Fgr.** Inflammatory, haemostatic, and rheological markers for incident peripheral arterial disease: Edinburgh Artery Study. *Eur Heart J.* 2007; 28: 354-62.
35. **Mueller T, Marschon R, Dieplinger B, Haidinger D, Gegenhuber A, Poelz W, & Al.** Factor V Leiden, Prothrombin G20210A, and Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T mutations are not associated with chronic limb ischemia: The Linz Peripheral Arterial Disease (Lipad). *Study J Vasc Surg.* 2005; 41: 808-815.
36. **Crowther MA, Kelton JG.** Congenital thrombophilic states associated with venous thrombosis: a qualitative overview and proposed classification system. *Ann Intern Med.* 2003; 138: 128-34.
37. **Fowkes FG, Lee AJ, Hau CM, Cooke A, Connor JM, Lowe GD.** Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) and nitric oxide synthase (ecNOS) genes and risks of peripheral arterial disease and coronary heart disease: Edinburgh Artery Study. *Atherosclerosis.* 2000; 150: 179-85.
38. **Verhoeff BJ, Trip MD, Prins MH, Kastelein JJ, Reitsma PH.** The effect of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation on levels of homocysteine, folate, vitamin B12 and on the risk of premature atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1998; 141: 161-6.
39. **Todesco L, Angst C, Litynski P, Loehrer F, Fowler B, Haefeli WE.** Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma homocysteine and age. *Eur J Clin Invest.* 1999; 29: 1003-9.
40. **Rassoul F, Richter V, Janke C, Purschwitz K, Klotzer B, Geisel J, & Al.** Plasma homocysteine and lipoprotein profile in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Angiology.* 2000; 51: 189-96.
41. **Stricker H, Soldati G, Balmelli T, Mombelli G.** Homocysteine, vitamins and gene mutations in peripheral arterial disease. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2001; 12: 469-75.
42. **Ciccarone E, Di Castelnuovo A, Assanelli D, Archetti S, Ruggeri G, Salcuni N, & Al.** Homocysteine levels are associated with the severity of peripheral arterial disease in Type 2 diabetic patients. *J Thromb Haemost.* 2003; 1: 2540-7.