Nancy-Université
Université Henri Poincaré

AVERTISSEMENT

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

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

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

➢ Contact SCD Nancy 1 : theses.sciences@scd.uhp-nancy.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Nancy-Université
Université Henri Poincaré

Instituts thématiques

Inserm
Institut national de la santé et de la recherche médicale

paul verlaine université - metz

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par Abderrahim OUSSALAH

Titre :

Déterminants génétiques du métabolisme des monocarbones : approche gène candidat dans deux populations ambulatoires et étude d'association avec la maladie de Crohn

Date de soutenance : 31/10/2011

Membres du jury :

Rapporteurs :

Professeur Hervé Puy	PU-PH de Biochimie-Biologie Moléculaire à la Faculté de Médecine X. Bichat, Membre du Centre de l'Inserm de l'Université de Paris VII
Professeur Yves Malthiery	Directeur de l'Unité Inserm 694 de l'Université d'Angers

Examinateurs :

Professeur Laurent Peyrin-Biroulet	PU-PH à l'Université Henri Poincaré Nancy 1, Inserm U954, Co-directeur de thèse
Professeur Jean-Louis Guéant	Directeur de l'Unité Inserm U954, PU-PH à l'Université Henri Poincaré Nancy 1 Directeur de thèse

---

Inserm U954, Unité de recherche NGERE - Nutrition-Génétique et Exposition aux Risques Environnementaux
Faculté de Médecine – BP 184, 54505, Vandœuvre-lès-Nancy

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Jean-Louis Guéant qui m'a accueilli dans son laboratoire, m'a confié ce travail et m'a offert les moyens de le réaliser. A travers sa confiance et ses recommandations il m'a transmis le plaisir de la recherche. Il me fait l'honneur de juger cette thèse, qu'il veuille trouver ici le témoignage de ma sincère gratitude et de toute ma considération.

Je remercie mon co-directeur de thèse, Monsieur le Professeur Laurent Peyrin-Biroulet, qui m'a confié ce travail. Il m'a fait profiter de ses grandes et inestimables connaissances scientifiques et médicales. Qu'il soit assuré de mon grand respect, de ma profonde reconnaissance et de mon amitié.

J'adresse mes remerciements au Professeur Marc-André Bigard qui m'a accueilli dans son service et qui m'a initié aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

J'exprime toute ma gratitude et ma reconnaissance au Professeur Jean-Pierre Bronowicki qui m'a accueilli dans son service et qui m'a toujours soutenu et encouragé dans mes travaux de recherche.

J'adresse mes remerciements et ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Jean-Yves Jouzeau, directeur de l'école doctorale BioSE pour son soutien.

Je remercie touts les membres de l'unité Inserm U954, du Laboratoire de Biochimie - Biologie Moléculaire - Nutrition – Métabolisme et du service d'Hépato-Gastroentérologie, qui ont permis à ce travail de voir le jour.

Je tiens à remercier :

Monsieur le Professeur Yves Malthiery, qui a bien voulu me faire la faveur de juger cette thèse. Je tiens à lui exprimer mon profond respect et toute ma reconnaissance.

Monsieur le Professeur Hervé Puy, qui m'a fait le privilège d'accepter de juger ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de mes remerciements les plus respectueux.

A mon épouse qui m'a toujours soutenu dans mon travail,

A mon grand-père, à ma grand-mère,

A mes parents,

A mes enfants,

A ma famille.

Table des matières

1 Liste des abréviations 15
2 Introduction 17
3 Métabolisme de la vitamine B12 19
3.1 Structure 19
3.2 Nutrition 21
3.3 Absorption 22
3.4 Transport 25
3.5 Processing cellulaire de la cobalamine 29
4 Métabolisme des folates 33
4.1 Nutrition 33
4.2 Absorption 33
4.3 Transport plasmatique et cycle entérohépatique 36
4.4 Capture cellulaire de folates 36
4.4.1 Les récepteurs des folates (*Folate receptors*, *FR–alpha*, *FR–beta*, *FR–gamma*) 37
4.4.2 Les récepteurs RFC (*Reduced Folate Carriers*) 38
4.4.3 Le système de transport '*Proton-coupled folate transporter' (PCFT)* 38
4.5 Rétention cellulaire et excrétion des folates 39
5 Métabolisme intracellulaire et interaction entre cobalamine et folates 41
6 Métabolisme de l'homocystéine 45
6.1 Introduction 45
6.2 Les voies du métabolisme de l'homocystéine 46
6.3 Régulation nutritionnelle du métabolisme de l'homocystéine 49
6.4 Les causes nutritionnelles de l'hyperhomocystéinémie 51
6.5 L'hyperhomocystéinémie chez l'homme 51
6.5.1 La thermolabilité de la méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR) 54
6.5.2 Autres facteurs contrôlant le taux plasmatique de l'homocystéine 55
6.6 Hyperhomocystéinémie, stress cellulaire et inflammation de la muqueuse intestinale au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin 56
6.7 Traitement de l'hyperhomocystéinémie 58
7 Influence du métabolisme des donneurs de méthyle sur les mécanismes épigénétiques et épigénomiques liés aux réactions de transméthylation 59
7.1 Introduction 59

7.2 Biologie de la méthylation du génome 60
7.2.1 Les modèles de méthylation de l'ADN 60
7.2.2 Les enzymes de la méthylation de l'ADN 61
7.2.3 La méthylation de l'ADN et la transcription 61
7.2.4 Existe t-il une déméthylation active de l'ADN ? 62
7.2.5 La modification des histones 62
7.2.6 Quelle est la fonction biologique de la méthylation de l'ADN ? 63
7.3 La synthèse de l'ADN et les voies de la méthylation : rôle des folates, de la bétaïne, de la vitamine B12 et du zinc 63
7.3.1 Les voies métaboliques 63
7.3.2 Les agents exogènes pouvant affecter la méthylation de l'ADN 66
7.3.3 L'hypothèse de la trappe méthyle-folate (*the methyl folate trap hypothesis*) 69
8 La gastrite à *Helicobacter pylori* et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : deux états inflammatoires de la muqueuse digestive, associés au déficit en vitamine B12 71
8.1 La gastrite à *Helicobacter pylori* 71
8.1.1 Introduction 71
8.1.2 Epidémiologie 72
8.1.3 Pathogénie de l'infection par *Helicobacter pylori* 73
8.1.4 Aspects cliniques de la gastrite liée à l'infection par *Helicobacter pylori* 75
8.1.5 Gastrite chronique à *Helicobacter pylori* et malabsorption de la vitamine B12 76
8.2 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin 78
8.2.1 La rectocolite hémorragique 78
8.2.2 La maladie de Crohn 79
8.2.3 Les gènes de susceptibilité dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin 80
8.2.4 Maladie de Crohn et malabsorption en vitamine B12 81
9 Hypothèses et objectifs du travail 83
10 Publication N° 1 : *Le statut sérologique de l'infection par Helicobacter pylori n'a aucune influence sur l'association entre le polymorphisme FUT2 461 G>A de la fucosyltransférase 2 et la vitamine B12 en Europe et en Afrique de l'Ouest* 87
10.1 Contexte de notre étude 89
10.2 Patients et méthodes 90
10.2.1 Populations étudiées 90
10.2.2 Prélèvements sanguins 91

10.2.3 Dosages de la vitamine B12, des folates, de l'homocystéine et de l'acide méthylmalonique 91
10.2.4 Sérologie de l'infection par *Helicobacter pylori* 91
10.2.5 Analyse de l'ADN génomique 92
10.2.6 Analyses statistiques 93
10.3 Résultats 94
10.3.1 Caractéristiques de base 94
10.3.2 Influence du statut sérologique de l'infection par *Helicobacter pylori* sur les marqueurs du métabolisme des monocarbones en Europe et en Afrique de l'Ouest 94
10.3.3 Fréquences de distribution des génotypes du polymorphisme *FUT2 461 G>A* 95
10.3.4 Influence du polymorphisme *FUT2 461 G>A* sur le statut sérologique de l'infection par *Helicobacter pylori* en Europe et en Afrique de l'Ouest 96
10.3.5 Influence du polymorphisme *FUT2 461 G>A* sur les marqueurs du métabolisme des monocarbones en Europe et en Afrique de l'Ouest 96
10.4 Discussion 100
10.5 Tableaux 104
10.6 Figures 111
10.7 Tableaux supplémentaires 112
11 Publication N°2 : *L'hyperhomocystéinémie au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : revue systématique et méta-analyse* 119
11.1 Contexte de notre étude 121
11.2 Matériel et méthodes 123
11.2.1 Critères de sélection des études et extraction des données 123
11.2.2 Mesures étudiées 124
11.2.3 Synthèse des données et analyses statistiques 124
11.3 Résultats 125
11.3.1 Revue systématique de la littérature 125
11.3.2 Comparaison du taux plasmatique de l'homocystéine entre les patients avec une maladie inflammatoire chronique de l'intestin et les sujets témoins 126
11.3.3 L'hyperhomocystéinémie n'est pas associée au risque thromboembolique chez les patients avec une maladie inflammatoire chronique de l'intestin 128
11.3.4 Association du polymorphisme *MTHFR C677T* avec le risque primaire de maladie inflammatoire chronique de l'intestin en fonction du statut en folate 128
11.3.5 Analyses de sensibilité 129
11.3.6 Analyse des biais de publication 129

11.4 Discussion 130
11.5 Tableaux 135
11.6 Figures 141
12 Etude N°3 : *Etude des déterminants génétiques du métabolisme des monocarbones au cours de la maladie de Crohn : Etude d'association utilisant un plex de 384 SNP (manuscrit soumis)* 157
12.1 Contexte de notre étude 159
12.2 Patients et méthodes 160
12.2.1 Population étudiée 160
12.2.2 Prélèvements sanguins 160
12.2.3 Dosages de la vitamine B12, des folates, de l'homocystéine et de la superoxyde dismutase 160
12.2.4 Analyse de l'ADN génomique 161
12.2.5 Dessin du plex méthylation 162
12.2.6 Lecture du plex méthylation 162
12.2.7 Analyse statistique 163
12.3 Résultats 164
12.3.1 Caractéristiques de base des 296 patients inclus 164
12.3.2 Facteurs prédictifs du taux plasmatique de l'homocystéine 164
12.3.3 Facteurs prédictifs du taux plasmatique de la superoxyde dismutase 165
12.3.4 Facteurs prédictifs de l'âge du diagnostic de la maladie de Crohn 167
12.4 Discussion 168
12.5 Tableaux 174
12.6 Figures 189
12.7 Tableaux supplémentaires 190
13 Discussion générale 213
13.1 Le statut sérologique de l'infection par *Helicobacter pylori* n'a aucune influence sur l'association entre le polymorphisme *FUT2 461 G>A* de la *fucosyltransférase 2* et la vitamine B12 213
13.2 Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et hyperhomocystéinémie : des liaisons dangereuses 215
13.2.1 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin représentent un facteur de risque avéré d'hyperhomocystéinémie 215
13.2.2 Hyperhomocystéinémie et maladie thromboembolique au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : des données supplémentaires sont nécessaires 216

13.2.3 Polymorphisme *MTHFR 677 C>T* et risque primaire de maladie inflammatoire chronique de l'intestin : influence du statut en folates sur le risque primaire associé au génotype *MTHFR 677, T/T* 217

13.3 Déterminants génétiques du métabolisme des monocarbones au cours de la maladie de Crohn : mise en évidence de nouveaux polymorphismes 218

13.3.1 Déterminants génétiques de l'hyperhomocystéinémie au cours de la maladie de Crohn : rôles des polymorphismes de *MTHFR* et *AHCY* (*SAHH*) 218

13.3.2 Déterminants génétiques de la superoxyde dismutase : implication du métabolisme des monocarbones dans la sévérité de la maladie de Crohn 220

13.3.3 Polymorphismes du métabolisme des monocarbones et âge précoce de survenue de la maladie de Crohn : rôle de *ABCB1* (*MDR1*) 221

13.4 *Fucosyltransférase 2* : un gène impliqué à la fois dans le déterminisme de la vitamine B12 et le risque primaire de la maladie de Crohn 222

14 Annexe 227

14.1 Manuscrit accepté pour publication dans: *"The American Journal of Clinical Nutrition"* 229

14.2 Manuscrit accepté pour publication dans : *"Alimentary pharmacology and Therapeutics"* 249

14.3 Manuscrit soumis (*under review*) dans : *"The American Journal of Gastroenterology"* 267

15 Références bibliographiques 343

1 Liste des abréviations

5,10-MTHF	5,10-méthylène-tétrahydrofolate
5-MTHF	5-méthyl- H_4PteGlu
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMM	Autorisation de mise sur le marché
BHMT	Bétaïne-homocystéine méthyltransférase
CagA	Cytotoxin-associated gene A
CBS	Cystathionine β-synthase
DHF	Dihydrofolate
DMP	Différence moyenne pondérée
DNMT	DNA méthyltransférase
dTMP	Déoxythymidine monophosphate
dUMP	Déoxyturidine monophosphate
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FBP	Folate binding proteins
f-met-tRNA	ARNt portant l'acide aminé méthionine formylé, 1er acide aminé de la chaîne de protéines
FR	Folate receptors
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
FUT2	Fucosyltransférase 2
GNMT	Glycine N-méthyltransférase
GWAS	Genome wide association studies
H. pylori	Helicobacter pylori
H_4PteGlu	Tétrahydrofolate
HR	Hazard ratio
IBD	Inflammatory bowel diseases
IC 95 %	Intervalle de confiance à 95 %
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IgG	Immunoglobuline G
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
IPP	Inhibiteur de la pompe à protons
IQR	Interquartile range 25e – 75^e
MALT	Gastric mucosa–associated lymphoid tissue
MC	Maladie de Crohn
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MICI	Maladie inflammatoire chronique de l'intestin
MTHFR	Méthyletétrahydrofolate reductase
MTR	Méthionine synthase
NF-κB	Necrosis Factor kappa B

NO	Oxyde nitrique
OipA	Outer membrane inflammatory protein
OR	Odds ratio
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PCFT	Proton-coupled folate transporter
PCR	Polymerase chain reaction
PLP	Pyridoxine 5'-phosphate
$PteGlu_n$	Ptéroylpolyglutamate
RCH	Rectocolite hémorragique
RFCs	Reduced folate carriers
SAH	S-adénosyl-L-homocystéine
SAHH	S–adénosylhomocystéine hydrolase
SAHH	SAH hydrolase
SAM	S-adénosylméthionine
SNP	Single nucleotid polymorphism
SOD	superoxyde dismutase
TC I	Transcobalamine I
TC II	Transcobalamine II
TC III	Transcobalamine III
Th1	T-helper 1
THF	Tétrahydrofolate
UPLC-MS/MS	Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry
VacA	Vacuolating cytotoxin A
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1

2 Introduction

La vitamine B12, également appelée cobalamine, est une vitamine hydrosoluble essentielle pour le maintient des fonctions hématologique et neurologique. Elle représente un cofacteur pour la reméthylation de l'homocystéine en méthionine par la méthionine synthase et fait partie du métabolisme des monocarbones qui est essentiel pour la synthèse de la purine et de la thymidine, nécessaires au maintien de l'intégrité du génome.[1]

Dans une enquête épidémiologique américaine menée entre 2004 et 2009 —la *National Health and Nutrition Examination Survey*— sur 12 612 adultes sains, la prévalence de la carence en vitamine B12, définie par un taux sérique < 200 pmol/L, était de 10 %.[2] La carence en vitamine B12 est fréquemment observée au cours des pathologies digestives telles que la gastrite atrophique à *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). L'infection par *H. pylori* est l'une des infections chroniques les plus répandues dans le monde et touche entre 20 % et 90 % des individus adultes selon les pays.[3-6] L'infection étant plus fréquente dans les pays en voie de développement en comparaison aux pays industrialisés.[3-6] Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont un groupe d'affections idiopathiques incluant la rectocolite hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn (MC). Ces maladies représentent un véritable problème de santé publique de part leur fréquence[7-9], leur coût[10-13], leur pronostic à court et à long termes[14, 15], leur retentissement sur la qualité de vie, et le handicap fonctionnel qu'elles engendrent.[16]

Des études en GWA ont suggéré que le polymorphisme du gène de la *fucosyltransférase 2* (*FUT2*) influençait le taux plasmatique de vitamine B12.[17-19] Le variant *FUT2* est un trait physiologique qui régule l'expression et la sécrétion des antigènes ABH dans les cellules épithéliales des glandes.[20] De façon intéressante, le statut sécréteur pour *FUT2* a été impliqué dans la susceptibilité à l'infection par *H. pylori*.[17] Dans une étude de

deux populations ambulatoires, nous avons évalué l'influence du polymorphisme de *FUT2* sur les marqueurs du métabolisme des monocarbones ainsi que la possible association entre l'infection par *H. pylori* et le polymorphisme de *FUT2*.

L'hyperhomocystéinémie est un marqueur de carence en donneurs de méthyle.[21] Plusieurs travaux ont évalué le taux plasmatique de l'homocystéine au cours des MICI et ont abouti à des résultats mitigés. Par ailleurs, l'ampleur de l'association entre le métabolisme de l'homocystéine et les MICI reste méconnue. Afin de répondre à ces problématiques, nous avons réalisé une revue systématique de la littérature avec une méta-analyse sur les études qui ont évalué le taux plasmatique d'homocystéine chez les patients avec une MICI.

Il a été démontré que les taux élevés d'homocystéine augmentaient le taux plasmatique de la superoxyde dismutase (SOD), un marqueur fiable et validé du stress oxydatif.[22, 23] Nous avons récemment mis en évidence une association entre la sévérité de la MC, telle que mesurée par le *Crohn's disease activity index* (CDAI) et le taux plasmatique de la SOD qui était influencée par un polymorphisme sur le gène de la méthionine synthase réductase (MTRR), une enzyme clé dans la reméthylation de l'homocystéine en méthionine.[24] En outre, nous avons démontré qu'un statut carencé en donneur de méthyle aggravait la colite expérimentale au DSS (Dextran sodium sulfate) chez le rat.[25] A l'aide d'un SNP array exhaustif du métabolisme des monocarbones, nous avons étudié les déterminants génétiques de l'homocystéine et de la SOD sur une cohorte de patients avec une MC.

3 Métabolisme de la vitamine B12

3.1 Structure

Le terme cobalamine fait référence à une famille de composés dont la structure est montrée en **Figure 1**. La vitamine B12, ou cyanocobalamine, est une molécule de 1355 Da composée en deux parties : (1) un groupe planaire (noyau corrine) constitué par une structure annulaire entourant un atome de cobalt, et (2) un groupe nucléotidique qui consiste en une base, le 5,6-diméthylbenzimidazole et un ribose phosphorylé estérifié avec le 1-amino,2-propanolol (**Figure 1**). La vitamine B12 est appelée cyanocobalamine car lorsqu'elle a été isolée initialement à partir du foie, sa position beta était occupée par un groupement cyano. La cobalamine ne possède pas un ligand dans son cobalt en position beta. Différentes formes de vitamine B12 résultent du remplacement du cyanide par un groupement hydroxylé, adénosyl, ou méthyle ; généralement elles sont appelées les cobalamines.[26]

La cobalamine est synthétisée par certains microorganismes à l'instar des bactéries ou des levures. Certaines souches de microorganismes produisent la cobalamine en excès par rapport à leur besoin et représentent ainsi une excellente source de cobalamine commerciale utilisée en pharmacologie. Les analogues de la cobalamine avec des effets cobalamine-like ou anti-cobalamine sont produits par des microbes via des interactions chimiques avec la cobalamine naturelle ou avec ses métabolites.

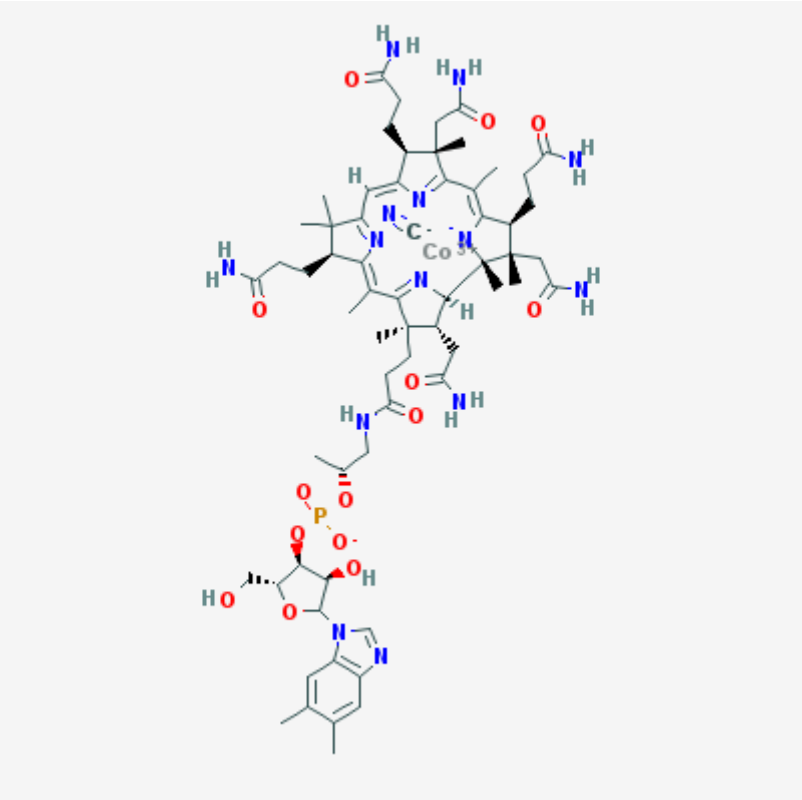


Figure 1. Structure de la vitamine B12 ($C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$). Source : http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov.

3.2 Nutrition

La cobalamine est produite uniquement par des microorganismes producteurs de cobalamine et les êtres humains reçoivent la cobalamine uniquement à partir de l'alimentation.[27] Chez l'homme, les bactéries coliques produisent la cobalamine ; néanmoins le colon est distal par rapport au site d'absorption de la cobalamine chez l'homme (iléon). Les protéines animales sont la source majeure de la cobalamine chez les non-végétariens. Les viandes issues des organes parenchymateux (abats) sont les plus riches en cobalamine (> 10 µg de cobalamine par 100 g de poids sec). Les poissons, et le muscle strié animal, les produits laitiers, et le jaune d'œuf contiennent 1 à 10 µg de cobalamine par 100 g de poids sec. En moyenne, un sujet occidental non-végétarien ingère entre 5 et 7 µg de cobalamine par jour, ce qui participe à l'équilibre physiologique de la balance en cobalamine. Une diététique végétarienne apporte en moyenne entre 0,25 et 0,5 µg de cobalamine par jour. Par conséquent, la plupart des végétariens ne reçoivent pas l'apport journalier recommandé en cobalamine et sont à risque de développer une carence en cobalamine.[28] Les besoins journaliers en cobalamine dans les différentes catégories sont comme suite : homme, 2,4 µg/j ; femme en dehors de la grossesse, 2,4 µg/j ; femme enceinte, 2,6 µg/j ; femme allaitante, 2,8 µg/j ; sujet jeune (entre 9 et 18 ans), 1,5 à 2 µg/j.[29]

Bien que la cobalamine soit stable au cours de la cuisson à de hautes températures, elle peut être convertie en analogues inactifs par l'acide ascorbique. La cobalamine est exceptionnellement bien conservée dans les tissus sous sa forme de coenzyme. Le contenu total en cobalamine chez l'adulte varie entre 2 et 5 mg dont 1 mg contenu dans le foie. La perte obligatoire en cobalamine est de 0,1 % par jour (1,3 µg). Trois à quatre ans sont nécessaires pour dépléter les stocks en cobalamine de l'organisme lorsque l'apport en cobalamine cesse brutalement (exemple : gastrectomie).[30]

3.3 Absorption

Les principales étapes de l'absorption de la vitamine B12 sont présentées dans les **Figures 2 et 3**. La cobalamine alimentaire est généralement sous la forme de coenzyme (5'-déoxyadénosyl cobalamine [adénosylcobalamine] et méthylcobalamine), non spécifiquement lié aux protéines. Dans l'estomac, la digestion peptique à faible pH est nécessaire pour la libération de la cobalamine à partir des protéines alimentaires.[30] Cette donnée a une relevance clinique dans la population âgée, notamment après 70 ans, parmi laquelle l'hypochlorhydrie qui touche 25 % à 50 % des sujets entraine une libération inadéquate de la cobalamine par la protéolyse acido-peptique (la pepsine nécessite un faible pH pour agir). Ces individus peuvent donc développer un déficit en cobalamine, résultant d'une malabsorption de cobalamine alimentaire. Une fois libérée par la protéolyse, la cobalamine se lie préférentiellement à une protéine de 150-kd, la *cobalamine-binding protein* appelée aussi *R protein* ou *haptocorrine*, au niveau de la salive et du suc gastrique et qui présente une affinité supérieure à celle du facteur intrinsèque (FI). Le complexe 'cobalamine–haptocorrine' (protéine holo–R), en même temps que l'apo–haptocorrine en excès et que le FI, traversent la seconde portion du duodénum où les protéases pancréatiques dégradent l'holo–R et l'apo–haptocorrine mais non le FI. Ceci résulte en un transfert de la cobalamine vers le FI, une glycoprotéine de 45-kd avec une haute affinité. L'échec de la dégradation de la protéine holo–R par les protéases pancréatiques entraine la l'exclusion du FI du processus d'absorption de la cobalamine car les récepteurs du complexe 'cobalamine–FI' sont spécifiques de la cobalamine liée au FI et non de la cobalamine liée à l'haptocorrine.[30] Alors que l'haptocorrine se lie à la cobalamine et ses analogues, le FI se lie uniquement à la cobalamine. Le FI est produit par la cellule pariétale (oxyntique) dans le fundus et le cardia de l'estomac[30] et est libéré par un processus de transport vésiculaire à travers la membrane.[30] Le FI possède deux sites de liaison : un pour la cobalamine et un autre pour le récepteur ileal du complexe 'cobalamine–FI'. Le FI est produit

largement en excès par rapport à la quantité requise pour l'absorption[30] et le FI dans 2 à 4 ml de suc gastrique est suffisant pour restaurer un déficit en cobalamine chez un sujet adulte ne produisant pas de FI. En l'absence de FI, moins de 2 % de la cobalamine ingérée est absorbée, alors que 70 % de la cobalamine sont absorbés en sa présence. Le FI est secrété en réponse à la présence d'aliments dans l'estomac de façon analogue à la sécrétion gastrique acide (par stimulation vagale et hormonale). La libération du FI peut être inhibée par la prise au long cours des inhibiteurs des récepteurs H2 de l'histamine (exemple : ranitidine). Les inhibiteurs de la pompe à protons peuvent réduite l'absorption de la cobalamine liée aux protéines avec comme conséquence possible une malabsorption de la cobalamine.[30] Le FI se lie à la cobalamine présente dans la bile ainsi qu'à la cobalamine nouvellement ingérée après son transfert de l'haptocorrine.[30] L'absence de liaison entre le FI et les analogues de la cobalamine est un mécanisme d'excrétion fécale des analogues de la cobalamine permettant ainsi la réabsorption de la cobalamine biliaire uniquement. Le complexe stable 'cobalamine–FI' traverse le jéjunum vers l'iléon où il est fixé sur des récepteurs membranaires spécifiques du complexe 'cobalamine–FI', situés dans les microvillosités des entérocytes de l'iléon.[30]

Le récepteur fonctionnel du complexe 'cobalamine–FI' est composé de deux protéines appelées collectivement *cubam* —composée de la cubiline (codée par le gène CUBN, chromosome 6) et *amnionless* (codée par le gène AMN, chromosome 7)— qui est essentiel au transport du complexe 'cobalamine–FI' à partir de la lumière intestinale vers l'intérieur de l'entérocyte. La dysfonction du récepteur cubam représente la base physiopathologique du syndrome d'Imerslund–Gräsbeck. Le récepteur cubam nécessite le Ca^{2+} pour sa liaison avec un pH supérieur à 5,4. Il ne se lie pas au FI, à la cobalamine seule, ou au complexe 'cobalamine–haptocorrine' mais se lie uniquement et de façon spécifique au complexe 'cobalamine–FI'. L'iléon humain contient assez de récepteurs cubam pour lier jusqu'à 1 mg de cobalamine intégrée dans le complexe 'cobalamine–FI' et représente donc l'étape limitante

pour l'absorption de la cobalamine.[30] En outre, le récepteur cubam participe à l'absorption de plusieurs protéines porteuses de vitamines (complexe vitamine B12–transcobalamine, protéine de liaison de la vitamine D, *retinol binding protein*) ainsi que celle d'autres protéines transporteuses (albumine, myoglobine, hémoglobine, lactoferrine, transferrine), d'hormones (exemple : insuline), d'enzymes, de drogues, et de toxines (exemple : aminoglycosides).[31]

Les événements qui suivent la liaison du complexe 'cobalamine–FI' au récepteur cubam dans l'entérocyte n'ont pas été complètement élucidés. La transcobalamine II (TC II) est secrétée de façon unidirectionnelle à travers la membrane basolatérale et la cobalamine se fixe sur la TC II au niveau de la surface basale de l'entérocyte iléal.[30] Le complexe 'cobalamine–FI' subit un transcytose à partir du pole apical en direction le pole basal ; durant cette transcytose le transfert de la TC II est accompli.[30] Après un délai de 3 à 5 heures, la cobalamine apparait dans le sang portal avec une proportion prédominante (> 90 %) liée à la TC II. Bien qu'une partie de la cobalamine soit convertie en adénosylcobalamine dans l'entérocyte, la majorité de la cobalamine est destinée au sang portal et atteint un pic de concentration après 8 heures environ.[30] A forte dose, la cobalamine peut diffuser de façon passive à travers les muqueuses buccale, gastrique, jéjunale et moins de 1 % de la dose ingérée peut donc apparaitre dans la circulation après quelques minutes.

Récemment, dans un modèle animal, la protéine de transport ABCC1 (*ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1*), a été impliquée dans le flux de la cobalamine à travers la membrane basolatérale.[32] Néanmoins, le rôle de la protéine MRP1 n'a pas été confirmé chez l'homme.[33] La protéine ABCC1 fait partie de la famille des transporteurs ABC qui permettent le transport de plusieurs molécules et xénobiotiques à travers la membrane cellulaire. La protéine MRP1 est impliquée dans la résistance aux drogues.

3.4 Transport

Les principales étapes du transport de la vitamine B12 sont présentées dans les **Figures 2 et 3**. Plus de 90 % de la cobalamine récemment ingérée ou injectée est liée à la TC II, qui est une protéine de transport spécifique permettant de délivrer la cobalamine aux différents tissus. La TC II, un polypeptide de 38-kd synthétisé dans plusieurs tissus, fixe la cobalamine avec une haute affinité (molarité 1 : 1).[30] Contrairement au FI, la TC II —tout comme l'haptocorrine— peut fixer une variété d'analogues de la cobalamine. Néanmoins, la TC II ne fait pas partie de la famille des protéines–R et diffère immunologiquement de deux autres protéines–R plasmatiques, les TC I et TC III. Le complexe 'cobalamine–TC II' est éliminé si rapidement de la circulation (demi-vie de 6 à 9 minutes) que 98 % de la TC II plasmatique est non saturée.[30] Le complexe 'cobalamine–TC II' est rapidement lié à des récepteurs protéiques de surface pour la TC II, présents sur plusieurs cellules.[30] La haute affinité de la liaison du complexe 'cobalamine–TC II' avec les récepteurs TC II est spécifique pour holo– et apo–TC II. Une fois fixé sur les récepteurs de la TC II, le complexe 'cobalamine–TC II' est internalisé par un mécanisme d'endocytose.[30] A faible pH, au sein des lysosomes, la TC II se dissocie de la cobalamine. La TC II est par la suite dégradée et la cobalamine réduite et convertie en coenzyme. L'importance de la fonction de transport de la TC II est soulignée par le fait qu'un déficit en TC II entraine un déficit cellulaire grave en cobalamine.[30] La protéine TC II peut aussi être synthétisée par une variété de cellules incluant les cellules rénales, les entérocytes et les hépatocytes. La protéine TC II agit comme une protéine de la phase aiguë de l'inflammation et sont taux augmente au cours des conditions inflammatoires ou infectieuses.[34]

La cobalamine n'est pas retrouvée sous forme libre dans le plasma. Dix à 30 % de la cobalamine plasmatique est liée à la TC II ; la majeure partie de la cobalamine plasmatique étant lié à une autre protéine–R, la TC I. La TC I n'est pas une protéine de transport et la

cobalamine liée à la TC I présente une faible clearance avec une demi-vie de 9 à 12 jours. Malgré le fait que la TC I fixe 75 % de la cobalamine plasmatique, approximativement 50 % de la TC I totale est sous forme apo–.

Le déficit héréditaire en TC I n'a pas de conséquence clinique apparente.[30] La TC I peut représenter la forme de stockage plasmatique de la cobalamine, car celle-ci représente moins de 0,5 % de la capture cellulaire totale de la cobalamine plasmatique. Les TC I et III sont retrouvées dans les granules secondaires des polynucléaires matures.[30] La TC III parait présenter des fonctions de transport, car elle est éliminée du plasma après un délai de 3 minutes et exclusivement par les récepteurs asialoglycoprotéines hépatiques, un mécanisme commun à une variété d'asialoglycoprotéines dont le groupement terminal beta-galactosyl terminale est intact. La TC III fonctionnelle se lie à une variété d'analogues de la cobalamine et est rapidement éliminée par le foie dans le flux d'excrétion biliaire. La majeure partie de la TC III sérique est libérée à partir des granulocytes au cours de la coagulation *in vitro*. Les haptocorrines (TC I et III) peuvent être libérées à partir des granulocytes, des glandes salivaires, du foie, ou à partir des autres tissus de l'organisme. L'élévation des taux de TC I et de TC III est observée au cours des syndromes myéloprolifératifs.

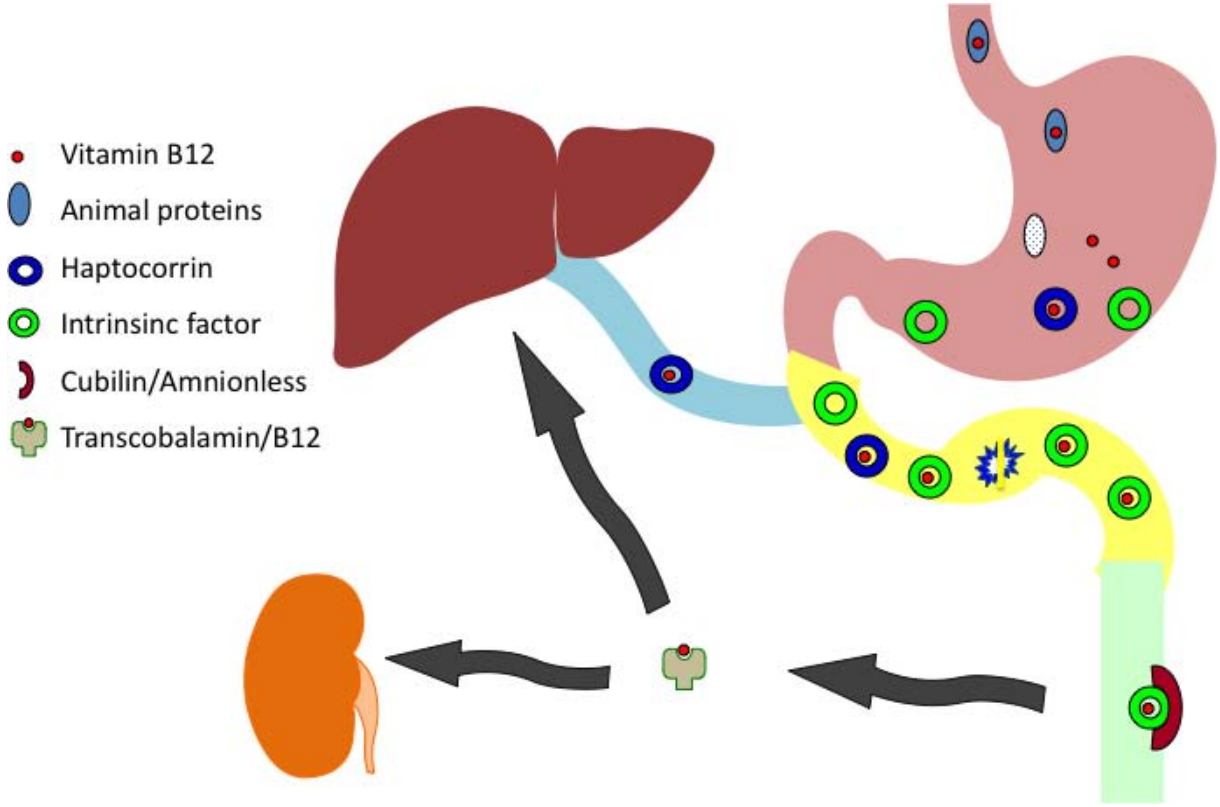


Figure 2. Vue d'ensemble sur le transport et l'absorption de la vitamine B12.

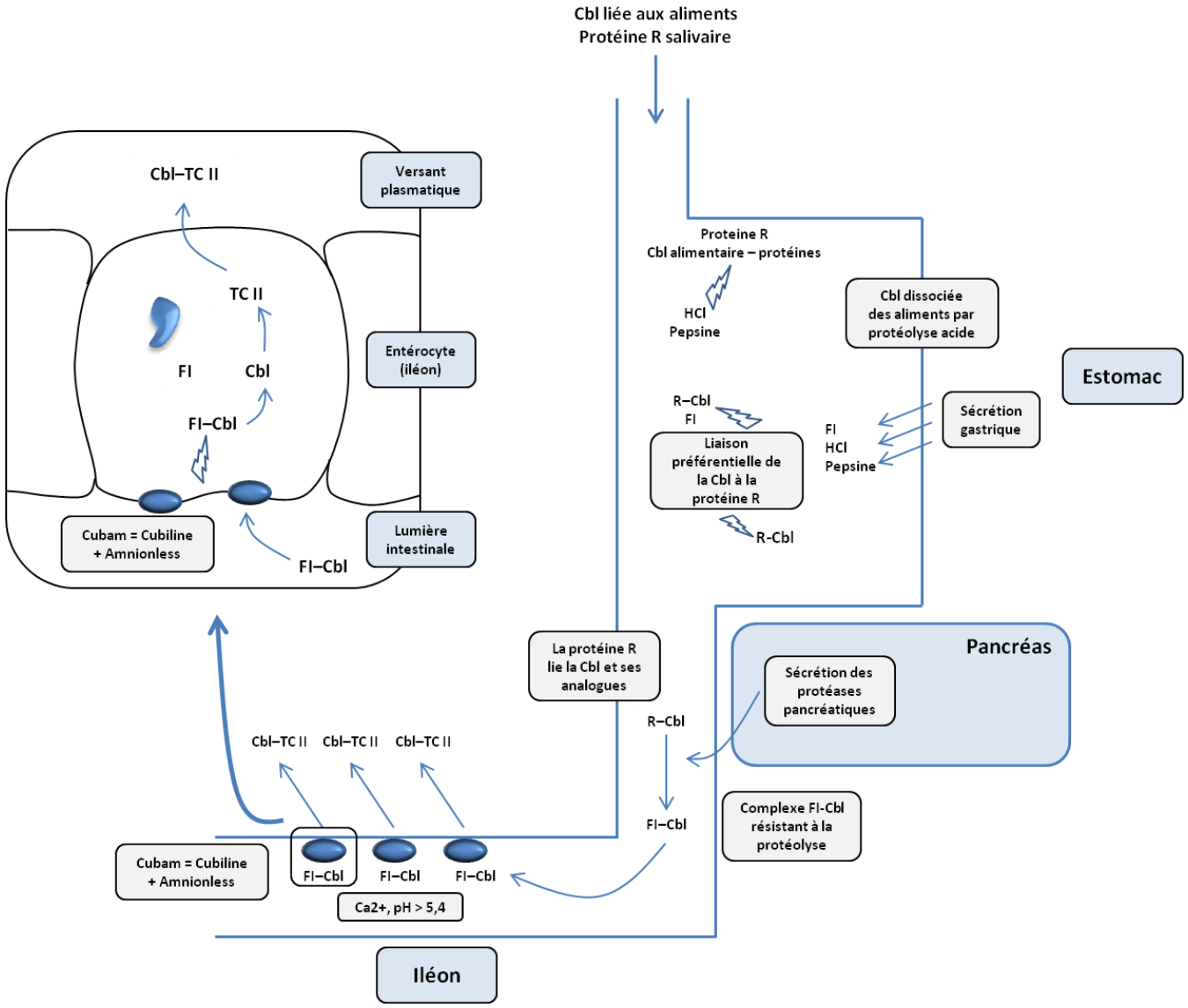


Figure 3. Absorption et transport de la vitamine B12 chez l'homme. R : haptocorrine (protéine R) ; Cbl : cobalamine ; FI : facteur intrinsèque ; TC II : transcobalamine II ; HCl : sécrétion gastrique acide.

3.5 Processing cellulaire de la cobalamine

Après l'endocytose mediée par la TC II dans le lysosome, la libération de la cobalamine par la dégradation lysosomale de la TC II est une étape obligatoire pour le métabolisme intracellulaire de la cobalamine.[30] Après son transport par le lysosome dans le cytoplasme par un système de transport spécifique[30], plus de 95 % de la cobalamine intracellulaire est liée à deux enzymes intracellulaires : la méthylmalonyl-CoA mutase et la méthionine synthase.[30] La cob(III)alamine, la forme la plus oxydée de la cobalamine doit être convertie en cob(II)alamine et en cob(I)alamine par deux reductases séquentiellement.

Dans la mitochondrie, la cob(I)alamine est par la suite convertie sous sa forme coenzyme, l'adénosylcobalamine, qui agit comme une coenzyme. L'enzyme méthylmalonyl-CoA mutase, en présence de l'adénosylcobalamine convertit le méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA, convertissant ainsi les produits du métabolisme du propionate (c.-à-d. le méthylmalonyl-CoA) en produits métaboliques faciles à utiliser. Dans le cytoplasme, la cobalamine, sous la forme de méthylcobalamine fonctionne comme une coenzyme dans la réaction impliquant la méthionine synthase, qui catalyse le transfert d'un groupement méthyl de la méthylcobalamine vers l'homocystéine pour former la méthionine.[30] Dans ce processus, la méthylcobalamine est convertie en cob(I)alamine. Le groupement méthyl du 5-MTHF (5-méthyl-H_4PteGlu, 5-méthyltétrahydrofolate) est fourni à la cob(I)alamine afin de régénérer la méthylcobalamine et le 5-MTHF est converti en tétrahydrofolate. Les folates et la cobalamine sont donc tous deux nécessaires pour le métabolisme des monocarbones. Après la formation de la méthionine, celle-ci peut être adénylée en S-adénosyl-méthionine qui peut à son tour donner son groupement méthyl dans une série de réactions biologiques de méthylation impliquant plus de 80 protéines, des phospholipides, des neurotransmetteurs, l'ARN, et l'ADN. La méthionine synthase catalyse par ailleurs la conversion de la S-adénosyl-méthionine en S-adénosyl-homocystéine, processus au cours duquel le groupement méthyl de

la S-adénosyl-méthionine peut aussi servir à la reméthylation de la cob(I)alamine. Il existe un régulateur redox, la méthionine synthase réductase qui restaure l'activité enzymatique en présence de S-adénosyl-méthionine et de NADPH.[35] Cette enzyme a un intérêt clinique car les mères présentant à la fois un polymorphisme de la méthionine synthase reductase (*MTRR A66G*) en association à un polymorphisme de la *MTHFR C677T*, sont à haut risque d'avoir des enfants avec un syndrome de Down.[36] L'importance physiologique des deux rôles de cofacteurs des deux formes de la cobalamine —adénosylcobalamine et méthylcobalamine pour la méthylmalonyl-CoA mutase et la méthionine synthase, respectivement— est représentée par le fait que les produits de ces deux réactions enzymatiques sont critiques pour la biosynthèse de l'ADN, de l'ARN, et des protéines (**Figure 4**).

La méthionine synthase est une protéine modulaire qui comporte quatre régions distinctes et séparées pour la liaison à l'homocystéine, au 5-MTHF, au groupement prosthétique de la cobalamine, et à la S-adénosyl-méthionine.[30] Ceci explique comment l'enzyme joue un rôle central dans la catalyse du transfert du groupement méthyl de la méthylcobalamine vers l'homocysteine, permettant la fabrication de la cob(I)alamine et de la méthionine ; par la suite le cofacteur libre, la cob(I)alamine, est reméthylé par le 5-MTHF, complétant ainsi le cycle.

La réabsorption rénale de la cobalamine est mal élucidée. Une protéine membranaire appelée mégaline, qui interagit avec la cubiline et qui est retrouvée dans les cellules épithéliales du tube contourné proximal, fonctionne comme un récepteur multiligand pour une variété de molécules.[37] Par ailleurs, la mégaline se lie de façon spécifique et permet de médier l'endocytose du complexe 'cobalamine–TC II' dans le tube contourné proximal.[30]

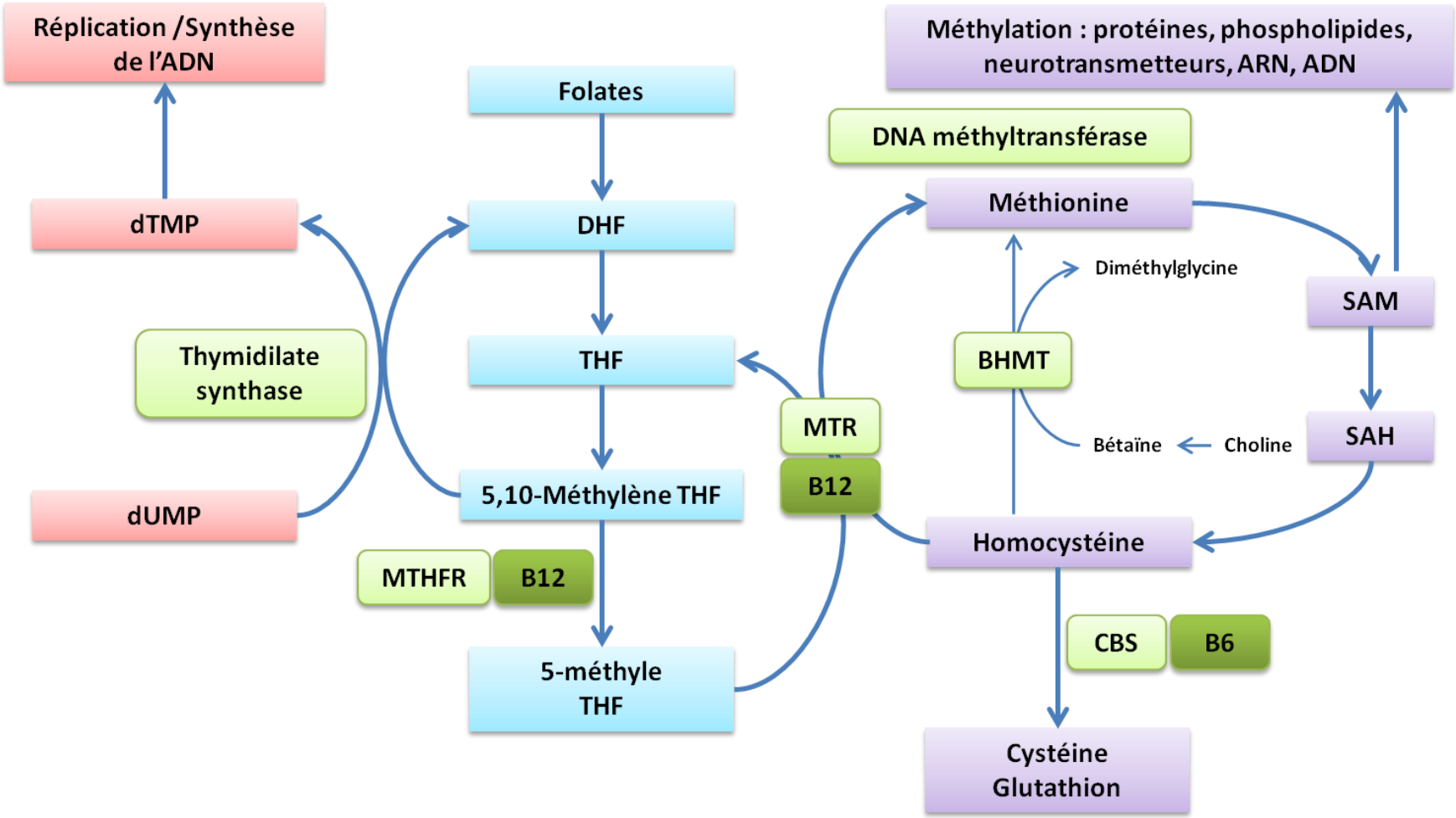


Figure 4. Vitamines du groupe B, métabolisme des monocarbones, méthylation et réplication de l'ADN. DHF : dihydrofolate ; THF : tétrahydrofolate ; MTR : méthionine synthase ; MTHFR : méthylène tétrahydrofolate reductase ; CBS : cystathionine β-synthase ; SAM : S-adénosyl-méthionine ; SAH : S-adénosyl-homocystéine ; B12 : vitamine B12 ; B6 : vitamine B6 ; dUMP : déoxyturidine monophosphate ; dTMP : déoxythymidine monophosphate.

4 Métabolisme des folates

4.1 Nutrition

Les folates, largement distribuées dans la nature sous forme réduite ou polyglutamatée, sont synthétisés par les microorganismes et les plantes. Les légumes à feuilles (épinards, laitue, le brocoli), les haricots, les fruits (par exemple, bananes, melons, citrons), la levure, les champignons, et des protéines animales (par exemple, foie, reins) sont de riches sources d'acide folique.[30] Les folates sont dégradées au cours d'une cuisson dépassant 15 min ; une dégradation pouvant atteindre une proportion de 95 %.[30] L'apport journalier recommandé en folates est de 400 µg/jour chez l'homme et la femme en dehors de la grossesse, de 600 µg/j chez la femme enceinte, de 500 µg/j chez la femme allaitante, et entre 300 et 400 µg/j chez le sujet jeune (entre 9 et 18 ans).[29] Une nutrition occidentale équilibrée apporte des quantités adéquates en folates. A l'inverse l'apport en folates dans certains pays en voie de développement peut être insuffisant.[30, 38, 39]

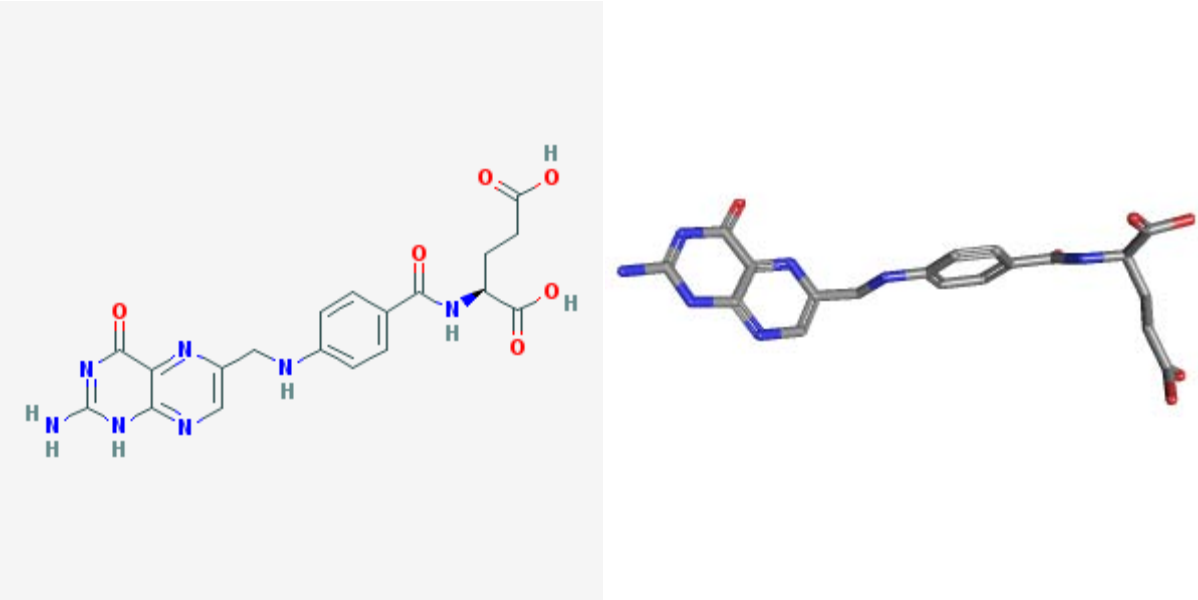
4.2 Absorption

Les folates contenues dans l'alimentation, qui sont sous forme de ptéroyl*poly*glutamate (PteGlu$_n$), sont moins bien absorbés que le ptéroyl*mono*glutamate (PteGlu ; acide folique) (**Figure 5**).[30] Bien que les folates de certains aliments (chou, laitue, orange) sont moins bien absorbés la plupart des autres folates apportés par l'alimentation ont une bonne biodisponibilité.[30] Les ptéroylpolyglutamates doivent être hydrolysées en dérivés de ptéroylmonoglutamate avant leur absorption par l'enzyme ptéroylpolyglutamate hydrolase, une enzyme présente sur la bordure en brosse des entérocytes.[30] Cette enzyme a une activité maximale à un pH de 5,5 en présence du zinc. Au niveau de la bordure en brosse intestinale, le polyglutamate luminal interagit avec des protéines de type *Reduced folate carriers*

(RFCs).[40, 41] L'expression du gène RCF, qui code pour une protéine de 85-kd, est régulée au cours du développement avec une capacité d'absorption maximale pour le 5-méthyl-H_4PteGlu dans les entérocytes matures en comparaison aux cellules cryptiques en cours de prolifération.[30] Chez la souris, l'expression du gène RCF peut être stimulée en cas de carence en folates, ce qui a pour effet d'augmenter la capacité d'absorption intestinale des folates.[42] L'augmentation simultanée de l'activité de la ptéroylpolyglutamate hydrolase[43] et de l'expression des récepteurs RCF de la surface cellulaire[42, 44] permet aux entérocytes luminaux déficients en folates d'augmenter leur absorption en folates afin de maintenir l'intégrité cellulaire.[42] La membrane basolatérale possède un système de transport des folates vers le sang portal.[30]

L'ingestion du lait maternel humain —qui contient des protéines spécifiques pour le transport des folates, *folate binding proteins* (FBP)— régule la biodisponibilité des folates chez le nouveau-né.[30] Bien que le mécanisme précis de cette régulation reste obscure, celle-ci peut impliquer l'interaction avec la mégaline qui peut lier et médier la capture cellulaire par l'entérocyte des FBP solubles du lait maternel qui contiennent les folates.[45]

La diffusion passive de l'acide folique (aka ptéroylglutamate, PteGlu) est probablement le mécanisme principal d'absorption intestinale des folates à concentration élevée.[30] L'intestin grêle a une grande capacité d'absorption des folates, avec un pic plasmatique de folates atteint 1 à 2 heures après l'administration orale.[30] Alors que l'acide folique pharmacologique est directement absorbé et ne subit aucune modification lors du passage dans le sang portal, les folates alimentaires ($PteGlu_n$) subissent une hydrolyse avant le transport dans l'entérocyte et sont réduits en H_4PteGlu (tétrahydrofolate) puis méthylés en 5-méthyl- H_4PteGlu (5-MTHF) avant leur libération dans le plasma.[30]



A B

Figure 5. Structures en 2D (panel A) et en 3D (panel B) de l'acide folique ($C_{19}H_{19}N_7O_6$).

Source : http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov.

4.3 Transport plasmatique et cycle entérohépatique

Le taux plasmatique normal de folate est maintenu par l'apport alimentaire en folates ainsi qu'un cycle entérohépatique efficace et représentant environ 90 µg/j en folates.[30] Les folates sont rapidement éliminés du plasma (jusqu'à 95 % en 3 minutes) par les tissus, incluant le foie, par l'intermédiaire d'un récepteur RCF.[40] Le drainage biliaire entraine une chute majeure du taux sérique de folates (à environ 30 % du taux basal après 6 heures), et une interruption brutale de l'apport en folates dans l'alimentation entraine une chute du taux sérique de folate après 3 semaines environ.[30] Dans le plasma, un tiers des folates est sous forme libre et deux tiers sont faiblement liés aux protéines sériques. Une faible proportion des folates sériques est liée de façon hautement spécifique à une protéine FBP de 40-kd.[46] A l'inverse de la cobalamine, il n'existe pas de transporteur sérique spécifique des folates qui augmente leur capture cellulaire.[30]

4.4 Capture cellulaire de folates

Le transport des folates implique la translocation du ligand dans la cellule à partir du compartiment extracellulaire (mécanismes de capture cellulaire) ou à travers les barrières cellulaires d'un compartiment vers l'autre (mécanismes transcellulaires).[30, 46] Deux composants distincts sont impliqués dans le transport cellulaire des folates. Le RFC est un système de faible affinité et de haute capacité qui permet de médier la capture des folates par une variété de cellules.[40] Le transport des folates vers la cellule est médié aussi par une protéine membranaire de 44-kd appelée *folate receptors (FR)* (en anglais) qui se lie les folates physiologiques (5-MTHF) avec une haute affinité.[46] Les voies d'entrée des folates et des antagonistes des folates diffèrent selon les cellules et dépendent de l'efficacité relative des mécanismes médiés par les FR et les RFC ainsi que des concentrations intra- et extracellulaires des folates et de leurs antagonistes.[30] Le transporteur ABCB1 (*ATP-binding*

cassette sub-family B member 1), appelé aussi glycoprotéine-P, MDR1, et PGY1 a été impliqué dans le transport et le maintient de l'homéostasie des folates.[47] Le transporteur ABCB1 est un transporteur bien caractérisé et fait partie de la famille des transporteurs ABC qui permettent le passage d'une variété de substrats à travers la membrane cellulaire.[48] La protéine ABCB1 est exprimée dans l'épithélium intestinal, les hépatocytes, le tube contourné proximal du rein, les glandes surrénales, et les cellules endothéliales. Il est intéressant de souligner que la protéine ABCB1 intervient dans le transport intracellulaire du méthotrexate à coté d'autres xénobiotiques.[49-53] Les membres de la famille des protéines ABC sont impliqués dans la résistance aux drogues.

4.4.1 Les récepteurs des folates (*Folate receptors, FR–alpha, FR–beta, FR–gamma*)

Les FRs permettent la capture du 5-MTHF par les cellules normales ou malignes.[46] Parmi les trois isoformes humaines de FR, FR-alpha et FR-beta sont attachés à la surface cellulaire par un ancrage membranaire, le glycosyl-phosphatidylinositol alors que la troisième isoforme (FR-gamma) est secrétée de façon constitutive.[30] Le FR transfère le folate en intracellulaire par endocytose.[30] Le FR-alpha est exprimé dans la plupart des cellules épithéliales normales et malignes.[30] L'expression du FR-beta dans les tissus normaux est limitée au placenta et aux cellules hématopoïétiques.[30] Les systèmes de transport FR et RFC ne communiquent pas mutuellement et sont tous deux efficaces pour le transport du méthotrexate.[30] Lorsque les récepteurs FR sont exprimés en quantité suffisante, ils permettent le transport simultané du méthotrexate et du 5-MTHF avec des vitesses comparables en comparaison aux cellules exprimant les récepteurs RFC. La production des FR est régulée en fonction des concentrations intra- et extracellulaires des folates via des mécanismes de régulation de la transcription, de la traduction, ou en post-traduction. L'inhibition post-traductionnelle de la production des récepteurs FR (ou FBPs) chez le rat au cours du déficit en

folate s'effectue via une protéolyse préférentielle de l'apo-FR par une métalloprotéinases appelée *meprine*.[54] Chez l'homme, dans un modèle de cancer du col de l'utérus, la stimulation de la traduction du FR-alpha au cours du déficit en folate est mediée par l'homocystéine.[55, 56]

4.4.2 Les récepteurs RFC (*Reduced Folate Carriers*)

Le second mécanisme de capture cellulaire des folates implique un processus de transport pH- et énergie-dépendant qui transporte les folates réduits.[40] Le gène RFC code pour une protéine de 58-kd et ressemble au transporteur de glucose des mammifères (GLUT1), qui est un membre de la famille des transporteurs membranaires à 12 domaines transmembranaires.[57, 58] L'acquisition d'un déficit en transport du méthotrexate dans certaines cellules peut résulter d'un mutation inactivatrice des allèles du gène RFC.[30]

4.4.3 Le système de transport '*Proton-coupled folate transporter' (PCFT)*

Jusque tout récemment, le transport des folates dans la cellule était rattaché à la fonction de deux récepteurs que sont les récepteurs RFC et FR.[59] Récemment, un nouveau récepteur a été cloné : le *proton-coupled folate transporter* (*PCFT*) et a été impliqué dans l'absorption des folates, notamment dans un environnement à faible pH.[59] Après l'entrée des folates dans la cellule par endocytose, le transporteur PCFT aide à exporter les folates du milieu acidifié de l'endosome vers le cytoplasme des cellules ainsi que vers le liquide céphalo-rachidien.[59, 60]

La *malabsorption héréditaire de folates* est un syndrome autosomique récessif causé par une mutation de la protéine PCFT qui entraîne un défaut de transport des folates à travers la barrière intestinale ainsi que dans plexus choroïde vers le liquide céphalo-rachidien.[60, 61] L'altération du système PCFT provoque une anomalie du transfert des folates dans le liquide

céphalo-rachidien malgré des récepteurs de folates intacts.[60] Le patients avec ce syndrome présentent une anémie mégaloblastique, une hypoglobulinémie avec des infections récurrentes, une diarrhée chronique, et des anomalies neurologiques (retard mental, crises comitiales).[60] Ces anomalies sont irréversibles si elle ne sont pas traitées.[60] Des doses parentérales élevées d'acide folique peuvent assurer la diffusion passive dans le liquide céphalo-rachidien et améliorer le tableau clinique de ces enfants.[60]

La sulfasalazine, la pyriméthamine, et les inhibiteurs de la pompe à proton peuvent inhiber la protéine PCFT et entrainer la réduction de l'absorption des folates par voie orale.[60]

4.5 Rétention cellulaire et excrétion des folates

La polyglutamation des folates est le mécanisme majeur de rétention intracellulaire des folates.[30] Par conséquent, les cellules déficitaires en folypolyglutamate synthase sont résistantes aux antagonistes des folates, qui ne peuvent être polyglutamatés et retenus dans la cellule.[30] Dans les érythrocytes humains, les folates sont accumulés au cours des stades précoces dans la moelle osseuse par les récepteurs FR.[30] Lors de leur maturation, plus de 90 % des molécules de $PteGlu_n$ interagissent avec l'hémoglobine permettant ainsi la rétention des folates en intracellulaire.[30]

Le *turn-over* de folates et leur catabolisme peut être accéléré par l'activité de la ferritine à chaine lourde[62] qui limite la quantité importée de folates monoglutamate avant la polyglutamation.[30]

Apres filtration glomérulaire, les folates luminaux se lient aux récepteurs FR de la bordure en brosse des membranes des cellules rénales tubulaires proximales et sont internalisés par endocytose. Dans les vésicules d'endocytose, le faible pH favorise la dissociation des folates et leur libération à travers la membrane basolatérale vers la circulation sanguine avec un recyclage de l'apo-FR vers la bordure en brosse.[30] La cubiline et la

mégaline participant toutes les deux à la captation et à l'endocytose des folates liés au récepteurs FBP via le tube contourné proximal du rein.[45]

5 Métabolisme intracellulaire et interaction entre cobalamine et folates

Les ptéroylpolyglutamates sont des substrats naturels pour plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme des monocarbones. Les ptéroylmonoglutamates doivent être polyglutamatés par la folypolyglutamate synthase avant d'être intégrés dans le métabolisme des monocarbones.[30] Le tétrahydroptéroylglutamate (H_4PteGlu) est le substrat physiologique préférentiel pour la folypolyglutamate synthase et la forme polyglutamatée (H_4PteGlu$_n$) joue un rôle central dans le métabolisme des monocarbones.[30] Les facteurs qui limitent l'apport du H_4PteGlu ou qui régulent la folypolyglutamate synthase influencent la polyglutamation et la rétention intracellulaire des folates. La forme polyglutamatée H_4PteGlu$_n$ peut être convertie en formate sous la forme de 10-formyl-H_4PteGlu$_n$ (utilisé dans la synthèse de novo des purines) et en formaldéhyde sous la forme de 5,10-méthylène-H_4PteGlu$_n$ (utilisé dans la biosynthèse du thymidilate).[30]

Afin de comprendre les fonctions des coenzymes des folates, il est important de souligner d'emblée que le 5,10-méthylène-H_4PteGlu$_n$ peut être utilisé dans le cycle du thymidilate par la thymidilate synthase pour la synthèse de la thymidine et de l'ADN ou dans le cycle de méthylation après sa conversion en 5-méthyl-H_4PteGlu$_n$, qui par l'intermédiaire de la méthionine synthase entraine la formation de la méthionine et du H*4*PteGlu$_n$.

L'acide folique (ptéroylmonogluamate, PteGlu) n'est pas une forme biologiquement active des folates. Lorsque l'acide folique est apporté sous forme thérapeutique, il nécessite une réduction en H_4PteGlu par la dihydrofolate reductase —une enzyme de 20-kd— dans une réaction en deux temps (PteGlu en H_2PteGlu puis en H_4PteGlu). La forme majoritaire de folate transportée dans la cellule par les récepteurs FR et RFC est le 5-méthyl-H_4PteGlu. Les données suggèrent que le métabolisme des monocarbones médié par les folates est compartimentalisé dans les organelles intracellulaires.[30, 63] L'enzyme thymidilate synthase

catalyse le transfert de la forme formaldéhyde 5,10-méthylène-H_4PteGlu$_n$ vers la position 5 du déoxyuridylate.[30] Dans ce processus, le 5,10-méthylène-H_4PteGlu$_n$ est par ailleurs réduit en dihydrofolate, qui inhibe la 5,10-methylene-H_4PteGlu$_n$ reductase (MTHFR). L'inhibition par la méthionine —produit de la méthionine synthase— de la méthionine synthase elle-même, illustre que la modulation de la MTHFR par les niveaux du dihydrofolate et de la méthionine peut déterminer le degré de canalisation du 5,10-méthylène-H_4PteGlu$_n$ vers le cycle de la méthylation ou du thymidilate.[30]

Le métabolisme des folates et des enzymes folate-dépendantes est compartimentalisé dans la matrice mitochondriale et dans le cytoplasme. La plupart des unités monocarbones, sous forme de formate, sont dérivées des mitochondries et sont utilisées dans la synthèse du formate, de la glycine, et du *f-met-tRNA* (ARNt portant l'acide aminé méthionine formylé, 1er acide aminé de la chaîne de protéines).[30]

Les mécanismes par lesquels le déficit en cobalamine entraine une anémie mégaloblastique ne sont pas clairement élucidés.[30] Il est généralement admis que le déficit en cobalamine entraine un déficit intracellulaire fonctionnel en 5,10-méthylène-H_4PteGlu$_n$. L'hypothèse du piège méthylfolate, « *the methylfolate trap hypothesis* », a été conçue à l'origine pour expliquer la relation entre le déficit en cobalamine et le déficit fonctionnel en folate. Dans les conditions normales, le 5,10-méthylène-H_4PteGlu est converti par la méthionine synthase dépendante de la cobalamine en H_4PteGlu qui est à son tour polyglutamaté pour intégrer le métabolisme des monocarbones. Avec le déficit en cobalamine, la méthionine synthase est inactive et entraine une accumulation de 5-méthyl-H_4PteGlu, qui n'est pas un bon substrat pour la folypolyglutamate synthase. Sans alternative métabolique, le 5-méthyl-H_4PteGlu piégé fuit hors de la cellule, entrainant un déficit progressif en folates polyglutamatés intracellulaires. L'hypothèse de la carence en formate, ou *« formate starvation hypothesis »*, focalise sur l'importance du formate (sous la forme de 10-

formyle-$H_4PteGlu_n$) et du précurseur du formate —la méthionine— qui sont diminués aussi lorsque la méthionine synthase est inhibée par le déficit en cobalamine. Lorsque la méthionine intracellulaire est en excès, son groupement méthyl est oxydé en formate qui peut être utilisé pour générer les 5- et le 10-formyle-$H_4PteGlu_n$.

6 Métabolisme de l'homocystéine

6.1 Introduction

En 1969, McCully *et al.* rapportent le cas d'un enfant souffrant d'homocystéinurie, de cystathioninurie, et de méthylmalonurie secondaires à une anomalie du métabolisme de la cobalamine, qui présentait des lésions artérielles ressemblant particulièrement à celles observées chez les patients souffrant de déficit en cystathionine-β-synthase (CBS).[64] Cette observation a permis de proposer l'hypothèse que des taux plasmatiques élevés d'homocystéine, retrouvée chez les patients avec une homocystéinurie, étaient responsables de l'apparition des lésions vasculaires précoces. En 1976, Wilcken *et al.* rapportent pour la première fois que les concentrations du disulfure mixte 'cystéine-homocystéine' était plus élevée chez les patients avec une coronaropathie en comparaison aux sujets contrôles après un test de charge en méthionine.[65] Cette étude princeps a pavé la voie à plusieurs travaux depuis les années 1990 pour culminer en une méta-analyse en 1995.[66] Cette méta-analyse a identifié 27 études ayant inclus 4000 patients avec une atteinte vasculaire sténosante (coronaropathie, pathologies vasculaire périphérique et cérébrovasculaire) et 4000 sujets contrôles et a démontré que l'homocystéine était un facteur de risque indépendant de ces pathologies vasculaires occlusives.[66] L'hyperhomocystéinémie a par ailleurs été impliquée dans le défaut de fermeture du tube neural[67], dans la maladie d'Alzheimer, la démence et la perte de la fonction cognitive.[68-71] Néanmoins, il est important de souligner que la relation entre l'hyperhomocystéinémie et les diverses affections suscitées est basées sur des données épidémiologiques sans que le lien de causalité ne soit formellement établi.

L'homocystéine est un acide aminé soufré dont le métabolisme se situe entre deux voies : (i) la voie de la méthylation en méthionine qui nécessite les folates et la vitamine B12 (ou la bétaïne dans une réaction alternative) et (ii) la voie de la transsulfuration en cystathionine qui nécessite le pyridoxine 5'-phosphate. Ces deux voies sont coordonnées par

la S-adénosylméthionine (SAM) qui agit comme un inhibiteur allostérique de la méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR) et comme un activateur de la cystathionine-β-synthase (CBS).[21] L'hyperhomocystéinémie est condition associée à une augmentation du risque vasculaire survient lors d'une perturbation du métabolisme de l'homocystéine. L'hyperhomocystéinémie sévère peut être causée par de rares déficits génétiques des enzymes CBS ou MTHFR ou bien des enzymes impliquées dans la synthèse de la méthyle-B12 et la méthylation de l'homocystéine.[21] L'hyperhomocystéinémie modérée peut être observée en cas de d'altération de la voie de la méthylation (déficit en vitamine B12 ou en folate ou bien thermolabilité de l'enzyme MTHFR). L'hyperhomocystéinémie faisant suite à un test de charge en méthionine peut être en rapport avec un génotype hétérozygote pour la CBS ou à un déficit en vitamine B6.

6.2 Les voies du métabolisme de l'homocystéine

L'homocystéine est un acide aminé soufré dont le métabolisme se situe à l'intersection de deux voies métaboliques : la reméthylation et la transsulfuration (**Figure 6**).[21] Au cours de la reméthylation, l'homocystéine acquiert un groupement méthyl à partir du N-5-méthyltétrahydrofolate ou de la bétaïne pour former la méthionine. La réaction avec le N-5-méthyltétrahydrofolate a lieu dans tous les tissus et dépend de la vitamine B12, alors que la réaction avec la bétaïne a lieu essentiellement dans la foie et ne dépend pas de la vitamine B12.[21] Une proportion considérable de méthionine est par la suite activée par l'ATP pour former la S-adénosylméthionine (SAM). La SAM sert principalement de donneur de méthyle universel pour une variété d'accepteurs. La S-adénosyl-L-homocystéine (SAH), le produit de ces réactions de méthylation, est par la suite hydrolysée afin de régénérer l'homocystéine qui devient de nouveau disponible pour un nouveau cycle de transfert du groupement méthyl. Il est important de noter que cette hydrolyse est une réaction réversible qui favorise la synthèse

de la SAH et que des concentrations intracellulaires élevées de ce métabolite accompagnent souvent toutes les formes d'hyperhomocystéinémie.[21]

Dans la voie de la transsulfuration, l'homocystéine s'associe à la sérine pour former la cystathionine au cours d'une réaction irréversible catalysée par une enzyme contenant du pyridoxine 5'-phosphate (PLP), la CBS. La cystathionine est hydrolysée par une seconde enzyme contenant du PLP, la γ-cystathioninase, pour former la cystéine et le α-kétobutyrate. L'excès de cystéine est oxydé en taurine ou en sulfate inorganique ou bien est excrété dans les urines. Ainsi, outre la synthèse de la cystéine, la voie de la transsulfuration catabolise efficacement l'excès d'homocystéine non nécessaire au transfert du groupement méthyl.

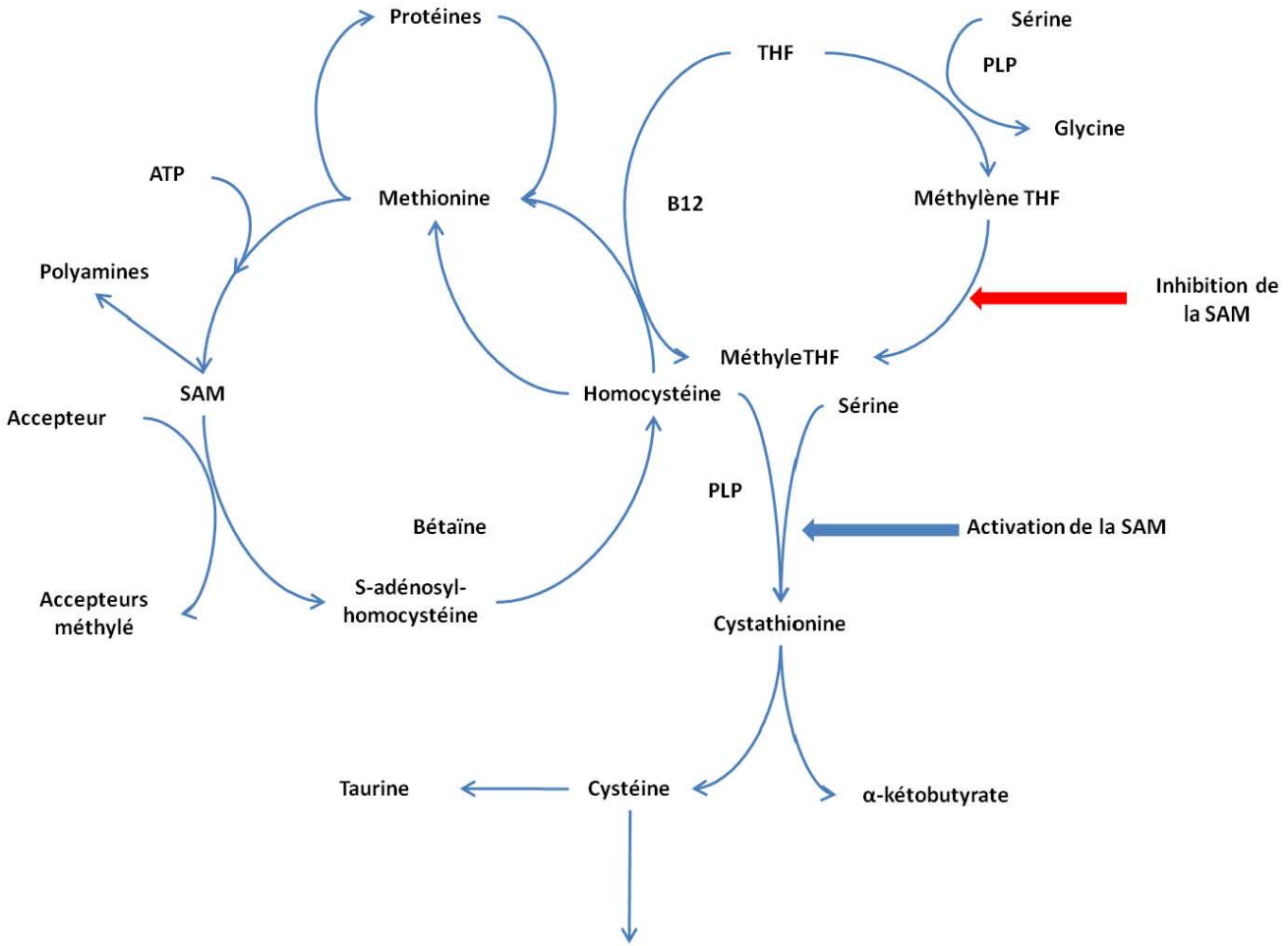


Figure 6. Métabolisme de l'homocystéine chez l'homme et l'animal (adapté à partir de : *Selhub J.* référence [21]). THF : tétrahydrofolate ; PLP : Pyridoxine 5'-phosphate ; SAM : S-adénosyl-méthionine ; B12 : vitamine B12.

6.3 Régulation nutritionnelle du métabolisme de l'homocystéine

Plusieurs études sur la régulation du métabolisme de l'homocystéine ont démontré que l'utilisation des molécules d'homocystéine par les voies de transsulfuration et de reméthylation est régulée par des facteurs nutritionnels.[21] Deux études ont démontré que lorsque l'apport en groupement méthyl labile (méthionine et choline) est modifié, la synthèse de novo de la méthionine était affectée.[72, 73] Lorsqu'une alimentation carencée en méthionine était administrée, l'homocystéine est déviée vers la voie de la reméthylation. A l'inverse, lorsque l'alimentation administrée est riche en méthionine, le recyclage de l'homocystéine en méthionine diminue. Des adaptations similaires ont été retrouvées chez le rat.[74]

La capacité de l'organisme à discriminer entre les voies de la reméthylation et de la transsulfuration afin de s'adapter aux variations d'apport de la méthionine dans l'alimentation implique l'existence d'une régulation et d'une coordination entre ces deux voies.[21] Les données expérimentales disponibles suggèrent que cette coordination est réalisée par deux mécanismes. Le premier mécanisme réside dans la capacité de la SAM d'agir comme un inhibiteur allostérique de la MTHFR et comme un activateur de la CBS (**Figure 6**).[75-78] Le second mécanisme par lequel la reméthylation et la transsulfuration sont coordonnés consiste en la régulation intracellulaire de la SAM. Dans le foie, la synthèse de la SAM est catalysée par deux enzymes spécifiques de cet organe.[79-81] La première enzyme, un tétramère de haut poids moléculaire, présente une haute affinité pour la méthionine et fonctionne dans des conditions physiologiques. La seconde enzyme est un dimère de bas poids moléculaire avec une faible affinité pour la méthionine et fonctionne dans des conditions d'apport élevé en méthionine.[21] Ainsi, les modifications de la concentration intracellulaire en méthionine, en rapport avec les apports alimentaires, affecte la vitesse de synthèse de la SAM basée sur les enzymes SAM synthétases.[21] Par ailleurs, il a été suggéré que l'utilisation de la SAM est spécifiquement régulée par une réaction dans laquelle un groupement méthyl de la SAM est

transféré vers la glycine pour former la sarcosine. Cette réaction est catalysée par glycine N-méthyltransférase (GNMT) qui est abondante dans le foie et qui est fortement inhibée par le N-5-méthyltétrahydrofolate polyglutamate.[82-84] Ainsi, en parallèle avec la concentration intracellulaire de la méthionine, le N-5-méthyltétrahydrofolate participe à la régulation de la concentration intracellulaire de la SAM.[21]

Lorsque les deux mécanismes de régulation sont considérés en même-temps, les scenarios suivants peuvent être prédits :

1. lorsque l'apport diététique de méthionine est élevé, la SAM synthétases convertit rapidement la méthionine en SAM. L'augmentation résultante de la SAM intracellulaire sera associée à (i) l'inhibition de la MTHFR ce qui entraine une diminution de la synthèse du N-5-méthyltétrahydrofolate, permettant ainsi à l'enzyme GNMT d'agir en pleine capacité du fait de la suppression de son inhibiteur (le N-5-méthyltétrahydrofolate) ; et (ii) à l'activation de l'enzyme CBS ce qui entraine une augmentation du catabolisme de l'homocystéine. Dans ce scénario, la transsulfuration de l'homocystéine prédomine sur la reméthylation, ce qui est consistant avec une diminution des besoins en méthionine du fait de son apport élevé.
2. Inversement, lorsque l'apport en méthionine est faible, la concentration de la SAM est insuffisante pour inhiber la MTHFR, ce qui entraine une augmentation de la production du N-5-méthyltétrahydrofolate. L'augmentation résultante du N-5-méthyltétrahydrofolate sera associée avec (i) une inhibition de la GNMT et donc une conservation de la SAM ; et (ii) une augmentation de la disponibilité du substrat pour la reméthylation de l'homocystéine. Ainsi, dans ce scénario, la reméthylation de l'homocystéine est favorisée sur la transsulfuration car la concentration de la SAM est trop faible pour activer l'enzyme CBS. Ce processus

est consistant avec la nécessité de l'augmentation de la synthèse de novo de la méthionine du fait de son faible apport.

6.4 Les causes nutritionnelles de l'hyperhomocystéinémie

Dans des modèle expérimentaux, la concentration plasmatique d'homocystéine augmentait de 8 à 10 fois chez le rat carencé en folate et de 2,5 fois chez le rat carencé en vitamine B12.[21] Chez le rat carencé en folate, il existait une relation inverse entre la concentration intracellulaire de la SAM et la concentration plasmatique de l'homocystéine.[85] Par ailleurs, lorsque une injection intra-péritonéale d'ethionine —un analogue de la méthionine— était réalisée chez le rat carencé en folate, le taux plasmatique d'homocystéine diminuait et se normalisait.[75, 76] Cette diminution est probablement liée à la S-adénosylethionine, qui comme la SAM est un activateur puissant de la CBS mais qui contrairement à la SAM est moins déméthylée et métabolisée en homocystéine.[75, 76] L'activation par la S-adénosylethionine a réintroduit la coordination entre les deux voies de méthylation et de transsulfuration initialement interrompue par la carence en folate du fait de la diminution de la synthèse de la SAM.

Chez le rat carencé en vitamine B6, la concentration plasmatique d'homocystéine n'est pas augmentée.[86, 87] Par ailleurs, chez le rat carencé en vitamine B6, un gavage par voie orale en méthionine provoque une augmentation de la concentration en homocystéine plasmatique avec une élévation significative de la concentration hépatique en SAM.[88] Ceci contraste avec ce qui est observé chez le rat carencé en folate qui présente une augmentation significative de la concentration plasmatique d'homocystéine après une charge en méthionine.[88]

6.5 L'hyperhomocystéinémie chez l'homme

L'hyperhomocystéinémie observée chez l'homme peut être classée en différentes catégories selon la cause, la prévalence, et la sévérité. Les cas les plus sévères

d'hyperhomocystéinémie sont dus, dans la plupart des cas, à des mutations homozygotes des gènes codant pour les enzymes du métabolisme de l'homocystéine (**Tableau 1**). Dans ces cas, le déficit impliquant une enzyme de la voie de la reméthylation ou de la transsulfuration entraine une augmentation majeure de l'homocystéinémie et de l'homocystéinurie. La forme classique de ce désordre —l'homocystéinurie congénitale— est causée par un déficit sur le gène codant pour la CBS.[21] Chez ces patients, l'homocystéinémie plasmatique à jeun peut atteindre 400 µmol/L.[89] Des déficits homozygotes sur d'autres gènes peuvent entraîner des élévations similaires et incluent les mutations du gène codant pour MTHFR ou toute autre enzyme participant à la synthèse de la méthylcobalamine.[90-95] Les causes les plus fréquentes d'hyperhomocystéinémie, responsable des formes modérées, sont représentées par les déficits moins sévères sur les gènes codant pour les enzymes du métabolisme de l'homocystéine ou de l'apport inadéquat des vitamines impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine (**Tableau 1**). L'homocystéine plasmatique chez ces patients dépend de la voie altérée du métabolisme de l'homocystéine.[96] Une altération de la voie de la reméthylation, même si elle est minime, entraînera une augmentation substantielle de l'homocysteinémie. Une telle altération peut être causée par un statut déficient en folate ou en vitamine B12 ou à un déficit sur l'enzyme MTHFR.[96-108] A l'inverse, en cas d'altération de la voie de transsulfuration, l'augmentation de l'homocystéine plasmatique sera modérée. Cette altération peut être provoquée par un déficit hétérozygote de l'enzyme CBS ou d'un apport inadéquat en vitamine B6[109, 110] et sera identifié par une augmentation anormale de l'homocystéine après un test de charge en méthionine ou en postprandial.[85-88, 111]

Tableau 1. Classification des hyperhomocystéinémies

Hyperhomocystéinémie sévère
• Taux élevés d'homocystéine en permanence ; • Causes : Déficit des enzymes CBS, MTHFR, ou des enzymes impliquées dans le métabolisme des vitamines B12.
Hyperhomocystéinémie modérée
• Hyperhomocystéinémie à jeun modérément élevée ; • Reflète une altération de la méthylation de l'homocystéine ; • Causes : déficit en folate, en B12 ou déficit enzymatique modéré : ex. MTHFR thermolabile.
Hyperhomocystéinémie après test de charge en méthionine
• Augmentation anormale de l'homocystéine après test de charge de méthionine ; • Altération de la voie de la transsulfuration de l'homocystéine (statut hétérozygote pour la CBS, déficit en vitamine B6).

Note. CBS : Cystathionine β-synthase; MTHFR : Méthyltétrahydrofolate reductase.

Les données relatives à la relation entre le statut vitaminique et le taux plasmatique de l'homocystéine étaient rapportées initialement par Kang *et al.* qui ont démontré une relation inverse entre les taux d'homocystéine et de folate.[90] D'autres études ont démontré une relation inverse entre les taux d'homocystéine et de vitamine B12 et ont rapporté l'efficacité de la supplémentation vitaminique sur la réduction et la normalisation du taux plasmatique de l'homocystéine.[69, 76, 77, 102, 103, 112-127] Dans ces dernières études, la supplémentation en folate et en vitamine B12, mais non en vitamine B6, réduisait l'homocystéinémie plasmatique à jeun. La vitamine B6 était efficace uniquement dans la réduction du taux plasmatique d'homocystéine après un test de charge en méthionine.[21] L'association indépendante entre les nutriments et la concentration plasmatique d'homocystéine a été étudiée dans une cohorte bien établie, la *Framingham Heart Study*.[128] Après ajustement pour l'âge, le sexe, et les autres vitamines, le taux plasmatique d'homocystéine était significativement associé et de façon non linéaire au taux de folates plasmatiques.[128] Les taux les plus bas d'homocystéine étaient observés pour des concentrations de folate autour de 10 nmol/L ou plus.[128] La concentration plasmatique d'homocystéine était faiblement associée à la concentration en vitamine B12 et au pyridoxine 5'-phosphate.[128]

6.5.1 La thermolabilité de la méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR)

Les mutations qui entrainent une réduction sévère de l'activité MTHFR et une hyperhomocystéinémie sévère sont rares.[116, 129] En 1988, Kang *et al*. ont rapporté le cas de deux patients non apparentés et qui présentaient une hyperhomocystéinémie avec un taux plasmatique faible en folate.[90] Ces patients présentaient un variant de l'enzyme MTHFR distinguée de l'enzyme normale par une activité réduite de 50 % et une thermolabilité.[90] Dans des études ultérieures, le même groupe a démontré que la thermolabilité de la MTHFR était un trait hérité de façon récessive, et touchait environ 5 % de la population générale et 17 %

des patients avec une coronaropathie mais qu'il n'était pas associé à des complications neurologiques.[117, 130] L'ADN complémentaire de l'enzyme MTHFR humaine a été isolé[116] et il a été démontré que la thermolabilité de la MTHFR était causée par une mutation sur un site polymorphe (677 C>T), résultant en une substitution de l'acide aminé valine par une alanine dans l'enzyme. [131] La mutation était retrouvée chez 38 % des chromosomes non sélectionnées chez 57 sujets canadiens français.[131] L'état homozygote pour cette mutation était présent chez 12 % des sujets et était corrélé de façon significative à l'augmentation de l'homocystéinémie.[131]

Dans un travail publié en 1996, Jacques *et al.* ont démontré une interaction entre le variant thermolabile de MTHFR et le statut en folate.[132] Lorsque la concentration plasmatique en folate est élevée (> 15,4 nmol/L), les taux d'homocystéine sont bas et non associés au génotype *MTHFR*.[132] A l'inverse, lorsque la concentration en folate est basse, le taux plasmatique d'homocystéine est significativement élevé chez les sujets homozygotes *MTHFR 677, T/T* en comparaison aux sujets présentant un génotype sauvage.[132] L'existence d'une telle interaction a été confirmée dans des études ultérieures.[133-135] Ces données impliquent que l'expression phénotypique du génotype de *MTHFR* est dépendante de la biodisponibilité en folate. Ceci suggère que les sujets homozygotes *MTHFR 677, T/T* pourraient avoir un besoin plus élevé en folate en comparaison aux sujets présentant un génotype sauvage.

6.5.2 Autres facteurs contrôlant le taux plasmatique de l'homocystéine

Le taux plasmatique de l'homocystéine est plus élevé chez les hommes en comparaison aux femmes. Des taux élevés d'homocystéinémie ont été associés à l'altération de la fonction rénale, une créatininémie élevée, un tabagisme actif, la consommation de café,

d'alcool, et de certaines drogues incluant les antagonistes des folates, le monoxyde d'azote, et la L-DOPA.[136]

6.6 Hyperhomocystéinémie, stress cellulaire et inflammation de la muqueuse intestinale au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

L'homocystéine possède *in vitro* une action pro-oxydante, son groupe thiol étant oxydé pour former des espèces réactives de l'oxygène qui sont responsables de lésions et de dysfonctionnement cellulaires.[137] Des études expérimentales chez l'animal ont permis de démontrer que des souris transgéniques surexprimant la SOD présentent une colite inflammatoire plus sévère après administration de dextran sulfate de sodium (DSS) que des souris sauvages.[138] Chez l'homme, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle majeur joué par les espèces réactives de l'oxygène dans la survenue des lésions de la muqueuse colique au cours des MICI.[139, 140] Des taux accrus de glutathion peroxydase ont ainsi été mesurés dans le plasma des patients atteints de MICI en réponse au stress oxydatif.[141] L'homocystéine peut également sensibiliser les cellules au stress oxydatif en diminuant l'expression d'une large gamme d'enzymes anti-oxydantes. Des résultats récents indiquent notamment que l'expression et l'activité de l'hème oxygénase-1 et de la glutathion peroxidase étaient diminuées lors de cultures de cellules endothéliales après traitement par de l'homocystéine.[142, 143] C'est ainsi qu'une une diminution de la capacité antioxydante totale a été rapportée chez les sujets atteints de MICI.[144] Des études complémentaires sur le rôle pivot du stress oxydatif secondaire à l'activation du facteur de transcription *Necrosis Factor kappa B* (NF-κB) en présence d'homocystéine pourraient également apporter une meilleure compréhension du rôle joué par l'hyperhomocystéinémie dans le développement des lésions intestinales muqueuses au cours des MICI.[145, 146]

Il a également été montré *in vitro* que l'homocystéine pouvait stimuler la production de plusieurs facteurs pro-inflammatoires tels que MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), une chémokine pour les monocytes, et l'interleukine (IL)-8, une chémokine pour les lymphocytes T et les neutrophiles, ceci via l'activation de NFkB.[145, 147, 148] L'homocystéine peut aussi moduler la réponse inflammatoire en régulant la synthèse de molécules d'adhésion comme VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) et ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), ainsi que celle du PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*)[149], l'expression de ces 3 molécules étant augmentée chez les patients atteints de MICI.[150] Enfin, Les résultats d'expériences menées *in vitro* et *in vivo* suggèrent que l'homocystéine pourrait provoquer des lésions de la muqueuse intestinale par un effet cytotoxique médié par le TNF ; l'homocystéine induirait une mort cellulaire en augmentant la capacité du TNF à détruire les potentiels membranaires mitochondriaux.[151] Les lésions induites par l'homocystéine via une augmentation de la production de molécules d'adhésion, de cytokines, et de chémokines pourraient ainsi participer au maintien d'une inflammation chronique de la muqueuse intestinale chez les patients atteints de MICI. Des études portant sur d'autres cytokines induites par l'homocystéine, dont IL-6, pourraient également permettre une meilleure compréhension de l'homocystéine dans la régulation de l'inflammation intestinale.[152]

L'intestin humain est constamment en contact étroit avec divers microorganismes. Des études récentes sur l'immunité innée suggèrent que la reconnaissance des bactéries par l'hôte est cruciale pour empêcher le développement d'une inflammation intestinale excessive et maintenir une homéostasie intestinale.[153] L'un des principaux systèmes antimicrobiens des cellules phagocytaires est iNOS (*inducible nitric oxide synthase*), qui est responsable de la production de la molécule effectrice, l'oxyde nitrique (NO).[154] En effet, des souris déficientes pour iNOS sont plus susceptibles à diverses infections intestinales, y compris *Mycobacterium tuberculosis, Listeria monocytogenes* et *Salmonella enterica.*[154] Une hyperhomocystéinémie

pouvant empêcher l'action antimicrobienne du NO sur *Salmonella typhimurium*[155], nous pensons qu'une hyperhomocystéinémie pourrait augmenter la susceptibilité vis-à-vis de certains entéropathogènes au cours des MICI.[156] Cette piste pourrait expliquer au moins en partie le rôle délétère de l'hyperhomocystéinémie au cours des MICI.

6.7 Traitement de l'hyperhomocystéinémie

L'hyperhomocystéinémie est fréquente dans la population générale, notamment les sujets âgés. Le statut vitaminique est un déterminant majeur de l'hyperhomocystéinémie minime à modérée et représente environ deux-tiers des cas d'hyperhomocystéinémie. La supplémentation vitaminique entraine une normalisation de l'homocystéine plasmatique dans la plupart des cas.[157-160] Les patients avec une augmentation isolée de l'homocystéine après un test de charge en méthionine peuvent tirer bénéfice d'une supplémentation en vitamine B6.

7 Influence du métabolisme des donneurs de méthyle sur les mécanismes épigénétiques et épigénomiques liés aux réactions de transméthylation

7.1 Introduction

L'acide folique, la vitamine B12 et les autres nutriments influencent l'activité des enzymes qui participent dans divers processus de méthylation en affectant l'addition des groupements méthyl que ces enzymes incorporent à une large variété de molécules. La methylation modifie l'ADN génomique sans altérer la séquence primaire : c'est la modification épigénétique. La méthylation entraine par ailleurs des modifications au niveau de l'ARN, des phospholipides, des protéines, et de la synthèse des neurotransmetteurs. Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN survient principalement sur la cytosine au niveau des dinucleotides CpG et a été proposée comme jouant un rôle dans la stabilité génomique et la régulation de la fonction des gènes. La méthylation d'un îlot CpG au sein d'une région promotrice est corrélée avec un silence transcriptionnel : la méthylation est corrélée avec une modification des protéines histones dans les nucléosomes et avec la compaction de la chromatine qui la rend indisponible pour les facteurs de transcription. Le principal donneur de méthyle pour plusieurs enzymes méthyltransférase est la S-adénosylméthionine (SAM), qui dérive de la méthionine. La méthionine est à son tour formée lorsque l'enzyme méthionine synthase (MTR) rajoute un groupement méthyl à partir du 5-MTHF à l'homocystéine. La méthionine peut être formée lorsqu'un groupement méthyl à partir de la bétaïne est rajouté à l'homocystéine par l'enzyme bétaïne-méthionine homocystéine méthyltransférase (BHMT). La forme méthylée de la cobalamine, la méthylcobalamine, est le cofacteur de l'enzyme MTR, et le zinc est le cofacteur de l'enzyme BHMT.

Plusieurs évidences *in vitro* et *in vivo* ont démontré que la variation du niveau d'acide folique dans la diététique peut altérer la méthylation de l'ADN et l'expression des gènes. La variation de la méthylation de l'ADN a été associée au vieillissement[161], à l'atherosclérose[162], aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin[163], et peut contribuer à la variation de l'expression des gènes au cours du développement[164] et au risque d'anomalies congénitales.[165-167] Les nutriments qui jouent un rôle dans la méthylation de l'ADN influencent aussi plusieurs processus cognitifs.[168] A partir de l'évaluation des différentes voies métaboliques aboutissant à la synthèse du donneur de méthyle, la SAM, il peut être déduit que l'acide folique, la bétaïne, le zinc, et la vitamine B12 peuvent potentiellement affecter la méthylation, et toute combinaison de ces nutriments peut être interprétée comme une « diététique méthylée ». D'autres facteurs dans les voies métaboliques, comme la méthionine ou la SAM peuvent être directement manipulés.

7.2 Biologie de la méthylation du génome

7.2.1 Les modèles de méthylation de l'ADN

Plus de 80 % des résidus cytosine dans les ilots CpG de l'ADN génomique des mammifères sont méthylés en position 5. La méthylation n'est pas distribuée de façon homogène dans le génome. Elle est notamment absente dans les régions riches en CpG à proximité de l'extrémité 5' des gènes, appelée ilôts CpG. Ces régions contiennent classiquement la région promotrice des gènes et le statut déméthylé est corrélé avec un statut transcriptionnel actif.[169] Lorsque les ilots CpG associés au promoteur sont méthylés, la transcription est inhibée de façon irréversible telle que dans les allèles des gènes soumis à l'empreinte parentale ou des gènes du chromosome X inactivé. Dans la plupart des cas la méthylation des ilôts CpG est héritée de façon stable par les cellules filles lors de la mitose

mais des variations pour un certain nombre de gènes a été démontré au cours du vieillissement ou du cancer, et peuvent avoir des conséquences biologiques significatives.[170]

7.2.2 Les enzymes de la méthylation de l'ADN

Trois méthyltransférases de l'ADN biologiquement actives sont capables de rajouter un groupement méthyl à la cytosine dans les dinucleotides CpG : DNMT1, DNMT3a, et DNMT3b.[171-174] toutes les enzymes DNMT sont essentielles au développement embryonnaire. Les enzymes DNMT3a et DNMT3b sont des méthylases de novo, alors que la DNMT1 est une méthylase de maintien avec une activité préférentielle pour l'ADN semi-méthylé.[174-177] La DNMT1 peut aussi avoir une faible activité méthylation de novo et un variant spécifique de cette protéine (Dnmt1o) peut participer au profil de méthylation et à l'expression des gènes soumis à l'empreinte parentale.[178]

7.2.3 La méthylation de l'ADN et la transcription

la méthylation de l'ADN dans les ilôts CpG des régions promotrices, interfère en théorie avec la transcription via trois voies.[179] Elle peut interférer avec la liaison des facteurs de transcription, même si certains facteurs de transcription peuvent se fixer sur un ADN méthylé. L'ADN méthylé peut interagir avec des complexes protéiques telles que le MeCP1 et la MeCP2 qui se lient spécifiquement aux dinucleotides CpG méthylés[180-184], ou bien il peut altérer la structure de la chromatine vers un état répresseur.[185, 186] Il apparait clairement que ces trois mécanismes sont intriqués. Tous les ilôts CpG ne sont pas situés dans les régions régulatrices 5' mais peuvent être retrouvés dans les introns, les exons, et les régions 3'.[187, 188] La méthylation de ces ilôts CpG n'est pas forcément associée à une répression de la transcription des gènes associés. Si les ilôts CpG appartiennent à des éléments suppresseurs

qui deviennent inactivés par la méthylation, cela résulte en une augmentation et non pas une diminution de l'expression du gène.[189]

7.2.4 Existe t-il une déméthylation active de l'ADN ?

La déméthylation est un événement rare dans les cellules différenciées et survient généralement selon un processus passif lorsque les cellules échouent à reméthyler des séquences antérieurement méthylées après réplication de l'ADN.[190, 191] Ceci peut survenir lorsque les donneurs de méthyle sont déficients. La déméthylation active et rapide est connue pour survenir uniquement dans le génome du zygote parental immédiatement après la fertilisation, avant la déméthylation du génome maternel.[192, 193]

7.2.5 La modification des histones

La méthylation des histones est associée à un état répressif de la chromatine via la déacétylation des résidus lysine dans les histones de la particule cœur H3 et H4. La déacétylation de la queue des histones est un mécanisme habituel de répression transcriptionnelle.[194] L'acétylation des histones est associée à une activation de la transcription de la chromatine et l'enzyme histone acétyltrasnférase est habituellement dans les complexes activateurs de la transcription. Des modifications additionnelles des histones, telles que la phosphorylation et la méthylation, jouent un rôle dans la régulation de la transcription. De façon intéressante, la connexion entre la méthylation et l'acétylation des histones est un mécanisme qui peut réguler la transcription.[195, 196] L'enzyme histone méthyltransférase utilise la SAM comme donneur de méthyle. Il a été suggéré que les facteurs diététiques affectant l'apport du groupement méthyl peuvent altérer la fonction du génome à ce niveau en dehors de leur influence directe sur la méthylation de la cytosine.[1]

7.2.6 Quelle est la fonction biologique de la méthylation de l'ADN ?

La méthylation de l'ADN est essentielle à la survie chez les mammifères. La mutation *Null* de l'une des trois enzymes *Dnmts* chez la souris est létale.[176, 177] La méthylation de l'ADN est nécessaire à l'acquisition héréditaire et irréversible de l'inactivation du chromosome X et à l'inactivation des allèles des gènes soumis à l'empreinte parentale.[197] Cependant, puisque la majorité de la méthylation de l'ADN survient en dehors des régions qui jouent un rôle direct dans la régulation de l'activité des gènes, celle-ci pourrait être impliquée dans d'autres fonctions. Il a été suggéré que la méthylation représente un mécanisme de répression utilisé par les organismes complexes pour réduire le « bruit transcriptionnel » (*transcriptional noise*, en anglais).[198] Au moins 35 % du génome consiste en transposons d'ADN endogènes, qui peuvent être considérés comme des ADN intra-génomiques parasites hautement spécialisés. Dans certains cas, ces AND parasites peuvent coder pour tous les facteurs nécessaires à la transcription et nécessitent donc d'être inactivés afin d'éviter une interruption du gène ou un réarrangement chromosomique.[199] Cette inactivation est atteinte avec un haut niveau de méthylation de ces séquences d'ADN.

7.3 La synthèse de l'ADN et les voies de la méthylation : rôle des folates, de la bétaïne, de la vitamine B12 et du zinc

7.3.1 Les voies métaboliques

La SAM est le principal donneur de méthyle pour tous les processus de méthylation dans la cellule. La SAM est synthétisée dans une voie de méthylation directement à partir de la méthionine (**Figure 4**). Trois enzymes sont nécessaires pour la synthèse de la méthionine. La plus importante est la méthionine synthase (MTR) qui transfert un groupement 5-MTHF vers homocystéine par la réduction du 5MHTF en tétrahydrofolate (THF). Cette enzyme est

exprimée de façon ubiquitaire dans tous les tissus et les organes. L'enzyme MTR est l'une des deux enzymes (l'autre étant la méthyl-malonyl CoA-mutase) qui nécessite la vitamine B12, la méthylcobalamine, comme cofacteur. L'acide folique entre dans cette voie métabolique via le dihydrofolate (DHF) et peut être recyclé via la formation du 5,10-méthylène-tétrahydrofolate (5,10-MTHF) (**Figure 4**). La sérine et la glycine sont les principaux donneurs du groupement carbone dans ce processus. Lorsque le 5,10MTHF est réduit en 5-MTHF, il libère un groupement méthyl qui sera utilisé dans la biosynthèse de la thymidine et de la purine. L'acide folique est donc non seulement important pour la méthylation de l'ADN génomique mais aussi pour sa synthèse. Cinquante pourcent de la méthionine du foie est synthétisée via des voies alternatives lorsque la bétaïne est hydrolysée en diméthylglycine par l'enzyme enzyme bétaïnehomocystéine méthyltransférase (BHMT), qui est exprimée chez la plupart des mammifères dans le foie et le rein.[200, 201] La bétaïne dérive elle-même de l'oxydation de la choline. Récemment, une seconde enzyme bétaïnehomocystéine méthyltransférase, appelée BHMT2 a été identifiée[202], et est plus abondante dans le foie et le rein mais qui est présente aussi dans les autres tissus (cerveau, cœur, et muscle squelettique) et au cours du développement embryonnaire (cœur, foie, poumon, et œil chez la souris). Les deux enzymes BHMT sont dépendantes du zinc.[1] Lorsque la SAM donne son groupement méthyl à l'ADN, à l'ARN, aux protéines ou aux phospholipides comme cofacteur pour une variété de méthyltransférases (incluant les DNMTs), elle est convertie en S-adénosylhomocystéine (SAH). L'enzyme S–adénosylhomocystéine hydrolase (SAHH) convertit la SAH en homocystéine permettant ainsi le recyclage de l'homocystéine en méthionine dans la voie de la reméthylation. Un apport inadéquat en groupement méthyl lié à un manque d'apport de donneurs de méthyle tels que les folates ou la bétaïne ou un déficit des cofacteurs méthylcobalamine ou zinc, peut entraîner une accumulation de l'homocystéine et une réduction des taux de SAM. L'homocystéine est convertie aussi en cystéine via la voie de

transsulfuration. L'hydrolyse de la SAH est une réaction réversible. Lorsque l'homocystéine s'accumule, il en résulte une augmentation de la SAH et une diminution du ratio SAM/SAH (l'index de méthylation).[1] La SAH possède une propriété inhibitrice directe sur les DNA-méthyltransférases. Un déficit des enzymes participants à ces différentes voies interconnectées ou un apport inadéquat en cofacteurs ou en substrats peut entraîner des modifications de la méthylation de l'ADN.

7.3.2 Les agents exogènes pouvant affecter la méthylation de l'ADN

Il a été démontré *in vivo* et *in vitro*, notamment dans les études sur le cancer, que la méthylation d'ilôts CpG spécifiques peut être modifiée dans les cellules différenciées : l'hyperméthylation entrainant une répression des gènes suppresseurs de tumeurs et l'hypométhylation entrainant une activation des proto-oncogènes.[203, 204] Ces événements ont été influencés en culture cellulaire et dans des modèles animaux par la supplémentation et la déplétion en donneurs de méthyle.[204-207] Puisque la SAM représente le donneur de méthyle universel utilisé par les DNA méthyltransférases pour rajouter un groupement méthyl à la cytosine, des variations des taux de chacun des cofacteurs des voies de la méthylation peut entraîner une augmentation ou une diminution de la méthylation de l'ADN.[1]

7.3.2.1 L'acide folique et ses dérivés

Les folates réduits agissent comme cofacteurs pour plusieurs processus en apportant l'unité monocarbone nécessaire à plusieurs réactions de méthylation et pour la synthèse de la glycine, le thymidine, la purine, et la méthionine. Les sources alimentaires contiennent un mélange de folates attachées au polyglutamate (dihydrofolate or tétrahydrofolate). Ces composants sont très instables et ont une biodisponibilité allant de 25 à 50 %. Au cours de l'absorption par la muqueuse intestinale, la chaine de polyglutamate est dégradée et le groupement 5-méthyle est rajouté pour former le 5-MTHF. Les suppléments de folate contiennent une forme synthétique d'acide folique, qui est stable pendant des mois voire des années et qui a une biodisponibilité de 100 %.[1] Au cours de l'absorption intestinale, l'acide folique est réduit par l'enzyme dihydrofolate reductase en dihydrofolate et tétrahydrofolate puis est converti en 5-MTHF. Une fois dans la cellule, le 5-MTHF est polyglutamaté afin qu'il soit retenu. La dihydrofolate reductase a une capacité limitée et lorsque l'acide folique est ingéré en excès, il peut apparaitre non modifié dans le plasma. Une certaine proportion

peut dans ce cas être métabolisée par d'autres cellules si elles possèdent une dihydrofolate reductase active. L'enzyme méthionine synthase nécessite le 5-MTHF. Dans les conditions normales, la synthèse de l'ADN et les cycles de méthylation régénèrent le THF, mais une petite partie est perdue dans les urines, la bile ou la peau. Un déficit fonctionnel peut donc survenir en l'absence de compensation.[208] Dans cette situation, la cellule a besoin de capter le folate à partir du sérum sous la forme de MTHF monoglutamate.[209] Les niveaux de SAM et de SAH régulent la formation de THF. Lorsque le taux de SAM est élevé ou que celui de la SAH est bas, l'enzyme MTHFR est activée et le folate est dévié de la synthèse de la DNA vers la voie de reméthylation.[210] Le folate est une vitamine hydrosoluble qui a un bon profil de tolérance, néanmoins, les rats supplémentés avec des doses très élevées ont des ratons plus petits en taille[211] et des doses dépassant 200 mg/kg peuvent entraîner une insuffisance rénale aigue chez le rat.[212]

7.3.2.2 La bétaïne et la choline

Le second donneur de méthyle, la bétaïne, entre dans le métabolisme via l'oxydation de la choline. Toute la bétaïne de l'organisme est dérivée de la choline et sans supplémentation aucun apport n'est réalisé par l'alimentation. La supplémentation en bétaïne a démontré son efficacité dans les désordres liés à un déficit du recyclage des folates (ex. déficit de l'enzyme MTHFR). La bétaïne est hydrolysée par les enzymes BHMT1 et 2 en diméthylglycine lorsqu'elle transfert un groupement méthyl vers l'homocystéine pour générer la méthionine.[200-202] La choline est un composant diététique essential et un métabolite important pour plusieurs aspects cellulaires de la fonction neuronale. Elle représente un composant majeur des phospholipides et de la sphingomyéline et participe directement à la neurotransmission via l'acétylcholine.[213] Le déficit en choline chez le rat entraine une diminution de la SAM dans les tissus.[214]

7.3.2.3 La vitamine B12 (méthylcobalamine)

L'enzyme MTR est l'une des deux enzymes dépendantes de la cobalamine. L'enzyme PTR utilise la méthylcobalamine alors que la seconde enzyme dépendante de la vitamine B12 utilise l'adénosylcobalamine.[1] Le déficit sévère en cobalamine entraine une anémie mégaloblastique, une neuropathie, et une démyélinisation. Du fait de la nécessite de la vitamine B12 pour l'enzyme PTR, toute supplémentation en folate doit être accompagnée d'un taux adéquat de méthylcobalamine afin d'améliorer les réactions de méthylation.[215] Le zinc est essentiel pour plusieurs enzymes impliquées dans la stabilité, la synthèse, la réparation, et la transcription de l'ADN. L'enzyme BHMT est une métalloprotéine.[202, 216] Les diététiques visant à améliorer la méthylation doivent contenir une supplémentation en zinc.[215]

7.3.2.4 La méthionine

La méthionine est un acide aminé essentiel non seulement nécessaire pour les rections de méthylation en tant que précurseur de la SAM mais elle est nécessaire aussi pour la biosynthèse des protéines. La méthionine est apportée en excès par l'alimentation car l'homocystéine est recyclée en méthionine via la voie de la reméthylation.[208] Ainsi, lorsque la réaction de reméthylation est insuffisante, les niveaux fonctionnels de la méthionine deviennent bas et avec une réduction du niveau de la SAM. La supplémentation diététique en méthionine réduit le risque de défaut de fermeture du tube neural dans des modèles expérimentaux de souris.[217]

7.3.2.5 La S-adénosylméthionine (SAM)

La SAM est formée d'adénosine et de méthionine par la méthionine-adénosyl-transférase. Une régulation étroite et continue de l'apport en SAM peut représenter l'objectif majeur de la voie de la reméthylation de l'homocystéine.[218] L'administration de SAM par

voie orale ou par voie parentérale permet de restaurer les concentrations dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien.[168]

7.3.2.6 L'homocystéine et la S-adénosylhomocystéine

Toute l'homocystéine est dérivée *in vivo* du recyclage de la SAH par l'enzyme SAH hydrolase (SAHH). Cette enzyme est importante pour la régulation des réactions de méthylation. Elle assure l'apport adéquat en SAM via le cycle de reméthylation mais aussi la dégradation efficiente de la SAH qui se lie avec une plus haute affinité à la méthyltransférase que la SAM et peut donc représenter un inhibiteur compétitif. Lorsque les niveaux d'homocystéine deviennent élevés du fait d'un déficit sur les voies de méthylation ou de transsulfuration, la réaction SAHH —qui est une réaction réversible— entraine l'accumulation de la SAH et une diminution du ratio SAM/SAH, ou index de méthylation.

7.3.3 L'hypothèse de la trappe méthyle-folate (*the methyl folate trap hypothesis*)

Un taux faible de vitamine B12 ou une insuffisance de l'enzyme MTR limite l'apport nécessaire en méthionine pour générer la SAM. Ceci va stimuler l'enzyme MTHFR pour générer plus de 5-MTHF dans l'organisme pour recycler le folate vers la synthèse de la méthionine. Néanmoins, avec une fonction méthylcobalamine inadéquate, le 5-MTHF va s'accumuler, alors que le folate intracellulaire disponible pour les réactions de méthylation diminue. L'effet du déficit en vitamine B12 sur ces voies métaboliques est celui d'un déficit fonctionnel en folate avec une hyperhomocystéinémie et un taux faible de méthionine.[219]

8 La gastrite à *Helicobacter pylori* et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : deux états inflammatoires de la muqueuse digestive, associés au déficit en vitamine B12

8.1 La gastrite à *Helicobacter pylori*

Au cours de la phase gastrique de l'absorption de la vitamine B12, le faible pH gastrique et la digestion acido-peptique permettent la libération de la cobalamine liée aux protéines alimentaires.[220-222] La gastrite chronique atrophique induite par *H. pylori* peut causer une perturbation de la sécrétion acido-peptique, qui à son tour peut causer une malabsorption de cobalamine.[222, 223]

8.1.1 Introduction

Helicobacter pylori (*H. pylori*) est une bactérie unique qui vit idéalement dans l'environnement acide de l'estomac humain.[224] La forme spiralée de la bactérie ainsi que ses multiples flagelles unipolaires lui permettent de se mouvoir dans la couche de mucus adhérente à la muqueuse gastrique, la protégeant ainsi du faible pH intra-gastrique.[225] *H. pylori* produit une grande quantité d'uréase, une enzyme qui hydrolyse l'urée en ammonium et en CO_2. Ceci permet à la bactérie de mieux contrôler le pH de son microenvironnement. L'activité uréase de la bactérie représente par ailleurs la base des tests diagnostiques cliniques : le test respiratoire (*breath-test*) et le test sur biopsie gastrique. La culture d'*H. pylori* est difficile du fait de sa croissance lente et de la nécessité d'un environnement microaérophile.

Une fois dans l'estomac, *H. pylori* reconnait et s'attache à différents récepteurs de surface sur les cellules épithéliales de la muqueuse gastrique, entrainant une colonisation chronique de la muqueuse, alterant la fonction cellulaire, provoquant une intense réaction inflammatoire et une réponse immunitaire systémique, et altérant par conséquent la sécrétion acide physiologique.[226, 227] Les manifestations cliniques de l'infection par *H. pylori* incluent la maladie ulcéreuse gastrique ou duodénale, le lymphome gastrique du MALT (*gastric mucosa–associated lymphoid tissue*), et l'adénocarcinome. Néanmoins, la majorité des sujets restent asymptomatiques malgré le développement d'une gastrite chronique. [226, 228, 229] Les facteurs qui déterminent l'évolution de l'infection par *H. pylori* vers l'une des complications qui lui sont associée restent non complètement élucidés et incluent des facteurs génétiques, bactériens, et environnementaux.[229, 230]

8.1.2 Epidémiologie

La prévalence de l'infection par *H. pylori* varie largement selon les régions géographiques. Dans les pays en voie de développement, plus de 80 % de la population est infectée par *H. pylori*.[3] Dans les pays industrialisés, la prévalence de l'infection par *H. pylori* demeure en dessous de 40 % et est considérablement faible parmi les enfants et les adolescents en comparaison aux adultes et aux sujets âgés.[4] Au sein d'une même région géographique, la prévalence de l'infection par *H. pylori* est inversement corrélée au statut socio-économique, notamment au cours de la période de l'enfance.[5] Dans les pays en voie de développement, la prévalence de l'infection par *H. pylori* augmente rapidement au cours des cinq premières années de vie puis continue à progresser pendant l'âge adulte.[6] Dans les pays industrialisés, l'incidence de l'infection *de novo* par *H. pylori* est inferieure à 0,5 % par an. La

prévalence élevée de l'infection par *H. pylori* parmi les sujets âgés dans les pays industrialisés reflète un effet de cohorte avec une acquisition de l'infection au cours du jeune âge.[231]

8.1.3 Pathogénie de l'infection par *Helicobacter pylori*

H. pylori provoque une réponse inflammatoire dans la muqueuse gastrique avec une induction des cytokines dérivées de l'épithélium, notamment l'interleukine 8 et l'interleukine 1-beta.[232, 233] L'afflux des polynucléaires neutrophiles dans la muqueuse gastrique provoque la libération d'enzymes lysosomales, de leucotriènes, et d'espèces réactives de l'oxygène qui altèrent les défenses de la muqueuse.[234, 235] Les lymphocytes T et B activés par les antigènes bactériens et les cytokines proinflammatoires régulent les réponses immunitaires locale et systémique avec la libération de cytokines supplémentaires (interleukines 1, 2, 6, 10, et TNF alpha), et d'anticorps.[234, 235] Le réponse cellulaire de type T est cruciale dans ce processus pathogénique avec des dégâts tissulaires plus proéminents résultat d'une réponse Th1 (*T helper 1*) prédominante alors qu'une réponse cellulaire T régulatrice prédominante confère une protection.[236]

Certaines souches d'*H. pylori* isolées de patients avec une maladie ulcéreuse présentent une forte virulence. Les caractéristiques de virulence des souches bactériennes d'*H. pylori* incluent des propriétés d'adhésion et la production d'enzymes toxiques. Les souches virulentes peuvent produire une quantité plus élevée d'uréase en comparaison des souches isolées chez les sujets ne présentant pas une maladie ulcéreuse.[237] L'uréase catalyse la production d'ammonium, qui à concentration élevée entraine la formation de complexes toxiques tels que le NH_4Cl.[238] Les phospholipases bactériennes A et C altèrent la couche

muqueuse de phospholipides qui permettent de maintenir l'hydrophobicité et l'intégrité de la barrière épithéliale gastrique.[239-241]

Des génotypes spécifiques d'*H. pylori* sont associés à une morbidité sévère. Les génotypes les plus prévalents d'*H. pylori* parmi les patients présentant une maladie ulcéreuse sont les génotypes vacA et cagA.[242, 243] La cytotoxine VacA (*vacuolating cytotoxin A*) —une protéine de 87-kd— provoque la dégénérescence vacuolaire des préparation de cellules gastriques en culture et des ulcérations gastriques chez les animaux de laboratoire.[237] Bien que présent dans toutes les souches bactériennes, l'expression du gène *vacA* dépend de son expression allélique et est exprimé dans 60% des souches.[244] Le *CagA* (*cytotoxin-associated gene A*), observé sur les souches produisant les cytotoxines, est situé dans un ilot de 31 gènes et correspondant à l'ilot de pathogénicité CagA. Le gène *CagA* code pour une protéine de 120 à 160-kd, une protéine immunodominante associée à une augmentation de la virulence et à une forte réponse inflammatoire locale.[245-247]Une série d'autres gènes de virulence avec une forte prévalence au cours de la maladie ulcéreuse ont été décrits, tel que la protéine d'adhésion BabA[248] et la *outer membrane inflammatory protein OipA*.[249]

Une prédisposition génétique à acquérir l'infection par *H. pylori* a été rapportée à partir d'un travail mené sur des jumeaux.[5] Les études antérieures ont suggéré que les personnes présentant un groupe sanguin O avaient un risque plus élevé de développer une maladie ulcéreuse gastrique en comparaison aux personnes présentant un autre groupe sanguin. L'adhésion d'*H. pylori* à la muqueuse gastrique est augmentée chez les patients porteurs des antigènes Lewis b qui sont exprimés sur les cellules sanguines ainsi que les cellules épithéliales gastriques.[250] Il a été suggéré que la présence de ces antigènes s'associait à une augmentation de l'adhésion d'*H. pylori*.[237]

8.1.4 Aspects cliniques de la gastrite liée à l'infection par *Helicobacter pylori*

La colonisation par *H. pylori* n'est pas une condition pathologique en soit, néanmoins, elle augmente le risque relatif de développer diverses pathologies du tractus digestif supérieur. Bien que la colonisation par *H. pylori* induise une gastrite chronique chez la quasi-totalité des individus, seule une minorité développe des signes cliniques de cette colonisation. Il a été estimé que les sujets infectés par *H. pylori* avaient 10 % à 20 % de risque de développer une maladie ulcéreuse au cours de leur vie et que ce risque était de 1 % à 2 % pour le cancer gastrique distal.[251-253]

8.1.4.1 Gastrite aiguë à Helicobacter pylori

Les données sur la phase aiguë de l'infection par *H. pylori* sont peu nombreuses et proviennent le plus souvent de *case-report* de sujets qui se sont délibérément infectés par la bactérie ou qui l'ont ingéré par inadvertance lors de manipulations de matériel contaminé.[254-258] Ces rapports démontrent que la phase aigue de l'infection par *H. pylori* peut s'associer de symptômes dyspeptiques non spécifiques (embarras gastrique, nausée, vomissements) et d'une inflammation intense de la muqueuse gastrique (estomac proximal, estomac distal, ou pangastrite). Cette phase est souvent associée à une hypochlorhydrie qui peut durer plusieurs mois. Des études menées sur des jumeaux monozygotes ont suggéré que certains individus ont une susceptibilité pour la colonisation par *H. pylori* alors que d'autres ont tendance à être protégés de l'infection ou bien pouvoir éliminer une infection établie.[259]

8.1.4.2 Gastrite chronique à Helicobacter pylori

Lorsque la colonisation par *H. pylori* devient persistante, une corrélation étroite existe entre le degré de sécrétion gastrique acide et la topographie de la gastrite. Chez les sujets avec une sécrétion gastrique acide intacte, *H. pylori* colonise l'antre où peu de cellules pariétales

sont présentes.[225] Ce profil de colonisation est associé à la gastrite antrale prédominante. Les sujets présentant une sécrétion gastrique acide diminuée — quelque soit le mécanisme sous-jacent— ont une distribution plus large de la gastrite (corps et antre) avec un contact plus étroit avec la muqueuse du corps de l'estomac, entrainant une pangastrite avec prédominance de l'inflammation sur le corps.[260] La réduction de la sécrétion acide peut être secondaire à une gastrite atrophique ou bien à l'inhibition de la sécrétion par une vagotomie ou l'utilisation d'un inhibiteur de la pompe à protons (IPP). L'inflammation active qui en résulte au niveau du corps gastrique aggrave l'hypochlorhydrie, et fait intervenir plusieurs cytokines notamment l'interleukine 1-beta qui exerce un puissant effet inhibiteur sur la fonction des cellules pariétales.

La gastrite corporéale induite par *H. pylori* est associée à une hypochlorhydrie et l'éradication de l'infection entraine une augmentation de la sécrétion acide.[261, 262] La gastrite corporéale associée à *H. pylori* augmente l'effet inhibiteur des IPP sur la sécrétion gastrique acide.[263] Une troisième observation soulignant l'effet acido-suppresseur de la gastrite corporéale à *H. pylori* provient d'une étude qui a démontré que les sujets présentant un génotype proinflammatoire (interleukine 1-beta) avaient un risque plus élevé de développer une pangastrite prédominant sur le corps qui les prédisposaient à l'atrophie gastrique, à la métaplasie intestinale, et au cancer gastrique.[264]

8.1.5 Gastrite chronique à *Helicobacter pylori* et malabsorption de la vitamine B12

La diminution de la libération de la vitamine B12 à partir des protéines alimentaires en raison d'une altération de la sécrétion acido-peptique telle que rencontrée au cours de la gastrite atrophique[265] ou de l'utilisation des IPP[266] peut être à l'origine d'une malabsorption de la vitamine B12.

Plusieurs données soulignent le lien entre l'infection par *H. pylori* et le déficit en cobalamine.[222, 267-269] Le rationnel est que l'infection au long cours par *H. pylori* entraine une altération de la fonction acido-peptique[269] qui joue un rôle essentiel dans la libération de la cobalamine contenue dans les sources alimentaires afin qu'elle soit disponible pour le FI.[268] Dans une étude prospective, Kaptan *et al.* ont évalué la prévenance de l'infection par *H. pylori* ainsi que l'impact de l'éradication de l'infection par *H. pylori* sur le taux de vitamine B12 chez des patients présentant une carence en vitamine B12.[267] L'infection par *H. pylori* était détectée chez 56 % (77/138) des patients.[267] L'éradication d'*H. pylori* était associée à une amélioration du taux sérique de la vitamine B12 chez 40 % des patients (33/77) avec une amélioration de l'anémie.[267] De façon similaire, Marino *et al.* ont rapporté dans une étude prospective, un bénéfice à long terme de l'éradication de l'infection par *H. pylori* sur le taux de vitamine B12.[268] Ces données suggèrent que l'infection par *H. pylori* peut s'associer à un déficit en vitamine B12 et que l'éradication de l'infection par *H. pylori* peut améliorer ce déficit.

Un des mécanismes potentiels par lequel l'infection par *H. Pylori* entraine une perturbation de la sécrétion acido-peptique, est l'apparition d'une gastrite chronique atrophique.[223] Dans une étude en population menée en Finlande et ayant inclus 12 252 hommes, Sipponen *et al.* ont mis en évidence une relation entre la présence d'une gastrite chronique atrophique et un faible taux plasmatique de vitamine B12.[269] Par ailleurs l'infection par *H. pylori* était présente chez trois quart des patients présentant un statut déficient en vitamine B12.[269]

8.2 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont un groupe d'affections idiopathiques incluant la RCH et la MC. Ces désordres sont diagnostiqués sur la base d'un faisceau d'arguments cliniques, endoscopiques, histologiques, iconographiques. Selon la théorie actuellement admise, la pathogénie de ces maladies implique une dysrégulation de la réponse immunitaire muqueuse dirigée contre des éléments de la flore intestinale, survenant chez des patients génétiquement prédisposés. Le mode d'hérédité des MICI est complexe et ces maladies représentent probablement un groupe hétérogène de désordres partageant plusieurs gènes de susceptibilité. De considérables progrès ont été réalisés quant à l'élucidation des mécanismes génétiques des MICI et à ce jour 30 gènes de susceptibilité ont été identifiés dans les MICI.[270]

La malnutrition est fréquemment observée chez les patients MICI, notamment au cours des phases actives de la maladie.[271, 272] Plusieurs études ont évalué la cause de l'hyperhomocystéinémie observée au cours des MICI et la plupart des études ont fait le lien entre l'hyperhomocystéinémie et le statut carencé en vitamine B12 et/ou en folate.[273, 274] La MC iléale ou la résection iléale liée à la MC sont des causes classiques de carence en vitamine B12, par malabsorption. Par ailleurs, la pullulation microbienne —parfois observée au cours de la MC sténosante— peut représenter une cause supplémentaire de malabsorption de la vitamine B12.

8.2.1 La rectocolite hémorragique

La RCH est une affection chronique caractérisée par une inflammation diffuse de la muqueuse colique. Elle touche le rectum dans 95 % des cas et peut s'étendre en proximal de façon symétrique, circonférentielle, sans interruption pour toucher une partie ou la totalité du colon.[275] Les signes cliniques cardinaux de la RCH sont représentés par la diarrhée glairo-

sanglante souvent avec un syndrome rectal proéminent fait de ténesme et de faux besoins. L'évolution de la maladie est faite de poussées entrecoupées de rémissions pouvant survenir spontanément ou en réponse au traitement.[276] La RCH touche environ 500.000 personnes au États-Unis avec une incidence de 8 à 12 nouveaux cas par 100.000 habitants par an. L'incidence est restée constante au cours des cinq dernières décennies.[7, 8] La RCH représente environ un quart de million de visites médicales par an, 30.000 hospitalisations et une perte de plus d'un million de jours de travail.[10] Le cout médical annuel direct de la RCH dépasse quatre milliards de dollars, incluant le coût des hospitalisations qui dépasse 960 millions de dollars US[11, 277] et le coût lié aux médicaments qui dépasse 680 millions de dollars US.[11] Le traitement médical de la RCH repose sur les dérivés de l'acide 5-aminosalicylique, les corticoïdes, les immunosuppresseurs —incluant l'azathioprine et le méthotrexate— et les thérapies biologiques représentées par l'infliximab qui est le seul anti-TNF a posséder l'autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le traitement d'induction et de maintien de la rémission au cours de la RCH.[275]

8.2.2 La maladie de Crohn

La MC correspond à un groupe de désordres multisystémique avec des signes cliniques et anatomopathologiques caractéristiques incluant une inflammation focale, asymétrique, transmurale et parfois granulomateuse touchant principalement le tractus digestif.[278] Ce désordre multisystémique avec un risque potentiel de complications systémiques et extra-intestinales[279] peut toucher tous les groupes d'âge mais l'âge de début de la maladie est classiquement situé entre les deuxième et troisième décades. L'incidence et la prévalence de la MC aux États-Unis sont en augmentation pour des raisons qui ne sont pas claires. L'incidence et la prévalence de la MC aux États-Unis sont similaires à celles observées dans les pays développés avec des chiffres respectifs de 5/100.000 et 50/100.000.[9]

Il est important de différencier la MC des autres MICI. La MC est une affection chronique actuellement incurable médicalement ou chirurgicalement et nécessitant des approches thérapeutiques permettant d'induire et de maintenir la rémission clinique, d'améliorer la qualité de vie, de minimiser les toxicités à court et à long terme des traitements ainsi que les complications.[280] Les nouveaux objectifs thérapeutiques de la MC sont représentés par l'induction et le maintien d'une cicatrisation muqueuse (et histologique)[281, 282] pouvant altérer « l'histoire naturelle » de la maladie.[283] Malgré les chiffres relativement faibles de l'incidence et de la prévalence de la MC en comparaison avec les autres affections digestives, le coût annuel du traitement médico-chirurgical de la MC est estimé à 2 milliards de dollars US aux États-Unis avec une augmentation attendue depuis l'avènement des thérapies biologiques.[12, 13] Lorsqu'un patient débute un traitement par les corticoïdes, la probabilité cumulée de chirurgie à un an est de 38 %.[15] Dans une étude de population récemment menée au Canada, le taux d'hospitalisation pour MC était de 27/100.000 patients avec une durée estimée du séjour de 9 jours avec la moitié des hospitalisations qui avaient nécessité une prise en charge chirurgicale.[14]

8.2.3 Les gènes de susceptibilité dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Jusque tout récemment, deux approches étaient utilisées pour rechercher des gènes impliqués dans la pathogénie des MICI. L'approche du 'gène candidat' (*candidate gene approach*, en anglais) testait l'association entre une maladie et des gènes impliqués dans la régulation de la réponse inflammatoire. En général, il s'agissait de comparer des fréquences alléliques entre des patients MICI et des contrôles sains. L'association entre la maladie et un marqueur spécifique suggérait une relation causale ou alternativement un déséquilibre de

liaison. Des faux positifs pouvaient toutefois survenir lorsque les patients et les contrôles n'étaient pas issus de la même ethnie. La seconde approche est celle de l'étude de la 'liaison génétique' (*genetic linkage study*, en anglais) qui ne repose pas sur l'hypothèse d'un gène candidat mais plutôt sur un screening large du génome chez plusieurs familles de patients atteints de MICI dans le but d'identifier des régions chromosomiques, loci, chez les membres affectés d'une famille. Une fois que le lien est établi, l'association d'études de gènes candidat dans la région identifiée permettait de rechercher le gène spécifique de la maladie. Ce type d'études a permis la découverte de plusieurs régions de susceptibilité appelés IBD 1 à 9 selon l'ordre chronologique de leur découverte.[284-289]

Dans les années récentes une nouvelle technique a rapidement évolué permettant une accélération de la recherche génétique. Après l'achèvement du séquençage du génome humain, il a été possible de réaliser des études d'association sur le génome entier (*genome-wide association studies (GWAS)*, en anglais) permettant ainsi l'évaluation systématique de la contribution des variations génétiques à la pathogénie des MICI.[290, 291] Cette approche a permis de mettre à jour différents gènes candidats des voies de l'inflammation impliqués dans la pathogénie des MICI. Les études par GWA impliquent le génotypage de plusieurs milliers de marqueurs et la comparaison des fréquences alléliques entre les patients et les contrôles sains.[291] Ces études ont permis l'identification de plusieurs loci impliqués dans les MICI, ont souligné l'importance du système immunitaire inné et ont impliqué de nouvelles voies pathogéniques telles que l'autophagie.[270, 292, 293]

8.2.4 Maladie de Crohn et malabsorption en vitamine B12

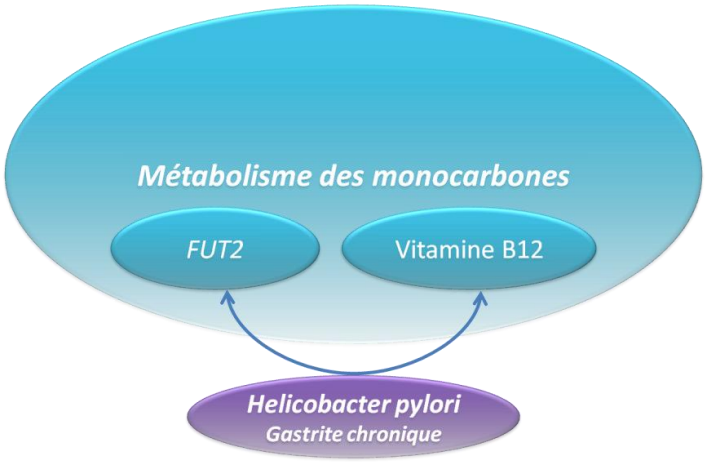
Plusieurs études ont démontré la présence d'une carence en vitamine B12 au cours de la MC.[294-302] Cette carence fait intervenir un mécanisme de malabsorption du fait d'une atteinte

de la muqueuse iléale ou d'une résection iléale avec comme conséquence une réduction de la surface absorptive du complexe 'cobalamine-FI'.[265] Une résection iléale d'une longueur supérieure à 60 cm entraine habituellement une malabsorption en vitamine B12.[303]

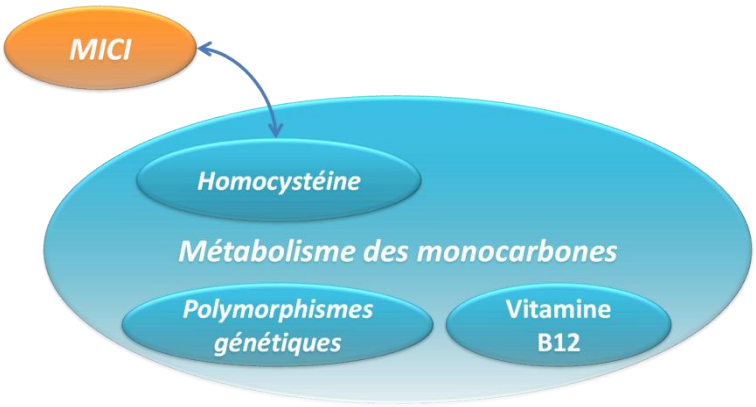
Un autre mécanisme potentiel par lequel la MC peut entraîner une carence en vitamine B12, est celui de la pullulation microbienne. La pullulation microbienne associe classiquement une anémie mégaloblastique —causée par une malabsorption de vitamine B12— à une stéatorrhée causée par la malabsorption.[304] L'anémie mégaloblastique associée à une sténose de MC a été décrite pour la première fois en 1897.[305] Le déficit en vitamine B12 est causé par le détournement par les bactéries de la vitamine B12 intraluminale avant son absorption par la muqueuse.[306] Les organismes anaérobies sont les principaux pourvoyeurs de la carence en vitamine B12 et seul un traitement dirigé contre les bactéries anaérobies peut entraîner la résolution de la carence en vitamine B12.[307] Contrairement aux bactéries aérobies, les bactéries anaérobies peuvent utiliser la vitamine B12 aussi bien sous forme libre que liée au FI.[308] Les bactéries anaérobies peuvent entraîner une carence en vitamine B12 en produisant des métabolites inactifs de la vitamine B12, les *cobamides*, qui peuvent être en compétition avec la vitamine B12 sur les récepteurs iléaux.[309]

9 Hypothèses et objectifs du travail

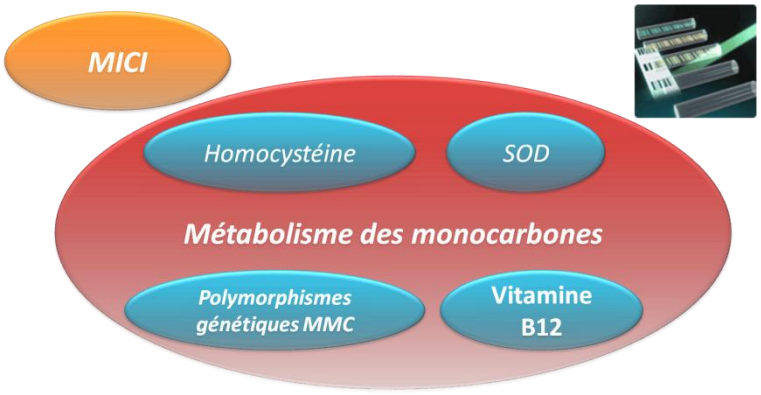
Les études en GWA ont suggéré que le polymorphisme du gène de la *fucosyltransférase 2* (*FUT2*) influençait le taux plasmatique de vitamine B12.[17-19] La famille des α-1,2-fucosyltransférases (dénommée aussi l'enzyme Se) catalyse l'addition du fucose — un désoxy-hexose— sur une liaison α-1,2 au galactose de type 1 et 2 pour former les antigènes H de types 1 et 2.[310] Le variant *FUT2* est un trait physiologique qui régule l'expression et la sécrétion des antigènes ABH dans les cellules épithéliales des glandes.[20] Environ, 20 % des caucasiens sont non-sécréteurs pour l'enzyme Se (Se-) et n'expriment pas les antigènes ABO dans la salive car ils sont homozygotes pour l'allèle muté *FUT2 461, A/A*.[20] Le statut sécréteur pour FUT2 a été impliqué dans la susceptibilité aux infections bactériennes telle que la gastrite à *H. pylori*[17] ou à l'infection par le virus Norwalk.[311] Au cours de la phase gastrique de l'absorption de la vitamine B12, le faible pH gastrique et la digestion acido-peptique permettent la libération de la cobalamine liée aux protéines alimentaires.[220-222] La gastrite chronique atrophique induite par *H. pylori* peut causer une perturbation de la sécrétion acido-peptique, qui à son tour peut causer une malabsorption de cobalamine.[222, 223] Dans l'**étude N°1**, nous avons évalué la distribution du polymorphisme *FUT2 461G>A* (rs601338) et son influence sur les marqueurs du métabolisme des monocarbones (vitamine B12, folate, homocystéine, et acide méthylmalonique) ainsi que la possible association entre l'infection par *H. pylori* et le polymorphisme *FUT2 461G>A* dans la population générale.



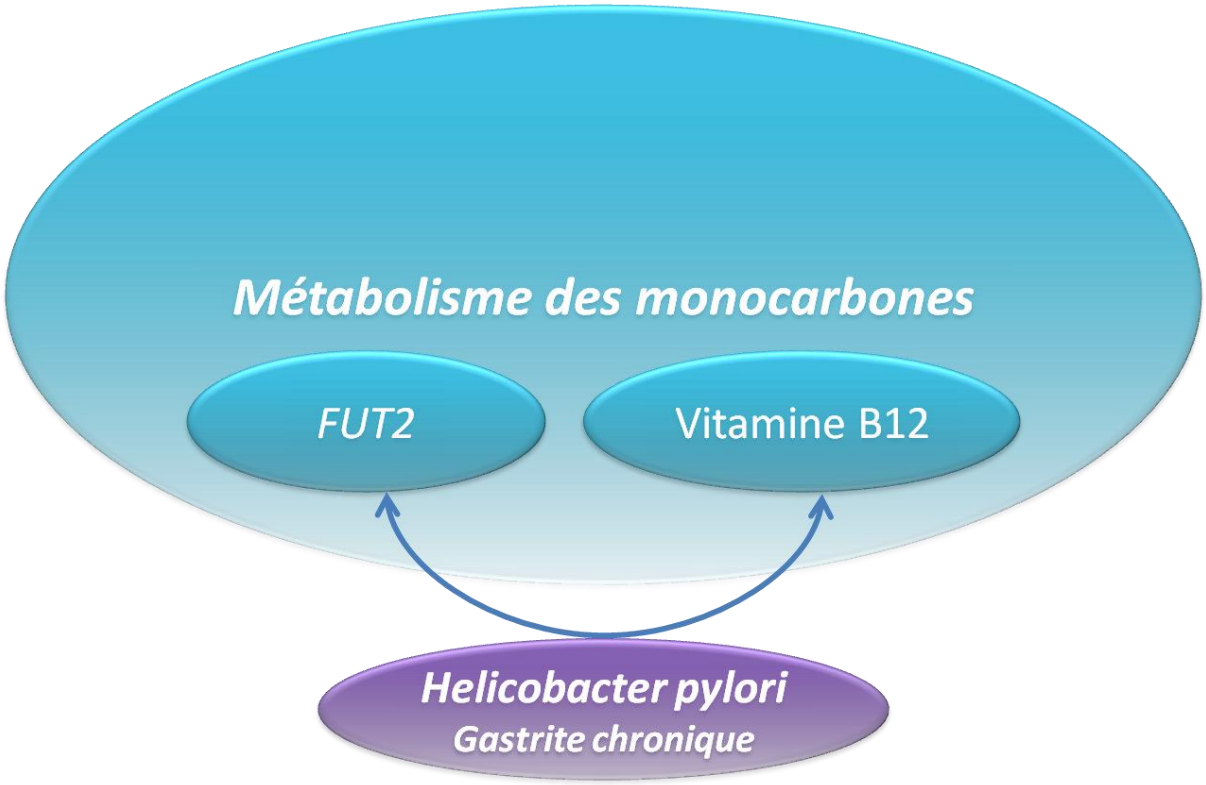
L'hyperhomocystéinémie est un marqueur de carence en donneurs de méthyle.[21] La MC est un facteur de risque de dénutrition et de carence en vitamine B12 et/ou en folates[294-302], responsable d'une hyperhomocystéinémie par altération de la reméthylation de l'homocystéine.[21] Plusieurs travaux ont évalué le taux plasmatique de l'homocystéine au cours des MICI avec des résultats mitigés. Par ailleurs, l'ampleur de l'association entre le métabolisme de l'homocystéine et les MICI est inconnue. En outre, l'association entre l'hyperhomocystéinémie et le risque de thrombose au cours des MICI reste controversée. Afin de répondre à ces problématiques, nous avons réalisé une revue systématique de la littérature avec une méta-analyse sur les études qui ont évalué le taux plasmatique d'homocystéine chez les patients avec une MICI. Les objectifs de la méta-analyses étaient les suivants : 1) la comparaison du taux plasmatique d'homocystéine entre les sujets MICI et les sujets témoins ; 2) l'évaluation du risque d'hyperhomocystéinémie chez les patients MICI en comparaisons aux témoins ; 3) l'évaluation de la relation entre l'hyperhomocystéinémie et le risque thromboembolique chez les sujets MICI ; et 4) l'évaluation de l'association entre le polymorphisme *MTHFR C677T* et le risque de MICI en fonction de la concentration plasmatique de folate (**étude N°2**).



Il a été démontré que les taux élevés d'homocystéine augmentaient le taux plasmatique de la SOD, un marqueur fiable et validé du stress oxydatif.[22, 23] Plusieurs études ont évalué le rôle de l'homocystéine dans la physiopathologie des MICI.[312] L'homocystéine agit comme un pro-oxydant[313] et a été incriminée dans la diminution de la capacité antioxydante chez les patients avec une MICI. [144] Par ailleurs, plusieurs travaux ont démontré l'implication du métabolisme des donneurs de méthyle dans le risque primaire[314] ou l'activité des MICI.[24, 25] Il a été récemment mis en évidence une association entre la sévérité de la MC, telle que mesurée par le *Crohn's disease activity index* (CDAI) et le taux plasmatique de SOD qui était influencée par un polymorphisme sur le gène de la méthionine synthase réductase (MTRR), une enzyme clé dans la reméthylation de l'homocystéine en méthionine.[24] Par ailleurs, il a été démontré qu'un statut carencé en donneur de méthyle aggravait la colite expérimentale au DSS (Dextran sodium sulfate) chez le rat.[25] Afin de réaliser une évaluation globale du métabolisme des monocarbones au cours de la MC, nous avons étudié le déterminisme de taux plasmatique de l'homocystéine, de la SOD, et de l'âge au diagnostic de la MC dans une étude d'association génomique sur une cohorte de 296 patients avec une MC en utilisant un plex de 384 SNP ayant permis un génotypage exhaustif des gènes impliqués dans le métabolisme des monocarbones (**étude N°3**).



10 **Publication N° 1 :** *Le statut sérologique de l'infection par Helicobacter pylori n'a aucune influence sur l'association entre le polymorphisme FUT2 461 G>A de la fucosyltransférase 2 et la vitamine B12 en Europe et en Afrique de l'Ouest*



10.1 Contexte de notre étude

La vitamine B12 est une vitamine hydrosoluble qui est nécessaire pour le métabolisme des monocarbones.[315] La cobalamine est retrouvée dans les aliments d'origine animale, la viande, le lait, les œufs, ainsi que les crustacés.[316] L'absorption de la vitamine B12 alimentaire et son transport vers les cellules représentent un processus complexe qui nécessite des protéines de liaison à la cobalamine, le facteur intrinsèque, l'*haptocorine* (anciennement dénommée, R-binder), la transcobalamine, ainsi que les récepteurs membranaires de ces différentes protéines.[315] La vitamine B12 est un cofacteur pour la reméthylation de l'homocystéine en méthionine par la méthionine synthase. Elle fait partie du métabolisme des monocarbones, essentiel pour la synthèse de la purine et de la thymidine qui sont nécessaires au maintien de l'intégrité du génome.[1] Des études d'association sur le génome entier ont suggéré que le taux plasmatique de vitamine B12 pouvait être influencé par des polymorphismes génétiques.[17-19] Hazra *et al.* ont démontré que les sujets homozygotes pour le SNP (*single nucleotid polymorphim,* en anglais) *fucosyltransférase 2* (*FUT2*, NG_007511.1, localisé sur le chromosome 19 en 19q13.3.) rs492602 G —en fort déséquilibre de liaison avec le SNP *FUT2* rs601338 [*461 G>A* (NM_000511) selon la nomenclature de la *Human Genome Variation Society*, connu aussi sous la dénomination *428 G>A*] variant allélique non sécréteur (W143X)— avaient un taux plasmatique de vitamine B12 plus élevé.[17] Il a été suggéré que l'association entre *FUT2* et un taux faible de vitamine B12 pouvait être la conséquence d'une susceptibilité accrue à l'infection par *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) chez les sujets sécréteurs pour *FUT2* en comparaison aux sujets non-sécréteurs.[18] Néanmoins, aucune étude à ce jour n'a évalué la relation entre le polymorphisme de *FUT2* et le statut sérologique de l'infection par *H. pylori*. Par ailleurs, les données relatives à l'influence du polymorphisme de *FUT2* sur le métabolisme des monocarbones ne sont pas connues et

aucune étude n'a évalué l'effet du polymorphisme de *FUT2* sur le taux plasmatique de la vitamine B12 en analyse multivariée.

Les buts de l'étude sont : (i) d'évaluer la distribution du polymorphisme *FUT2 461G>A* (rs601338) et d'évaluer son influence sur les marqueurs du métabolisme des monocarbones (vitamine B12, folate, homocystéine, et acide méthylmalonique) et (ii) d'étudier la possible association entre l'infection par *H. pylori* et le polymorphisme *FUT2 461G>A* dans la population générale.

10.2 Patients et méthodes

10.2.1 Populations étudiées

Entre janvier 1999 et décembre 2006, des sujets ambulatoires étaient inclus dans trois pays : Italie (cohorte OASI, Sicile[317]), Bénin (région urbaine côtière de Cotonou), et Togo (Lomé et Savane). Ces populations ont été décrites au préalable dans deux études publiées.[318, 319] Les sujets Italiens étaient considérés comme représentatifs du continent européen et ceux originaire du Bénin et du Togo étaient considérés comme originaire de l'Afrique de l'Ouest. L'approbation du comité d'éthique était obtenue auprès du comité d'éthique du centre médical de Troina (*Instituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico* (IRCCS), *the Oasi Maria Institute, Institute for Research on Mental Retardation*, Troina, Sicile, Italie), le centre hospitalo-universitaire de Nancy (Vandoeuvre-lès-Nancy, France), l'université du Bénin (Cotonou, Bénin), et l'université de Lomé (Lomé, Togo).[318-320] Un consentement éclairé était obtenu pour tous les participants. Tous les participants avaient bénéficié d'une évaluation clinique systématique permettant d'éliminer un cancer, une pathologie cardiovasculaire, rénale, hépatique, génétique ou toute supplémentation vitaminique antérieure à l'étude.

10.2.2 Prélèvements sanguins

Une phlébotomie était réalisée à jeun et le sang était collecté dans un tube EDTA. Les échantillons étaient centrifugés immédiatement à 2500g pendant 15 min à température ambiante. Les aliquots étaient conservés à une température de -70°C jusqu'à l'analyse.

10.2.3 Dosages de la vitamine B12, des folates, de l'homocystéine et de l'acide méthylmalonique

Tous les dosages étaient réalisés dans le même laboratoire (Vandoeuvre-lès-Nancy, France). L'homocystéine et l'acide méthylmalonique étaient dosés par chromatographie en phase liquide à haute performance (UPLC-MS/MS, *ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*) tel que rapporté précédemment[321] avec une colonne Acquity UPLC BEH C18 (1,7 µm, 2,1 × 50 mm) (Waters Corporation, Versailles, France). Le dosage de l'acide méthylmalonique était réalisé uniquement sur la population européenne. Les taux plasmatiques de vitamine B12 et de folate étaient dosés en utilisant des kits de dosage faisant appel à la chimiluminescence automatisée (Chiron Diagnostics ASC:180® Automated Chemiluminescence Systems; East Walpole, MA, USA). Les coefficients de variation intra-essai (reproductibilité) pour la vitamine B12, les folate, l'homocystéine, et l'acide méthylmalonique étaient respectivement de 2,8 %, 5,1 %, 4,5 % et 7,3 %.

10.2.4 Sérologie de l'infection par *Helicobacter pylori*

Les échantillons de sérum ont été testés pour la présence des anticorps IgG anti-*H. pylori* en utilisant la technique ELISA (Mastazyme™ Helicobacter; MAST DIAGNOSTIC,

Amiens, France) selon les recommandations du fabriquant. La classification du statut sérologique a été réalisée selon les recommandations du fabriquant.

10.2.5 Analyse de l'ADN génomique

L'ADN génomique a été isolé à partir des leucocytes du sang périphérique en utilisant un kit Qiagen (Qiagen-France, Courtaboeuf cedex France). Le génotypage du polymorphisme *FUT2 461G>A* (rs601338) a été réalisé par la technique FRET (*Fluorescence resonance energy transfer (FRET) real-time polymerase chain reaction (PCR)),* en utilisant un instrument LightCycler® 480 (Roche Molecular Biochemicals, Lyon, France). Les séquences ADN 5'-3' amorce 'sens' et 'anti-sens', la sonde d'hybridation, et la sonde d'ancrage utilisées pour le polymorphisme *FUT2 461G>A* étaient respectivement : AGATTCAAGCCATGTGGGAGTTA, CTTCCACACTTTTGGCATGAC, CCTGCTCCTACACCTTCTACC, et CCACCTCCGCCAGGAGATCCTC. La PCR était réalisée dans une plaque à 96 puits avec un volume total de 10 µL. La réaction finale contenait 10 ng d'ADN génomique, 0,5 µM de chacune des amorces 'sens' et 'anti-sens', 0,2 µM de chacune des sondes d'hybridation et d'ancrage (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Germany), et 2 µL LightCycler® 480 Genotyping Master (Kit pour 384 réactions). la PCR en temps réel pour le génotypage du polymorphisme *FUT2 461G>A* (rs601338) a été réalisée par dénaturation initiale à 95°C pendant 10 min, suivie de 45 cycles de 95°C pendant 10 sec, 59°C pendant 10 sec, et de 72°C pendant 20 sec. Afin de définir les points de fusion après la phase d'amplification, une courbe de fusion a été réalisée à 95°C pendant 20 sec et à 40°C pendant 20 sec, suivie par un chauffage à une vitesse de 0,2°C par seconde jusqu'à atteindre une température de 85°C.

10.2.6 Analyses statistiques

Toutes les variables quantitatives sont décrites en médiane et en intervalle interquartile (25e et 75e percentiles). Toutes les proportions et les fréquences génotypiques sont exprimées en pourcentages avec un IC 95 %. Les distributions génotypiques ont été testées pour l'équilibre de Hardy-Weinberg selon la méthode proposée par Rodriguez S, *et al.*[322] La comparaison des proportions a été réalisée par le test du Chi-deux ou par le test exact de Fisher, selon le cas. Toutes les corrélations ont été étudiées en utilisant le coefficient de corrélation de Spearman. La comparaison des taux plasmatiques de vitamine B12 (pmol/L), de folate (nmol/L), d'homocystéine (µmol/L), et d'acide méthylmalonique entre les différents génotypes du polymorphisme *FUT2 461 G>A* a été réalisée par le test de Kruskal-Wallis et les analyses post-hoc pour la comparaison des sous-groupes ont été réalisées avec le test de Conover.[323] Afin d'évaluer l'influence des caractéristiques de base et du polymorphisme *FUT2 461G>A* sur les taux plasmatiques de vitamine B12 (pmol/L), folate (nmol/L), homocystéine (µmol/L), et acide méthylmalonique (µmol/L), une analyse univariée a été réalisée par un test de corrélation de Spearman, un test *U* de Mann-Whitney, ou un test de Kruskal-Wallis, selon le cas. Tous les items significatifs en analyse univariée ont été intégrés dans un modèle de régression multiple en utilisant la méthode *stepwise*. Toutes les variables avec un $P < 0,1$ étaient intégrées dans le modèle et les variables avec un $P < 0,05$ étaient retenues dans le modèle. Tous les tests statistiques rapportés sont bilatéraux et les valeurs de $P < 0,05$ étaient considérées comme statistiquement significatives. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel MedCalc, version 11.4.4 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgique).

10.3 Résultats

10.3.1 Caractéristiques de base

Au total, 1282 sujets ambulatoires ont été inclus dans l'étude (Italie, n = 657 ; Afrique de l'Ouest, n = 625 dont 517 sujets du Bénin et 108 sujets du Togo). L'âge médian de la population étudiée était de 60 ans et les taux plasmatiques de vitamine B12 et de folate étaient dans les limites de la normale (**Tableau 1**). Les taux plasmatiques de vitamine B12 et de folate étaient significativement et inversement corrélés au taux d'homocystéine avec des coefficients *rho* respectifs de -0,259 (IC 95% : -0.310 à -0.206 ; $P < 0,0001$) et de 0,286 (IC 95 % : -0,336 à -0,233 ; $P < 0,0001$). Le taux plasmatique de la vitamine B12 était inversement corrélée avec celui de l'acide méthylmalonique (rho = -0,187 ; IC 95 % : -0,261 à -0,111 ; $P < 0,0001$). Le taux plasmatique de l'homocystéine était positivement corrélée avec celui de l'acide méthylmalonique (rho = 0,180 ; IC 95 % : 0,105 à 0,254 ; $P < 0,0001$). La prévalence de la positivité pour la sérologie d'*H. pylori* était plus élevée parmi les participants de l'Afrique de l'Ouest en comparaison aux sujets européens avec des proportions respectives de 92,1 % et 81,0 % ($P < 0,0001$) (**Tableau 1**).

10.3.2 Influence du statut sérologique de l'infection par *Helicobacter pylori* sur les marqueurs du métabolisme des monocarbones en Europe et en Afrique de l'Ouest

10.3.2.1 Population globale

En population globale, la sérologie positive pour *H. pylori* n'a pas réduit de façon significative le taux de vitamine B12 (**Tableau 1 supplémentaire**). Inversement, le taux plasmatique de folate était significativement plus élevé chez les sujets *H. pylori* négatifs (11,4 nmol/L ; IQR 25e – 75e, 8,5 à 15,9) en comparaison aux sujets *H. pylori* positifs (9,8 nmol/L ; IQR 25e – 75e, 6,7 à 13,9) ($P < 0,0001$) (**Tableau 1 supplémentaire**).

10.3.2.2 Europe

En Europe, les sujets présentant une sérologie *H. pylori* positive avaient un taux plasmatique de folate significativement inférieur (P = 0.03) et un taux d'acide méthylmalonique significativement supérieur (P = 0.0008) en comparaison aux sujets *H. pylori* négatifs. Les taux plasmatiques de vitamine B12 et d'homocystéine ne différaient pas significativement selon le statut sérologique pour *H. pylori* (**Tableau 1 supplémentaire**).

10.3.2.3 Afrique de l'Ouest

En Afrique de l'Ouest, le statut sérologie pour *H. pylori* n'influençait pas significativement les taux plasmatique de vitamine B12, de folate, d'homocystéine ou d'acide méthylmalonique (**Tableau 1 supplémentaire**).

10.3.3 Fréquences de distribution des génotypes du polymorphisme *FUT2 461 G>A*

La distribution des génotypes du polymorphisme *FUT2 461 G>A* dans les populations européenne et Ouest-Africaine est présentée dans le **Tableau 2**. La distribution du génotype *FUT2 461G>A* est consistante avec l'équilibre de Hardy-Weinberg (**Tableau 2 supplémentaire**). Le génotype *FUT2 461, G/G* (sauvage), était plus fréquent en Afrique de l'Ouest en comparaison à l'Europe (36,0 % versus 21,5 % ; P < 0,0001). Inversement, le génotype hétérozygote (*G/A*) était plus fréquent en Europe en comparaison à l'Afrique de l'Ouest avec des fréquences respectives de 52,0 % et 42,7 % (P = 0,001) (**Table 2**). La proportion du génotype *FUT2* non-sécréteur (*A/A*) ne différait pas significativement entre les populations Européenne (26,8 %) et Ouest-Africaine (21,2 %) (P = 0,0502) (**Table 2**). Il est intéressant de noter que la prévalence du phénotype sécréteur pour FUT2 —correspondant

aux génotypes *FUT2 461, G/G* et *G/A*— ne différait pas significativement entre les populations européenne (73,2 %) et Ouest-Africaine (78,8 %) (P = 0,0502) (**Table 2**).

10.3.4 Influence du polymorphisme *FUT2 461 G>A* sur le statut sérologique de l'infection par *Helicobacter pylori* en Europe et en Afrique de l'Ouest

Aussi bien en Europe qu'en Afrique de l'Ouest, la prévalence de la sérologie positive pour *H. pylori* ne différait pas selon les génotypes du polymorphisme *FUT2 461 G>A* (*P* = 0,21 ; *P* = 0,47 ; et *P* = 0,88 respectivement pour la population globale, l'Europe, et l'Afrique de l'Ouest) (**Tableau 3**). De façon consistante, la prévalence de la sérologie positive pour *H. pylori* ne différait entre les sujets de phénotype sécréteur et non-sécréteur pour FUT2 et ce aussi bien en population globale (*P* = 0,18) qu'en Europe (*P* = 0,27) et qu'en Afrique de l'Ouest (*P* = 0,80) (**Tableau 3**).

10.3.5 Influence du polymorphisme *FUT2 461 G>A* sur les marqueurs du métabolisme des monocarbones en Europe et en Afrique de l'Ouest

10.3.5.1 Analyse univariée

En population globale, le taux plasmatique de vitamine B12 était significativement influencé par le polymorphisme *FUT2 461 G>A* avec des taux médians de 310 pmol/L, 325 pmol/L, et 378 pmol/L chez les sujets *FUT2 461, G/G*, *G/A*, et *A/A* (*P* = 0,0007) (**Tableau 4 et Figure 1**). De façon consistante, l'effet du polymorphisme *FUT2 461 G>A* sur le taux plasmatique de vitamine B12 était observé aussi bien en Europe (*P* = 0,0009) qu'en Afrique de l'Ouest (*P* = 0,0015) (**Tableau 4 et Figure 1**). Chez les participants avec une sérologie positive pour *H. pylori*, le taux plasmatique de vitamine B12 était significativement influencé

par le polymorphisme *FUT2 461 G>A* dans la population globale (*P* = 0,0016), en Europe (*P* = 0,0017), et en Afrique de l'Ouest (*P* = 0,0040) (Tableau 5). Dans le groupe de participants avec une sérologie négative pour *H. pylori*, la puissance statistique liée à la faible taille de l'échantillon n'a permis l'évaluation de cette association que chez les sujets Européens. Dans ce sous-groupe européen négatif pour *H. pylori*, nous avons observé l'influence des allèles de *FUT2 461 G>A* sur le taux plasmatique de vitamine B12, en considérant les génotypes homozygotes avec des concentrations médianes de vitamine B12 de 247,8 pmol/L (IQR 25e – 75e : 181,8 à 299,0) et 323,5 pmol/L (IQR 25e – 75e : 196,9 à 423,6) respectivement pour les allèles *G* et *A* (*P* = 0.0063) (**Tableau 4**). Le taux plasmatique d'homocystéine était significativement associé au polymorphisme *FUT2 461 G>A* en Afrique de l'Ouest (P = 0,02) mais non en Europe (P = 0,21) (**Tableau 4**). Le taux plasmatique de l'acide méthylmalonique n'était pas influencé par le polymorphisme de *FUT2 461 G>A* dans la population européenne (**Tableau 4**).

Lorsque les marqueurs du métabolisme des monocarbones étaient étudiés en fonction du phénotype sécréteur de FUT2, seule la vitamine B12 était influencée, avec un taux plasmatique significativement supérieur dans le groupe 'FUT2 non-sécréteur' en comparaison au groupe 'FUT2 sécréteur' et ce aussi bien en population globale (*P* = 0,0004) qu'en Europe (*P* = 0,0005) et en Afrique de l'Ouest (*P* = 0,0092) (**Tableau 3 supplémentaire**).

10.3.5.2 Analyse multivariée

10.3.5.2.1 Facteurs prédictifs du taux plasmatique de vitamine B12

En analyse par régression multiple, le génotype *FUT2 461, G/G* était indépendamment et négativement associé au taux plasmatique de vitamine B12 dans la population globale (**β**

coefficient = -52,9 ; Erreur standard = 17,3 ; *P* = 0,0023), en Europe (**β** coefficient = -46,8 ; Erreur standard = 22,1 ; *P* = 0,036), et en Afrique de l'Ouest (**β** coefficient = -267,5 ; Erreur standard = 118,2 ; *P* = 0,024) (**Tableau 6**). De façon consistante, lorsque l'item 'Génotype *FUT2 461 G/G* ou *G/A*' était considéré dans le modèle de régression —ce qui correspond au phénotype 'FUT2 sécréteur'— il était indépendamment et négativement associé au taux plasmatique de vitamine B12 dans la population globale (**β** coefficient = -53,8 ; Erreur standard = 16,3 ; *P* = 0,0009) ainsi que dans les populations européenne (**β** coefficient = -43,6 ; Erreur standard = 18,9 ; *P* = 0,0215) et Ouest-Africaine (**β** coefficient = -73.1 ; Erreur standard = 29,2, *P* = 0,0128) (**Tableau 4 supplémentaire**). La sérologie positive pour *H. pylori* n'était pas un facteur prédictif indépendant du taux plasmatique de vitamine B12 dans la population globale aussi bien qu'en Europe et en Afrique de l'Ouest (**Tableau 6**). L'âge était indépendamment et négativement associé au taux plasmatique de vitamine B12 dans la population globale (**Tableau 6**). Le sexe masculin était indépendamment et négativement associé au taux plasmatique de vitamine B12 dans la population globale ainsi qu'en Europe et en Afrique (**Tableau 6**).

10.3.5.2.2 Facteurs prédictifs du taux plasmatique de folate

En analyse par régression multiple, le polymorphisme *FUT2 461 G>A* n'était pas un facteur prédictif indépendant du taux plasmatique de folate en Europe ou en Afrique de l'Ouest. La sérologie positive pour *H. pylori* était indépendamment et négativement associée au taux plasmatique de folate en Europe (**β** coefficient = -1,5 ; Erreur standard = 0.7 ; *P* = 0,024) mais pas en Afrique de l'Ouest (**Tableau 5 supplémentaire**). Le sexe masculin était indépendamment et négativement associé au taux plasmatique de folate dans la population globale (**β** coefficient = -2,7 ; Erreur standard = 0,5 ; *P* < 0,0001) et en Europe (**β** coefficient =

-3,1 ; Erreur standard = 0,6 ; $P < 0,0001$). L'âge était un facteur prédictif positif indépendant du taux plasmatique de folate en Europe seulement (**Tableau 5 supplémentaire**).

10.3.5.2.3 Facteurs prédictifs du taux plasmatique de l'homocystéine

Le génotype *FUT2 461, G/G* était négativement et indépendamment associé au taux plasmatique de l'homocystéine en Afrique de l'Ouest mais pas en Europe (Tableau 7). Lorsque l'item 'Génotype *FUT2 461 G/G* ou *G/A*' était considéré dans le modèle de régression —ce qui correspond au phénotype 'FUT2 sécréteur'— il n'était pas indépendamment associé au taux plasmatique de l'homocystéine (**Tableau 6 supplémentaire**). La sérologie positive pour *H. pylori* n'était pas un facteur prédictif indépendant du taux plasmatique de l'homocystéine. Le taux plasmatique de folate était indépendamment et négativement associé au taux plasmatique de l'homocystéine en population globale (**β** coefficient = -0,30 ; Erreur standard = 0,05 ; $P < 0,0001$), en Europe et en Afrique de l'Ouest (**Tableau 7**). Le taux plasmatique de vitamine B12 était indépendamment et négativement associé au taux plasmatique de l'homocystéine en population globale (**β** coefficient = -0,006 ; Erreur standard = 0,001 ; $P = 0,0002$), en Europe, et en Afrique de l'Ouest (**Tableau 7**). L'âge était un facteur prédictif positif indépendant du taux plasmatique de l'homocystéine en Europe (**β** coefficient = 0,19, Erreur standard = 0,04 ; $P < 0,0001$) mais pas en Afrique de l'Ouest (**Tableau 7**). Le sexe masculin était indépendamment et positivement associé au taux plasmatique d'homocystéine dans la population globale (**β** coefficient = 3,37 ; Erreur standard = 0,75 ; $P < 0,0001$) ainsi qu'en Europe et en Afrique de l'Ouest (**Tableau 7**).

10.3.5.2.4 Facteurs prédictifs du taux plasmatique de l'acide méthylmalonique

La sérologie positive pour *H. pylori*, les taux plasmatique de vitamine B12 et de folate ainsi que l'âge étaient les quatre facteurs prédictifs indépendants du taux plasmatique d'acide méthylmalonique dans la population Européenne. Le taux plasmatique de l'acide méthylmalonique n'a pas été évalué dans la population Ouest-Africaine (**Tableau 7 supplémentaire**).

10.4 Discussion

La présente étude, réalisée sur des sujets ambulatoires de la population générale en Europe et en Afrique de l'Ouest a démontré que le polymorphisme *FUT2 461 G>A* était un facteur prédictif indépendant du taux plasmatique de vitamine B12. Ces résultats sont consistants avec ceux de deux études d'associations pangénomiques menées sur des populations caucasiennes.[18, 19] La famille des α-1,2-fucosyltransférases (dénommée aussi l'enzyme Se) catalyse l'addition du fucose —un désoxy-hexose— sur une liaison α-1,2 au galactose de type 1 et 2 pour former les antigènes H de types 1 et 2.[310] Le variant *FUT2* est un trait physiologique qui régule l'expression et la sécrétion des antigènes ABH dans les cellules épithéliales des glandes.[20] Environ, 20 % des caucasiens sont non-sécréteurs pour l'enzyme Se (Se-) et n'expriment pas les antigènes ABO dans la salive car ils sont homozygotes pour l'allèle muté *FUT2 461, A/A*.[20] Chez les européens, les africains, et les iraniens, le variant non-sécréteur de *FUT2* était associé à une concentration plasmatique de vitamine B12 plus élevée que celle observée chez les sujets porteurs du variant sécréteur de *FUT2*.[18, 20]

Hazra *et al.* ont démontré que les femmes caucasiennes homozygote pour l'allèle *G* du rs492602 —en fort déséquilibre de liaison avec le rs601338— était associé à un taux plus

élevé de vitamine B12.[17] Dans la présente étude nous avons réalisé le génotypage direct du rs601338 et avons démontré que celui-ci était en association avec le taux plasmatique de la vitamine B12 chez 1282 sujets ambulatoires européens et Ouest-Africains, deux zones avec une prévalence contrastée de l'infection par *H. pylori*. Il a été suggéré que la concentration réduite de vitamine B12 chez les sujets de phénotype 'FUT2 sécréteur' était la conséquence d'une susceptibilité accrue pour l'infection par *H. pylori* en comparaison aux sujets avec un phénotype 'FUT2 non-sécréteur'.[18] En effet, les souris *knockout* pour *FUT2* présentent une altération de leur profil de glycosylation et une altération de l'adhésion d'*H. pylori* à la muqueuse gastrique. [324] Par ailleurs, dans une étude prospective sur 304 sujets infectés par *H. pylori*, Azevedo *et al.* ont démontré que le phénotype 'FUT2 sécréteur' était associé à l'infection par *H. pylori* ainsi qu'à la sévérité des lésions gastriques induites par *H. pylori*.[325]

Au cours de la phase gastrique de l'absorption de la vitamine B12, le faible pH gastrique et la digestion acido-peptique permettent la libération de la cobalamine liée aux protéines alimentaires.[220-222] La gastrite chronique atrophique induite par *H. pylori* peut causer une perturbation de la sécrétion acido-peptique, qui à son tour peut causer une malabsorption de cobalamine.[222, 223] Ceci a été suggéré par une étude menée au sein de la population Finnoise qui a reporté une prévalence élevée de l'infection par *H. pylori* parmi les patients présentant une atrophie gastrique et un statut carencé en vitamine B12.[269] Néanmoins, dans une étude cas-témoins, Settin *et al.* ont évalué les marqueurs du métabolisme des monocarbones chez 90 sujets sains dont 69 avec une sérologie positive pour *H. pylori* et n'avaient pas mis en évidence une influence de la sérologie d'*H. pylori* sur le statut vitaminique B.[326] De façon similaire, dans notre étude ayant porté sur des sujets ambulatoires sans pathologie digestive rapportée, le taux plasmatique de vitamine B12 n'était pas influence par le statut sérologie pour *H. pylori* aussi bien en analyse univariée qu'en analyse multivariée. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'un statut sérologique positif pour *H. pylori*

n'implique pas nécessairement la présence d'une gastrite chronique atrophique. En effet, dans une large étude prospective de cohorte menée au sein de la population allemande, parmi les sujets présentant une sérologie positive pour *H. pylori*, seuls 2,7 % avaient développé une gastrite chronique atrophique après 5 ans de suivi.[327]

A notre connaissance, notre étude est la première à avoir examiné l'influence du polymorphisme de *FUT2* sur le statut sérologique de l'infection par *H. pylori*. Il est intéressant de noter que le polymorphisme *FUT2 461 G>A* aussi bien que le phénotype 'FUT2 sécréteur' n'étaient tous les deux pas prédictifs d'une sérologie positive pour *H. pylori*. Par ailleurs, le génotype *FUT2 461, G/G* était un facteur prédictif indépendant du taux plasmatique de vitamine B12 chez les sujets *H. pylori* positifs mais aussi chez les sujets *H. pylori* négatifs, du moins au sein de la population européenne. Il peut être supposé que les sujets ayant une sérologie négative pour *H. pylori* n'ont pas de contact avec *H. pylori*. Par conséquent, une partie de l'influence du polymorphisme de *FUT2* sur le taux plasmatique de la vitamine B12 peut être indépendante de l'infection par *H. pylori*. En effet, une hypothèse alternative pourrait être que la concentration réduite en vitamine B12 chez les sujets présentant un phénotype 'FUT2 sécréteur' puisse résulter en partie de l'influence de *FUT2* sur des mécanismes impliqués dans l'absorption ou le transport de la vitamine B12. Ceci devrait être investigué dans des modèles expérimentaux.

Il est intéressant de souligner que similairement à notre étude, dans le travail rapporté par Hazra *et al.* le taux de vitamine B12, influencé par le polymorphisme *FUT2* rs601338, restait dans les limites de la normale dans chacun des trois génotypes.[17] Ainsi, même si le polymorphisme de *FUT2* est impliqué dans la variation du taux plasmatique de la vitamine B12, il n'est pas pour autant un facteur prédictif de carence en vitamine B12. En effet, dans notre étude, le polymorphisme de *FUT2* n'avait pas d'effet sur l'augmentation du taux

plasmatique d'acide méthylmalonique dans les deux populations étudiées et avait un faible effet sur l'homocystéine dans la population d'Afrique de l'Ouest seulement. La concentration élevée de vitamine B12 observée chez les participants d'Afrique de l'Ouest, en comparaison aux européens, n'était probablement pas liée à des facteurs environnementaux, cette différence ayant été préalablement observée entre des caucasiens et des africains vivant au Royaume-Uni. [328] Parmi les facteurs génétiques potentiels pouvant expliquer cette différence, on peut supposer que le polymorphisme de *FUT2* pourrait avoir une influence limitée vu que la proportion des sujets avec un phénotype 'FUT2 non-sécréteur' —correspondant au génotype *FUT2 461, A/A*— était similaire dans les deux populations rapportées dans la présente étude. De plus, le statut sérologique pour *H. pylori* n'était pas un facteur contributif et n'était pas un facteur prédictif du statut en vitamine B12 dans les deux populations.

En conclusion, la présente étude est la première à être menée au sein de la population générale et qui a évalué l'influence du statut sérologique sur l'association entre le polymorphisme *FUT2 461 G>A* et le taux plasmatique de vitamine B12. Dans la présente étude, le statut sérologique de l'infection par *H. Pylori* n'avait pas d'influence sur cette association, suggérant l'implication d'autres mécanismes de *FUT2*, en plus de son effet potentiel sur la gastrite à *H. pylori*, du moins chez les sujets européens et Ouest-Africains.

10.5 Tableaux

Tableau 1. Caractéristiques des 1282 sujets sains inclus dans l'étude

Régions géographiques	***Vitamine B12 (pmol/L)***		
	N	**Médiane**	**IQR, 25e – 75e**
Population globale	1226	**345,0**	239,0 à 500,0
Europe	650	**297,0**	209,1 à 401,2
Afrique de l'Ouest	576	**418,0**	293,1 à 589,5
P-value Europe vs. Afrique de l'Ouest		< 0.0001[a]	
Régions géographiques	***Folate (nmol/L)***		
	N	**Médiane**	**IQR, 25e – 75e**
Population globale	1225	**10,0**	6,8 à 14,0
Europe	648	**12,0**	8,8 à 15,8
Afrique de l'Ouest	577	**7,7**	5,4 à 11,5
P-value Europe vs. Afrique de l'Ouest		< 0.0001[a]	
Régions géographiques	***Homocystéine (µmol/L)***		
	N	**Médiane**	**IQR, 25e – 75e**
Population globale	1278	**14,3**	11,4 à 18,7
Europe	654	**14,4**	11,8 à 18,1
Afrique de l'Ouest	624	**14,1**	10,7 à 19,4
P-value Europe vs. Afrique de l'Ouest		0.11[a]	
Régions géographiques	***Acide méthylmalonique (µmol/l)***		
	N	**Médiane**	**IQR, 25e – 75e**
Europe	648	**0,205**	0,135 à 0,298
Afrique de l'Ouest	0		
	Sérologie positive pour Helicobacter pylori		
	N	**%**	**IC 95 %**
Population globale	1036	**85,1**	83,0 à 87,3
Europe	654	**81,0**	78,0 à 84,1
Afrique de l'Ouest	382	**92,1**	89,4 à 94,9
P-value Europe vs. Afrique de l'Ouest		< 0.0001[b]	
Régions géographiques	***Sexe masculin***		
	N	**%**	**IC 95 %**
Population globale (*n=1280*)	683	**53,4**	50,6 à 56,1
Europe (*n=657*)	262	**39,9**	36,1 à 43,6
Afrique de l'Ouest (*n=623*)	421	**67,6**	63,9 à 71,3
P-value Europe vs. Afrique de l'Ouest		< 0,0001[b]	

NOTE. N: nombre de sujets ; IC 95 % : intervalle de confiance à 95 % ; IQR: intervalle interquartile.

[a] Test *U* de Mann-Whitney ;

[b] Test du chi-deux.

Tableau 2. Distribution du polymorphisme *FUT2 461 G>A* et du statut sécréteur de FUT2 selon la région géographique

Régions géographiques	**Nombre de sujets**	**Comptes génotypiques**								
		FUT2 461, G/G			***FUT2 461, G/A***			***FUT2 461, A/A***		
		n	**%**	**IC 95 %**	**n**	**%**	**IC 95 %**	**n**	**%**	**IC 95 %**
Population globale	1047	282	**26,9**	24,2 à 29,6	507	**48,4**	45,4 à 51,5	258	**24,6**	22,0 à 27,3
Europe	642	136	**21,2**	18,0 à 24,4	334	**52,0**	48,2 à 55,9	172	**26,8**	23,4 à 30,2
Afrique de l'Ouest	405	146	**36,0**	31,4 à 40,7	173	**42,7**	37,9 à 47,6	86	**21,2**	17,2 à 25,2
P-value Europe vs. Afrique de l'Ouest		<0,0001[a]			0,0014[a]			0,0502[a]		
		Statut sécréteur de FUT2 (G/G ou G/A)						***Statut non-sécréteur de FUT2 (A/A)***		
		n	**%**	**IC 95 %**				**n**	**%**	**IC 95 %**
Population globale	1047	789	75,4	72,7 à 78,0				258	**24,6**	22,0 à 27,3
Europe	642	470	73,2	69,8 à 76,6				172	**26,8**	23,4 à 30,2
Afrique de l'Ouest	405	319	78,8	74,8 à 82,8				86	**21,2**	17,2 à 25,2
P-value Europe vs. Afrique de l'Ouest		0,0502[a]						0,0502[a]		

NOTE. IC 95 % : intervalle de confiance à 95 % ; *FUT2*: *Fucosyltransférase 2*.

[a] Test du chi-deux.

Tableau 3. Prévalence de la sérologie positive pour *Helicobacter pylori* selon le polymorphisme *FUT2 461 G>A* ou le statut sécréteur de FUT2

Régions géographiques	***FUT2 461, G/G***				***FUT2 461, G/A***				***FUT2 461, A/A***				***P*-value**
	N	***Hp +, n***	**%**	**IC 95 %**	**N**	***Hp +, n***	**%**	**IC 95 %**	**N**	***Hp +, n***	**%**	**IC 95 %**	
Population globale	259	229	**88,4**	84,5 à 92,3	475	407	**85,7**	82,5 à 88,8	239	198	**82,8**	78,0 à 87,7	0,2068[a]
Europe	134	112	**83,6**	77,2 à 89,9	325	269	**82,8**	78,6 à 86,9	170	134	**78,8**	72,6 à 85,0	0,4712[a]
Afrique de l'Ouest	125	117	**93,6**	89,2 à 98,0	150	138	**92,0**	87,6 à 96,4	69	64	**92,8**	86,5 à 99,0	0,8785[a]
	Statut sécréteur de FUT2 (G/G ou G/A)								***Statut non-sécréteur de FUT2 (A/A)***				***P*-value**
	N	***Hp +, n***	**%**	**IC 95 %**					**N**	***Hp +, n***	**%**	**IC 95 %**	
Population globale	734	636	**86,6**	84,2 à 89,1					239	198	**82,8**	78,0 à 87,7	0,1761[a]
Europe	459	381	**83,0**	79,6 à 86,5					170	134	**78,8**	72,6 à 85,0	0,2744[a]
Afrique de l'Ouest	275	255	**92,7**	89,6 à 95,8					69	64	**92,8**	86,5 à 99,0	0,8012[a]

NOTE. FUT2: *Fucosyltransférase 2* ; N: nombre de sujets ; *Hp +, n* : nombre de sujets avec une sérologie *Helicobacter pylori* positive.

[a] Test du chi-deux.

Tableau 4. Comparaison du taux plasmatique de la vitamine B12, des folates, de l'homocystéine, et de l'acide méthylmalonique selon le polymorphisme *FUT2 461 G>A*

Marqueurs du métabolisme des monocarbones	Régions géographiques	*FUT2 461, G/G*			*FUT2 461, G/A*			*FUT2 461, A/A*			
		N	Médiane	IQR, 25e – 75e	N	Médiane	IQR, 25e – 75e	N	Médiane	IQR, 25e – 75e	*P*-value
Vitamine B12 (pmol/L)	Population globale	257	**310,0**	223,0 à 420,3	488	**324,5**	222,2 à 469,9	249	**378,3**	250,0 à 516,0	0,0007[a]
	Europe	134	**270,0**	191,0 à 374,0	332	**283,4**	199,9 à 394,4	170	**345,5**	231,1 à 443,2	0,0009[a]
	Afrique de l'Ouest	123	**382,0**	263,8 à 505,5	156	**443,5**	309,5 à 580,0	79	**486,0**	328,3 à 645,0	0,0015[a]
Folates (nmol/L)	Population globale	256	**8,7**	5,8 à 12,4	488	**10,7**	7,1 à 14,2	249	**10,0**	6,8 à 14,4	0,0001[a]
	Europe	132	**11,0**	8,6 à 14,4	332	**12,2**	9,4 à 15,9	170	**11,7**	8,3 à 16,3	0,1351[a]
	Afrique de l'Ouest	124	**6,0**	4,1 à 8,7	156	**6,7**	5,1 à 10,4	79	**7,4**	5,0 à 10,3	0,0986[a]
Homocystéine (µmol/L)	Population globale	281	**15,0**	12,1 à 19,3	505	**14,2**	11,3 à 17,9	258	**14,8**	12,2 à 19,7	0,0054[a]
	Europe	136	**14,8**	12,3 à 17,5	332	**14,2**	11,6 à 17,9	172	**14,6**	12,1 à 19,7	0,2068[a]
	Afrique de l'Ouest	145	**15,8**	11,9 à 21,8	173	**14,1**	10,9 à 18,2	86	**15,1**	12,3 à 20,7	0,0148[a]
Acide méthylmalonique (µmol/l)	Europe	134	**0,202**	0,112 à 0,296	329	**0,204**	0,133 à 0,297	170	**0,205**	0,141 à 0,305	0,6129[a]
	Afrique de l'Ouest	0			0			0			

NOTE. N: nombre de sujets ; IQR: intervalle interquartile ; *FUT2*: *Fucosyltransférase 2*;

[a] Test de Kruskal-Wallis.

Tableau 5. Influence du polymorphisme *FUT2 461 G>A* sur le taux plasmatique de la vitamine B12 selon le statut sérologique de l'infection par Helicobacter pylori

Sérologie *Helicobacter pylori* positive										
	FUT2 461, G/G			***FUT2 461, G/A***			***FUT2 461, A/A***			
Régions géographiques	**N**	**Médiane**	**IQR, 25e – 75e**	**N**	**Médiane**	**IQR, 25e – 75e**	**N**	**Médiane**	**IQR, 25e – 75e**	***P-value***
Population globale	206	**316,0**	225,0 à 439,0	395	**321,6**	230,7 à 460,0	192	**384,1**	253,1 à 520,5	0,0016[a]
Europe	112	**273,3**	209,3 à 377,5	269	**282,9**	200,8 à 386,3	134	**349,5**	239,0 à 447,0	0,0017[a]
Afrique de l'Ouest	94	**383,0**	268,0 à 514,0	126	**450,5**	314,0 à 579,0	58	**489,0**	340,0 à 665,0	0,0040[a]
Sérologie *Helicobacter pylori* négative										
	FUT2 461, G/G			***FUT2 461, G/A***			***FUT2 461, A/A***			
Régions géographiques	**N**	**Médiane**	**IQR, 25e – 75e**	**N**	**Médiane**	**IQR, 25e – 75e**	**N**	**Médiane**	**IQR, 25e – 75e**	***P-value***
Population globale	30	**258,7**	191,0 à 345,0	66	**331,7**	203,6 à 514,6	41	**341,0**	222,7 à 450,7	[b]
Europe	22	**247,8**	181,8 à 299,0	56	**319,4**	194,5 à 474,9	36	**323,5**	196,9 à 423,6	[b]
Afrique de l'Ouest	8	**376,0**	281,5 à 669,5	10	**403,0**	312,0 à 586,0	5	**553,0**	326,0 à 734,5	[b]

NOTE. N: nombre de sujets ; IQR: intervalle interquartile ; *FUT2*: *Fucosyltransférase 2*;

[a] Test de Kruskal-Wallis.

[b] *P*-value non calculable du fait de la faible taille de l'échantillon.

Tableau 6. Facteurs prédictifs indépendants du taux plasmatique de vitamine B12

	***P*-value, Analyse univariée**	***P*-value, Analyse multivariée[d]**	**Coefficient (β)**	**Erreur standard**
	Population globale			
FUT2 461G>A	0,0007[a]	0,0023[e]	-52,93[e]	17,30[e]
Sérologie *Hp* positive	0,0500[b]	–	–	–
Age (années)	<0,0001[c]	<0,0001	-3,40	0,44
Sexe masculin	0,0035[b]	0,0003	-56,66	15,55
	Europe			
FUT2 461G>A	0,0009[a]	0,0363[e]	-46,79[e]	22,31[e]
Sérologie *Hp* positive	0,2613[b]	–	–	–
Age (années)	0,0369 [c]	Non retenu[f]	–	–
Sexe masculin	<0,0001[b]	0,0017	-58,45	18,54
	Afrique de l'Ouest			
FUT2 461G>A	0,0015[a]	0,0242[e]	-267,45[e]	118,18[e]
Sérologie *Hp* positive	0,7410[b]	–	–	–
Age (années)	0,7829[c]	–	–	–
Sexe masculin	<0,0001[b]	0,0354	-258,40	122,40

NOTE. *FUT2* : *Fucosyltransférase 2* ; Hp : *Helicobacter pylori*.

[a] Test de Kruskal-Wallis ;

[b] Test *U* de Mann-Whitney ;

[c] Coefficient de corrélation de Spearman ;

[d] Analyse par régression multiple (méthode *stepwise*) ;

[e] Pour le génotype *FUT2 461, G/G* ;

[f] Item non retenu dans le modèle de régression multiple.

Tableau 7. Facteurs prédictifs indépendants du taux plasmatique de l'homocystéine

	***P*-value, Analyse univariée**	***P*-value, Analyse multivariée[d]**	**Coefficient (β)**	**Erreur standard**
	Population globale			
FUT2 461G>A	0,0054[a]	0,0226[e]	1,92[e]	0,84[e]
Sérologie *Hp* positive	0,4340[b]	–	–	–
Folates (nmol/L)	<0,0001[c]	<0,0001	-0,30	0,05
Vitamine B12 (pmol/L)	<0,0001[c]	0,0002	-0,01	0,002
Age (années)	<0,0001[c]	Non retenu[f]	–	–
Sexe masculin	< 0,0001[b]	<0,0001	3,37	0,75
	Europe			
FUT2 461G>A	0,2068[a]	–	–	–
Sérologie *Hp* positive	0,0591[b]	–	–	–
Folates (nmol/L)	<0,0001[c]	<0,0001	-0,15	0,04
Vitamine B12 (pmol/L)	<0,0001[c]	<0,0001	-0,01	0,001
Age (années)	<0,0001[c]	<0,0001	0,19	0,036
Sexe masculin	0,0002[b]	0,0006	1,76	0,51
	Afrique de l'Ouest			
FUT2 461G>A	0,0148[c]	0,0496[e]	3,71[e]	1,88[e]
Sérologie *Hp* positive	0,3047[b]	–	–	–
Folates (nmol/L)	<0,0001[c]	<0,0001	-0,65	0,15
Vitamine B12 (pmol/L)	<0,0001[c]	0,0161	-0,01	0,004
Age (années)	0,0127[c]	Non retenu[f]	–	–
Sexe masculin	< 0,0001[b]	0,0065	5,44	1,99

NOTE. *FUT2* : *Fucosyltransférase 2* ; Hp : *Helicobacter pylori*.

[a] Test de Kruskal-Wallis ;

[b] Test *U* de Mann-Whitney ;

[c] Coefficient de corrélation de Spearman ;

[d] Analyse par régression multiple (méthode *stepwise*) ;

[e] Pour le génotype *FUT2 461, G/G* ;

[f] Item non retenu dans le modèle de régression multiple.

10.6 Figures

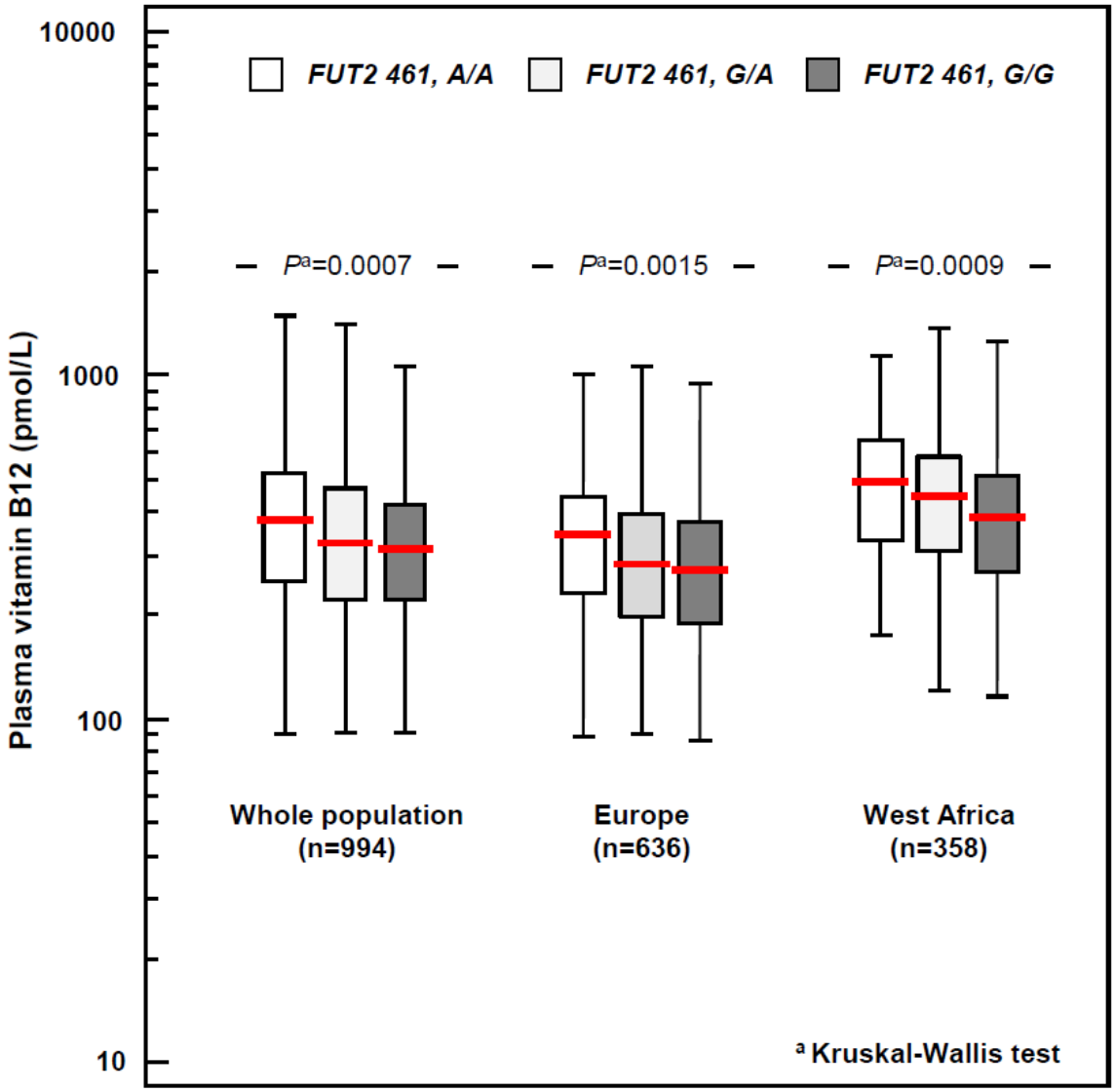


Figure 1. Taux plasmatique de vitamine B12 selon le polymorphisme *FUT2 461 G>A* eu Europe et en Afrique de l'Ouest (population globale, n = 994 ; Europe, n = 363 ; Afrique de l'Ouest, n = 358).

[a] Test de Kruskal-Wallis.

10.7 Tableaux supplémentaires

Tableau 1 Supplémentaire. Influence du statut sérologique de l'infection par Helicobacter pylori sur les marqueurs du métabolisme des monocarbones dans les populations européennes et ouest-africaines.

Marqueur du métabolisme des monocarbones	Sérologie Helicobacter pylori négative			Sérologie Helicobacter pylori positive			
	Population globale						
	N	**Médiane**	**IQR, 25th – 75th**	**N**	**Médiane**	**IQR, 25e – 75e**	***P*-value[a]**
Vitamine B12	143	306,0	198,9 à 436,3	807	338,0	239,0 à 468,1	0,0500[b]
Folates	143	11,4	8,5 à 15,9	808	9,8	6,7 à 13,9	0,0001[b]
Homocystéine	144	14,6	11,9 à 19,0	844	14,3	11,6 à 18,0	0,4340[b]
Acide méthylmalonique	–	–	–	–	–	–	–
	Europe						
	N	**Médiane**	**IQR, 25th – 75th**	**N**	**Médiane**	**IQR, 25e – 75e**	***P*-value[a]**
Vitamine B12	119	281,3	188,0 à 398,4	524	298,5	216,0 à 402,3	0,2613[b]
Folates	119	12,8	9,8 à 16,5	524	11,6	8,6 à 15,5	0,0293[b]
Homocystéine	118	14,6	12,0 à 19,2	519	14,1	11,600 à 17,0	0,0591[b]
Acide méthylmalonique	117	0,237	0,153 à 0,394	519	0,195	0,132 à 0,283	0,0008[b]
	Afrique de l'Ouest						
	N	**Médiane**	**IQR, 25th – 75th**	**N**	**Médiane**	**IQR, 25e – 75e**	***P*-value[a]**
Vitamine B12	24	412,5	313,0 à 631,5	283	428,0	297,0 à 569,3	0,7410[b]
Folates	24	7,1	5,3 à 8,9	284	6,5	4,8 à 9,1	0,4528[b]
Homocystéine	26	12,9	11,3 à 17,1	325	14,8	11,7 à 19,8	0,3047[b]
Acide méthylmalonique	0	–	–	0	–	–	–

NOTE. N: nombre de sujets ; IQR: intervalle interquartile.

[a] Sérologie *Helicobacter pylori* négative vs. positive ; [b] Test *U* de Mann-Whitney.

Tableau 2 Supplémentaire. Equilibre de Hardy–Weinberg pour le polymorphisme *FUT2 461 G>A*

Equilibre de Hardy–Weinberg pour le polymorphisme *FUT2 461 G>A*		
Génotypes	Fréquences observées (%)	Fréquences attendues (%)
Homozygote, référence	26,9	26,1
Hétérozygote	48,4	49,9
Homozygote variant	24,6	23,8
Chi-deux	0,093036499	
Test Chi-deux, *P*-value	0,760352	

Tableau 3 Supplémentaire. Comparaison des taux plasmatiques de vitamine B12, des folates, de l'homocystéine, et de l'acide méthylmalonique en fonction du statut sécréteur de FUT2

Marqueurs du métabolisme des monocarbones	Régions géographiques	Phénotype FUT2 non-sécréteur			Phénotype FUT2 sécréteur			*P*-value
		N	Médiane	IQR, 25e – 75e	N	Médiane	IQR, 25e – 75e	
Vitamine B12 (pmol/L)	Population globale	249	378,3	250,0 à 516,0	745	318,2	222,9 à 455,8	0,0004[a]
	Europe	170	345,5	231,1 à 443,2	466	280,2	199,3 à 386,0	0,0005[a]
	Afrique de l'Ouest	79	486,0	328,3 à 645,0	279	403,0	287,3 à 542,5	0,0092[a]
Folates (nmol/L)	Population globale	249	10,0	6,8 à 14,4	744	10,0	6,7 à 13,9	0,5682[a]
	Europe	170	11,7	8,3 à 16,3	464	11,9	9,0 à 15,4	0,7084[a]
	Afrique de l'Ouest	79	7,4	5,0 à 10,3	280	6,5	4,7 à 9,5	0,2705[a]
Homocystéine (mmol/L)	Population globale	258	14,8	12,2 à 19,7	786	14,5	11,6 à 18,5	0,1037[a]
	Europe	172	14,6	12,0 à 19,7	468	14,4	11,8 à 17,8	0,1316[a]
	Afrique de l'Ouest	86	15,1	12,3 à 20,7	318	14,6	11,5 à 19,8	0,3965[a]
Acide méthylmalonique (µmol/l)	Europe	170	0,205	0,141 à 0,305	463	0,204	0,128 à 0,297	0,4931[a]
	Afrique de l'Ouest	0			0			

NOTE. N: nombre de sujets ; IQR: intervalle interquartile ; *FUT2*: *Fucosyltransférase 2*;

[a] Test *U* de Mann-Whitney.

Tableau 4 Supplémentaire. Facteurs prédictifs indépendants du taux plasmatique de vitamine B12

	***P*-value, Analyse univariée**	***P*-value, Analyse multivariée[c]**	**Coefficient (β)**	**Erreur standard**
	Population globale			
Génotypes *FUT2 461G/G* ou *G/A* (Statut sécréteur de FUT2)	0,0004[a]	0,0009	-53,79	16,13
Sérologie *Hp* positive	0,0500[a]	–	–	–
Age (années)	<0,0001[b]	<0,0001	-3,25	0,40
Sexe masculin	0,0035[a]	<0,0001	-61,74	14,53
	Europe			
Génotypes *FUT2 461G/G* ou *G/A* (Statut sécréteur de FUT2)	0,0005[a]	0,0215	-43,62	18,93
Sérologie *Hp* positive	0,2613[a]	–	–	–
Age (années)	0,0369 [b]	Non retenu[d]	–	–
Sexe masculin	<0,0001[a]	0,0014	-54,72	17,09
	Afrique de l'Ouest			
Génotypes *FUT2 461G/G* ou *G/A* (Statut sécréteur de FUT2)	0,0092[a]	0,0128	-73,07	29,20
Sérologie *Hp* positive	0,7410[a]	–	–	–
Age (années)	0,7829[b]	–	–	–
Sexe masculin	<0,0001[a]	0,0002	-99,88	26,82

NOTE. *FUT2* : *Fucosyltransférase 2* ; *Hp* : *Helicobacter pylori*.

[a] Test U de Mann-Whitney ;

[b] Coefficient de corrélation de Spearman ;

[c] Analyse par régression Multiple (méthode *stepwise*) ;

[d] Item non retenu dans le modèle de régression multiple.

Tableau Supplémentaire 5. Facteurs prédictifs indépendants du taux plasmatique de folates

	***P*-value, Analyse univariée**	***P*-value, Analyse Multivariée[d]**	**Coefficient (β)**	**Erreur standard**
	Population globale			
FUT2 461G>A	0,0001[a]	Non retenu[e]	–	–
Sérologie *Hp* positive	0,0001[b]	0,0240	-1,5223	0,6731
Age (années)	<0,0001[c]	<0,0001	0,1016	0,01381
Sexe masculin	< 0,0001[b]	<0,0001	-2,7035	0,4890
	Europe			
FUT2 461G>A	0,1351[a]	–	–	–
Sérologie *Hp* positive	0,0293[b]	0,0226	-1,8428	0,8063
Age (années)	0,3328[c]	–	–	–
Sexe masculin	< 0,0001[b]	<0,0001	-3,1016	0,6334
	Afrique de l'Ouest			
FUT2 461G>A	0,0986[a]	–	–	–
Sérologie *Hp* positive	0,4528[b]	–	–	–
Age (années)	0,0011[c]	Non retenu[e]	–	–
Sexe masculin	< 0,0001[b]	Non retenu[e]	–	–

NOTE. *FUT2 : Fucosyltransférase 2* ; *Hp* : *Helicobacter pylori*.

[a] Test de Kruskal-Wallis ;

[b] Test U de Mann-Whitney *;*

[c] Coefficient de corrélation de Spearman ;

[d] Analyse par régression multiple (méthode *stepwise*) ;

[e] Item non retenu dans le modèle de régression multiple

Tableau 6 Supplémentaire. Facteurs prédictifs indépendants du taux plasmatique de l'homocystéine

	***P*-value, Analyse univariée**	***P*-value, Analyse Multivariée[c]**	**Coefficient (β)**	**Erreur standard**
	Population globale			
Génotypes *FUT2 461G/G* ou *G/A* (Statut sécréteur de FUT2)	0,1037[a]	–	–	–
Sérologie *Hp* positive	0,4340[a]	–	–	–
Folates (nmol/L)	<0,0001[b]	<0,0001	-0,31	0,051
Vitamine B12 (pmol/L)	<0,0001[b]	0,0001	-0,006	0,001
Age (années)	<0,0001[b]	Non retenu[d]	–	–
Sexe masculin	< 0,0001[a]	<0,0001	3,43	0,75
	Europe			
Génotypes *FUT2 461G/G* ou *G/A* (Statut sécréteur de FUT2)	0,1316[a]	–	–	–
Sérologie *Hp* positive	0,0591[a]	–	–	–
Folates (nmol/L)	<0,0001[b]	<0,0001	-0,15	0,04
Vitamine B12 (pmol/L)	<0,0001[b]	<0,0001	-0,005	0,001
Age (années)	<0,0001[b]	<0,0001	0,19	0,04
Sexe masculin	0,0002[a]	0,0006	1,76	0,51
	Afrique de l'Ouest			
Génotypes *FUT2 461G/G* ou *G/A* (Statut sécréteur de FUT2)	0,3965[a]	–	–	–
Sérologie *Hp* positive	0,3047[a]	–	–	–
Folates (nmol/L)	<0,0001[b]	<0,0001	-0,45	0,10
Vitamine B12 (pmol/L)	<0,0001[b]	0,0018	-0,007	0,003
Age (années)	0,0127[b]	Non retenu[d]	–	–
Sexe masculin	< 0,0001[a]	0,0003	5,10	1,39

NOTE. *FUT2* : *Fucosyltransférase 2* ; Hp : *Helicobacter pylori*.

[a] Test U de Mann-Whitney ;

[b] Coefficient de corrélation de Spearman ;

[c] Analyse par régression multiple (méthode *stepwise*) ;

[d] Item non retenu dans le modèle de régression multiple.

Tableau 7 Supplémentaire. Facteurs prédictifs indépendants du taux plasmatique de l'acide méthylmalonique

	***P*-value, Analyse univariée**	***P*-value, Analyse Multivariée[c]**	**Coefficient (β)**	**Erreur standard**
	Europe			
FUT2 461G>A	0,6129[a]	–	–	–
Sérologie Hp positive	0,0008[b]	0,0006	-0,06504	0,01894
Folates (nmol/L)	0,0190[c]	0,0179	0,002198	0,0009255
Vitamine B12 (pmol/L)	<0,0001[c]	<0,0001	-0,0001545	0,00003264
Age (années)	<0,0001[c]	<0,0001	0,007313	0,001052
Sexe masculin	0,5242[b]	–	–	–

NOTE. FUT2 : Fucosyltransférase 2 ; *Hp* : *Helicobacter pylori*.

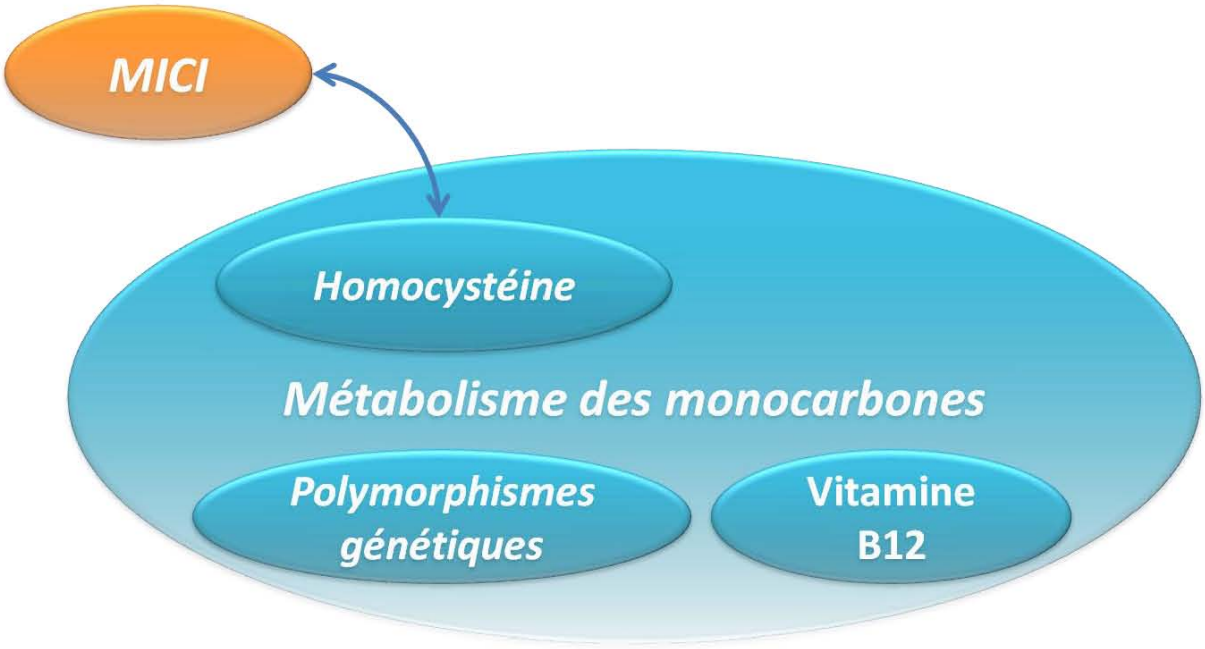
[a] Test de Kruskal-Wallis ;

[b] Test *U* de Mann-Whitney *;*

[c] Coefficient de corrélation de Spearman ;

[d] Analyse par régression multiple (méthode *stepwise*).

11 **Publication N°2 :** *L'hyperhomocystéinémie au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : revue systématique et méta-analyse*



11.1 Contexte de notre étude

L'homocystéine est un acide aminé sulfuré dont le métabolisme se situe à l'intersection de deux voies métaboliques : 1) la voie de la reméthylation de la méthionine, qui nécessite les folates et la vitamine B12 et 2) la voie de transsulfuration vers la cystathionine, qui nécessite le pyridoxal-50-phosphate.[21] L'homocystéine est produite à partir de la méthionine à partir de plusieurs réactions de transméthylation dépendant de la S-adénosylméthionine.[136] Selon la balance métabolique de la méthionine, l'homocystéine peut être métabolisée par trois enzymes. Lorsque la méthionine est en excès, l'homocystéine est convertie de façon irréversible en cysteine dans la voie de transsulfuration, catalysée par la cystathionine b-synthase (CBS) dépendante de la vitamine B6.[136] En cas de balance négative de la méthionine, l'homocystéine est convertie en méthionine via deux voies de conservation de la méthionine. La première voie dépend de la bétaïne-homocystéine méthyltransférase (BHMT) —au niveau du foie et du rein— qui utilise la betaine comme donneur de méthyle. Toute la bétaïne disponible dans l'organisme est dérivée de la choline et en dehors d'une supplémentation exogène, celle-ci n'est pas apportée par l'alimentation.[1] La bétaïne est hydrolysée par la BHMT en diméthylglycine lorsqu'elle transfert son groupement méthyl à l'homocystéine afin de produire la méthionine.[1] La seconde voie métabolique est celle de la méthionine synthase (MTR) —dans la plupart des tissus— qui utiliser la vitamine B12 comme cofacteur et le méthyltétrahydrofolate comme substrat. La production de méthyltétrahydrofolate est catalysée par la méthyltétrahydrofolate reductase (MTHFR) (**Figure 1**).[136]

L'hyperhomocystéinémie, correspondant à l'accumulation de l'homocystéine dans la circulation, est un facteur reconnu du risque thromboembolique dans la population générale.[329] Dans ce sens, l'hyperhomocystéinémie a reçu une attention toute particulière comme facteur de risque potentiel pouvant expliquer l'augmentation du risque

thromboembolique chez les patients atteints de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI).[312] Lamber *et al.* ont été les premiers à rapporter l'augmentation du taux plasmatique de l'homocystéine chez des patients avec une MC en comparaison à des sujets contrôles.[330] Par la suite, plusieurs travaux ont évalué le taux plasmatique d'homocystéine chez les patients MICI, principalement dans des études de faible effectif et avec des résultats mitigés. Ainsi, l'ampleur de l'association entre l'hyperhomocystéinémie et les MICI n'est pas connue. Par ailleurs, la relation entre l'hyperhomocystéinémie et le risque de thrombose reste débattue au cours des MICI.

L'enzyme MTHFR synthétise le 5-methyltetrahydrofolate qui représente le principal donneur de méthyle dans la reméthylation de l'homocystéine en méthionine.[331] La mutation *MTHFR 677 T* (substitution du résidu alanine par la valine en position 222, A222V) code pour une enzyme thermolabile avec une activité réduite conduisant à l'accumulation de l'homocystéine dans la circulation.[131] Les individus *MTHFR 677, T/T* (mais non *677CC* ou *CT*) avec un taux plasmatique faible de folate sont à risque de développer une hyperhomocystéinémie.[132, 331] Une méta-analyse portant sur les variant génétiques des enzymes intervenant dans les voies du métabolisme de l'homocystéine chez les sujets MICI n'a pas révélé d'association entre le polymorphisme *MTHFR C677T* et le risque primaire de MICI.[332] Néanmoins, cette méta-analyse n'a pas évalué l'impact du polymorphisme *MTHFR C677T* sur le risque primaire de MICI en fonction de la concentration en folate.

Nous avons réalisé une revue systématique de la littérature avec une méta-analyse sur les études qui ont évalué le taux plasmatique d'homocystéine chez les patients avec une MICI. Les objectifs de la méta-analyses étaient les suivants : 1) la comparaison du taux plasmatique d'homocystéine entre les sujets MICI et les sujets témoins ; 2) l'évaluation du risque d'hyperhomocystéinémie chez les patients MICI en comparaisons aux témoins ; 3) l'évaluation de la relation entre l'hyperhomocystéinémie et le risque thromboembolique chez

les sujets MICI ; et 4) l'évaluation de l'association entre le polymorphisme *MTHFR C677T* et le risque de MICI en fonction de la concentration plasmatique de folate.

11.2 Matériel et méthodes

11.2.1 Critères de sélection des études et extraction des données

La revue de la littérature a été réalisée sur la littérature indexée dans la base de données MEDLINE en utilisant le moteur de recherche PubMed (National Center for Biotechnology Information (www.pubmed.gov)), entre janvier 1966 et avril 2011, en utilisant les mots clés MeSH (medical subject heading) suivants : ("homocysteine"[MeSH Terms] OR "homocysteine"[All Fields]) AND (("crohn disease"[MeSH Terms] OR ("crohn"[All Fields] AND "disease"[All Fields]) OR "crohn disease"[All Fields]) OR ("colitis, ulcerative"[MeSH Terms] OR ("colitis"[All Fields] AND "ulcerative"[All Fields]) OR "ulcerative colitis"[All Fields] OR ("colitis"[All Fields] AND "ulcerative"[All Fields]) OR "colitis, ulcerative"[All Fields]) OR ("inflammatory bowel diseases"[MeSH Terms] OR ("inflammatory"[All Fields] AND "bowel"[All Fields] AND "diseases"[All Fields]) OR "inflammatory bowel diseases"[All Fields])). Par ailleurs, une recherché manuelle a été effectuée sur les abstracts des congrès internationaux suivants : *European Crohn's and Colitis Organisation* (de 2007 à 2010 incluse), *American Digestive Disease Week* (de 2007 à 2010 incluse), et *United European Gastroenterology Week* (de 2006 à 2010 incluse). Des références additionnelles ont été recensées à partir des résultats primaires de la recherche bibliographique. Deux investigateurs (A. Oussalah, L. Peyrin-Biroulet) ont revus de façon indépendante les titres des abstracts de toutes les citations identifiées par la revue de la littérature. Les articles éligibles ont été revus de façon dupliquée et indépendante par les deux investigateurs (AO, LPB). Les désagréments dans l'extraction des données ont été résolus par le consensus. La présente méta-analyse répond aux critères du groupe MOOSE sur les méta-analyses des études

observationnelles en épidémiologie (*Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) Group*).[333] Aucune restriction de langue n'a été appliquée.

11.2.2 Mesures étudiées

Les mesures à étudier étaient définie au préalable. La méta-analyse a évalué trois mesures à savoir : 1) le taux plasmatique d'homocystéine (avec nombre de sujets, moyenne, et écart-type, chez les sujets MICI et chez les contrôles) ; 2) la proportion de sujets avec une hyperhomocystéinémie parmi les patients MICI et les contrôles ; 3) la proportion de patients avec une hyperhomocystéinémie parmi les sujets MICI avec ou sans complications thromboembolique ; et 4) la proportion du génotype *MTHFR 677, T/T* chez les patients MICI et chez les contrôles.

11.2.3 Synthèse des données et analyses statistiques

Les données ont été collectées et tabulées en utilisant Microsoft Office Excel 2007. Lorsque la 'mesure étudiée' n'était pas clairement définie, la donnée qui lui correspondait n'était pas utilisée dans la méta-analyse. La comparaison des taux plasmatiques d'homocystéine entre les sujets avec une MICI, une RCH, MC et les sujets témoins était réalisée par la méthode de la différence moyenne pondérée (DMP) avec son intervalle de cofinance à 95% (IC 95 %). Les variables catégorielles étaient exprimées en compte et en pourcentage. Pour le calcul du risque d'hyperhomocystéinémie chez les sujets avec une MICI, RCH ou MC en comparaison aux sujets témoins, la mesure estimée était l'Odds ratio (OR) avec son IC 95 %. Le calcul global de la méta-analyse était réalisé en poolant toutes les études selon les modèles à effet fixe (*fixed-effects*) [334] ou aléatoire (*random-effects*, Der-Simonian

and Laird).[335] L'effet sommaire calculé était illustré par un diamant dans la partie inférieure du Forst plot, dont la largeur correspond à l'IC 95 %.

L'hétérogénéité statistique a été évaluée par les méthodes statistiques du *χ2-based Q* et du I^2. L'hétérogénéité était considérée comme significative si la valeur de *P* était inférieure à 0,1 avec un $I^2 > 50$ %.[336] Les biais de publication ont été évalués par la méthode des *funnel plots*[337] et par le test *Rosenthal's Fail-safe N* qui permet de calculer le nombre d'études manquantes nécessaire à additionner pour obtenir un résultat global non-significatif.[338] La robustesse des résultats a été évaluée par l'analyse de sensibilité. L'effet global calculé était recalculé après exclusion d'une étude à chaque fois, afin d'identifier les études les plus influentes sur le résultat global.

La relation entre le taux plasmatique de folate (en nmol/L) et le risque de MICI associée au polymorphisme *MTHFR C677T* a été évaluée par une méta-régression utilisant la régression linéaire pondérée. Les résultats on été rapportés en utilisant le modèle des effets mixtes (*unrestricted maximum likelihood method*).

Toutes les valeurs de *P* sont bilatérales et le seuil alpha a été défini à 0,05. La méta-analyse et la méta-régression ont été réalisées avec le logiciel statistique *Comprehensive Meta-Analysis, version 2.2.050 (BioStat Software, Engelwood, New Jersey).*

11.3 Résultats

11.3.1 Revue systématique de la littérature

La recherche bibliographique a généré 66 citations parmi lesquelles 46 étaient pertinentes pour la revue systématique. Parmi ces 46 études, 17 ont été exclues, laissant 29 études éligibles à la méta-analyse [24, 147, 314, 330, 339-363] (**Figure 1 supplémentaire)**. Les études

exclues de la méta-analyse et les raisons de leur exclusion sont rapportées dans le **Tableau 1 supplémentaire.** Le tableau 1 rapporte les études qui ont évalué le taux plasmatique d'homocystéine chez les patients avec une MICI[24, 147, 314, 330, 339-362] et qui ont inclus 2370 patients avec une MICI (RCH = 950 ; MC = 1420) et 1972 contrôles. Le tableau 2 présente les études qui ont rapporté la proportion de sujets avec une hyperhomocystéinémie parmi les patients MICI et les contrôles.[24, 339, 342, 344, 345, 347-349, 351, 353, 355, 356, 358, 361, 362]

11.3.2 Comparaison du taux plasmatique de l'homocystéine entre les patients avec une maladie inflammatoire chronique de l'intestin et les sujets témoins

11.3.2.1 Les patients avec une maladie inflammatoire chronique de l'intestin ont un taux plasmatique d'homocystéine et un risque d'hyperhomocystéinémie significativement plus élevés en comparaison aux sujets témoins

Douze études ont comparé le taux plasmatique d'homocystéine entre les sujets MICI et les témoins.[330, 339, 344, 349, 350, 352, 354, 356, 359-362] Le taux plasmatique d'homocystéine était significativement supérieur dans le groupe MICI (incluant RCH et MC) en comparaison au groupe contrôle avec une DMP de 3,75 µmol/L (IC 95 % : 2,23 à 5,26 µmol/L; $P < 0,0001$) en utilisant le modèle d'effets aléatoires (**Figure 2 et Figure 2 Supplémentaire**). Dans le test *Rosenthal's Fail-safe N* le nombre d'études manquantes nécessaires pour rendre la valeur de $P > 0,05$ est de 659. La taille de l'effet (*effect size*) ainsi que les résultats de tests d'hétérogénéité des études qui ont évalué le taux plasmatique d'homocystéine chez les patients MICI et chez les sujets contrôle sont rapportés dans le **Tableau 3**.

Onze études ont évalué la proportion de sujets avec une hyperhomocystéinémie parmi les patients MICI et les contrôles.[24, 339, 342, 344, 345, 348, 349, 351, 355, 356, 361] Le risque d'hyperhomocystéinémie était significativement plus élevé dans le groupe MICI en

comparaison au groupe contrôle (OR = 4,65; IC 95 % : 3,04 à 7,09; P < 0,0001; hétérogénéité: Q-value = 20, I^2 = 51, P = 0,03) en utilisant le modèle d'effets aléatoires (**Figure 3**). Dans le test *Rosenthal's Fail-safe N* le nombre d'études manquantes nécessaires pour rendre la valeur de P > 0,05 est de 288.

11.3.2.2 Les patients avec une rectocolite hémorragique ont un taux plasmatique d'homocystéine supérieur à celui des sujets témoins

Six études ont comparé le taux plasmatique d'homocystéine entre les patients avec une RCH et les témoins.[147, 341, 350, 352, 359, 361] Le taux plasmatique d'homocystéine était significativement supérieur dans le groupe RCH en comparaison avec le groupe contrôle avec une DMP de 5,01 µmol/L (IC 95 % : 2,87 à 7,16 µmol/L ; P < 0,0001) en utilisant le modèle d'effets aléatoires (**Figure 2, Figure 3 Supplémentaire, et Tableau 3**). Dans le test *Rosenthal's Fail-safe N* le nombre d'études manquantes nécessaires pour rendre la valeur de P > 0,05 est de 288.

11.3.2.3 Les patients avec une maladie de Crohn ont un taux plasmatique d'homocystéine supérieur à celui des sujets témoins

Cinq études ont évalué le taux plasmatique d'homocystéine chez des patients avec une MC en comparaison à des témoins.[147, 330, 341, 350, 362] Le taux plasmatique d'homocystéine était significativement supérieur dans le groupe MC en comparaison au groupe contrôle avec une DMP de 4,50 µmol/L (IC 95 % : 2,81 à 6,19 µmol/L ; P < 0,0001) en utilisant le modèle d'effets aléatoires (**Figure 2, Figure 4 Supplémentaire, et Tableau 3**). Dans le test *Rosenthal's Fail-safe N* le nombre d'études manquantes nécessaires pour rendre la valeur de P > 0,05 est de 156.

11.3.2.4 Les patients avec une rectocolite hémorragique ont le même taux d'homocystéine que ceux avec une maladie de Crohn

Cinq études ont comparé le taux plasmatique d'homocystéine entre des patient avec une RCH et ceux avec une MC.[147, 341, 350, 353, 358] le taux plasmatique d'homocystéine était similaire entre les deux groups avec une DMP de 0,41 µmol/L (IC 95 % : -2,45 à 3,06 µmol/L ; P = 0,76) en utilisant le modèle d'effets aléatoires (**Figure 2, Figure 5 Supplémentaire, et Tableau 3**).

11.3.3 L'hyperhomocystéinémie n'est pas associée au risque thromboembolique chez les patients avec une maladie inflammatoire chronique de l'intestin

Cinq études, ayant inclus 497 patients avec une MICI, ont évalué la proportion de patients avec une hyperhomocystéinémie parmi ceux qui ont présenté une complication thromboembolique ou non. [342, 344, 349, 356, 363] Le risque d'hyperhomocystéinémie n'était pas supérieur parmi les patients MICI ayant présenté une complication thromboembolique en comparaison à ceux qui n'en avaient pas présenté (OR = 1,97 ; IC 95 % : 0,83 à 4,67 ; P = 0,12 ; hétérogénéité: Q-value = 6 ; I^2 = 32 ; P = 0,21) en utilisant le modèle d'effets aléatoires (**Figure 4**).

11.3.4 Association du polymorphisme *MTHFR C677T* avec le risque primaire de maladie inflammatoire chronique de l'intestin en fonction du statut en folate

Quatre études ayant évalué la relation entre le polymorphisme *MTHFR C677T* et le risque primaire de MICI ont rapporté le taux plasmatique de folate chez les patients MICI.[314, 344, 349, 354] Parmi ces études, trois ont évalué un nombre suffisant de patients (>100) et ont été incluses dans la méta-analyse.[314, 344, 349] En analyse globale, l'Odds ratio associé au risque

primaire de MICI pour le génotype *MTHFR 677, T/T* était de 1,45 (IC 95% : 0,93 à 2,26 ; *P* = 0,09). Le risque primaire de MICI associé au génotype *MTHFR 677, T/T* était significativement supérieur chez les patients avec un statut carencé en folate (< 11 nmol/L) (OR = 2,64 ; IC 95 % : 1,44 à 4,81 ; *P* = 0,002) en comparaison à ceux avec un statut non carencé en folate (≥11 nmol/L) (OR = 0,73 ; IC 95 % : 0,41 à 1,31 ; *P* = 0,29) (*P* = 0,004 ; OR statut carencé en folate versus non carencé) (**Figure 5**). En analyse par méta-régression, l'OR du risque primaire de MICI associé au polymorphisme *MTHFR C677T* était négativement et significativement associé à la concentration plasmatique en folate chez les patients MICI (Régression à effets mixtes, pente = -0.16 ; IC 95 % : -0.28 à -0.04 ; *P* = 0.006).

11.3.5 Analyses de sensibilité

Lorsque les analyses de sensibilité ont été réalisées en éliminant une seule étude à la fois, tous les effets (*effect size*) mesurés n'ont pas été altérés (données non affichées).

11.3.6 Analyse des biais de publication

Les biais de publication ont été étudiés avec la méthode des '*funnel plot*' pour : 1) la comparaison des taux plasmatiques d'homocystéine entre les groupes MICI, RCH, MC avec les témoins et pour la comparaison entre RCH et MC (Figures 6 à 9 Supplémentaires, respectivement) ; 2) le risque d'hyperhomocystéinémie pour les sujets MICI en comparaison aux contrôles (Figure Supplémentaire 10) ; et 3) le risque d'hyperhomocystéinémie parmi les patients MICI ayant ou non présenté une complication thromboembolique (Figure 11 Supplémentaire). Les '*funnel plots*' étaient symétriques, suggérant l'absence de biais de publication. Ces résultats étaient concordant avec ceux des tests *Rosenthal's Fail-safe N*.

11.4 Discussion

Cette méta-analyse démontre que les patients avec une RCH ou une MC ont un taux d'homocystéine supérieur à celui des témoins et que la MICI représente un facteur de risque d'hyperhomocystéinémie. Plusieurs études ont évalué le rôle de l'homocystéine dans la physiopathologie des MICI.[312] L'homocystéine agit comme un pro-oxydant[313] et a été incriminée dans la diminution de la capacité antioxydante chez les patients avec une MICI. [144] L'homocystéine est impliquée dans la réponse immunitaire de l'hôte par l'induction de la production de plusieurs cytokines et chémokines proinflammatoires[147, 148], le stress du réticulum endoplasmique[364], et par la régulation de l'expression des gènes par la méthylation au niveau des promoteurs des gènes.[365] Plusieurs études ont évalué la cause de l'hyperhomocystéinémie observée au cours des MICI et la plupart des études ont fait le lien entre l'hyperhomocystéinémie et le statut carencé en vitamine B12 et/ou en folate.[273, 274] La malnutrition est fréquemment observée chez les patients MICI, notamment au cours des phases actives de la maladie.[271, 272] Dans une étude prospective, 126 patients MICI consécutifs ont bénéficié de mesures anthropomorphiques, d'un questionnaire alimentaire sur 4 jours, et d'un bilan biochimique des marqueurs nutritionnels.[296] Les déficits en folate et en vitamine B12 étaient respectivement notés chez 19 % et 18 % des patients.[296] De façon intéressante, il a été démontré que le déficit en donneur de méthyle aggravait les colites expérimentales chez le rat.[25] Plusieurs études ont démontré une relation entre le taux plasmatique d'homocystéine et le degré d'activité de la MICI.[352, 356, 362, 366, 367] Dans une étude prospective, Morgenstern et *al.* ont démontré un taux élevé d'homocystéine dans la muqueuse colique des patients avec une RCH ou une MC en comparaison à des témoins.[366] Dans une étude pilote sur 30 patients avec une RCH, le taux plasmatique de l'homocystéine était significativement supérieur chez les patients avec une maladie active en comparaison aux patients en rémission avec des valeurs respectives de 11,2 ± 3,5 mmol/L et de 9,0 ± 2,3 mmol/L ; P=0.048).[352] De façon

intéressante, les patients ayant présenté plusieurs récidives de leur maladie avaient les taux plasmatiques d'homocystéine les plus élevés en comparaison aux patients qui ont une maladie quiescente avec des valeurs respectives de 11,5 ± 3,6 mmol/L versus 9,0 ± 2,1 mmol/L ; *P*=0.035).[352] Par ailleurs, dans cette étude, le taux plasmatique d'homocystéine était corrélé avec la durée de la maladie (r = 0,6632 ; $P < 0,05$).[352] Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Kallel *et al.* dans une étude prospective sur 89 patients avec une MC.[362] Dans cette étude, le risque d'hyperhomocystéinémie était positivement associé avec l'activité de la maladie (OR = 7,54 ; IC 95 % : 1,15 à 49,3; $P = 0,03$) et à une durée de la maladie supérieure à deux ans (OR = 8,69 ; IC 95 % : 1,53 à 49,3 ; $P = 0,002$).[362] A l'inverse, le risque d'hyperhomocystéinémie était inversement associé au taux plasmatique de folate (OR = 0,64; IC 95 % : 0,48 à 0,84; $P = 0,002$) et de vitamine B12 (OR = 0,993 ; IC 95 % : 0,987 à 0,999 ; $P = 0,02$).[362] Enfin, dans une étude prospective sur 105 patients consécutifs avec une MICI, les taux plasmatique de cobalamine et d'albumine, la vitesse de sédimentation, et le taux de plaquettes étaient des facteurs prédictifs indépendants de l'hyperhomocystéinémie.[356] Au total, ces données suggèrent que l'hyperhomocystéinémie est fréquente au cours des MICI et qu'elle est potentiellement associée à l'activité de la MICI. Ces données soulignent l'intérêt clinique d'un dépistage systématique des carences en folate et en vitamine B12 chez les patients MICI compte tenu de la fréquence de ces carences chez les patients MICI et de leur rôle potentiel dans la survenue d'une hyperhomocystéinémie. Néanmoins, l'intérêt du dépistage systématique du déficit en folate et en vitamine B12 et de l'hyperhomocystéinémie et du bénéfice potentiel de l'impact de leur normalisation sur l'activité de la MICI nécessite des études interventionnelles. Il a été démontré que l'alimentation riche en choline et en bétaïne est associée à des taux moindres des marqueurs de l'inflammation tels que la protéine-C-réactive, l'homocystéine, l'interleukine-6, et le *tumour necrosis factor* (TNF).[368] Ces données méritent confirmation chez les patients avec une MICI.

L'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque démontré pour la maladie thromboembolique[329, 369] et les thromboses veineuses recidivantes[370] dans la population générale. Une étude cas-témoin nichée dans une cohorte basée sur la *General Practice Research Database*, ayant apparié 13 756 patients avec MICI avec 71 672 témoins, a évalué le risque d'accidents thromboemboliques au cours des différentes phases d'activité de la MICI.[371] Les patients avec une MICI avaient un surrisque d'événements thromboemboliques en comparaison aux témoins (hazard ratio (HR) = 3,4; IC 95 % : 2,7 à 4,3).[371] Ces résultats ont été confirmés par une étude menée au sein de la population Danoise, qui a inclus 49 799 patients MICI adultes et pédiatriques (RCH = 14 211 ; MC = 35 229) et 477 507 appariés par tirage au sort à partir de la population générale et qui a confirmé un doublement du risque thromboembolique chez les patients MICI (HR = 2,0 ; IC 95 % : 1,8 à 2,1).[372] Ces données suggèrent une augmentation du risque thromboembolique chez les patients suivis pour une MICI.[371, 372] L'implication de l'hyperhomocystéinémie dans l'augmentation du risque thromboembolique au cours des MICI reste controversée.[373] Dans la présente méta-analyse, le risque d'hyperhomocystéinémie parmi les patients MICI avec une complication thromboembolique était élevé sans atteindre néanmoins la significativité statistique. Ceci peut être en rapport avec un manque de puissance de la méta-analyse, lié au faible nombre des études qui ont évalué cet objectif et à la taille relativement faible des échantillons de patients. En résumé et contrairement à la population générale, chez les patients avec une MICI, le rôle causal de l'hyperhomocystéinémie comme facteur de risque des complications thromboemboliques reste peu défini.[374] L'intérêt chez les patients MICI de la correction du déficit en vitamine B12 et/ou en folate —notamment en cas de maladie sévère, d'antécédent de résection iléale (pour la vitamine B12), et/ou de traitement par méthotrexate (folate)— dans la réduction du risque de thrombose requiert des études spécifiquement conçues pour répondre à cette problématique.[312, 314]

Dans la présente méta-analyse, le génotype *MTHFR 677, T/T* était associé à une augmentation du risque primaire de MICI en cas de statut carencé en folate. Il a été démontré que les sujets qui ont une forme thermolabile de l'enzyme MTHFR peuvent avoir un besoin accru en folate pour la régulation de la concentration plasmatique de l'homocystéine.[132] Par ailleurs, le polymorphisme MTHFR C677T était associé avec les défauts de fermeture du tube neural et le syndrome de Down dans le nord de l'Europe —une région connue pour son alimentation carencée en folate— mais non dans les régions de l'ouest et du sud-ouest de l'Europe, où l'apport en folate en la fréquence de l'allèle *MTHFR 677 T* sont nettement supérieurs.[318] Ces résultats sont en ligne avec ceux de la présente méta-analyse qui démontre une corrélation inverse entre la concentration plasmatique en folate et le risque primaire de MICI en rapport avec le polymorphisme *MTHFR C677T* et supporte la stratégie visant à normaliser l'apport en folate chez les patients avec une MICI. Néanmoins, cette hypothèse nécessite d'être investiguée.

La présente méta-analyse présente plusieurs avantages. En premier lieu, la revue bibliographique exhaustive a permis d'identifier toutes les études qui ont évalué le taux plasmatique d'homocystéine chez 2370 patients avec une MICI et 1972 sujets témoins. En second lieu, la méta-analyse a été réalisée en utilisant le modèle des effets aléatoires, qui permet d'obtenir des résultats plus conservateur avec des intervalles de confiance plus larges. Il n'a pas été mis en évidence de Biais de publication tel que rapporté dans les '*funnel plots*' et les tests *Rosenthal's Fail-safe N* qui permettent de calculer le nombre d'études nécessaires pour obtenir une taille d'effet global non significative. Troisièmement, cette méta-analyse est la première à comparer l'effet du polymorphisme MTHFR C677T sur le risque de MICI en fonction du statut en folate.

Plusieurs limitations sont à souligner néanmoins. Le risque potentiel de l'hétérogénéité statistique est toujours présent lorsque des études cas-témoin sont poolées. C'est la raison

pour laquelle le modèle des effets aléatoires a été utilisé, permettant d'obtenir des résultats plus conservateurs. Par ailleurs, la méta-analyse qui a évalué le risque d'hyperhomocystéinémie en fonction des complications thromboemboliques n'a inclus que quatre études et a évalué 497 patients avec le risque possible d'erreur de type II. Par conséquent, les données actuellement disponibles ne permettent pas de conclure sur le risque de complication thromboembolique en rapport avec l'hyperhomocystéinémie chez les patients avec une MICI.

En conclusion, cette méta-analyse démontre que les patients avec une MICI ont un taux plasmatique d'homocystéine significativement supérieur à celui des sujets contrôles. Par ailleurs, les patients avec une MICI ont un risque accru d'hyperhomocystéinémie. L'évaluation du risque de complication thromboembolique liée à l'hyperhomocystéinémie nécessite la réalisation d'études supplémentaires. L'intérêt de la normalisation des taux élevés d'homocystéine chez les patients avec une MICI active, via la supplémentation en vitamine B12 et/ou en folate, nécessite la réalisation d'études prospectives interventionnelles.

11.5 Tableaux

TABLEAU 1. Etudes ayant évalué le taux plasmatique de l'homocystéine chez les patients suivis pour une maladie inflammatoire chronique de l'intestin et chez les témoins

Premier auteur	Année	Nombre de sujets				Hcy, MICI			Hcy, RCH			Hcy, MC			Hcy, Contrôles			Ref.
		IBD	UC	CD	C	Moy.	DS	n	Moy.	DS	n	Moy.	DS	n	Moy.	DS	n	
Lambert D.	1996	21	0	21	20	13,24	5,53	21				13,24	5,53	21	10,2	3,6	20	[330]
Cattaneo M.	1998	61	29	32	183	12,2	7,7	61							10,5	4,6	183	[339]
Mahmud N.	1999	174	91	83	89	10,85			11,09			10,19			8,99		89	[314]
Chowers Y.	2000	105	0	105	106	10,9	4,8	105				10,9	4,8	105				[340]
Koutroubakis I. E.	2000	108	53	55	74				15,87	10,34	53	13,62	6,55	55	9,59	3,39	74	[341]
Oldenburg B.	2000	231	89	142	102	12,3									11,1			[342]
Maire F.	2001	171	0	171	0	14,8		171				14,8		171				[343]
Papa A.	2001	64	39	25	121	11,7	5,7	64							7,8	2,5	121	[344]
Romagnuolo J.	2001	65	9	56	138	8,7		65							6,6		138	[345]
Vasilopoulos S.	2001	125	0	125	0	11,6	0,5	125				11,6	0,5	125				[346]
Bjerregaard L. T.	2002	106	52	54	0	10,7		106	10,7		52	10,7		54				[347]
Nakano E.*	2003	43	9	27	46													[348]
Danese S.	2005	166	83	83	70				11,1	4,9	83	13,7	6,1	83	7,1	1,7	70	[147]
Fernandez-Miranda C.	2005	52	16	36	186	9,7	4,4	52							9,1	1,9	186	[349]
Mahmood A.	2005	68	37	31	30	13,2	7,8	68	13,2	6,9	37	13,4	7,2	31	7,4	2,8	30	[350]
Zezos P.	2005	40	40	0	50													[351]
Drzewoski J.	2006	30	30	0	21	10,1	3,1	30	10,1	3,1	30				6,8	2,5	21	[352]
Roblin X.	2006	81	21	60	0				13,6	11	21	13,8	11,5	60				[353]

Yilmaz S.	2006	33	26	7	27	6,6	5,3	33						7,8	4,4	27	[354]
Banait V. S.	2008	28	28	0	100												[355]
Erzin, Y.	2008	105	57	48	85	16,35	8,7	105						9,6	2,21	85	[356]
Peyrin-Biroulet L.	2008	140	0	140	248												[24]
Wiese D.	2008	7	0	7	0	10,61		7									[357]
Zepeda-Gomez S.	2008	82	56	26	0	7,3	6,8	82	9,7	7,8	56	6,2	6,1	26				[358]
Akbulut S.	2010	55	55	0	45	13,3	1,93	55	13,3	1,93	55				11,3	3,58	45	[359]
Dagli N.	2010	40	32	8	40	20,9	7,8	40							13,2	3,8	40	[360]
Jiang Y.	2010	80	80	0	88	21,72	6,59	80	21,72	6,59	80				12,47	5,02	88	[361]
Kallel L.	2011	89	0	89	103	13,69	4,84	89				13,69	4,84	89	10,77	2,8	103	[362]

NOTE. MICI : maladie inflammatoire chronique de l'intestin; RCH : rectocolite hémorragique ; MC : maladie de Crohn ; Moy. : moyenne ; DS : déviation standard ; n : nombre de sujets ; Hcy : homocystéine (µmol/L); Ref. : références.

* Sept patients avaient une colite indéterminée.

Tableau 2. Etudes ayant évalué la proportion de sujets avec une hyperhomocystéinémie parmi les patients avec une maladie inflammatoire chronique de l'intestin et les sujets contrôles

Premier auteur	Année	Nombre de sujets				Seuil* µmol/L	Proportion des sujets avec une hyperhomocystéinémie								Références
		MICI	RCH	MC	C		MICI		RCH		MC		C		
							n	%	n	%	n	%	n	%	
Cattaneo M.	1998	61	29	32	183	NR	8	**13**					9	**5**	[339]
Oldenburg B.	2000	231	89	142	102	21,9	25	**11**					5	**5**	[342]
Papa A.	2001	64	39	25	121	12,8	17	**27**					4	**3**	[344]
Romagnuolo J.	2001	65	9	56	138	12,1	10	**15**					3	**2**	[345]
Bjerregaard L. T.	2002	106	52	54	0	15	11	**10**	6	**12**	5	**9**			[347]
Nakano E.†	2003	43	9	27	46	11,35	9	**21**					2	**4**	[348]
Fernandez-Miranda C.	2005	52	16	36	186	13	9	**17**					7	**4**	[349]
Zezos P.	2005	40	40	0	50	NR	12	**30**	12	**30**			5	**10**	[351]
Roblin X.	2006	81	21	60	0	15	45	**56**	13	**62**	32	**53**			[353]
Banait V. S.	2008	28	28	0	100	15	11	**39**	11	**39**			15	**15**	[355]
Erzin Y.	2008	105	57	48	85	‡	59	**56**					4	**5**	[356]
Peyrin-Biroulet L.	2008	140	0	140	248	15	33	**24**			33	**24**	20	**8**	[24]
Zepeda-Gomez S.	2008	82	56	26	0	12	18	**22**	11	**20**	7	**27**			[358]
Jiang Y.	2010	80	80	0	88	15	36	**45**	36	**45**			23	**26**	[361]
Kallel L.	2011	89	0	89	103	15					28	**31**	8	**8**	[362]

NOTE. MICI : maladie inflammatoire chronique de l'intestin ; RCH : rectocolite hémorragique ; MC : maladie de Crohn ; C : contrôle ; Moy. : moyenne ; DS : déviation standard ; n : nombre de sujets ; NR : non rapporté ; % : pourcentage.

***** Seuil utilisé pour définir l'hyperhomocystéinémie (µmol/L) ;

† Sept patients avaient une colite indéterminée ;

‡< 11,6 chez les femmes et < 15,3 mmol/L chez les hommes.

Tableau 3. Différence moyenne pondérée et intervalle de confiance à 95 % du taux plasmatique d'homocystéine (µmol/L)

	Nombre d'études	Taille de l'effet et intervalle de confiance à 95 %				Hétérogénéité			Références
		DMP	Limite supérieure	Limite inférieure	*P*-value	Q-value	I-squared	*P*-value	
Taux plasmatique d'homocystéine (µmol/L)									
MICI – contrôles	12	3,75	2,23	5,26	< 0,0001	130	92	< 0,0001	330, 339, 344, 349, 350, 352, 354, 356, 359-362
RCH – Contrôles	6	5,01	2,87	7,16	< 0,0001	52	90	< 0,0001	147, 341, 350, 352, 359, 361
MC – Contrôles	5	4,50	2,81	6,19	< 0,0001	18	77	0,001	147, 330, 341, 350, 362
RCH – MC	5	0,41	-2,25	3,06	0,76	14	72	0,007	147, 341, 350, 353, 358

NOTE. DMP : différence moyenne pondérée ; MICI : maladie inflammatoire chronique de l'intestin ; RCH : rectocolite hémorragique ; MC : maladie de Crohn.

Tableau 1 supplémentaire. Etudes exclues de la méta-analyse

Premier auteur	Année	Raisons de l'exclusion de la méta-analyse	Références
Roblin, X.	2006	Données dupliquées	[375]
Bermejo, F.	2009	Absence de données sur le taux plasmatique d'homocystéine	[376]
Bermejo, F.	2009	Données dupliquées	[377]
Bichard, P.	2007	Données dupliquées	[378]
Chen, M.	2008	Absence de données sur le taux plasmatique d'homocystéine	[379]
Chiarello, P. G.	2009	Absence de données sur le taux plasmatique d'homocystéine	[367]
Coll, P.	1999	Plusieurs maladies digestives	[380]
Kao, A.	2002	Absence de données sur le taux plasmatique d'homocystéine	[381]
Morgenstern, I.	2003	Absence de données sur le taux plasmatique d'homocystéine	[366]
Owczarek, D.	2009	Absence de données sur le taux plasmatique d'homocystéine	[382]
Phelip, J.	2007	Données dupliquées	[383]
Roblin, X.	2007	Absence de données sur le taux plasmatique d'homocystéine	[384]
Saibeni, S.	2003	Taux plasmatique d'homocystéine selon le statut en vitamine B6	[273]
Ventura, P.	2001	Absence de données sur le taux plasmatique d'homocystéine	[385]
Yi, J.	2009	Absence de données sur le taux plasmatique d'homocystéine	[386]
Kallel, L.	2009	Données dupliquées	[387]
Eren, M.	2004	Absence de groupe contrôle	[388]

11.6 Figures

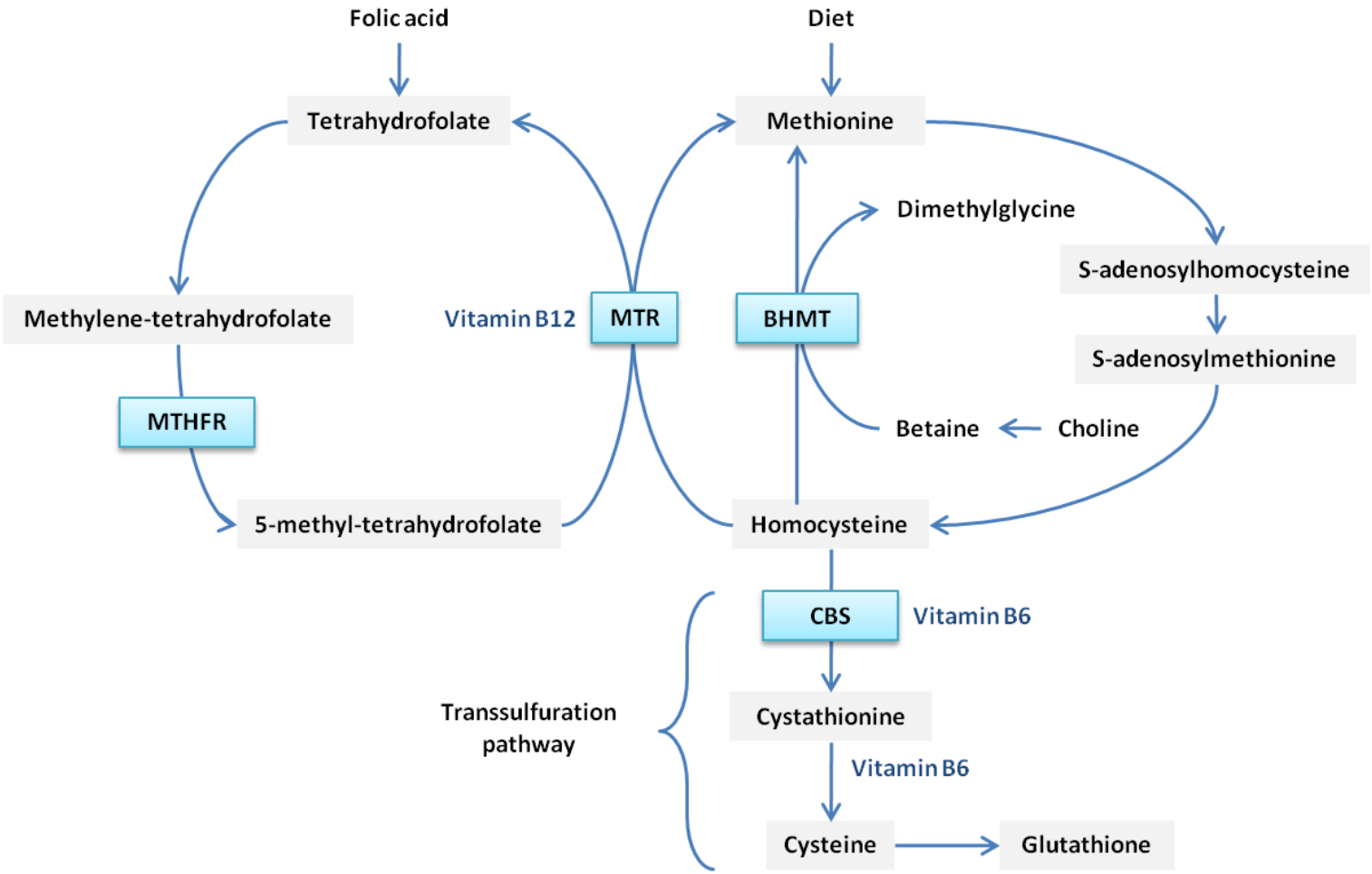


Figure 1. Métabolisme de l'homocystéine. MTR, méthionine synthase; BHMT, bétaïne-homocystéine méthyltransférase; MTHFR, méthylènetétrahydrofolate reductase; CBS, cystathionine β-synthase.

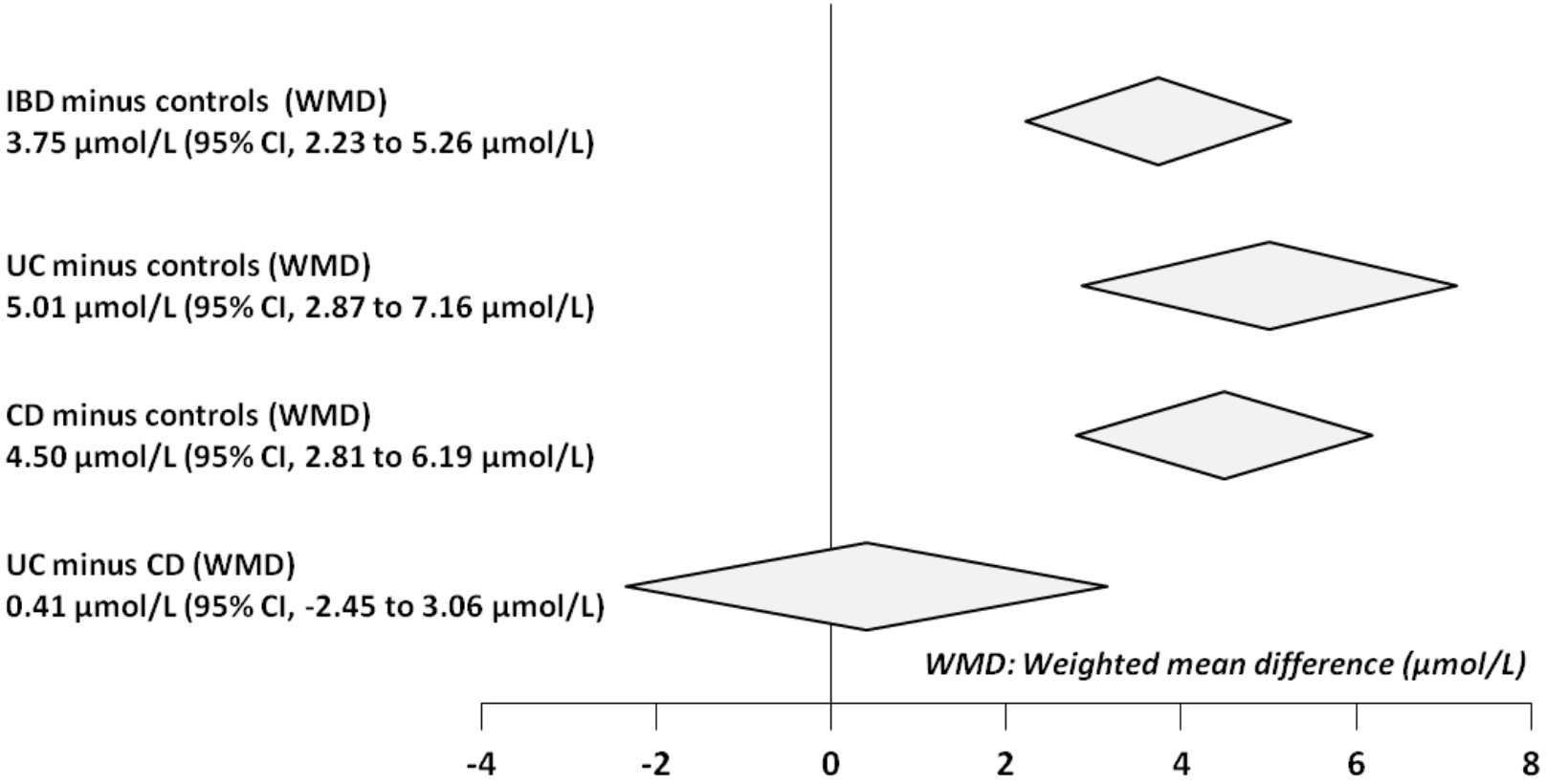


Figure 2. Différence moyenne pondérée du taux plasmatique d'homocystéine (µmol/L) entre les patients MICI et les contrôles. L'effet global calculé est illustré par un losange dans la partie inférieure du *Forest plot* et dont la largeur représente l'IC 95 %. (valeurs normale de l'homocystéine plasmatique : 5 à 12 µmol/L).

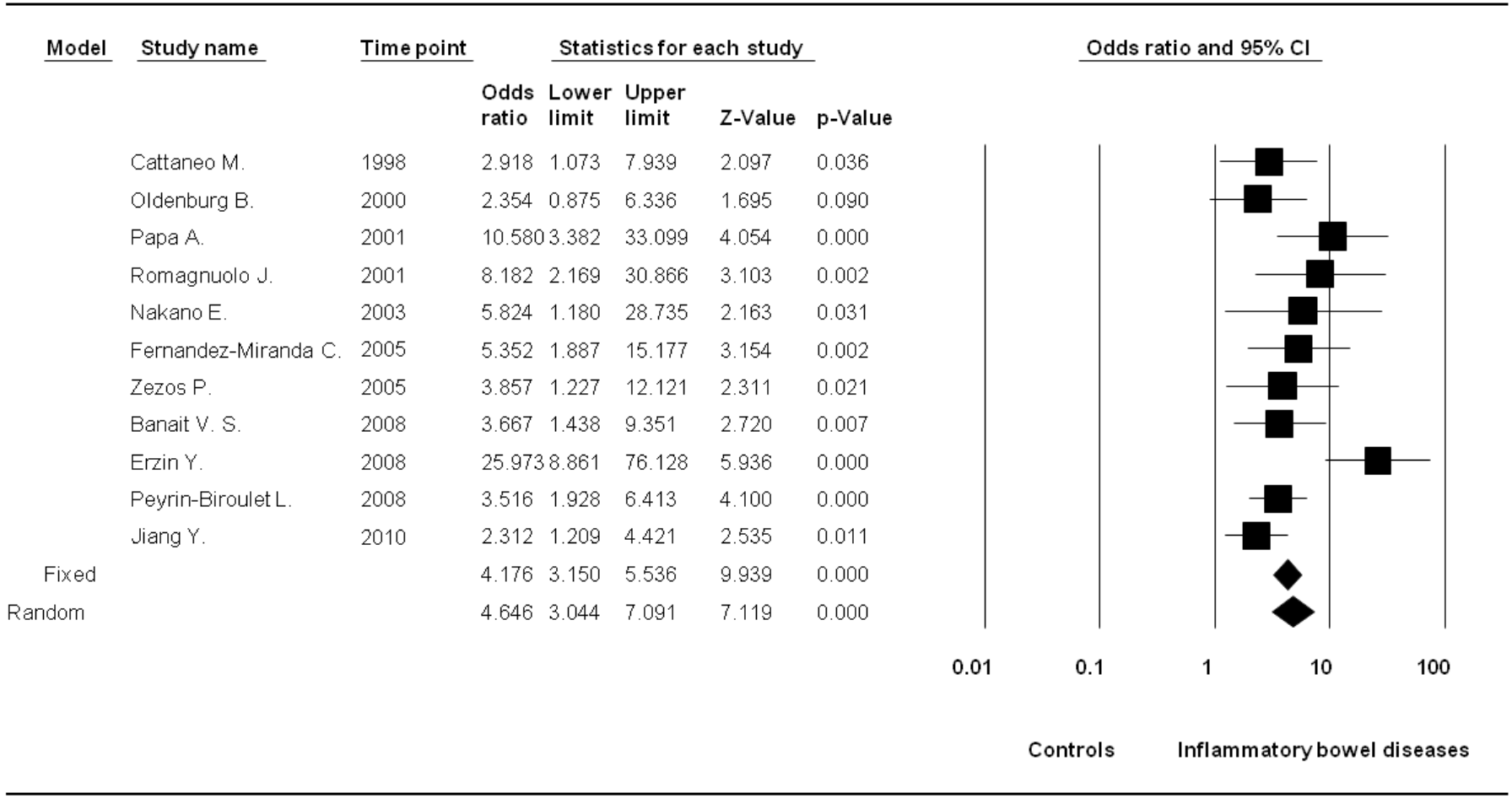


Figure 3. Méta-analyse des études qui ont évalué la proportion de sujets avec une hyperhomocystéinémie parmi les patients MICI et les contrôles. L'effet global calculé est illustré par un losange dans la partie inférieure du *Forest plot* et dont la largeur représente l'IC 95 %.

Model	Study name	Time point	Odds ratio	Lower limit	Upper limit	Z-Value	p-Value
	Oldenburg B.	2000	1.678	0.526	5.356	0.874	0.382
	Papa A.	2001	1.120	0.196	6.398	0.127	0.899
	Fernandez-Miranda C.	2005	14.333	1.974	104.085	2.632	0.008
	Erzin Y.	2008	0.928	0.265	3.256	-0.116	0.907
	Oldenburg B. 2	2005	3.474	0.333	36.240	1.041	0.298
Fixed			1.816	0.917	3.595	1.711	0.087
Random			1.973	0.833	4.674	1.545	0.122

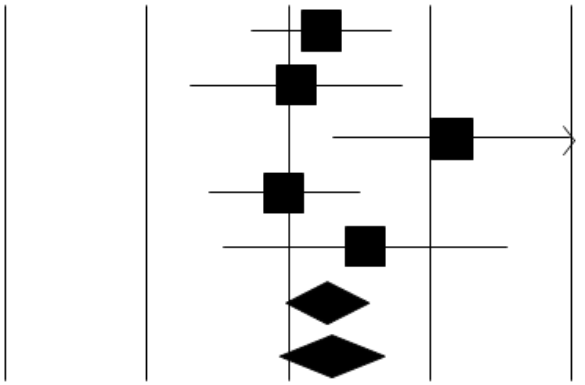


Figure 4. Méta-analyse des études qui ont évalué la proportion de sujets avec une hyperhomocystéinémie parmi les patients MICI qui ont présenté une complication thromboembolique et ceux qui n'en ont pas présenté. L'effet global calculé est illustré par un losange dans la partie inférieure du *Forest plot* et dont la largeur représente l'IC 95 %.

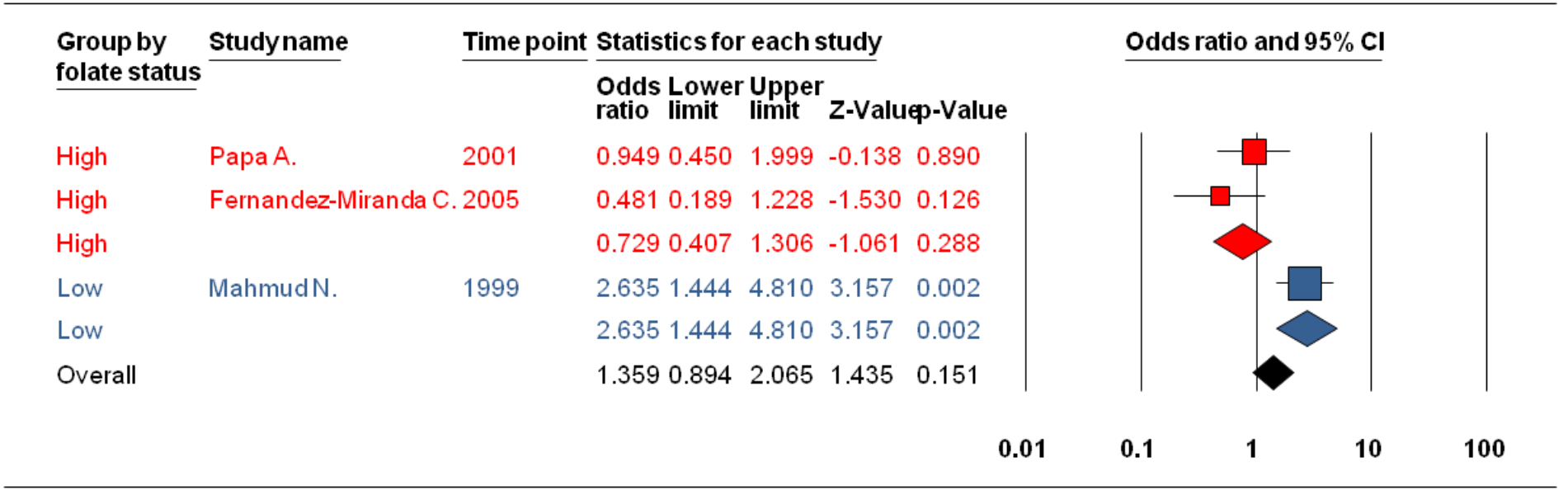


Figure 5. Méta-analyse des études qui ont évalué le risque primaire de MICI en fonction du génotype *MTHFR 677 T/T* en fonction du statut en folate. L'effet global calculé est illustré par un losange dans la partie inférieure du *Forest plot* et dont la largeur représente l'IC 95 %.

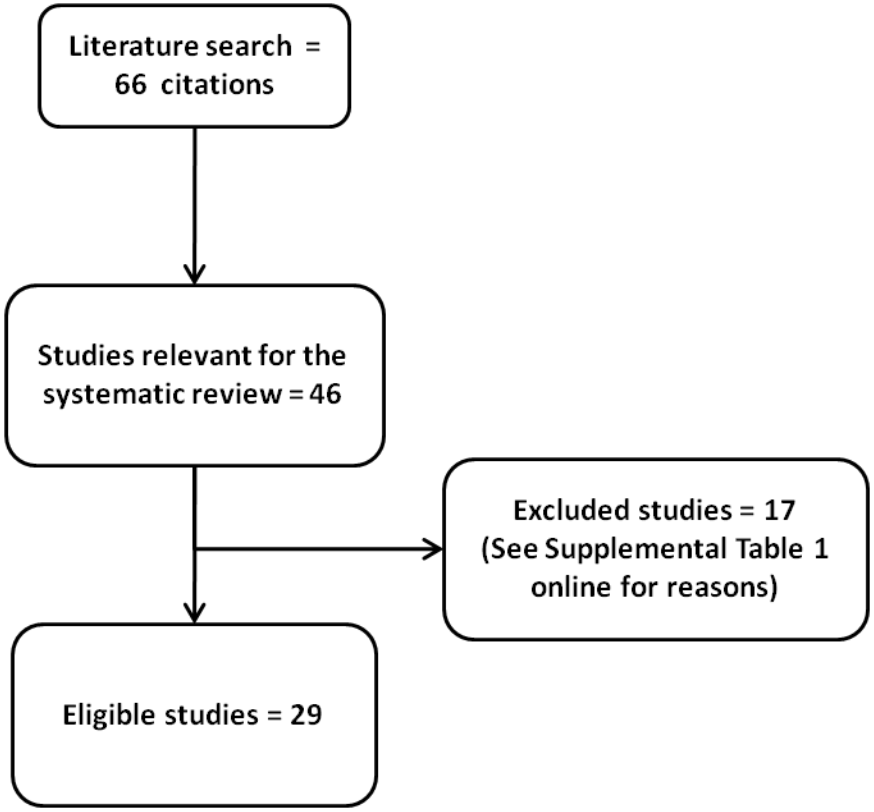


Figure 1 supplémentaire. *Flow chart* rapportant la revue de systématique de la littérature et le processus de sélection.

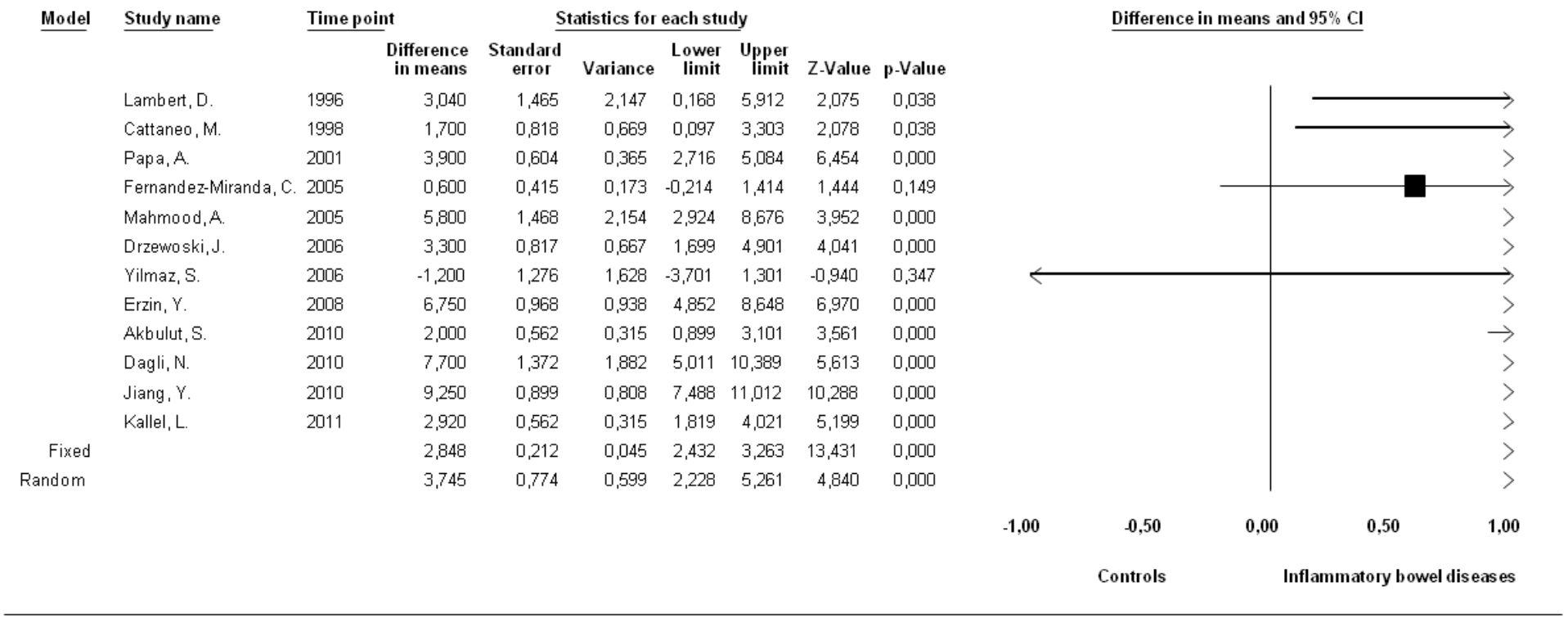


Figure 2 supplémentaire. Forest plot rapportant la différence moyenne pondérée du taux plasmatique d'homocystéine entre les sujets avec une MICI et les contrôles. La ligne verticale illustre le point de « non-différence » entre les deux groupes. La ligne horizontale rapporte l'IC 95 %.

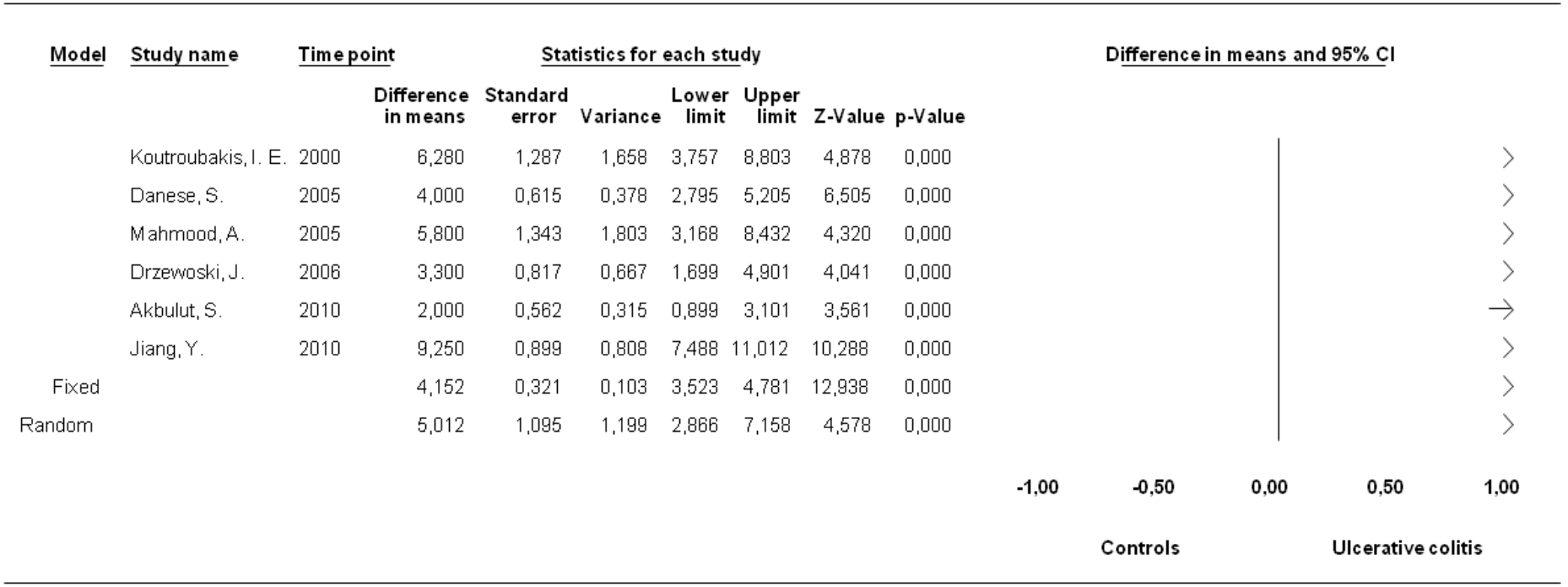


Figure 3 supplémentaire. Forest plot rapportant la différence moyenne pondérée du taux plasmatique d'homocystéine entre les sujets avec une RCH et les contrôles. La ligne verticale illustre le point de « non-différence » entre les deux groupes. La ligne horizontale rapporte l'IC 95 %.

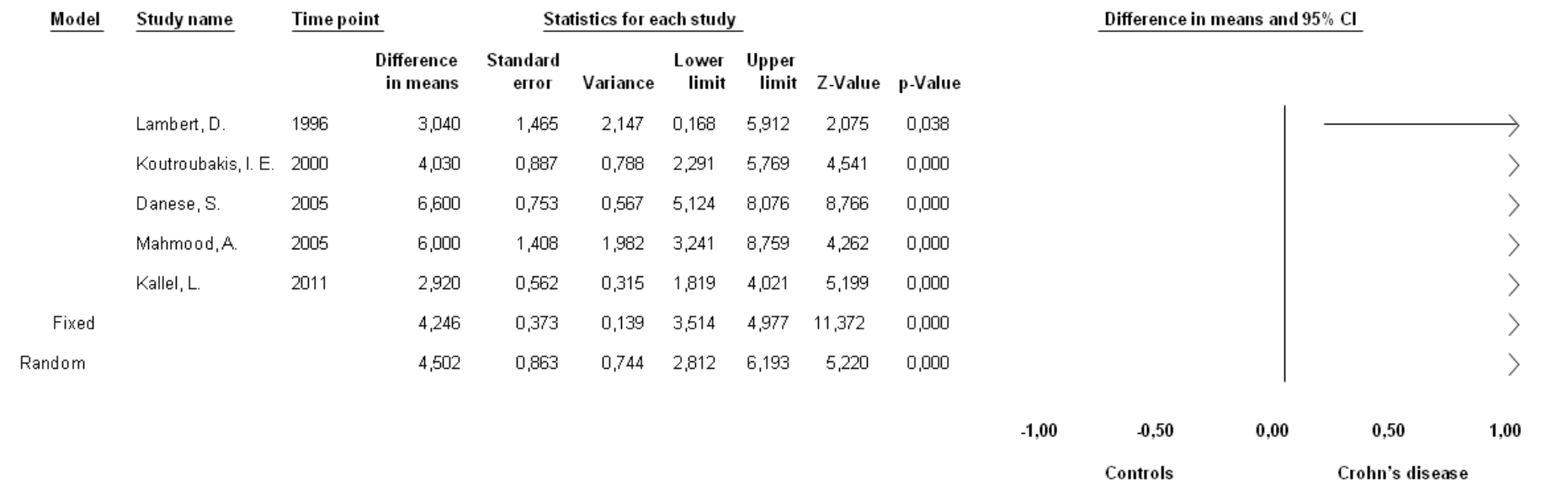


Figure 4 supplémentaire. *Forest plot* rapportant la différence moyenne pondérée du taux plasmatique d'homocystéine entre les sujets avec une MC et les contrôles. La ligne verticale illustre le point de « non-différence » entre les deux groupes. La ligne horizontale rapporte l'IC 95 %.

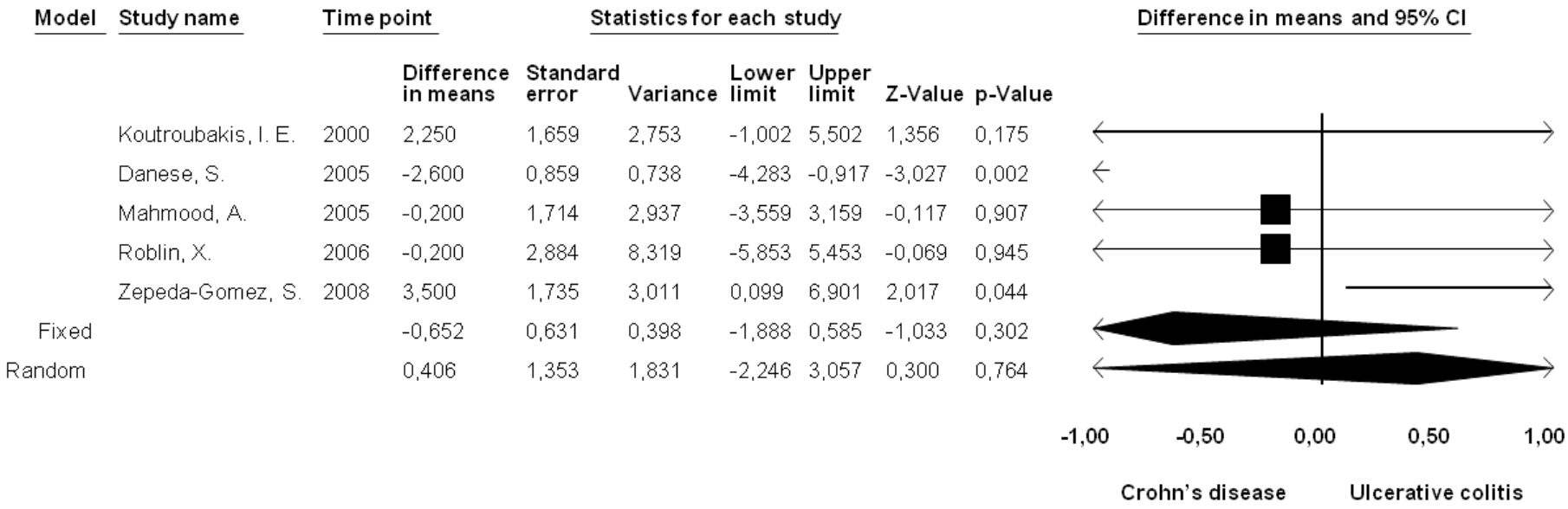
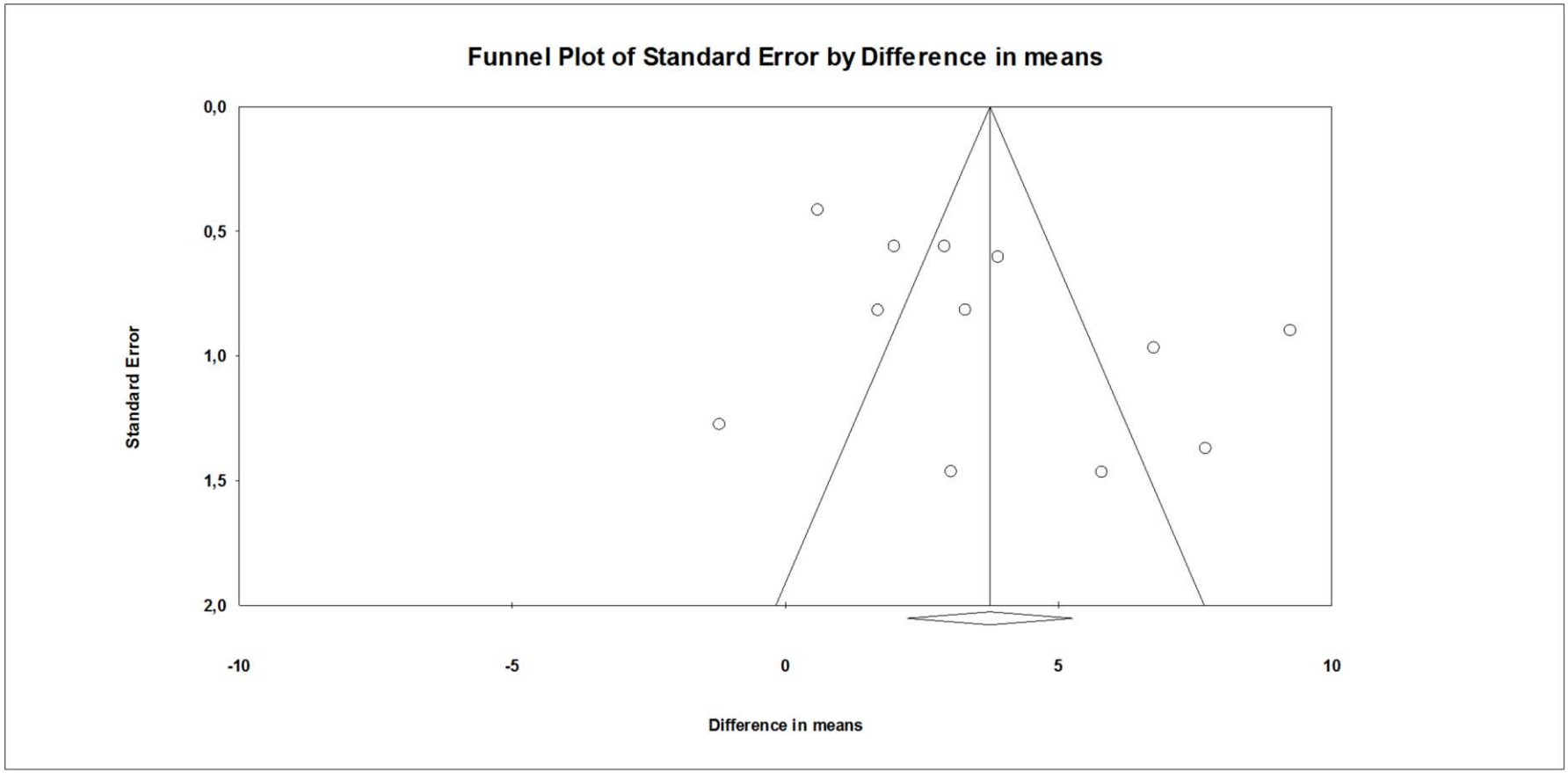
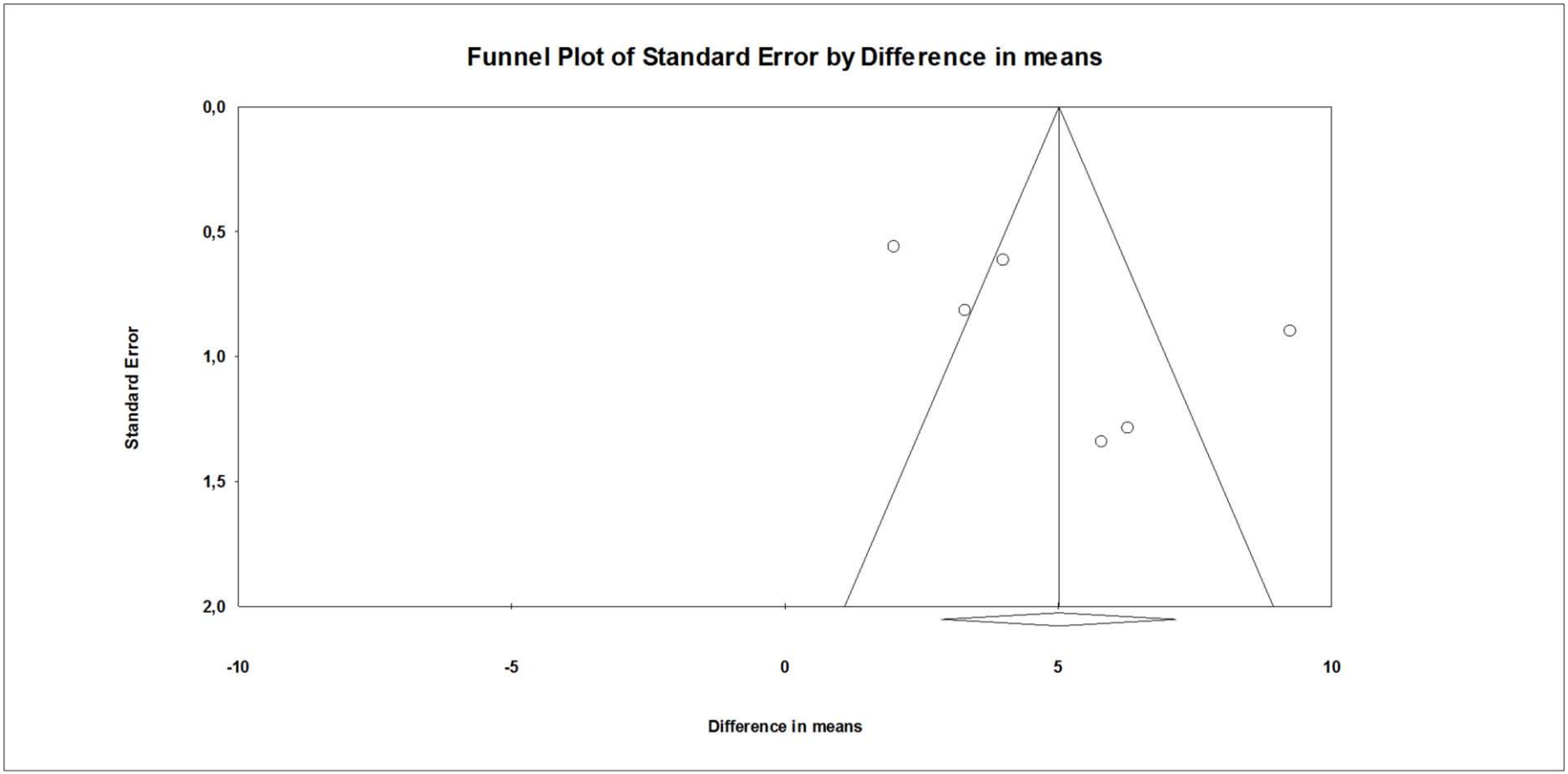


Figure 5 supplémentaire. *Forest plot* rapportant la différence moyenne pondérée du taux plasmatique d'homocystéine entre les sujets avec une RCH et une MC. La ligne verticale illustre le point de « non-différence » entre les deux groupes. La ligne horizontale rapporte l'IC 95 %.



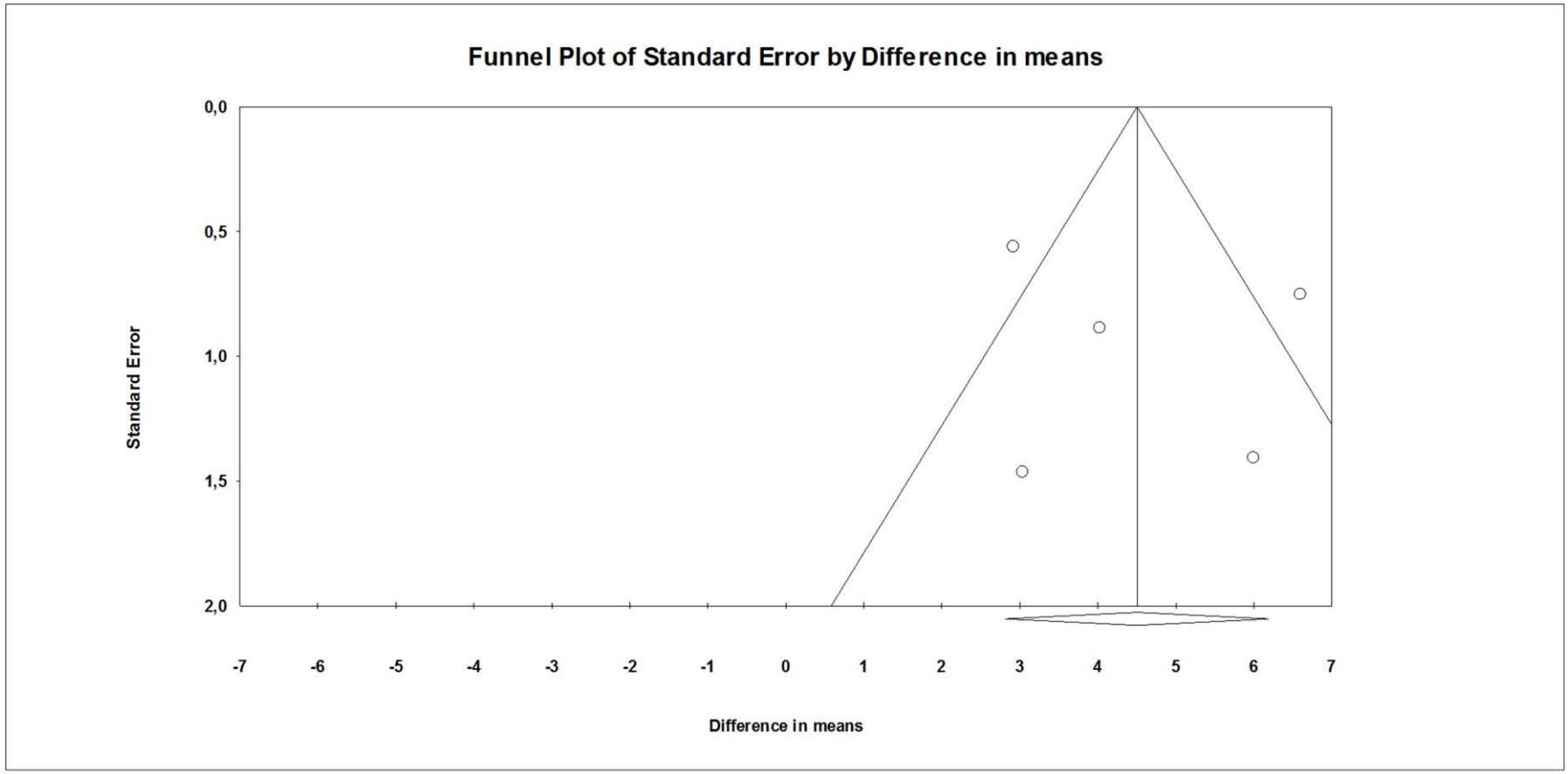
Supplemental Figure 6 online. Oussalah et al.

Figure 6 supplémentaire. *Funnel plot* évaluant le risque de biais de publication. Chaque point représente une étude séparée. *Funnel plot* rapportant l'erreur standard par la différence moyenne pondérée entres les sujets avec une MICI et les contrôles.



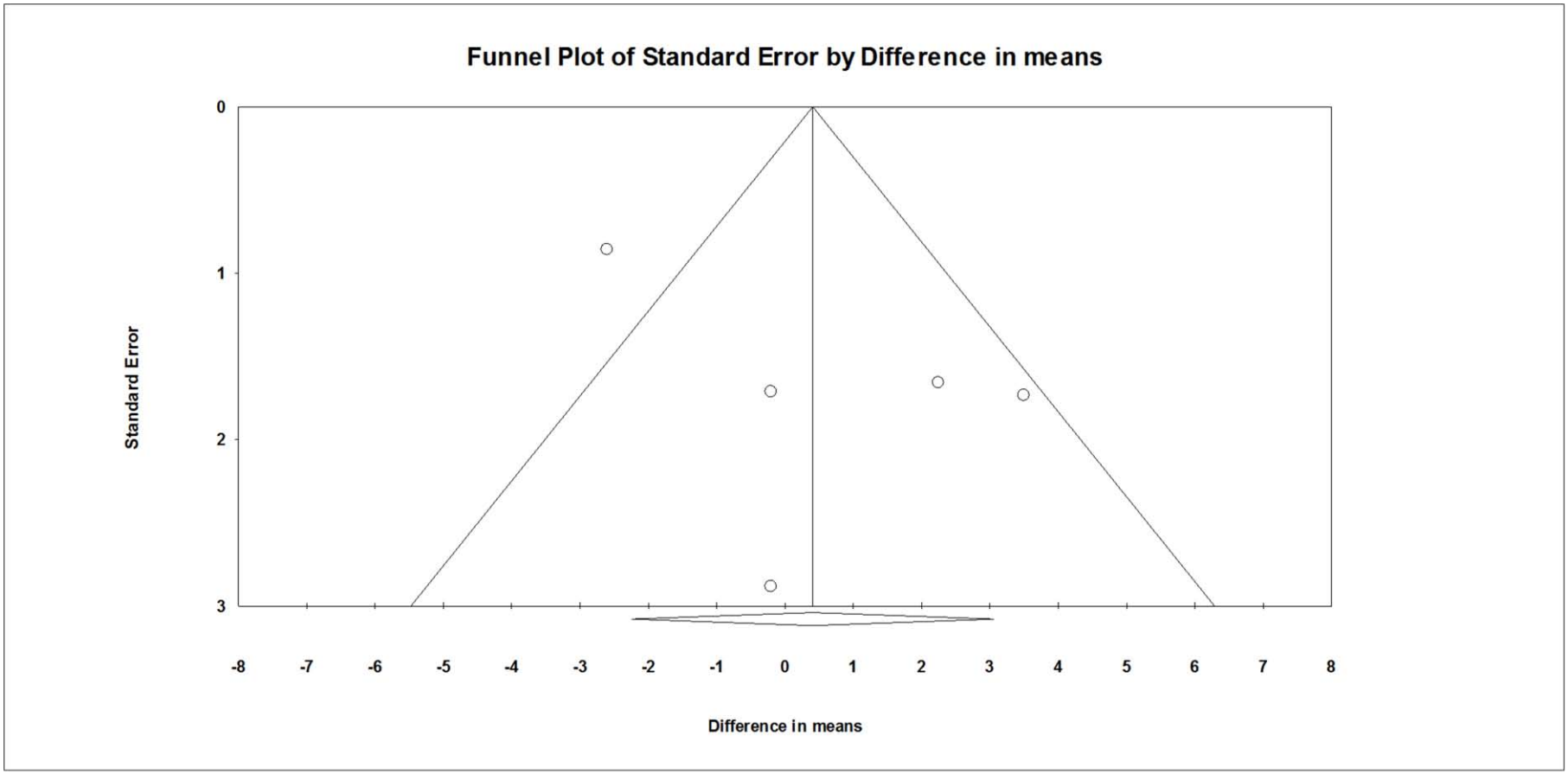
Supplemental Figure 7 online. Oussalah et al.

Figure 7 supplémentaire. *Funnel plot* évaluant le risque de biais de publication. Chaque point représente une étude séparée. *Funnel plot* rapportant l'erreur standard par la différence moyenne pondérée entres les sujets avec une RCH et les contrôles.



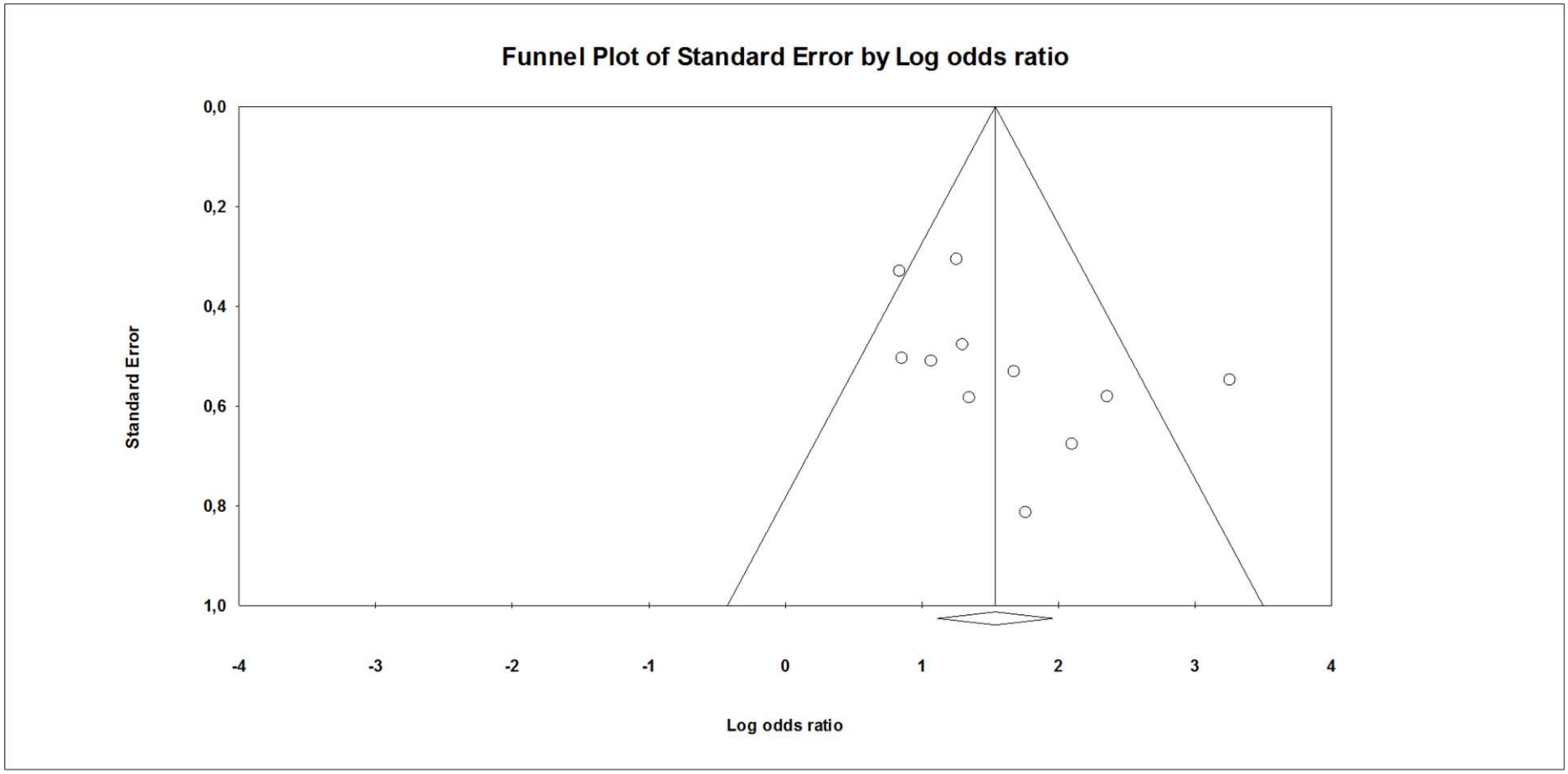
Supplemental Figure 8 online. Oussalah et al.

Figure 8 supplémentaire. *Funnel plot* évaluant le risque de biais de publication. Chaque point représente une étude séparée. *Funnel plot* rapportant l'erreur standard par la différence moyenne pondérée entres les sujets avec une MC et les contrôles.



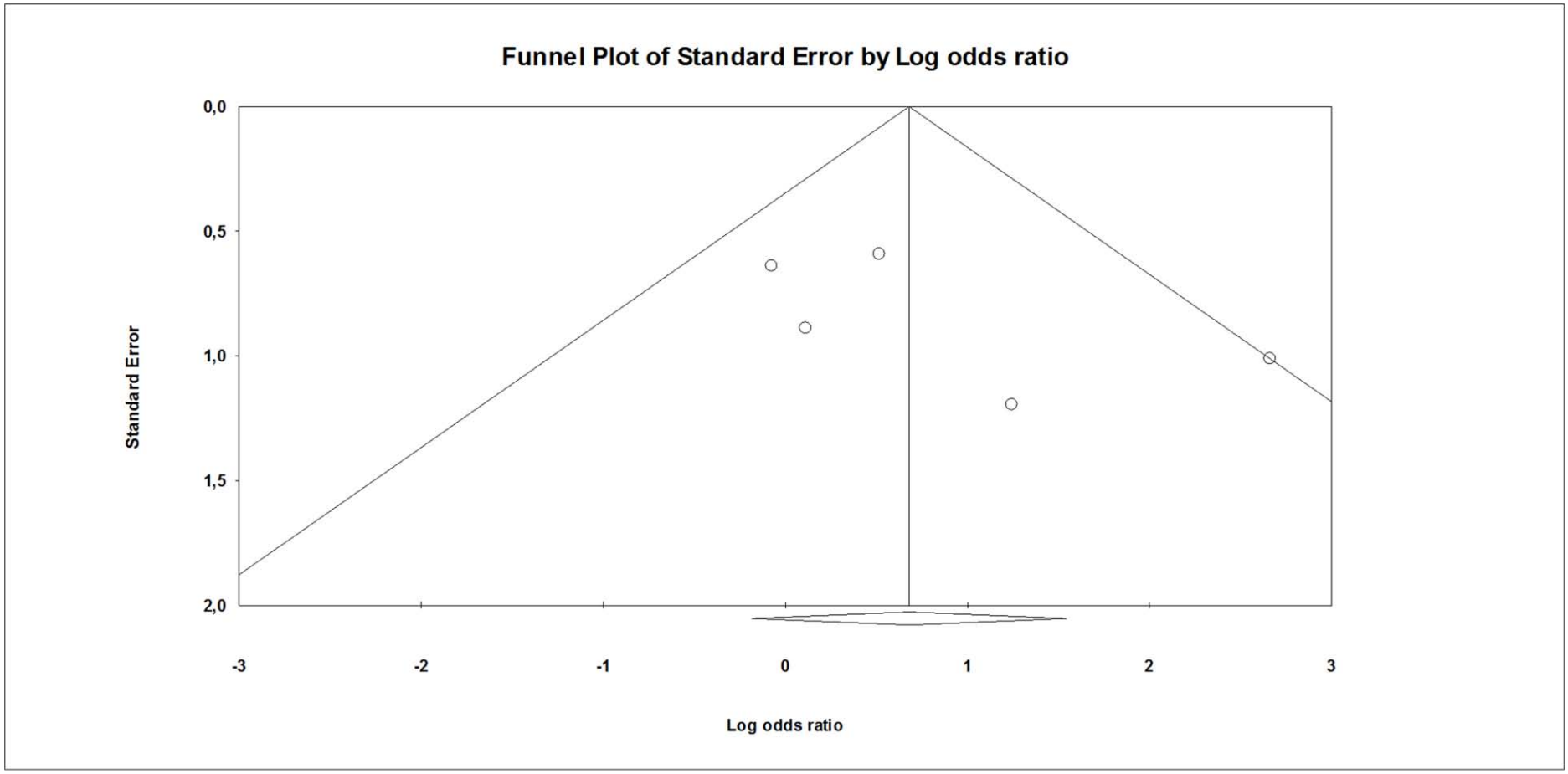
Supplemental Figure 9 online. Oussalah et al.

Figure 9 supplémentaire. *Funnel plot* évaluant le risque de biais de publication. Chaque point représente une étude séparée. *Funnel plot* rapportant l'erreur standard par la différence moyenne pondérée entres les sujets avec une RCH et ceux avec une MC.



Supplemental Figure 10 online. Oussalah et al.

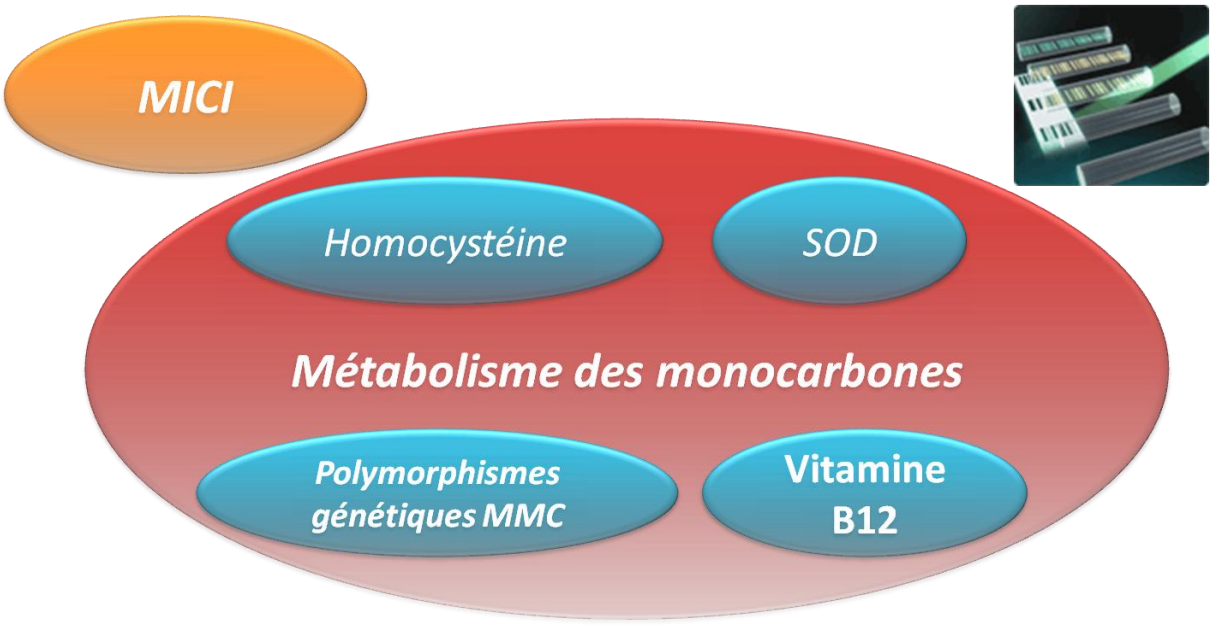
Figure 10 supplémentaire. *Funnel plot* évaluant le risque de biais de publication. Chaque point représente une étude séparée. *Funnel plot* rapportant l'erreur standard par le log Odds ratio (Odds ratio pour l'hyperhomocystéinémie entre les sujets avec une MICI et les contrôles).



Supplemental Figure 11 online. Oussalah et al.

Figure 11 supplémentaire. *Funnel plot* évaluant le risque de biais de publication. Chaque point représente une étude séparée. *Funnel plot* rapportant l'erreur standard par le log Odds ratio (Odds ratio pour l'hyperhomocystéinémie entre les sujets MICI avec ou sans complication thromboembolique).

12 Etude N°3 : *Etude des déterminants génétiques du métabolisme des monocarbones au cours de la maladie de Crohn : Etude d'association utilisant un plex de 384 SNP (manuscrit soumis)*



12.1 Contexte de notre étude

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont un groupe d'affections idiopathiques incluant la RCH et la MC. Selon la théorie actuellement admise, la pathogénie de ces maladies implique une dysrégulation de la réponse immunitaire muqueuse dirigée contre des éléments de la flore intestinale, survenant chez des patients génétiquement prédisposés. Ces maladies représentent un véritable problème de santé publique de part leur pronostic[14], leur retentissement sur la qualité de vie des patients, du handicap fonctionnel qu'elles génèrent[16], et de leur coût. [11-13, 277]

Plusieurs études ont évalué le rôle de l'homocystéine dans la physiopathologie des MICI.[312] L'homocystéine agit comme un pro-oxydant[313] et a été incriminée dans la diminution de la capacité antioxydante chez les patients avec une MICI. [144] L'homocystéine est impliquée dans la réponse immunitaire de l'hôte par l'induction de la production de plusieurs cytokines et chémokines proinflammatoires[147, 148], le stress du réticulum endoplasmique[364], et par la régulation de l'expression des gènes par la méthylation au niveau des promoteurs des gènes.[365] Plusieurs études ont évalué la cause de l'hyperhomocystéinémie observée au cours des MICI et la plupart des études ont fait le lien entre l'hyperhomocystéinémie et le statut carencé en vitamine B12 et/ou en folate.[273, 274] L'homocystéine possède *in vitro* une action pro-oxydante, son groupe thiol étant oxydé pour former des espèces réactives de l'oxygène qui sont responsables de lésions et de dysfonctionnements cellulaires.[137] Des études expérimentales chez l'animal ont permis de démontrer que des souris transgéniques surexprimant la SOD présentent une colite inflammatoire plus sévère après administration de dextran sulfate de sodium (DSS) que des souris sauvages.[138] Chez l'homme, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle majeur joué par les espèces réactives de l'oxygène dans la survenue des lésions de la muqueuse colique au cours des MICI.[139, 140]

Le but de ce travail était d'étudier le déterminisme de taux plasmatique de l'homocystéine, de la SOD, et de l'âge au diagnostic de la MC dans une étude d'association génomique sur une cohorte de 296 patients avec une MC en utilisant un plex de 384 SNP ayant permis un génotypage exhaustif des gènes impliqués dans le métabolisme des monocarbones.

12.2 Patients et méthodes

12.2.1 Population étudiée

L'étude a inclus des patients avec une MC diagnostiquée sur la base des critères internationalement admis.[389] Tous les patients inclus étaient issus de la cohorte MICI de Nancy rapportée antérieurement.[390] L'inclusion avait lieu en cours de consultation ou lors d'une hospitalisation. Un consentement éclairé était obtenu pour tous les patients.

12.2.2 Prélèvements sanguins

Une phlébotomie était réalisée à jeun et le sang était collecté dans un tube EDTA. Les échantillons étaient centrifugés immédiatement à 2500g pendant 15 min à température ambiante. Les aliquots étaient conservés à une température de -70°C jusqu'à l'analyse.

12.2.3 Dosages de la vitamine B12, des folates, de l'homocystéine et de la superoxyde dismutase

Tous les dosages étaient réalisés dans le même laboratoire (Vandoeuvre-lès-Nancy, France). L'homocystéine était dosée par chromatographie en phase liquide à haute

performance (UPLC-MS/MS, *ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*) tel que rapporté précédemment[321] avec une colonne Acquity UPLC BEH C18 (1,7 µm, 2,1 × 50 mm) (Waters Corporation, Versailles, France). Les taux plasmatiques de vitamine B12 et de folate étaient dosés en utilisant des kits de dosage faisant appel à la chimiluminescence automatisée (Chiron Diagnostics ASC:180® Automated Chemiluminescence Systems; East Walpole, MA, USA). Les coefficients de variation intra-essai (reproductibilité) pour la vitamine B12, les folate, l'homocystéine, et l'acide méthylmalonique étaient respectivement de 2,8 %, 5,1 %, 4,5 % et 7,3 %. La mesure du taux plasmatique de la SOD a été réalisée avec le kit Ransod (Randox, USA) selon les instructions du fabricant.

12.2.4 Analyse de l'ADN génomique

L'ADN génomique a été isolé à partir des leucocytes du sang périphérique en utilisant un kit Qiagen (Qiagen-France, Courtaboeuf cedex France). Le génotypage des polymorphismes impliqués dans le métabolisme des monocarbones a été réalisé sur une plateforme Illumina VeraCode BeadXpress (Illumina, San Diego, California) à l'aide d'un plex de 384 SNP (*single nucleotid polymorpohism*), « *plex méthylation* », élaboré à l'unité Inserm U954. Le choix des polymorphismes sélectionnés dans le plex méthylation était basé sur une revue exhaustive de la littérature réalisée par les investigateurs du laboratoire Inserm U954 (Professeur Jean-Louis Guéant et Docteur Laetitia Goffinet). Les SNP retenus dans le plex méthylation étaient sélectionnés selon une méthodologie de recherche préalablement définie sur la base des études *in silico* (NCBI : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/ ; HapMap : http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/ ; Ensembl : http://www.ensembl.org/index.html), de la recherche bibliographiques et/ou consécutives des travaux expérimentaux afin d'isoler les variants présentant une fréquence génotypique attendue supérieure à 10 % dans la

population étudiée, lorsque que celle-ci est connue, et pouvant se traduire par une modification de fonction, de régulation, de site d'épissage, de *turn over* du transcrit ou associée à une expression phénotypique sans que la mécanistique soit explicite. Le nombre de polymorphismes étudiés par plex est de 384 et les cohortes sont évaluées et segmentées par plaque de 96 sujets. Les tableaux supplémentaires 1 et 2 rapportent respectivement les SNP retrouvés par la recherche systématique et ceux retenus dans le plex méthylation selon le protocole suscité. La revue systématique des SNP des différentes voies du métabolisme des monocarbones a permis de retenir 384 SNP situés dans 77 gènes sur les 1500 SNP candidats situés dans 89 gènes (**Tableau supplémentaire 1**).

12.2.5 Dessin du plex méthylation

Le dessin de ce plex était en lien avec les contraintes inhérentes à la technologie VeraCode GoldenGate d'Illumina. Le plex est en phase liquide et les données de fluorescences issues de la ligation d'un oligonucléotide aspécifique avec un oligonucléotide spécifique du polymorphisme, auquel est adjoint le VeraCode, porteur du code barre d'identification de ce dernier. Un pré-dessin manuel de compatibilité des SNP au sein du même plex a été réalisé et évalué par un score de qualité prédit par le logiciel *Illumina® Assay Design Tool*.

12.2.6 Lecture du plex méthylation

La lecture du plex a été réalisée à l'aide du logiciel *Illumina® BeadStudio Genotyping Module v3.2*. Les signaux d'intensité des 96 échantillons d'un même locus étaient représentés sur un graphique cartésien rapportant l'intensité du laser vert dans l'axe des ordonnées et celle du laser rouge dans l'axe des abscisses. La normalisation suit un procédé accordant à chaque

point en représentation cartésienne une valeur d'angle Thêta (angle que forme le point avec l'axe des abscisses) et une valeur R correspondant à la valeur lue en ordonnée (Y). Les résultats sont déterminés par calculs de cluster, selon l'allèle spécifique du *VeraCode Illumina* étudié.

12.2.7 Analyse statistique

Toutes les variables quantitatives sont décrites en médiane et en intervalle interquartile (25e et 75e percentiles). Toutes les proportions et les fréquences génotypiques sont exprimées en pourcentages avec un IC 95 %. Le contrôle qualité des données a été réalisé avant l'analyse statistique. Tous les SNP avec un *call rate* inférieur à 0,94 et tous les SNP déviés par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg ont été éliminés de l'analyse. Les modèles génétiques additifs, dominant et récessif ont été appliqués à l'analyse génétique des données. En analyse univariée, la comparaison des taux plasmatiques de l'homocystéine (µmol/L), de la SOD, et de l'âge du diagnostic de la MC entre les différents génotypes des polymorphismes étudiés a été réalisée par le test de Kruskal-Wallis. Pour chaque objectif d'analyse, les SNP significatifs en analyse univariée ont été intégrés dans un modèle de régression multiple en utilisant la méthode *stepwise*. Toutes les variables avec un $P < 0,1$ étaient intégrées dans le modèle et les variables avec un $P < 0,05$ étaient retenues dans le modèle. Les modèles multivariés dont la variable dépendante était l'homocystéine et la SOD (UI/g Hb) on été ajustés sur l'âge et le sexe. Tous les SNP indépendamment associés à la variable dépendante étaient testés à la recherche d'une interaction épistatique dans un modèle de régression. L'étude des corrélations était réalisée en utilisant le coefficient de corrélation de Spearman. Tous les tests statistiques rapportés sont bilatéraux et les valeurs de $P < 0,05$ étaient considérées comme statistiquement significatives. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Golden Helix'

SNP & Variation Suite v7.5.2 (Bozeman, MT, USA) et MedCalc, version 11.4.4 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgique).

12.3 Résultats

12.3.1 Caractéristiques de base des 296 patients inclus

Entre le 01/06/2005 et le 01/04/2011, 296 patients avec une MC on été inclus dans l'étude. Les caractéristiques de base des 296 patients inclus sont rapportées dans le tableau 2. L'âge médian des patients inclus était de 31 ans et les patients de sexe masculin représentaient 38 % de l'effectif global. Il est intéressant de souligner que les valeurs médianes de vitamine B12 et de folate étaient dans les limites de la normale avec des chiffres respectifs de 207 pmol/L (IQR 25e – 75e : 160 à 279 pmol/L) et 7,8 nmol/L (IQR 25e – 75e : 5,2 à 13,3 nmol/L). La valeur médiane de l'indice d'activité de la MC (CDAI, *Crohn's disease activity index*, en anglais) était de 122 ce qui correspond à une maladie quiescente. Le taux plasmatique de l'homocystéine était négativement corrélé avec celui de la vitamine B12 (rho=-0.282, P<0.0001) et des folates (rho=-0.379, P<0.0001).

12.3.2 Facteurs prédictifs du taux plasmatique de l'homocystéine

12.3.2.1 Analyse univariée

En analyse univariée, neuf SNP étaient significativement associés au taux plasmatique de l'homocysteine : le rs1801133 correspondant au gène *MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H)* ; les SNP rs202700 et rs10839236 correspondant au gène *FOLH1: folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1* ; les rs34564141, rs17848169, rs34291900, rs41268685 correspondant au gène *LRP2: low density lipoprotein receptor-related protein 2*; et le rs13043752, *AHCY: adenosylhomocysteinase* (**Tableau 3**). A noter

que le rs rs1999594, significativement associé au taux plasmatique d'homocystéine n'a pas de correspondance avec un gène particulier sur la base de donnée dbSNP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp). Le contrôle qualité des neuf SNP significativement associés au taux plasmatique d'homocystéine est rapporté dans le **Tableau 4**.

12.3.2.2 Analyse multivariée

En analyse multivariée par régression multiple, deux SNP était indépendamment associés avec le taux plasmatique de l'homocystéine dans le modèle génétique additif : 1) le rs1801133 (*MTHFR),* coefficient (β) = 1,3769 ; Erreur standard = 0,631 ; *P* = 0,0301 ; et 2) le rs13043752 (*AHCY*)*,* coefficient (β) = 5,6163 ; Erreur standard = 2,2687 ; *P* = 0,014 (**Tableau 5**). Par ailleurs, ces mêmes SNP —rs1801133 (*MTHFR*) et rs13043752 (*AHCY*)— étaient indépendamment et respectivement associé avec le taux plasmatique d'homocystéine dans les modèles génétiques dominant et récessif (**Tableau 5**). Il est intéressant de noter que l'âge était indépendamment et positivement associé au taux plasmatique de l'homocystéine et que les taux de folate et de vitamine B12 étaient indépendamment et négativement associés au taux plasmatique de l'homocystéine (**Table 5**). Aucune interaction épistatique n'a été retrouvée entre les différents SNP dans chacun des trois modèles génétiques.

12.3.3 Facteurs prédictifs du taux plasmatique de la superoxyde dismutase

12.3.3.1 Analyse univariée

En analyse univariée, huit SNP étaient significativement associés au taux plasmatique de la SOD : rs4920037 et le rs234709 correspondant au gène ***CBS****: cystathionine-beta-synthase*, le rs719235 correspondant au gène ***GGH****: gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, folylpolygammaglutamyl hydrolase)* ; le rs11254363, correspondant au gène ***CUBN****: cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)* ; le rs9606756 correspondant au gène ***TCN2****:*

transcobalamin II ; le rs rs41301825 correspondant au gène ***AHCY**: adenosylhomocysteinase* ; le rs rs492602 correspondant au gène ***FUT2**: fucosyltransférase 2* (secretor status included); et le rs3918232 correspondant au gène ***NOS3**: nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)* (**Tableau 6**). Le contrôle qualité des neuf SNP significativement associés au taux plasmatique de la SOD est rapporté dans le **Tableau 7**.

12.3.3.2 Analyse multivariée

En analyse multivariée par régression multiple, en utilisant le modèle génétique additif quatre SNP étaient indépendamment associés avec le taux plasmatique de la SOD : 1) le rs719235 (*GGH),* coefficient (β) = -61,6358 ; Erreur standard = 26,211 ; *P* = 0,0197 ; 2) le rs9606756 (*TCN2),* coefficient (β) = 108,0493 ; Erreur standard = 32,2779 ; *P* = 0,001 ; 3) le rs41301825 (*AHCY),* coefficient (β) = -210,7092 ; Erreur standard = 103,1095 ; *P* = 0,0424 ; et 4) le r rs492602 (*FUT2),* coefficient (β) = 52,5656 ; Erreur standard = 22,7366 ; *P* = 0,0218 (**Tableau 8**).

En utilisant le modèle génétique dominant, trois SNP étaient indépendamment associés au taux plasmatique de la SOD : 1) le rs11254363 (*CUBN),* coefficient (β) = -81,4492 ; Erreur standard = 32,9349 ; *P* = 0,0143 ; 2) le rs9606756 (*TCN2),* coefficient (β) = 101,5839 ; Erreur standard = 37,7707 ; *P* = 0,0078 ; et 3) le rs492602 (*FUT2),* coefficient (β) = 78,7124 ; Erreur standard = 36,0713 ; *P* = 0,0303 (**Tableau 8**).

Dans le modèle génétique récessif, un seul SNP était indépendamment associé au taux plasmatique de la SOD : rs9606756 (*TCN2*), coefficient (β) = 289,0633 ; Erreur standard = 106,1499 ; *P* = 0,007 (**Tableau 8**).

Aucune interaction épistatique n'a été retrouvée entre les différents SNP dans chacun des trois modèles génétiques.

12.3.4 Facteurs prédictifs de l'âge du diagnostic de la maladie de Crohn

12.3.4.1 Analyse univariée

En analyse univariée, huit SNP étaient significativement associés à l'âge du diagnostic de la MC : rs9001 correspondant au gène, *CHDH: choline déshydrogénase* ; rs492602 correspondant au gène, *FUT2: fucosyltransférase 2 (secretor status included)* ; rs4820889 correspondant au gène, *TCN2: transcobalamin II* ; rs1045642 correspondant au gène, *ABCB1: ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1* ; rs1801394 correspondant au gène, *MTRR: 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase* ; rs202676 et rs202720 correspondant au gène *FOLH1: folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1* ; rs1208 correspondant au gène *NAT2: N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase)* (**Tableau 9**). Le contrôle qualité des huit SNP significativement associés à l'âge de diagnostic de la MC est rapporté dans le **Tableau 10**.

12.3.4.2 Analyse multivariée

En analyse multivariée par régression multiple, en utilisant le modèle génétique additif quatre SNP étaient indépendamment associés avec l'âge de diagnostic de la MC parmi lesquels deux SNP étaient associé à un âge précoce de la MC : 1) le rs9001 (*CHDH),* coefficient (β) = -4.455 ; Erreur standard = 1.7002 ; *P* = 0.0093 ; et 2) le rs1045642 (*ABCB1),* coefficient (β) = -2.4539 ; Erreur standard = 1.1141 ; *P* = 0.0285 (**Tableau 11**).

En utilisant le modèle génétique dominant, les mêmes SNP étaient indépendamment associés un âge précoce de la MC : 1) le rs9001 (*CHDH),* coefficient (β) = -4.8214 ; Erreur standard = 1.8499 ; *P* = 0.0097 ; et 2) le rs1045642 (*ABCB1),* coefficient (β) = -3.6148 ; Erreur standard = 1.7561 ; *P* = 0.0405 (**Tableau 11**).

Aucun SNP n'était retenu lorsque les analyses étaient réalisées selon le modèle génétique récessif (**Tableau 11**). Par ailleurs, aucune interaction épistatique n'a été retrouvée entre les différents SNP dans chacun des trois modèles génétiques.

12.3.4.3 SNP score basé sur les SNP associés à une survenue précoce de la maladie de Crohn

Un score composite basé sur les deux SNP (*SNP score*) associés à une survenue précoce de la MC (rs9001 : *CHDH* et rs1045642 : *ABCB1*) a été élaboré selon le modèle génétique additif. La présence d'un allèle mineur étais scorée '1' et la présence d'un allèle majeur était scorée '0'. Pour chaque SNP, le score pouvait varier de '0' à '2' et le score basé sur les deux SNP pouvait varier de '0' à '4'.

L'âge de survenue de la MC était significativement et inversement corrélé au *SNP score* (r = -22,6 ; *P* = 0,0002 ; IC 95 % : -0.336 à -0.110). De façon consistante, la distribution des médianes d'âge était significativement influencée par le SNP scores (*P* = 0,0046) (**Figure 1 et Tableau 12**).

12.4 Discussion

Nous rapportons la première étude qui a évalué de façon exhaustive les polymorphismes des gènes impliqués dans le métabolisme des monocarbones chez des patients atteints de MC. Dans notre étude deux SNP étaient indépendamment associés au taux plasmatique de l'homocystéine : le rs1801133 correspondant au gène *MTHFR* et le rs13043752 correspondant au gène *AHCY*. Dans une étude cas-témoin, Mahmud *et al.* ont évalué la prévalence du polymorphisme *MTHFR C677T* chez 174 patients MICI et 273 témoins.[314] La concentration plasmatique d'homocystéine était significativement plus élevée chez les patients MICI en comparaison aux témoins.[314] La prévalence du génotype *MTHFR 677, T/T*

était de 17,5 % dans le groupe RCH, de 16,8 % dans le groupe MC versus 7,3 % dans le groupe contrôle.[314] Le génotype *MTHFR 677, T/T* était associé à un taux significativement supérieur d'homocysteine dans le plasma.[314] De façon consistante, dans un travail prospectif sur 96 patients avec une arthrite rhumatoïde, le taux plasmatique d'homocystéine était significativement plus élevé chez les patients présentant un génotype *MTHFR 677, T/T*.[391]

Dans la présente étude, le polymorphisme rs13043752 de l'adénosylhomocystéinase était indépendamment associé avec le taux plasmatique d'homocystéine. L'adénosylhomocystéinase, appelée aussi, S–adénosylhomocystéine hydrolase (SAHH) convertit la SAH en homocystéine permettant ainsi le recyclage de l'homocystéine en méthionine dans la voie de la reméthylation.[1] La SAH formée après le rajout d'un groupement méthyl à la S-adénosyl-méthionine est hydrolysée en adénosine et en homocystéine par la SAHH dans les conditions physiologiques. Le rôle de la SAHH au cours des désordres inflammatoires a été rapporté dans plusieurs études.[392-397] Il a été démontré que l'administration d'un inhibiteur de la SAHH à des modèles cellulaires ou animaux entrainait une accumulation d'adénosyl homocystéine. L'inhibition de la SAHH peut représenter une cible thérapeutique potentielle car son blocage peut altérer la méthylation cellulaire des phospholipides, des protéines, des petites molécules, de l'ADN et de l'ARN.[397] Les effets attendus de cette inhibition incluent l'activation des gènes, l'induction de la différentiation cellulaire, l'augmentation de l'expression des facteurs de transcription, et parfois une répression des gènes.[397] Il a été démontré que l'inhibition de la SAHH pouvait présenter des propriétés immunosuppressives.[396] Dans un modèle d'encéphalite démyélinisantes auto-immune —qui sert de modèle à la forme humaine de la sclérose en plaque— l'administration d'un inhibiteur de la SAHH entrainait une suppression de l'activation des lymphocytes T avec une inhibition de la kinase cycline-dépendante.[395] Lawson *et al.* ont rapporté que l'inhibition de la SAHH entrainait une immunosuppression par la réduction de la phosphorylation de

plusieurs protéines impliquées dans la signalisation TCR, incluant Akt, Erk1/2, et NF-kappaB.[394] De façon intéressante, cet effet était limité aux lymphocytes T CD4+.[394] Ces données suggèrent que la transmethylation est nécessaire pour l'activation des lymphocytes T CD4 et que son inhibition peut représenter une approche thérapeutique interessante dans des maladies auto-immunes. Kominsky *et al.* ont évalué dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de colite murine les conséquences métaboliques de l'inflammation au niveau de la muqueuse intestinale.[392] L'analyse de la signature métabolique dans les tissus inflammatoires des colites murines a démontré une altération de l'expression des métabolites associés à la méthylation cellulaire.[392] Par ailleurs, l'expression des enzymes centrales à la méthylation —S-adénosylméthionine synthase et S-adénosylhomocystéine hydrolase— était augmentée en réponse à l'inflammation.[392] Dans cette étude, la méthylation de l'ADN était nettement augmentée au cours de l'inflammation et l'activité NF-kappaB était inhibée après traitement par un inhibiteur réversible de la SAHH, le DZ2002.[392] Par ailleurs, dans cette étude, l'inhibition de la méthylation cellulaire dans un modèle murin de colite entrainait l'exacerbation de l'activité inflammatoire alors que la supplémentation en folate entrainait une amélioration de la sévérité de la colite.[392] De façon consistante, dans une étude préalablement publiée, nous avons démontré qu'un statut carencé en donneur de méthyle aggravait la colite expérimentale au DSS (Dextran sodium sulfate) chez le rat.[25] Dans notre étude nous avons mis en évidence une association indépendante entre le polymorphisme de la SAHH et l'activité plasmatique de la SOD. Toutes ces données soulignent le rôle fondamental de la SAHH dans le maintien de l'homéostasie intestinale via le statut de méthylation.

Nos données montrent l'implication de plusieurs gènes du métabolisme des monocarbones dans le déterminisme du taux plasmatique de la SOD. Il a été démontré que les taux élevés d'homocystéine augmentaient le taux plasmatique de la SOD, un marqueur fiable et validé du stress oxydatif.[22, 23] Récemment, des taux plasmatiques de la SOD plus élevés ont

été rapportés chez des patients avec MICI[398], et les taux d'homocystéine ont été corrélés à l'activité, au nombre de poussées et à la durée de la maladie.[352] Trois des gènes associés à la SOD sont liés à la vitamine B12 (*FUT2, CUBN*, et *TCN2*), un est lié aux folates (*GGH*), et un dernier à la synthèse cellulaire de l'homocystéine (*AHCY*). Ceci suggère que le métabolisme des monocarbones peut être associé à la sévérité de la MC à travers la SOD. Dans la présente étude, le polymorphisme de *FUT2* était indépendamment associé au taux de SOD. La famille des α-1,2-fucosyltransférases (dénommée aussi l'enzyme Se) catalyse l'addition du fucose — un désoxy-hexose— sur une liaison α-1,2 au galactose de type 1 et 2 pour former les antigènes H de types 1 et 2.[310] Le variant *FUT2* est un trait physiologique qui régule l'expression et la sécrétion des antigènes ABH dans les cellules épithéliales des glandes.[20] Environ, 20 % des caucasiens sont non-sécréteurs pour l'enzyme Se (Se-) et n'expriment pas les antigènes ABO dans la salive car ils sont homozygotes pour l'allèle muté *FUT2 461, A/A*.[20] Dans un modèle de souris transgénique pour l'alpha1,2-fucosyltransférase humaine et qui développait une colite spontanée, il a été démontré que l'altération de la glycosylation influençait le développement des cellules T.[399] Dans une étude GWA sur 896 patients avec une MC et 3204 témoins le polymorphisme de *FUT2* (rs602662) était significativement associé au risque primaire de la MC.[400] Ce résultat a été répliqué dans une cohorte indépendante composée de 1174 patients avec une MC et 357 témoins (*P*-value combinée = $4{,}9 \times 10^{-8}$).[400] L'association entre *FUT2* et MC a été récemment confirmée dans une étude méta-analyse de 6 études GWA ayant inclus au total 6333 patients avec MC et 15056 témoins.[401] Ces résultats suggèrent l'implication de *FUT2* dans la pathogénie de la MC et soulèvent le rôle potentiel de la couche de mucus dans la pathogénie de cette maladie.[400]

Dans notre étude le polymorphisme du gène ABCB1 était associé à un âge de survenue précoce de la MC. De façon consistante avec nos résultats, dans une étude cas-témoin ayant inclus 270 patients avec une RCH et 274 contrôles, les polymorphismes *ABCB1*

C1236T et *G2677T/A* étaient associé à un âge de survenue plus précoce (< 29 ans).[402] Le rôle du gène *ABCB1* a été étudié au cours des MICI.[402-411] Wilk *et al.* ont rapporté un modèle de souris *knockout mdr1a(-/-)* qui développait une colite spontanée à la 12e semaine.[412] Nones, *et al.* ont évalué à 12 semaines puis à 25 semaines de vie la flore bactérienne caecale dans un modèle de souris *knockout mdr1a(-/-)* en comparaison à un modèle sauvage (FVB).[406] A 12 semaines de vie les souris *mdr1a(-/-)* présentaient une différence avec les souris FVB sur les fragments d'ADN bactériens de *Bacteroides fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*.[406] *Escherichia coli* et *Acinetobacter sp*. étaient identifiés uniquement chez la souris mdr1a(-/-) à la 25e semaine avec une inflammation intestinale sévère.[406] Cette étude suggère que l'absence du transporteur Abcb1 dans les cellules intestinales peut entraîner une modification du microbiote intestinal avec comme risque potentiel le développement d'une inflammation intestinale.[406] Il est intéressant de souligner que dans cette étude, l'altération de la flore caecale précédait l'apparition de l'inflammation intestinale chez les souris mdr1a(-/-).[406] Dans une étude sur des biopsies coliques de patients avec une RCH, l'expression de l'ARNm et des protéines du gène *ABCB1* étaient significativement et inversement corrélées à l'activité de la maladie et significativement abaissée chez les patients avec une RCH modérée à sévère.[407] Dans une étude cas-témoin ayant recruté 307 patients avec une MICI et 355 témoins, le polymorphisme de *ABCB1* était associé à une forme réfractaire de la MC.[403] Dans une série pédiatrique de MC, le polymorphisme rs2032583 de *ABCB1* était significativement associé à la corticodépendance.[409] Le second polymorphisme impliqué dans la survenue précoce de la MC dans notre étude est celui de la choline déshydrogénase. A ce jour aucune étude n'a rapporté ce polymorphisme au cours des MICI ou des désordres inflammatoires.

En conclusion, la présente étude a évalué de façon exhaustive les polymorphismes des gènes impliqués dans le métabolisme des monocarbones chez de patients suivis pour une MC. Cette étude a confirmé le rôle du polymorphisme de *MTHFR* dans le déterminisme du taux

plasmatique de l'homocysteine et a mis en évidence pour la première fois le rôle du polymorphisme de la *SAHH* dans le déterminisme de l'homocysteine au cours des MICI. Par ailleurs, nous avons mis en évidence, l'implication de plusieurs gènes du métabolisme des monocarbones dans le déterminisme du taux plasmatique de la SOD. Trois de ces gènes sont liés à la vitamine B12 (*FUT2, CUBN*, et *TCN2*), un est lié aux folates (*GGH*), et un dernier à la synthèse cellulaire de l'homocystéine (*AHCY*). Par ailleurs, nous avons mis en évidence l'implication du gène *ABCB1* dans la survenue précoce de la MC. Ces résultats méritent d'être validés dans des cohortes indépendantes.

12.5 Tableaux

Tableau 1. Voies métaboliques étudiées dans le ‘plex méthylation’

Transport et métabolisme de la vitamine B12
Métabolisme de la choline
Métabolisme de la vitamine B6
Métabolisme et transport des folates
Voie de la reméthylation de l’homocystéine et métabolisme de la S-adénosyl-méthionine
Voie de la transsulfuration de l’homocystéine
Transméthylation, ADN, ARN, protéines, coenzymes, métabolites
Synthèse des polyamines
Métabolisme de la purine, de la pyrimidine et métabolisme des xénobiotiques

Tableau 2. Caractéristiques de base des 296 patients avec une maladie de Crohn inclus dans l'étude

	N	**n**	**%**	**IC 95 %**
Sexe masculin	296	112	38	33 à 44
Folate < 7 nmol/L	277	116	42	36 à 48 %
Vitamine B12 < 118 pmol/L	277	19	7	4 à 10 %
	N	**Médiane**		**IQR, 25e – 75e**
Age à l'inclusion	295	31		24 à 42
Homocysteine (µmol/L)	266	12,5		9,7 à 16,7
Vitamine B12 (pmol/L)	277	207		160 à 279
Folate (nmol/l)	277	7,8		5,2 à 13,3
Albumine (g/L)	125	39,2		35,6 à 43,3
SOD UI/g Hb	214	1132		1013à 1286
Crohn's disease activity index (CDAI)	121	122		55 à 202

Note. N : nombre de sujets ; IC 95 % : intervalle de confiance à 95 % ; IQR : intervalle interquartile 25e – 75e percentile ; SOD : superoxyde dismutase.

Tableau 3. SNP significativement associés au taux plasmatique d'homocystéine chez les 296 patients avec une maladie de Crohn

SNP	Chr.	Position	Nom du gène	Allèle Majeur (d)	Allèle Mineur (D)	Changement du résidu	HGVS	Homozygote pour l'allèle Mineur (DD)			Hétérozygote (Dd)			Homozygote pour l'allèle Majeur (dd)			*P*-value[a]
								N	Médiane	IQR	N	Médiane	IQR	N	Médiane	IQR	
rs1801133	1	11778964	*MTHFR*	G	A	Ala222Val	665C>T	30	16,1	9,0	124	12,5	6,8	119	11,3	5,9	0,0006
rs41268685	2	169704315	*LRP2*	G	A	Gly4417Asp	13250G>A	0	—	—	11	9,1	2,7	262	12,6	7,0	0,0109
rs202700	11	49173274	*FOLH1*	G	A	—	412-2253G>A	14	17,0	5,7	117	12,5	6,5	142	12,3	6,9	0,0232
rs34564141	2	169693583	*LRP2*	G	A	Met4601Ile	13803G>A	0	—	—	7	8,9	2,9	267	12,6	7,0	0,0248
rs17848169	2	169768848	*LRP2*	A	G	Asn2632Asp	7894A>G	0	—	—	19	10,7	3,4	255	12,6	7,0	0,0293
rs1999594	1	11881802	—	G	A	—	—	47	10,8	5,7	136	12,0	6,6	90	13,5	6,7	0,0322
rs34291900	2	169837792	*LRP2*	G	A	Gly669Asp	2006G>A	0	—	—	13	10,0	3,4	260	12,6	7,0	0,0386
rs10839236	11	49149242	*FOLH1*	A	G	—	1308+80G>A	39	14,5	8,2	128	11,8	5,6	107	12,5	7,0	0,0398
rs13043752	20	32346968	*AHCY*	G	A	Arg10Trp	112C>T	0	—	—	8	15,1	7,0	266	12,3	6,9	0,0484

NOTE. SNP : *single nucleotide polymorphism* ; Chr. : chromosome ; HGVS: *Human Genome Variation Society* ; N : nombre de sujets ; IQR : intervalle interquartile ; ***MTHFR*** *: methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H) ;* ***LRP2*** *: low density lipoprotein receptor-related protein 2 ;* ***FOLH1*** *: folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1 ;* ***AHCY****: adenosylhomocysteinase.*

[a] Test de Kruswak-Wallis.

Tableau 4. Contrôle qualité et description des SNP significativement associés au taux plasmatique de l'homocystéine chez les 296 patients avec une maladie de Crohn

SNP	Chr.	Position	Nom du gène	Call Rate	Nombre des allèles	Allèle mineur (D)	Freq. Allèle mineur	Allèle majeur (d)	Freq. Allèle majeur	HWE *P*-value	Compte génotypique				Compte allélique		
											DD	Dd	dd	Manquant	D	d	Manquant
rs1801133	1	11778964	*MTHFR*	0,944	2	A	0,331	G	0,669	0,680	26	114	111	15	166	336	30
rs41268685	2	169704315	*LRP2*	0,944	2	A	0,018	G	0,982	0,772	0	9	242	15	9	493	30
rs202700	11	49173274	*FOLH1*	0,944	2	A	0,263	G	0,737	0,081	12	108	131	15	132	370	30
rs34564141	2	169693583	*LRP2*	0,947	2	A	0,012	G	0,988	0,848	0	6	246	14	6	498	28
rs17848169	2	169768848	*LRP2*	0,947	2	G	0,034	A	0,966	0,579	0	17	235	14	17	487	28
rs1999594	1	11881802	—	0,947	2	A	0,415	G	0,585	0,387	40	129	83	14	209	295	28
rs34291900	2	169837792	*LRP2*	0,944	2	A	0,022	G	0,978	0,723	0	11	240	15	11	491	30
rs10839236	11	49149242	*FOLH1*	0,947	2	G	0,371	A	0,629	0,852	34	119	99	14	187	317	28
rs13043752	20	32346968	*AHCY*	0,947	2	A	0,016	G	0,984	0,798	0	8	244	14	8	496	28

NOTE. SNP : single nucleotide polymorphism ; Chr. : chromosome ; DD : homozygote pour l'allèle mineur ; Dd : hétérozygote ; dd : homozygote pour l'allèle majeur ; Freq. : Fréquence ; WHE: Hardy-Weinberg Equilibrium ; ***MTHFR*** *: methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H) ;* ***LRP2*** *: low density lipoprotein receptor-related protein 2 ;* ***FOLH1*** *: folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1 ;* ***AHCY****: adenosylhomocysteinase.*

Tableau 5. SNP indépendamment associés au taux plasmatique de l'homocystéine chez les 296 patients avec une maladie de Crohn

SNP	Chr.	Position	Nom du gène	Modèle génétique additif[c]			Modèle génétique dominant[d]			Modèle génétique récessif[e]		
				P-value[a]	Coefficient (β)	Erreur standard	*P*-value[a]	Coefficient (β)	Erreur standard	*P*-value[a]	Coefficient (β)	Erreur standard
rs1801133	1	11778964	*MTHFR*	0,0301	1,3769	0,631	Non retenu[b]	—	—	0,0009	4,5055	1.3379
rs41268685	2	169704315	*LRP2*	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—
rs202700	11	49173274	*FOLH1*	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—
rs34564141	2	169693583	*LRP2*	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—
rs17848169	2	169768848	*LRP2*	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—
rs1999594	1	11881802	—	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—
rs34291900	2	169837792	*LRP2*	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—
rs10839236	11	49149242	*FOLH1*	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—
rs13043752	20	32346968	*AHCY*	0,014	5,6163	2,2687	0,0098	5,9397	2,2818	Non retenu[b]	—	—
Age (années)	—	—	—	<0,0001	0,1231	0,02904	<0,0001	0,127	0,02922	0,0001	0,1136	0,02899
Vitamine B12 (pmol/L)	—	—	—	0,0093	-0,00791	0,003015	0,0033	-0,008915	0,003003	0,005	-0,008402	0,002965
Folate (nmol/L)	—	—	—	0,001	-0,1531	0,04588	0,0003	-0,1669	0,04581	0,0015	-0,1462	0,04539
Sexe masculin	—	—	—	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—

NOTE. SNP: single nucleotide polymorphism; Chr.: chromosome; ***MTHFR****: methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H);* ***LRP2****: low density lipoprotein receptor-related protein 2;* ***FOLH1****: folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1;* ***AHCY****: adenosylhomocysteinase.*

[a] Analyse multivariée par régression multiple (méthode *stepwise*) ;

[b] Item non retenu dans le modèle de régression multiple ;

[c] Modèle génétique additif : DD versus Dd versus dd ;

[d] modèle génétique dominant : (Dd ou DD) versus dd ;

[e] modèle génétique récessif : DD versus (Dd ou dd).

Tableau 6. SNP significativement associés au taux plasmatique de la superoxyde dismutase chez les 296 patients avec une maladie de Crohn

SNP	Chr.	Position	Nom du gène	Allèle Majeur (d)	Allèle Mineur (D)	Changement du résidu	HGVS	Homozygote pour l'allèle Mineur (DD)			Hétérozygote (Dd)			Homozygote pour l'allèle Majeur (dd)			*P*-value[a]
								N	Médiane	IQR	N	Médiane	IQR	N	Médiane	IQR	
rs4920037	21	43354959	*CBS*	G	A	—	1039+530C>T	11	1063,5	151,75	92	1198	257	171	1098	232	0,01601
rs719235	8	64114234	*GGH*	C	A	—	—	15	1078	168	110	1098	280	148	1183	277,25	0,01916
rs11254363	10	17170698	*CUBN*	A	G	—	1766-349T>C	23	1101	241,5	111	1080	244	140	1185	278	0,01978
rs9606756	22	29336859	*TCN2*	A	G	Ile23Val	67A>G	6	1420	276	59	1187,5	309,25	209	1106	265,75	0,02412
rs41301825	20	32343902	*AHCY*	G	A	Gly123Arg	367G>A	0	—	—	6	987	208	266	1130	272	0,02920
rs492602	19	53898228	*FUT2*	A	G	Ala68=	204A>G	62	1198	303	124	1140	232	86	1093	311	0,03686
rs234709	21	43360032	*CBS*	G	A	—	317-477G>A	41	1092,5	296,5	149	1181	261	84	1067,5	206,75	0,03852
rs3918232	7	150337572	*NOS3*	G	A	—	2479G>A	0	—	—	2	872	18	272	1125	272	0,04032

NOTE. SNP : single nucleotide polymorphism ; Chr. : chromosome ; HGVS : *Human Genome Variation Society* ; N : nombre de sujets ; IQR : intervalle interquartile ; ***CBS*** *: cystathionine-beta-synthase ;* ***GGH*** *: gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, folylpolygammaglutamyl hydrolase) ;* ***CUBN*** *: cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor) ;* ***TCN2*** *: transcobalamin II ;* ***AHCY*** *: adenosylhomocysteinase ;* ***FUT2*** *: fucosyltransferase 2 (secretor status included) ;* ***NOS3*** *: nitric oxide synthase 3 (endothelial cell).*

[a] Test de Kruswak-Wallis.

Tableau 7. Contrôle qualité et description des SNP significativement associés au taux plasmatique de la superoxyde dismutase chez les 296 patients avec une maladie de Crohn

SNP	Chr.	Position	Nom du gène	Call Rate	Nombre des allèles	Allèle mineur (D)	Freq. Allèle mineur	Allèle majeur (d)	Freq. Allèle majeur	HWE P-value	Compte génotypique				Compte allélique		
											DD	Dd	dd	Manquant	D	d	Manquant
rs4920037	21	43354959	*CBS*	0,947	2	A	0,224	G	0,776	0,546	11	91	150	14	113	391	28
rs719235	8	64114234	*GGH*	0,944	2	A	0,265	C	0,735	0,241	14	105	132	15	133	369	30
rs11254363	10	17170698	*CUBN*	0,947	2	G	0,282	A	0,718	0,534	22	98	132	14	142	362	28
rs9606756	22	29336859	*TCN2*	0,947	2	G	0,137	A	0,863	0,496	6	57	189	14	69	435	28
rs41301825	20	32343902	*AHCY*	0,940	2	A	0,012	G	0,988	0,848	0	6	244	16	6	494	32
rs492602	19	53898228	*FUT2*	0,940	2	G	0,462	A	0,538	0,677	55	121	74	16	231	269	32
rs234709	21	43360032	*CBS*	0,947	2	A	0,425	G	0,575	0,055	38	138	76	14	214	290	28
rs3918232	7	150337572	*NOS3*	0,947	2	A	0,004	G	0,996	0,950	0	2	250	14	2	502	28

NOTE. SNP : single nucleotide polymorphism ; Chr. : chromosome ; DD : homozygote pour l'allèle mineur ; Dd : hétérozygote ; dd : homozygote pour l'allèle majeur ; Freq. : Fréquence ; WHE: Hardy-Weinberg Equilibrium ; ***CBS*** *: cystathionine-beta-synthase ;* ***GGH*** *: gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, folylpolygammaglutamyl hydrolase) ;* ***CUBN*** *: cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor) ;* ***TCN2*** *: transcobalamin II ;* ***AHCY*** *: adenosylhomocysteinase ;* ***FUT2*** *: fucosyltransferase 2 (secretor status included) ;* ***NOS3*** *: nitric oxide synthase 3 (endothelial cell).*

Tableau 8. SNP indépendamment associés au taux plasmatique de la superoxyde dismutase chez les 296 patients avec une maladie de Crohn

SNP	Chr.	Position	Nom du gène	Modèle génétique additif[c]			Modèle génétique dominant[d]			Modèle génétique récessif[e]		
				P-value[a]	Coefficient (β)	Erreur standard	*P*-value[a]	Coefficient (β)	Erreur standard	*P*-value[a]	Coefficient (β)	Erreur standard
rs4920037	21	43354959	*CBS*	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—	—	—	—
rs719235	8	64114234	*GGH*	0,0197	-61,6358	26,211	Non retenu[b]	—	—	—	—	—
rs11254363	10	17170698	*CUBN*	Non retenu[b]	—	—	0,0143	-81,4492	32,9349	—	—	—
rs9606756	22	29336859	*TCN2*	0,001	108,0493	32,2779	0,0078	101,5839	37,7707	0,007	289,0633	106,1499
rs41301825	20	32343902	*AHCY*	0,0424	-210,7092	103,1095	Non retenu[b]	—	—	—	—	—
rs492602	19	53898228	*FUT2*	0,0218	52,5656	22,7366	0,0303	78,7124	36,0713	—	—	—
rs234709	21	43360032	*CBS*	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—	—	—	—
rs3918232	7	150337572	*NOS3*	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—	—	—	—
Age (années)	—	—	—	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—
Sexe masculin	—	—	—	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—

NOTE. SNP : single nucleotide polymorphism ; Chr. : chromosome ; ***CBS*** *: cystathionine-beta-synthase ;* ***GGH*** *: gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, folylpolygammaglutamyl hydrolase) ;* ***CUBN*** *: cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor) ;* ***TCN2*** *: transcobalamin II ;* ***AHCY*** *: adenosylhomocysteinase ;* ***FUT2*** *: fucosyltransferase 2 (secretor status included) ;* ***NOS3*** *: nitric oxide synthase 3 (endothelial cell).*

[a] Analyse multivariée par régression multiple (méthode *stepwise*) ;

[b] Item non retenu dans le modèle de régression multiple ;

[c] Modèle génétique additif : DD versus Dd versus dd ;

[d] modèle génétique dominant : (Dd ou DD) versus dd ;

[e] modèle génétique récessif : DD versus (Dd ou dd).

Tableau 9. SNP significativement associés à l'âge du diagnostic de la maladie de Crohn chez les 296 patients avec une maladie de Crohn

SNP	Chr.	Position	Nom du gène	Allèle Majeur (d)	Allèle Mineur (D)	Changement du résidu	HGVS	Homozygote pour l'allèle Mineur (DD)			Hétérozygote (Dd)			Homozygote pour l'allèle Majeur (dd)			*P*-value[a]
								N	Médiane	IQR	N	Médiane	IQR	N	Médiane	IQR	
rs9001	3	53832957	*CHDH*	A	C	Glu40Ala	119A>C	3	17	4	57	20	11	214	24	14	0,0125
rs492602	19	53898228	*FUT2*	A	G	Ala68=	204A>G	62	20	7	124	24	15,25	86	23	12	0,0226
rs4820889	22	29349043	*TCN2*	G	A	Arg399Gln	1196G>A	0	—	—	15	32	17,5	259	23	14	0,0271
rs1045642	7	86976580	*ABCB1*	G	A	Ile1145=	3435T>A	60	20	12	141	23	15	73	24	14,5	0,0281
rs1801394	5	7923972	*MTRR*	G	A	Ile22Met	66A>G	65	23	13,75	142	22	12	67	26	15,5	0,0423
rs202676	11	49184195	*FOLH1*	A	G	Tyr75His	c,223T>C	9	38,5	19,75	100	24	12	163	23	13,75	0,0444
rs202720	11	49148926	*FOLH1*	G	C	—	1308+396C>G	9	38,5	19,75	101	24	12	164	23	13,5	0,0461
rs1208	8	18302595	*NAT2*	A	G	Arg268Lys	803G>A	48	21	12	138	24	15,75	86	23	11	0,0498

NOTE. SNP : *single nucleotide polymorphism* ; Chr. : chromosome ; HGVS: *Human Genome Variation Society* ; N : nombre de sujets ; IQR : intervalle interquartile ; ***CHDH** : choline dehydrogenase ; **FUT2** : fucosyltransferase 2 (secretor status included) ; **TCN2** : transcobalamin II ; **ABCB1** : ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 ; **MTRR** : 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase ; **FOLH1** : folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1 ; **NAT2** : N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase).*

[a] Test de Kruswak-Wallis.

Tableau 10. Contrôle qualité et description des SNP significativement associés l'âge du diagnostic de la maladie de Crohn chez les 296 patients avec une maladie de Crohn

SNP	Chr.	Position	Nom du gène	Call Rate	Nombre des allèles	Allèle mineur (D)	Freq. Allèle mineur	Allèle majeur (d)	Freq. Allèle majeur	HWE *P*-value	Compte génotypique				Compte allélique		
											DD	Dd	dd	Manquant	D	d	Manquant
rs9001	3	53832957	*CHDH*	0,947	2	C	0,117	A	0,883	0,782	3	53	196	14	59	445	28
rs492602	19	53898228	*FUT2*	0,940	2	G	0,462	A	0,538	0,677	55	121	74	16	231	269	32
rs4820889	22	29349043	*TCN2*	0,947	2	A	0,026	G	0,974	0,674	0	13	239	14	13	491	28
rs1045642	7	86976580	*ABCB1*	0,947	2	A	0,476	G	0,524	0,427	54	132	66	14	240	264	28
rs1801394	5	7923972	*MTRR*	0,947	2	A	0,498	G	0,502	0,257	58	135	59	14	251	253	28
rs202676	11	49184195	*FOLH1*	0,940	2	G	0,216	A	0,784	0,171	8	92	150	16	108	392	32
rs202720	11	49148926	*FOLH1*	0,947	2	C	0,216	G	0,784	0,159	8	93	151	14	109	395	28
rs1208	8	18302595	*NAT2*	0,940	2	G	0,418	A	0,582	0,224	39	131	80	16	209	291	32

NOTE. SNP : single nucleotide polymorphism ; Chr. : chromosome ; DD : homozygote pour l'allèle mineur ; Dd : hétérozygote ; dd : homozygote pour l'allèle majeur ; Freq. : Fréquence ; WHE: Hardy-Weinberg Equilibrium ; ***CHDH*** *: choline dehydrogenase ;* ***FUT2*** *: fucosyltransferase 2 (secretor status included) ;* ***TCN2*** *: transcobalamin II ;* ***ABCB1*** *: ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 ;* ***MTRR*** *: 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase ;* ***FOLH1*** *: folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1 ;* ***NAT2*** *: N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase).*

Tableau 11. SNP indépendamment associés l'âge du diagnostic de la maladie de Crohn chez les 296 patients avec une maladie de Crohn

SNP	Chr.	Position	Nom du gène	Modèle génétique additif[c]			Modèle génétique dominant[d]			Modèle génétique récessif[e]		
				P-value[a]	Coefficient (β)	Erreur standard	*P*-value[a]	Coefficient (β)	Erreur standard	*P*-value[a]	Coefficient (β)	Erreur standard
rs9001	3	53832957	*CHDH*	0,0093	-4,455	1,7002	0,0097	-4,8214	1,8499	Non retenu[b]	—	—
rs492602	19	53898228	*FUT2*	Non retenu[b]	—		Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—
rs4820889	22	29349043	*TCN2*	0,0169	7,9759	3,3161	0,0193	7,8945	3,3531	Non retenu[b]	—	—
rs1045642	7	86976580	*ABCB1*	0,0285	-2,4539	1,1141	0,0405	-3,6148	1,7561	Non retenu[b]	—	—
rs1801394	5	7923972	*MTRR*	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—
rs202676	11	49184195	*FOLH1*	0,0314	3,0406	1,4055	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—
rs202720	11	49148926	*FOLH1*	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—
rs1208	8	18302595	*NAT2*	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—	Non retenu[b]	—	—

NOTE. SNP : single nucleotide polymorphism ; Chr. : chromosome position ; ***CHDH*** *: choline dehydrogenase ;* ***FUT2*** *: fucosyltransferase 2 (secretor status included) ;* ***TCN2*** *: transcobalamin II ;* ***ABCB1*** *: ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 ;* ***MTRR*** *: 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase ;* ***FOLH1****: folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1 ;* ***NAT2*** *: N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase).*

[a] Analyse multivariée par régression multiple (méthode *stepwise*) ;

[b] Item non retenu dans le modèle de régression multiple ;

[c] Modèle génétique additif : DD versus Dd versus dd ;

[d] modèle génétique dominant : (Dd ou DD) versus dd ;

[e] modèle génétique récessif : DD versus (Dd ou dd).

Tableau 12. Répartition de la médiane d'âge dans chacun des cinq sous groupes du SNP score

	Age au diagnostic de la maladie de Crohn				
SNP score	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**
N	58	120	79	13	1
Médiane	**26**	**23**	**21**	**19**	**17**
IQR 25e – 75^{e}	20 à 36	20 à 35	17 à 29	17 à 30	17 à 17

Note. N : nombre de sujets ; IQR : intervalle interquartile ; SNP score (combinaison des deux SNP associés à la survenue précoce de la maladie de Crohn : rs9001, *CHDH* et rs1045642, *ABCB1*).

12.6 Figures

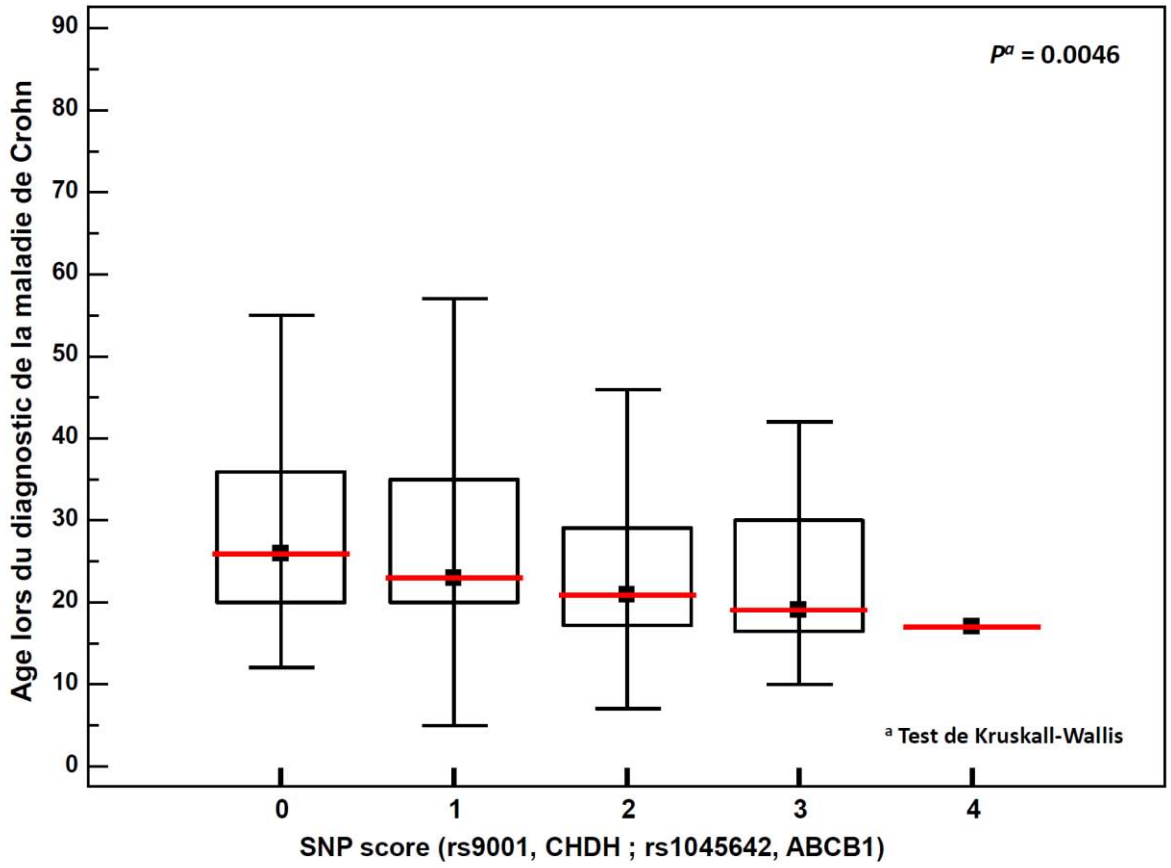


Figure 1. Répartition de l'âge au diagnostic de la maladie de Crohn en fonction du SNP score basé sur les deux SNP significativement associés avec un âge précoce du diagnostic de la maladie de Crohn (rs9001, *CHDH: choline déshydrogénase* ; *ABCB1: ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1*).

12.7 Tableaux supplémentaires

Tableau Supplémentaire 1. Voies et gènes du métabolisme des monocarbones inclus dans le plex méthylation (GoldenGate™ genotyping assay)

Voie métabolique	Produit du gène	Chromosome	Dénomination du gène (ancienne dénomination)	Gene ID (NCBI)
Transport et métabolisme de la vitamine B12	Intrinsic factor	11q13	*GIF (IF; INF; IFMH; TCN3)*	2694
	Intrinsic factor - cobalamin receptor (cubilin)	10p12.31	*CUBN (IFCR; MGA1; gp280; FLJ90055; FLJ90747)*	8029
	Low density lipoprotein-related protein 2 (Megalin)	2q24-q31	*LRP2 (DBS; gp330; LRP2)*	4036
	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	16p13.1	*ABCC1 (ABC29, ABCC, DKFZp686N04233, DKFZp781G125, GS-X, MRP, MRP1)*	4363
	Amnionless homolog (mouse)	14q32.3	*AMN (PRO1028)*	81693
	Fucosyltransferase 2	19q13.3	*FUT2 (SE; Se2; sej; SEC2; B12QTL1)*	2524
	Galectin, galactoside-binding, soluble, 3	14q21-q22	*LGALS3 (GAL3; MAC2; CBP35; GALBP; GALIG; LGALS2)*	3958
	CD320	19p13.3-p13.2	*CD320 (8D6; 8D6A, TCblR)*	51293
	LMBR1 domain containing 1	6q13	*LMBRD1*	55788
	Methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblC type, with homocystinuria	1p34.1	*MMACHC (DKFZp564I122, FLJ25671, RP11-291L19.3, cblC)*	25974

	Methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblD type, with homocystinuria	2q23.2	*MMADHC (cblD; C2orf25; CL25022; MMADHC)*	27249
	Methylmalonyl Coenzyme A mutase	6p12.3	*MUT*	4594
	Centromere protein Q	6p12.3	*CENPQ (CENP-Q; C6orf139; FLJ10545)*	55166
	Transcobalamin 1	11q11-q12	*TCN1 (TC1, TCI)*	6947
	Transcobalamin 2	22q12.2	*TCN2 (TC2; D22S676; D22S750)*	6948
Métabolisme de la choline	Choline dehydrogenase	3p21.1	*CHDH*	55349
	Choline kinase alpha	11q13.2	*CHKA*	1119
	Betaine homocysteine methyltransferase	5q13.1-q15	*BHMT*	635
	Betaine homocysteine methyltransferase 2	5q13	*BHMT2 (FLJ20001)*	23743
	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	17p11.2	*PEMT (MGC2483, PEAMT, PEMPT, PEMT2, PNMT)*	10400
	Phosphate cytidylyltransferase 1	3q29	*PCYT1A (CCTA, CT, CTA, CTPCT)*	5130
Métabolisme de la vitamine B6	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	1p36.12	*ALPL*	249
	Neuroblastoma breakpoint family, member 3	1p36.12	*NBPF3*	84224
Transport et métabolisme des folates	Folate receptor alpha	11q13.3-q14.1	*FOLR1 (FBP; FOLR; MOv18; FR-alpha)*	2348
	Folate receptor beta	11q13.3-q13.5	*FOLR2 (FR-P3; FR-BETA; BETA-HFR; FBP/PL-1)*	2350

	Reduced folate carrier 1	21q22.3	*SLC19A1 (CHMD; FOLT; IFC1; REFC; RFC1)*	6573
	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	7q21.12	*ABCB1 (ABC20, CD243, CLCS, GP170, MDR1, MGC163296, P-GP, PGY1)*	5243
	Solute carrier family 46 (folate transporter), member 1	17q11.2	*SLC46A1 (HCP1; PCFT; MGC9564)*	113235
	Folate-binding protein 3	11q13	*FOLR3 (FR-G; FR-gamma; gamma-hFR)*	2352
	Dihydrofolate reductase	5q11.2-q13	*DHFR*	1719
	Folylpolyglutamate synthase	9q34.1	*FPGS*	2356
	Serine hydroxymethyltransferase 1	17p11.2	*SHMT1 (SHMT; CSHMT; MGC15229; MGC24556)*	6470
	Serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)	12q12-q14	*SHMT2 (GLYA; SHMT)*	6472
	Neurexophilin 4	12q13.3	*NXPH4*	11247
	Mitochondrial methionyl-tRNA formyltransferase	15q22.31	*MTFMT (FMT1)*	123263
	Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	2q35	*ATIC (PURH; AICAR; AICARFT; FLJ93545; IMPCHASE)*	471
	10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	3q21.2	*ALDH1L1 (FTHFD; DKFZp781N0997)*	10840
	Gamma-glutamyl hydrolase	8q12.3	*GGH (GH)*	8836
	Formimino-transferase-cyclodeaminase	21q22.3	*FTCD (LCHC1)*	10841

	NAD-dependent methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase 1methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase	14q24	*MTHFD1 (MTHFC; MTHFD, FTHFS)*	4522
	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1-like	6q25.1	*MTHFD1L (RP1-292B18.2, DKFZp586G1517, FLJ21145, FTHFSDC1, MTC1THFS, dJ292B18.2)*	25902
	NAD-dependent methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2	2p13.1	*MTHFD2 (NMDMC)*	10797
	5,10-methenyltetrahydrofolate synthetase	15q25.1	*MTHFS (FLJ 30410; HsT 19268)*	10588
	Folate hydrolase	11p11.2	*FOLH1 (FGCP, FOLH, GCP2, GCPII, NAALAD1, NAALAdase, PSM, PSMA, mGCP)*	2346
	Carbamoyl-phosphate synthetase 1, mitochondrial	2q35	*CPS1 (CPSase I)*	1373
	NADPH oxidase 4	11q14.2-q21	*NOX4*	50507
	Synaptotagmin IX	11p15.4	*SYT9*	143425
	Prickle homolog 2	3p14.1	*PRICKLE 2 (DKFZp686D143, DKFZp686H1748, DKFZp686M031)*	166336
	Chloride channel 6	1p36	*CLCN6*	1185
	5,10-methylene-tetrahydrofolate reductase	1p36.3	*MTHFR*	4524
Voie de méthylation de l'homocystéine et métabolisme	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine S-methyltransferase (methionine synthase)	1q43	*MTR (FLJ33168, FLJ43216, FLJ45386, MS, cblG)*	4548

de la S-adénosyl-méthionine (SAM)	5-methyl-tetrahydrofolate-homocysteine methyl-transferase reductase	5p15.3-p15.2	*MTRR (MGC129643, MSR, cblE)*	4552
	Betaine homocysteine methyltransferase	5q13.1-q15	*BHMT*	635
	Betaine homocysteine methyltransferase 2	5q13	*BHMT2 (FLJ20001)*	23743
	Aminomethyl-transferase	3p21.2-p21.1	*AMT (GCE; NKH; GCST)*	275
	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	17p11.2	*PEMT (MGC2483, PEAMT, PEMPT, PEMT2, PNMT)*	10400
	Choline dehydrogenase	3p21.1	*CHDH*	55349
	S-adenosyl homocysteine hydrolase	20cen-q13.1	*AHCY (SAHH)*	191
	Methionine adenosyl-transferase 1 alpha	10q22	*MAT1A (RP11-36D19.2, MAT, MATA1, SAMS, SAMS1)*	4143
	Methionine adenosyltransferase 2 alpha	2p11.2	*MAT2A (MATA2, MATII, SAMS2)*	4144
	Methionine adenosyltransferase II, beta	5q34-q35	*MAT2B (MAT-II, MATIIbeta, MGC12237, Nbla02999, SDR23E1, TGR)*	27430
Voie de transsulfuration de l'homocystéine	Cystathionine gamma-lyase	1p31.1	*CTH*	1491
	Cystathionine beta-synthase	21q22.3	*CBS (HIP4)*	875
Transméthylation de l'ADN, de l'ARN, des protéines, des coenzymes, et des métabolites	DNA N-methyltransferase 1	19p13.2	*DNMT1 (AIM; DNMT; MCMT; CXXC9; FLJ16293; MGC104992)*	1786
	DNA N-methyltransferase 3A	2p23	*DNMT3A (M.HsaIIIA)*	1788

	DNA N-methyltransferase 3B	20q11.2	*DNMT3B (ICF, M.HsaIIIB)*	1789
	DNA N-methyltransferase 3L	21q22.3	*DNMT3L*	29947
	RNA (guanine-7-) methyltransferase	18p11.22-p11.23	*RNMT (DKFZp686H1252, KIAA0398, MET, RG7MT1, hCMT1c)*	8731
	O-6 methylguanine-DNA methyltransferase	10q26	*MGMT*	4255
	Protein arginine N-methyltransferase	19q13.3	*PRMT1 (ANM1, HCP1, HRMT1L2, IR1B4)*	3276
	Protein arginine N-methyltransferase	21q22.3	*PRMT2 (HRMT1L1, MGC111373)*	3275
	Protein carboxyl methyltransferase 1 = L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyltransferase	6q24-q25	*PCMT1*	5110
	Guanidinoacetate N-methyltransferase	19p13.3	*GAMT (PIG2, TP53I2)*	2593
	tRNA aspartic acid methyltransferase 1	10p15.1	*TRDMT1 (DNMT2; PuMet; RNMT1; M.HsaIIP)*	1787
	Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase	1p36.21	*ICMT (PCMT; PPMT; PCCMT; HSTE14; MST098; MSTP098; MGC39955; ICMT)*	23463
	RNA, U5E small nuclear	1p36.22	*RNU5E*	26829
	Methyltransferase COQ3	6q16.3	*COQ3 (DHHBMT; bA9819.1; DHHBMTASE; UG0215E05; COQ3)*	51805
	Coactivator-associated arginine methyltransferase 1	19p13.2	*CARM1 (PRMT4)*	10498

	Nicotinamide N-methyltransferase	11q23.1	*NNMT*	4837
Synthèse des polyamines	S-adenosyl-methionine decarboxylase 3	6q21-q22	*AMD1*	262
Métabolisme de la purine, de la pyrimidine, et des xenobiotiques	N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase)	8p23.1-p21.3	*NAT1 (AAC1; NAT)*	9
	N-acetyltransferase 2	8p22	*NAT2 (AAC2, PNAT)*	10
	Dimethylglycine dehydrogenase	5q14.1	*DMGDH*	29958
	Thymidylate synthase	18p11.32	*TYMS (HST422, MGC88736, TMS, TS)*	7298
	Chromosome 18 open reading frame 56, hypothetical protein LOC494514	18p11.32	*C18orf56*	494514
	Thiopurine methyltransferase	6p22.3	*TPMT*	7172
	Sarcosine dehydrogenase	9q33-q34	*SARDH (SAR; SDH; SARD; DMGDHL1; FLJ 36475)*	1757
	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	21q22.11	*GART (AIRS, GARS, GARTF, MGC47764, PAIS, PGFT, PRGS)*	2618
	Catechol-O-methyltransferases	22q11.21	*COMT*	1312

NOTE. NCBI: National Center for Biotechnology Information.

Tableau supplémentaire 2. SNPs (n=384) inclus dans le plex Méthylation (GoldenGate™ genotyping assay)

SNP ID	Chromosome	Position (chromosome)	SNP	Illumina® Strand	Nom IllumiCode
rs57035602	1	45747455	[A/C]	TOP	1688
rs11545267	1	150151857	[A/G]	TOP	3927
rs11545269	1	150144329	[A/G]	TOP	265
rs11545270	1	150144402	[T/C]	BOT	3011
rs61750442	1	150146954	[T/G]	BOT	215
rs61755260	1	150140523	[A/G]	TOP	1689
rs3927589	1	11777080	[T/G]	BOT	130
rs56182143	1	11777799	[T/C]	BOT	442
rs72552099	1	11777061	[T/C]	BOT	2915
rs2229274	1	235056764	[T/C]	BOT	5131
rs60599724	1	235092196	[G/C]	BOT	1671
rs61736326	1	235125366	[A/G]	TOP	2152
rs61736440	1	235082920	[A/G]	TOP	33
rs61736441	1	235046387	[T/C]	BOT	1042
rs61736442	1	235033501	[A/G]	TOP	5968
rs61739582	1	235126995	[A/G]	TOP	2954
rs1021737	1	70677387	[T/G]	BOT	2297
rs11799647	1	235127543	[A/G]	TOP	682
rs12060264	1	235054985	[A/G]	TOP	4931
rs12085006	1	11881309	[T/C]	BOT	23
rs1256335	1	21762972	[T/C]	BOT	5800
rs12749581	1	235033470	[A/G]	TOP	3906
rs1801131	1	11777062	[A/C]	TOP	2733
rs1801133	1	11778964	[T/C]	BOT	3625
rs1802353	1	6207266	[A/G]	TOP	814

SNP ID	Chromosome	Position (chromosome)	SNP	Illumina® Strand	Nom IllumiCode
rs1805087	1	235115122	[T/C]	BOT	4002
rs1999594	1	11881802	[T/C]	BOT	5003
rs2066472	1	11785557	[T/C]	BOT	3057
rs2274974	1	11773905	[A/G]	TOP	2091
rs2274976	1	11773513	[T/C]	BOT	1111
rs28595301	1	70656224	[A/G]	TOP	5350
rs35219601	1	45747435	[A/G]	TOP	4111
rs35737219	1	11773336	[A/G]	TOP	1272
rs3737965	1	11789037	[A/G]	TOP	4283
rs45449298	1	11774997	[T/C]	BOT	2322
rs45550133	1	11783879	[A/G]	TOP	113
rs4654748	1	21658654	[T/C]	BOT	2257
rs663649	1	70669770	[A/C]	TOP	2208
rs6662272	1	45745710	[G/C]	BOT	4071
rs56117859	2	215919817	[T/C]	BOT	3606
rs2228171	2	169761751	[A/G]	TOP	54
rs2229263	2	169883580	[A/G]	TOP	4075
rs56204990	2	169808247	[A/T]	TOP	4908
rs61995913	2	169781133	[C/G]	TOP	2753
rs71430659	2	169735322	[A/G]	TOP	4950
rs73035708	2	169771538	[T/C]	BOT	2166
rs73971823	2	169803056	[A/T]	TOP	3979
rs10175961	2	215917775	[C/G]	TOP	813
rs11674973	2	169756587	[A/C]	TOP	2966
rs13391626	2	169781009	[T/G]	BOT	1063
rs17848140	2	169823861	[A/C]	TOP	3470
rs17848149	2	169805952	[A/C]	TOP	1749

SNP ID	Chromosome	Position (chromosome)	SNP	Illumina® Strand	Nom IllumiCode
rs17848169	2	169768848	[T/C]	BOT	3031
rs17848188	2	169738794	[A/G]	TOP	1893
rs2075252	2	169719230	[A/G]	TOP	4997
rs2119289	2	164206191	[G/C]	BOT	2960
rs2228168	2	169776809	[A/G]	TOP	5188
rs2302691	2	169809629	[T/G]	BOT	1588
rs2372536	2	215898264	[G/C]	BOT	1601
rs28735621	2	169802015	[T/C]	BOT	2906
rs3213760	2	169747006	[T/C]	BOT	5348
rs34041086	2	169776897	[T/C]	BOT	5221
rs34052957	2	169772002	[A/C]	TOP	559
rs34291900	2	169837792	[T/C]	BOT	5310
rs34355135	2	169737902	[A/G]	TOP	153
rs34564141	2	169693583	[T/C]	BOT	10
rs34592807	2	169872072	[T/C]	BOT	2999
rs34693334	2	169855747	[G/C]	BOT	1493
rs34886916	2	150141246	[A/C]	TOP	2651
rs35086590	2	169750690	[T/C]	BOT	4969
rs35413340	2	169771625	[A/G]	TOP	989
rs35642533	2	169883528	[A/G]	TOP	4107
rs35734447	2	169750490	[A/G]	TOP	6123
rs35942532	2	169711580	[T/C]	BOT	5285
rs36082715	2	169820905	[T/C]	BOT	1711
rs41268685	2	169704315	[A/G]	TOP	1335
rs41268689	2	169778610	[T/C]	BOT	5290
rs4667591	2	169711677	[T/G]	BOT	3972
rs4667596	2	169778417	[A/G]	TOP	3938

SNP ID	Chromosome	Position (chromosome)	SNP	Illumina® Strand	Nom IllumiCode
rs4673993	2	215920583	[A/G]	TOP	2738
rs7422339	2	211248751	[T/G]	BOT	4099
rs9646779	2	169735392	[T/C]	BOT	3814
rs982393	2	164198774	[A/T]	TOP	2163
rs72965956	3	127307409	[T/G]	BOT	2180
rs9282693	3	127338334	[T/C]	BOT	4008
rs9001	3	53832957	[A/C]	TOP	1590
rs2229525	3	74291914	[T/C]	BOT	1319
rs62147682	3	74289354	[A/C]	TOP	3461
rs7639752	3	197457641	[T/C]	BOT	1753
rs939883	3	197449512	[T/A]	BOT	5057
rs1127717	3	127308748	[A/G]	TOP	5184
rs12676	3	53832842	[T/G]	BOT	4072
rs13088615	3	127359959	[A/G]	TOP	2879
rs153734	3	64053048	[T/C]	BOT	5815
rs2276724	3	127337098	[A/G]	TOP	5123
rs2886059	3	127348455	[T/G]	BOT	5930
rs34812788	3	49434646	[T/C]	BOT	5874
rs34974961	3	53828048	[T/C]	BOT	2461
rs3796191	3	127355073	[A/G]	TOP	4161
rs4646750	3	127308692	[A/G]	TOP	6117
rs9282691	3	127338354	[T/G]	BOT	2808
rs9282697	3	127338297	[A/G]	TOP	3987
rs2713280	4	134785907	[A/G]	TOP	718
rs56709544	5	78447358	[A/G]	TOP	4020
rs60947960	5	78452908	[A/G]	TOP	3468
rs651852	5	78444816	[C/G]	TOP	3498

SNP ID	Chromosome	Position (chromosome)	SNP	Illumina® Strand	Nom IllumiCode
rs73769969	5	78452040	[A/G]	TOP	2831
rs56053829	5	78420079	[T/C]	BOT	6030
rs58580238	5	78414400	[A/C]	TOP	233
rs60158007	5	78410978	[A/G]	TOP	1002
rs60797063	5	78414825	[T/C]	BOT	5366
rs60815816	5	78414881	[T/C]	BOT	1777
rs62342555	5	7950284	[T/C]	BOT	5394
rs10037809	5	78459392	[T/G]	BOT	2205
rs10064631	5	7938906	[G/C]	BOT	969
rs10380	5	7950190	[A/G]	TOP	1841
rs1050825	5	78462587	[A/C]	TOP	1647
rs13189440	5	78401371	[A/C]	TOP	331
rs1532268	5	7931178	[T/C]	BOT	5177
rs162036	5	7938958	[T/C]	BOT	5118
rs1643649	5	79975204	[T/C]	BOT	5898
rs16879334	5	7944505	[G/C]	BOT	747
rs16879355	5	7946012	[T/C]	BOT	3484
rs1801394	5	7923972	[A/G]	TOP	2807
rs1805073	5	78362505	[G/C]	BOT	1241
rs1805074	5	78360107	[T/C]	BOT	6016
rs2287780	5	7942303	[T/C]	BOT	51
rs2303080	5	7931423	[A/T]	TOP	4092
rs3733890	5	78457714	[T/C]	BOT	3704
rs41283145	5	7945936	[T/C]	BOT	5058
rs532964	5	78376041	[A/G]	TOP	5894
rs542721	5	78394187	[G/C]	BOT	1790
rs626105	5	78405656	[A/G]	TOP	5449

SNP ID	Chromosome	Position (chromosome)	SNP	Illumina® Strand	Nom IllumiCode
rs672346	5	78457655	[A/C]	TOP	619
rs7703033	5	7932949	[A/G]	TOP	5846
rs9332	5	7953711	[A/G]	TOP	5133
rs11555881	6	70508413	[T/C]	BOT	585
rs17854411	6	70467383	[A/G]	TOP	300
rs61748674	6	151311924	[T/C]	BOT	1955
rs61753800	6	151378413	[T/G]	BOT	952
rs61754784	6	151288992	[T/C]	BOT	2360
rs1136145	6	49515882	[T/C]	BOT	3804
rs1141321	6	49520392	[A/G]	TOP	2277
rs2228282	6	49531827	[A/G]	TOP	4069
rs2229395	6	49523407	[T/C]	BOT	1439
rs8589	6	49511241	[A/G]	TOP	5328
rs12214456	6	70515996	[T/C]	BOT	4116
rs35829704	6	151378481	[T/C]	BOT	101
rs4144164	6	99924321	[A/G]	TOP	2062
rs4267943	6	49547763	[T/C]	BOT	5021
rs4816	6	150156437	[T/C]	BOT	5052
rs6925344	6	99926099	[A/G]	TOP	2369
rs9354880	6	70464185	[A/T]	TOP	515
rs9473555	6	49517445	[C/G]	TOP	1661
rs9473556	6	49517527	[A/G]	TOP	5958
rs56331996	7	150337454	[T/G]	BOT	3789
rs61747096	7	150338763	[A/G]	TOP	5297
rs61760646	7	150321855	[T/G]	BOT	1375
rs61760657	7	150328549	[A/G]	TOP	3962
rs61761725	7	150329282	[A/G]	TOP	2861

SNP ID	Chromosome	Position (chromosome)	SNP	Illumina® Strand	Nom IllumiCode
rs61761728	7	150329439	[T/C]	BOT	3399
rs61761756	7	150337483	[A/G]	TOP	5257
rs61761758	7	150338628	[A/G]	TOP	162
rs61762632	7	150342111	[A/T]	TOP	2789
rs6947833	7	150338995	[C/G]	TOP	5176
rs10248420	7	87002921	[T/C]	BOT	2927
rs1045642	7	86976580	[T/C]	BOT	1030
rs1202184	7	87051836	[A/G]	TOP	4057
rs17327442	7	87050925	[T/A]	BOT	234
rs2235046	7	87012001	[A/G]	TOP	674
rs3918166	7	150324488	[A/G]	TOP	732
rs3918201	7	150338276	[T/G]	BOT	3896
rs3918232	7	150337572	[A/G]	TOP	3934
rs3918234	7	150338967	[A/T]	TOP	6004
rs41508746	7	150327367	[T/C]	BOT	1311
rs7792133	7	150335178	[T/C]	BOT	1987
rs11545077	8	64113791	[A/G]	TOP	1145
rs15073	8	64092632	[A/T]	TOP	5076
rs11545076	8	64114004	[A/C]	TOP	5140
rs11545078	8	64101317	[A/G]	TOP	2232
rs1208	8	18302595	[A/G]	TOP	3014
rs1799930	8	18302382	[T/C]	BOT	5817
rs1799931	8	18302649	[A/G]	TOP	2320
rs1800909	8	64113865	[T/C]	BOT	3049
rs1801280	8	18302133	[T/C]	BOT	3913
rs719235	8	64114234	[T/G]	BOT	3440
rs10986018	9	100163156	[A/G]	TOP	1382

SNP ID	Chromosome	Position (chromosome)	SNP	Illumina® Strand	Nom IllumiCode
rs12686275	9	129613066	[T/A]	BOT	4133
rs2073817	9	135549280	[A/G]	TOP	2312
rs34354111	9	129615522	[G/C]	BOT	2081
rs35559818	9	135589052	[T/G]	BOT	1826
rs35789560	9	129615335	[A/G]	TOP	3562
rs41306702	9	129606498	[A/G]	TOP	1824
rs886016	9	135545449	[A/G]	TOP	1740
rs1801220	10	17208783	[T/A]	BOT	4305
rs1801224	10	17187527	[T/G]	BOT	1682
rs1801227	10	17147558	[T/C]	BOT	2043
rs1801237	10	16983456	[A/G]	TOP	4061
rs2228053	10	17185148	[G/C]	BOT	1954
rs57163243	10	16933412	[C/G]	TOP	634
rs57335729	10	17192936	[T/C]	BOT	5381
rs62619939	10	17007592	[C/G]	TOP	1227
rs74116778	10	17029277	[T/C]	BOT	2729
rs1143693	10	82030464	[A/C]	TOP	119
rs61734474	10	82024336	[C/G]	TOP	1587
rs72558181	10	82024913	[A/G]	TOP	4029
rs2020893	10	131224594	[A/G]	TOP	2420
rs3750824	10	131447564	[A/G]	TOP	1808
rs11254274	10	16997056	[A/G]	TOP	2204
rs11254354	10	17150171	[C/G]	TOP	1693
rs11254363	10	17170698	[T/C]	BOT	5799
rs11254385	10	17211767	[T/G]	BOT	1037
rs11254413	10	17244192	[T/C]	BOT	2057
rs12259370	10	17211181	[A/G]	TOP	1888

SNP ID	Chromosome	Position (chromosome)	SNP	Illumina® Strand	Nom IllumiCode
rs1276708	10	17029258	[T/C]	BOT	1990
rs1276712	10	17007406	[T/C]	BOT	2398
rs12917	10	131396272	[A/G]	TOP	1269
rs1801222	10	17196156	[A/G]	TOP	2934
rs1801229	10	17064620	[A/T]	TOP	1644
rs1801230	10	16917115	[A/G]	TOP	614
rs1801231	10	17064508	[T/C]	BOT	3858
rs1801240	10	16959002	[T/C]	BOT	913
rs1907362	10	17125598	[T/C]	BOT	2994
rs2271460	10	17002000	[T/G]	BOT	1151
rs2271462	10	17022066	[T/C]	BOT	1173
rs2282164	10	131396217	[G/C]	BOT	3981
rs2295809	10	17239876	[T/A]	BOT	3500
rs2308321	10	131455053	[A/G]	TOP	398
rs2308327	10	131455159	[A/G]	TOP	5009
rs2356590	10	17019611	[T/G]	BOT	3072
rs2796835	10	16983376	[G/C]	BOT	209
rs35597944	10	17250918	[A/G]	TOP	2402
rs3740168	10	16988395	[G/C]	BOT	5091
rs41289305	10	17019719	[T/C]	BOT	5858
rs45474496	10	16972495	[T/G]	BOT	6062
rs45551835	10	16972389	[T/C]	BOT	5237
rs45569534	10	16970424	[C/G]	TOP	2983
rs45588636	10	17127013	[T/G]	BOT	1225
rs4748353	10	17186672	[A/G]	TOP	742
rs7905349	10	17166388	[T/C]	BOT	4136
rs7928739	11	67590119	[A/C]	TOP	629

SNP ID	Chromosome	Position (chromosome)	SNP	Illumina® Strand	Nom IllumiCode
rs61886492	11	49142850	[T/C]	BOT	3968
rs13908	11	71607379	[T/C]	BOT	1959
rs2229185	11	71528223	[T/C]	BOT	3453
rs61734430	11	7152778	[T/C]	BOT	2485
rs150884181	11	59366403	[T/C]	BOT	1935
rs10839236	11	49149242	[A/G]	TOP	1776
rs11018628	11	88846158	[A/G]	TOP	4125
rs11041321	11	7310444	[A/G]	TOP	5104
rs11268	11	71610356	[T/G]	BOT	1772
rs11825834	11	59367990	[A/G]	TOP	5854
rs1801932	11	71584425	[G/C]	BOT	2249
rs1803128	11	49124955	[A/T]	TOP	5246
rs1803569	11	71609946	[A/C]	TOP	2016
rs202676	11	49184195	[T/C]	BOT	2932
rs202700	11	49173274	[A/G]	TOP	5985
rs202720	11	49148926	[C/G]	TOP	2342
rs2298444	11	71610061	[A/G]	TOP	4974
rs2851557	11	49154029	[A/G]	TOP	2901
rs34324219	11	59379953	[T/G]	BOT	1000
rs34528912	11	59388110	[A/G]	TOP	607
rs35211634	11	59369434	[A/G]	TOP	2892
rs35287646	11	59386687	[T/C]	BOT	4951
rs35867471	11	59361329	[T/C]	BOT	5157
rs36044892	11	59378841	[G/C]	BOT	480
rs508114	11	71528310	[T/G]	BOT	2216
rs526934	11	59390068	[A/G]	TOP	859
rs7128652	11	49178398	[T/C]	BOT	5784

SNP ID	Chromosome	Position (chromosome)	SNP	Illumina® Strand	Nom IllumiCode
rs7928649	11	71580946	[A/G]	TOP	2962
rs17851654	11	59377056	[A/C]	TOP	3160
rs12319666	12	55911047	[A/C]	TOP	5073
rs7311958	12	55899691	[A/G]	TOP	1876
rs11557162	12	55911788	[T/G]	BOT	3901
rs11557163	12	55911544	[C/G]	TOP	2898
rs11557165	12	55914091	[T/G]	BOT	1931
rs73338162	12	55910968	[T/C]	BOT	1060
rs1134469	14	102464922	[A/G]	TOP	4004
rs61731158	14	102460027	[A/G]	TOP	1595
rs11125	14	54681592	[T/A]	BOT	1407
rs11538647	14	54674657	[T/C]	BOT	5127
rs10813	14	63985918	[A/G]	TOP	4022
rs1803950	14	63994743	[A/G]	TOP	753
rs1803951	14	63986016	[A/C]	TOP	1746
rs10148371	14	54679170	[A/G]	TOP	1886
rs11551058	14	63963853	[A/C]	TOP	901
rs1950902	14	63952132	[A/G]	TOP	6110
rs2236224	14	63978903	[A/G]	TOP	6021
rs2236225	14	63978597	[T/C]	BOT	3826
rs34181110	14	63962222	[T/C]	BOT	1333
rs4644	14	54674687	[A/C]	TOP	3811
rs4652	14	54674788	[T/G]	BOT	1938
rs4902283	14	63954364	[A/G]	TOP	4041
rs2946655	15	63108990	[A/G]	TOP	3857
rs34507711	15	63082493	[T/G]	BOT	67
rs35302908	15	63095843	[A/G]	TOP	3027

SNP ID	Chromosome	Position (chromosome)	SNP	Illumina® Strand	Nom IllumiCode
rs6495446	15	77942036	[T/C]	BOT	3038
rs8923	15	77924614	[A/G]	TOP	2158
rs28364006	16	16135750	[A/G]	TOP	3908
rs35529209	16	16112826	[T/C]	BOT	2328
rs60782127	16	16049580	[A/C]	TOP	6107
rs8187844	16	16011183	[A/G]	TOP	430
rs8187848	16	16037841	[T/C]	BOT	3734
rs13337489	16	16116183	[G/C]	BOT	6130
rs28706727	16	16123377	[A/G]	TOP	1267
rs35587	16	16047214	[A/G]	TOP	2442
rs41395947	16	16009252	[G/C]	BOT	5933
rs4148356	16	16084775	[T/C]	BOT	2308
rs41494447	16	16009342	[A/G]	TOP	1326
rs45511401	16	16080732	[A/C]	TOP	3980
rs45517537	16	16091882	[A/G]	TOP	2059
rs8057331	16	16137911	[A/G]	TOP	720
rs4646406	17	17357894	[T/A]	BOT	1838
rs70959686	17	17421045	[A/G]	TOP	656
rs70965427	17	17349850	[A/G]	TOP	1340
rs1979277	17	18172820	[A/G]	TOP	1628
rs2168781	17	18181470	[G/C]	BOT	1634
rs41297067	17	23757174	[A/G]	TOP	1309
rs41297069	17	23757101	[T/C]	BOT	756
rs41297081	17	23756111	[T/A]	BOT	3030
rs7215148	17	18177240	[G/C]	BOT	4012
rs7946	17	17350284	[A/G]	TOP	5790
rs73291881	17	18184782	[T/C]	BOT	895

SNP ID	Chromosome	Position (chromosome)	SNP	Illumina® Strand	Nom IllumiCode
rs1001761	18	652102	[T/C]	BOT	984
rs11540153	18	659116	[A/G]	TOP	1276
rs2853533	18	648063	[C/G]	TOP	178
rs502396	18	649235	[A/G]	TOP	1862
rs59755869	18	652164	[G/C]	BOT	4046
rs57195458	19	8275999	[A/G]	TOP	5342
rs2228612	19	10134372	[T/C]	BOT	4044
rs1047781	19	53898443	[A/T]	TOP	2358
rs1800025	19	53898539	[T/C]	BOT	1825
rs1800028	19	53898629	[T/C]	BOT	2122
rs16999593	19	10152180	[A/G]	TOP	5293
rs17851582	19	1348442	[A/G]	TOP	5829
rs1800021	19	53898097	[T/C]	BOT	1331
rs1800022	19	53898436	[A/G]	TOP	2995
rs1800030	19	53898906	[T/C]	BOT	102
rs2232775	19	8279151	[T/C]	BOT	3481
rs2232786	19	8273426	[A/G]	TOP	2501
rs2336573	19	8273708	[T/C]	BOT	1550
rs492602	19	53898228	[T/C]	BOT	6140
rs602662	19	53898796	[A/G]	TOP	1078
rs975484	19	54872077	[G/C]	BOT	1563
rs11552694	20	32342323	[A/G]	TOP	2828
rs11552695	20	32345569	[A/T]	TOP	1079
rs13043752	20	32346968	[T/C]	BOT	186
rs41301825	20	32343902	[T/C]	BOT	1006
rs61735858	21	43358837	[T/C]	BOT	2794
rs71322503	21	43361732	[A/C]	TOP	5413

SNP ID	Chromosome	Position (chromosome)	SNP	Illumina® Strand	Nom IllumiCode
rs56829757	21	46398561	[A/C]	TOP	2776
rs61735838	21	46381661	[G/C]	BOT	2632
rs8788	21	33818983	[T/C]	BOT	1882
rs1051266	21	45782221	[A/G]	TOP	154
rs2124459	21	43348782	[T/C]	BOT	651
rs234705	21	43356840	[T/C]	BOT	764
rs234709	21	43360032	[A/G]	TOP	950
rs34040148	21	43361699	[A/C]	TOP	5074
rs35786590	21	45760102	[T/C]	BOT	2833
rs4920037	21	43354959	[T/C]	BOT	1559
rs5742905	21	43356252	[A/G]	TOP	2862
rs6586282	21	43351565	[A/G]	TOP	5397
rs7354779	21	44495197	[A/G]	TOP	1312
rs8133955	21	46398517	[A/G]	TOP	2913
rs8971	21	33805487	[T/C]	BOT	3937
rs56822323	21	45775241	[T/C]	BOT	3262
rs58836581	21	45760212	[T/C]	BOT	56
rs59841046	21	45760409	[T/C]	BOT	4086
rs11544670	22	18330076	[T/G]	BOT	5035
rs165599	22	18336781	[T/C]	BOT	2361
rs5031015	22	18331103	[A/G]	TOP	2406
rs737865	22	18310121	[A/G]	TOP	915
rs769224	22	18331804	[T/C]	BOT	2179
rs8192488	22	18331237	[A/G]	TOP	1046
rs1131603	22	29348974	[A/G]	TOP	6131
rs1801198	22	29341609	[G/C]	BOT	2298
rs35838082	22	29341349	[T/C]	BOT	3780

SNP ID	Chromosome	Position (chromosome)	SNP	Illumina® Strand	Nom IllumiCode
rs35915865	22	29338866	[A/G]	TOP	1989
rs4680	22	18331270	[A/G]	TOP	3919
rs4820889	22	29349043	[T/C]	BOT	1953
rs6267	22	18330262	[T/G]	BOT	920
rs9606756	22	29336859	[T/C]	BOT	3495
rs9621049	22	29343418	[A/G]	TOP	1784
rs17849434	22	29341387	[T/C]	BOT	5906
rs61743653	22	29341618	[C/G]	TOP	1850

13 Discussion générale

13.1 Le statut sérologique de l'infection par *Helicobacter pylori* n'a aucune influence sur l'association entre le polymorphisme *FUT2 461 G>A* de la *fucosyltransférase 2* et la vitamine B12

Nous avons démontré que le polymorphisme *FUT2 461 G>A* était un facteur prédictif indépendant du taux plasmatique de vitamine B12 indépendamment du statut sérologique de l'infection par *H. pylori*. Ces résultats sont consistants avec ceux de deux études d'associations pangénomiques menées sur des populations caucasiennes.[18, 19] Hazra *et al.* ont démontré que les femmes caucasiennes homozygotes pour l'allèle *G* du rs492602 —en fort déséquilibre de liaison avec le rs601338— avaient à un taux plus élevé de vitamine B12.[17] Dans la présente étude nous avons réalisé le génotypage direct du rs601338 et avons démontré que celui-ci était en association avec le taux plasmatique de la vitamine B12 chez 1282 sujets ambulatoires européens et Ouest-Africains, deux zones avec une prévalence contrastée de l'infection par *H. pylori*.

Il a été suggéré que la concentration réduite de vitamine B12 chez les sujets de phénotype 'FUT2 sécréteur' était la conséquence d'une susceptibilité accrue pour l'infection par *H. pylori* en comparaison aux sujets avec un phénotype 'FUT2 non-sécréteur'.[18] En effet, les souris *knockout* pour *FUT2* présentent une altération de leur profil de glycosylation et une altération de l'adhésion d'*H. pylori* à la muqueuse gastrique.[324] La gastrite chronique atrophique induite par *H. pylori* peut causer une perturbation de la sécrétion acido-peptique, qui à son tour peut causer une malabsorption de cobalamine.[222, 223] Ceci a été suggéré par une étude menée au sein de la population Finnoise qui a rapporté une prévalence élevée de l'infection par *H. pylori* parmi les patients présentant une atrophie gastrique et un statut carencé en vitamine B12.[269] Néanmoins, dans une étude cas-témoins, Settin *et al.* ont évalué

les marqueurs du métabolisme des monocarbones chez 90 sujets sains dont 69 avec une sérologie positive pour *H. pylori* et n'avaient pas mis en évidence une influence de la sérologie d'*H. pylori* sur le statut vitaminique B.[326] De façon similaire, dans notre étude ayant porté sur des sujets ambulatoires sans pathologie digestive rapportée, le taux plasmatique de vitamine B12 n'était pas influence par le statut sérologie pour *H. pylori* aussi bien en analyse univariée qu'en analyse multivariée. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'un statut sérologique positif pour *H. pylori* n'implique pas nécessairement la présence d'une gastrite chronique atrophique. En effet, dans une large étude prospective de cohorte menée au sein de la population allemande, parmi les sujets présentant une sérologie positive pour *H. pylori*, seuls 2,7 % avaient développé une gastrite chronique atrophique après 5 ans de suivi.[327]

A notre connaissance, notre étude est la première à avoir examiné l'influence du polymorphisme de *FUT2* sur le statut sérologique de l'infection par *H. pylori*. Il est intéressant de noter que le polymorphisme *FUT2 461 G>A* aussi bien que le phénotype 'FUT2 sécréteur' n'étaient tous les deux pas prédictifs d'une sérologie positive pour *H. pylori*. Par ailleurs, le génotype *FUT2 461, G/G* était un facteur prédictif indépendant du taux plasmatique de vitamine B12 chez les sujets *H. pylori* positifs mais aussi chez les sujets *H. pylori* négatifs, du moins au sein de la population européenne.

Il est intéressant de souligner que similairement à notre étude, dans le travail rapport par Hazra *et al.* le taux de vitamine B12, influencé par le polymorphisme *FUT2* rs601338, restait dans les limites de la normale dans chacun des trois génotypes.[17] Ainsi, même si le polymorphisme de *FUT2* est impliqué dans la variation du taux plasmatique de la vitamine B12, il n'est pas pour autant un facteur prédictif de carence en vitamine B12. En effet, dans notre étude, le polymorphisme de *FUT2* n'avait pas d'effet sur l'augmentation du taux plasmatique d'acide méthylmalonique dans les deux populations étudiées et avait un faible

effet sur l'homocystéine dans la population d'Afrique de l'Ouest seulement. En conclusion, la présente étude est la première à être menée au sein de la population générale et qui a évalué l'influence du statut sérologique sur l'association entre le polymorphisme *FUT2 461 G>A* et le taux plasmatique de vitamine B12. Dans la présente étude, le statut sérologique de l'infection par *H. Pylori* n'avait pas d'influence sur cette association, suggérant l'implication d'autres mécanismes de *FUT2*, en plus de son effet potentiel sur la gastrite à *H. pylori*, du moins chez les sujets européens et Ouest-Africains.

13.2 Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et hyperhomocystéinémie : des liaisons dangereuses

13.2.1 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin représentent un facteur de risque avéré d'hyperhomocystéinémie

Nous avons démontré selon une approche méta-analytique que les patients avec une RCH ou une MC ont un taux d'homocystéine supérieur à celui des témoins et que la MICI représente un facteur de risque d'hyperhomocystéinémie. Plusieurs études ont évalué le rôle de l'homocystéine dans la physiopathologie des MICI.[312] L'homocystéine agit comme un pro-oxydant[313] et a été incriminée dans la diminution de la capacité antioxydante chez les patients avec une MICI. [144] L'homocystéine est impliquée dans la réponse immunitaire de l'hôte par l'induction de la production de plusieurs cytokines et chémokines proinflammatoires[147, 148], le stress du réticulum endoplasmique[364], et par la régulation de l'expression des gènes par la méthylation au niveau des promoteurs des gènes.[365] Plusieurs études ont évalué la cause de l'hyperhomocystéinémie observée au cours des MICI et la plupart des études ont fait le lien entre l'hyperhomocystéinémie et le statut carencé en vitamine B12 et/ou en folate.[273, 274] La malnutrition est fréquemment observe chez les patients MICI, notamment au cours des phases actives de la maladie.[271, 272] Ces données soulignent l'intérêt clinique d'un dépistage

systématique des carences en folate et en vitamine B12 chez les patients MICI compte tenu de la fréquence de ces carences chez les patients MICI et de leur rôle potentiel dans la survenue d'une hyperhomocystéinémie. Néanmoins, l'intérêt du dépistage systématique du déficit en folate et en vitamine B12 et de l'hyperhomocystéinémie et du bénéfice potentiel de l'impact de leur normalisation sur l'activité de la MICI nécessite des études interventionnelles.

13.2.2 Hyperhomocystéinémie et maladie thromboembolique au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : des données supplémentaires sont nécessaires

L'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque démontré pour la maladie thromboembolique[329, 369] et les thromboses veineuses recidivantes[370] dans la population générale. Une étude cas-témoin nichée dans une cohorte basée sur la *General Practice Research Database*, a démontré que les patients avec une MICI avaient un surrisque d'événements thromboembolique en comparaison aux témoins (hazard ratio (HR) = 3,4; IC 95 % : 2,7 à 4,3).[371] Ces résultats ont été confirmés par une étude menée au sein de la population Danoise et qui a confirmé un doublement du risque thromboembolique chez les patients MICI (HR = 2,0 ; IC 95 % : 1,8 à 2,1).[372] Ces données suggèrent une augmentation du risque thromboembolique chez les patients suivis pour une MICI.[371, 372]

L'implication de l'hyperhomocystéinémie dans l'augmentation du risque thromboembolique au cours des MICI reste controversée.[373] Dans notre méta-analyse, le risque d'hyperhomocystéinémie parmi les patients MICI avec une complication thromboembolique était élevé sans atteindre néanmoins la significativité statistique. Ceci peut être en rapport avec un manque de puissance statistique de la méta-analyse, lié au faible nombre des études qui ont évalué cet objectif et à la taille relativement faible des échantillons

de patients. L'intérêt chez les patients MICI de la correction du déficit en vitamine B12 et/ou en folate —notamment en cas de maladie sévère, d'antécédent de résection iléale (pour la vitamine B12), et/ou de traitement par méthotrexate (folate)— dans la réduction du risque de thrombose requiert des études spécifiquement conçues pour répondre à cette problématique.[312, 314]

13.2.3 Polymorphisme *MTHFR 677 C>T* et risque primaire de maladie inflammatoire chronique de l'intestin : influence du statut en folates sur le risque primaire associé au génotype *MTHFR 677, T/T*

Dans la méta-analyse que nous avons rapporté, le génotype *MTHFR 677, T/T* était associé à une augmentation du risque primaire de MICI en cas de statut carencé en folate. Il a été démontré que les sujets qui ont une forme thermolabile de l'enzyme MTHFR peuvent avoir un besoin accru en folate pour la régulation de la concentration plasmatique de l'homocystéine.[132] Par ailleurs, le polymorphisme MTHFR C677T était associé avec les défauts de fermeture du tube neural et le syndrome de Down dans le nord de l'Europe —une région connue pour son alimentation carencée en folate— mais non dans les régions de l'ouest et du sud-ouest de l'Europe, où l'apport en folate en la fréquence de l'allèle *MTHFR 677 T* sont nettement supérieurs.[318] Ces résultats sont en ligne avec ceux de notre méta-analyse qui démontre une corrélation inverse entre la concentration plasmatique en folate et le risque primaire de MICI en rapport avec le polymorphisme *MTHFR C677T* et supporte la stratégie visant à normaliser l'apport en folate chez les patients avec une MICI.

En conclusion, cette méta-analyse démontre que les patients avec une MICI ont un taux plasmatique d'homocystéine significativement supérieur à celui des sujets contrôles. Par ailleurs, les patients avec une MICI ont un risque accru d'hyperhomocystéinémie.

L'évaluation du risque de complication thromboembolique liée à l'hyperhomocystéinémie nécessite la réalisation d'études supplémentaires. L'intérêt de la normalisation des taux élevés d'homocystéine chez les patients avec une MICI active, via la supplémentation en vitamine B12 et/ou en folate, nécessite la réalisation d'études prospectives interventionnelles.

13.3 Déterminants génétiques du métabolisme des monocarbones au cours de la maladie de Crohn : mise en évidence de nouveaux polymorphismes

13.3.1 Déterminants génétiques de l'hyperhomocystéinémie au cours de la maladie de Crohn : rôles des polymorphismes de *MTHFR* et *AHCY* (*SAHH*)

Nous rapportons la première étude qui a évalué de façon exhaustive les polymorphismes des gènes impliqués dans le métabolisme des monocarbones chez des patients atteints de MC. Dans notre étude deux SNP étaient indépendamment associés au taux plasmatique de l'homocystéine : le rs1801133 correspondant au gène *MTHFR* et le rs13043752 correspondant au gène *AHCY*. Dans une étude cas-témoin, on a mis en évidence une augmentation du risque primaire de MICI parmi les sujets présentant un génotype *MTHFR 677, T/T*.[314] Par ailleurs, dans cette même étude, le génotype *MTHFR 677, T/T* était associé à un taux plasmatique d'homocysteine significativement plus élevé.[314]

Nous avons, par ailleurs, mis en évidence une association indépendante entre le polymorphisme rs13043752 de l'adénosylhomocystéinase et le taux plasmatique d'homocystéine. L'adénosylhomocystéinase —appelée aussi, S–adénosylhomocystéine hydrolase (SAHH)— convertit la SAH en homocystéine permettant ainsi le recyclage de l'homocystéine en méthionine dans la voie de la reméthylation.[1] La SAH formée après le rajout d'un groupement méthyl à la S-adénosyl-méthionine est hydrolysée en adénosine et en

homocystéine par la SAHH dans les conditions physiologiques. Le rôle de la SAHH au cours des désordres inflammatoires a été rapporté dans plusieurs études.[392-397] Il a été démontré que l'inhibition de la SAHH pouvait présenter des propriétés immunosuppressives.[396] Dans un modèle d'encéphalite démyélinisantes auto-immune —qui sert de modèle à la forme humaine de la sclérose en plaque— l'administration d'un inhibiteur de la SAHH entrainait une suppression de l'activation des lymphocytes T avec une inhibition de la kinase cycline-dépendante[395] notamment via la réduction de la phosphorylation de plusieurs protéines impliquées dans la signalisation TCR, incluant Akt, Erk1/2, et NF-kappaB.[394] Ces données suggèrent que la transmethylation est nécessaire pour l'activation des lymphocytes T CD4 et que son inhibition peut représenter une approche thérapeutique intéressante dans des maladies auto-immunes. Dans une autre étude, Kominsky *et al.* ont évalué dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de colite murine les conséquences métaboliques de l'inflammation au niveau de la muqueuse intestinale.[392] L'analyse de la signature métabolique dans les tissus inflammatoires des colites murines a démontré une altération de l'expression des métabolites associés à la méthylation cellulaire.[392] Par ailleurs, l'expression des enzymes centrales à la méthylation — S-adénosylméthionine synthase et S-adénosylhomocystéine hydrolase— était augmentée en réponse à l'inflammation.[392] Dans cette étude, la méthylation de l'ADN était nettement augmentée au cours de l'inflammation et l'activité NF-kappaB était inhibée après traitement par un inhibiteur réversible de la SAHH, le DZ2002.[392] Par ailleurs, dans cette étude, l'inhibition de la méthylation cellulaire dans un modèle murin de colite entrainait l'exacerbation de l'activité inflammatoire alors que la supplémentation en folate entrainait une amélioration de la sévérité de la colite.[392] De façon consistante, dans une étude préalablement publiée, nous avons démontré qu'un statut carencé en donneur de méthyle aggravait la colite expérimentale au DSS (Dextran sodium sulfate) chez le rat.[25] Dans notre étude nous avons mis en évidence une association indépendante entre le polymorphisme de la SAHH et le taux

plasmatique de la SOD. Toutes ces données soulignent le rôle fondamental de la SAHH dans le maintien de l'homéostasie intestinale via le statut de méthylation.

13.3.2 Déterminants génétiques de la superoxyde dismutase : implication du métabolisme des monocarbones dans la sévérité de la maladie de Crohn

Nos données montrent l'implication de plusieurs gènes du métabolisme des monocarbones dans le déterminisme du taux plasmatique de la SOD. Il a été démontré que les taux élevés d'homocystéine augmentaient le taux plasmatique de la SOD, un marqueur fiable et validé du stress oxydatif.[22, 23] Trois des gènes associés à la SOD sont liés à la vitamine B12 (*FUT2, CUBN*, et *TCN2*), un est lié aux folates (*GGH*), et un dernier à la synthèse cellulaire de l'homocystéine (*AHCY*). Ceci suggère que le métabolisme des monocarbones peut être associé à la sévérité de la MC à travers la SOD.

Dans la présente étude, le polymorphisme de *FUT2* était indépendamment associé au taux de SOD. Dans un modèle de souris transgénique pour l'alpha1,2-fucosyltransférase humaine et qui développait une colite spontanée, il a été démontré que l'altération de la glycosylation influençait le développement des cellules T.[399] Dans une méta-analyse ayant inclus 6 études en GWA (6333 patients avec MC et 15056 témoins), le polymorphisme de *FUT2* était significativement associé avec le risque primaire de MC.[401] Ces résultats suggèrent l'implication de *FUT2* dans la pathogénie de la MC et soulignent le rôle potentiel de la couche de mucus dans la pathogénie de cette maladie.[400]

13.3.3 Polymorphismes du métabolisme des monocarbones et âge précoce de survenue de la maladie de Crohn : rôle de *ABCB1* (*MDR1*)

Dans notre étude le polymorphisme du gène ABCB1 était associé à un âge de survenue précoce de la MC. Le rôle du gène *ABCB1* a été étudié au cours des MICI.[402-411] Wilk *et al.* ont rapporté un modèle de souris *knockout mdr1a(-/-)* qui développait une colite spontanée à la 12e semaine.[412] Nones, et al. ont mis en évidence une altération de la flore intestinale dans un modèle de souris *knockout mdr1a(-/-)* avant l'installation des lésions inflammatoires.[406] Cette étude suggère que l'absence du transporteur Abcb1 dans les cellules intestinales peut entraîner une modification du microbiote intestinal avec comme risque potentiel le développement d'une inflammation intestinale.[406] Il est intéressant de souligner que dans cette étude, l'altération de la flore caecale précédait l'apparition de l'inflammation intestinale chez les souris *mdr1a(-/-)*.[406] De façon consistante, dans une étude de familles de patients avec une MC, Vermeire *et al.* ont démontré la présence d'une dysbiose fécale chez les sujets apparentés indemnes de la maladie.[413] Enfin, le polymorphisme du gène *ABCB1* a été associé au caractère corticorésistant de la MC[403] ainsi qu'à la corticodépendance dans la forme pédiatrique de MC.[409]

En conclusion, la présente étude a évalué de façon exhaustive les polymorphismes des gènes impliqués dans le métabolisme des monocarbones chez de patients suivis pour une MC. Cette étude a confirmé le rôle du polymorphisme de *MTHFR* dans le déterminisme du taux plasmatique de l'homocysteine et a mis en évidence pour la première fois le rôle du polymorphisme de la *SAHH* dans le déterminisme de l'homocysteine au cours des MICI. Par ailleurs, nous avons mis en évidence, l'implication de plusieurs gènes du métabolisme des monocarbones dans le déterminisme du taux plasmatique de la SOD. Trois de ces gènes sont liés à la vitamine B12 (*FUT2, CUBN*, et *TCN2*), un est lié aux folates (*GGH*), et un dernier à

la synthèse cellulaire de l'homocystéine (*AHCY*). Par ailleurs, nous avons mis en évidence l'implication du gène *ABCB1* dans la survenue précoce de la MC.

13.4 *Fucosyltransférase 2* : un gène impliqué à la fois dans le déterminisme de la vitamine B12 et le risque primaire de la maladie de Crohn

La famille des α-1,2-fucosyltransférases (dénommée aussi l'enzyme Se) catalyse l'addition du fucose —un désoxy-hexose— sur une liaison α-1,2 au galactose de type 1 et 2 pour former les antigènes H de types 1 et 2.[310] Le variant *FUT2* est un trait physiologique qui régule l'expression et la sécrétion des antigènes ABH dans les cellules épithéliales des glandes.[20] Environ, 20 % des caucasiens sont non-sécréteurs pour l'enzyme Se (Se-) et n'expriment pas les antigènes ABO dans la salive car ils sont homozygotes pour l'allèle muté *FUT2 461, A/A*.[20] Dans un modèle de souris transgénique pour l'alpha1,2-fucosyltransférase humaine et qui développait une colite spontanée, il a été démontré que l'altération de la glycosylation influençait le développement des cellules T.[399]

Dans une étude GWA sur 896 patients avec une MC et 3204 témoins le polymorphisme de *FUT2* (rs602662) était significativement associé au risque primaire de la MC.[400] Ce résultat a été répliqué dans une cohorte indépendante composée de 1174 patients avec une MC et 357 témoins (*P*-value combinée = 4,9 x 10^{-8}).[400] L'association entre *FUT2* et MC a été récemment confirmée dans une étude méta-analyse de 6 études GWA.[401] Récemment, une étude en GWA ayant utilisé une approche métabolimique non ciblée sur plus de 37 000 métabolites, a confirmé l'implication du polymorphisme de *FUT2* à la fois dans le déterminisme du taux de vitamine B12 plasmatique et le risque primaire de MC.[414] Cette étude vient confirmer nos résultats et apporte un argument supplémentaire sur l'interaction entre le métabolisme des monocarbones et la pathogénie de la MC.

Les organismes pathogènes utilisent les molécules de surface des cellules de l'hôte, incluant les oligosaccharides —synthétisés par les fucosyltransférases— pour l'invasion cellulaire.[400] Il est possible qu'une prévalence élevée du statut non-sécréteur pour FUT2 dans la population générale ait conféré une protection historique contre l'infection par certains microorganismes tels que *H. pylori*.[415, 416] Les bactéries du genre *Lactobacillus*, qui sont des bactéries commensales du tube digestif, s'attachent au précurseur glycolipidique GA1, impliquant le rôle du profil glycolipidique de la muqueuse dans l'adhésion de la flore commensale.[417] Par ailleurs, les lactobacilles peuvent déplacer des germes pathogènes tels que *Clostridium* de la couche de mucus[418] et peuvent inhiber l'interaction hôte-bactérie pour *Shigella*.[419] Les bactéries commensales induisent l'expression de glycolipides.[420] Le fucosylglycolipide FGA1 est retrouvé dans l'intestin de la souris conventionnelle mais non chez la souris axénique.[420] Par ailleurs, l'expression de FGA1 est induite par l'administration de microbes et des transcrits de *FUT2* ont été induits dans l'iléon de souris axéniques, 48 heures après l'administration de selles issues de souris conventionnelles.[421] Les souris *Fut2(-/-)* n'expriment pas le fucosylglycolipide FGA1 dans le caecum et le colon alors que les souris normales l'expriment.[420] Les bactéries commensales et les probiotiques peuvent exercer leurs effets protecteurs via l'inhibition de l'adhésion ou bien via le déplacement des bactéries pathogènes, soulignant ainsi le rôle potentiel de *FUT2* et du statut non-sécréteur de *FUT2* sur le profil de la flore intestinale.[422] Les individus Se- peuvent donc avoir une interruption de l'équilibre homéostatique du système immunitaire intestinal, les rendant susceptibles au développement d'une inflammation muqueuse chronique. L'altération de la flore intestinale, ou dysbiose, a été bien décrite chez les patients avec une MICI.[423] Ces données mettent en exergue le rôle pathogénique potentiel de FUT2 au cours des MICI. L'étude de l'effet du polymorphisme de FUT2 sur le phénotype clinique, et en particulier son rôle sur le microbiote des individus non-sécréteurs pour FUT2 peut éclairer d'un nouveau jour les connaissances

actuelles sur les interactions hôte-bactéries dans la pathogénie des MICI en général et de la MC en particulier.

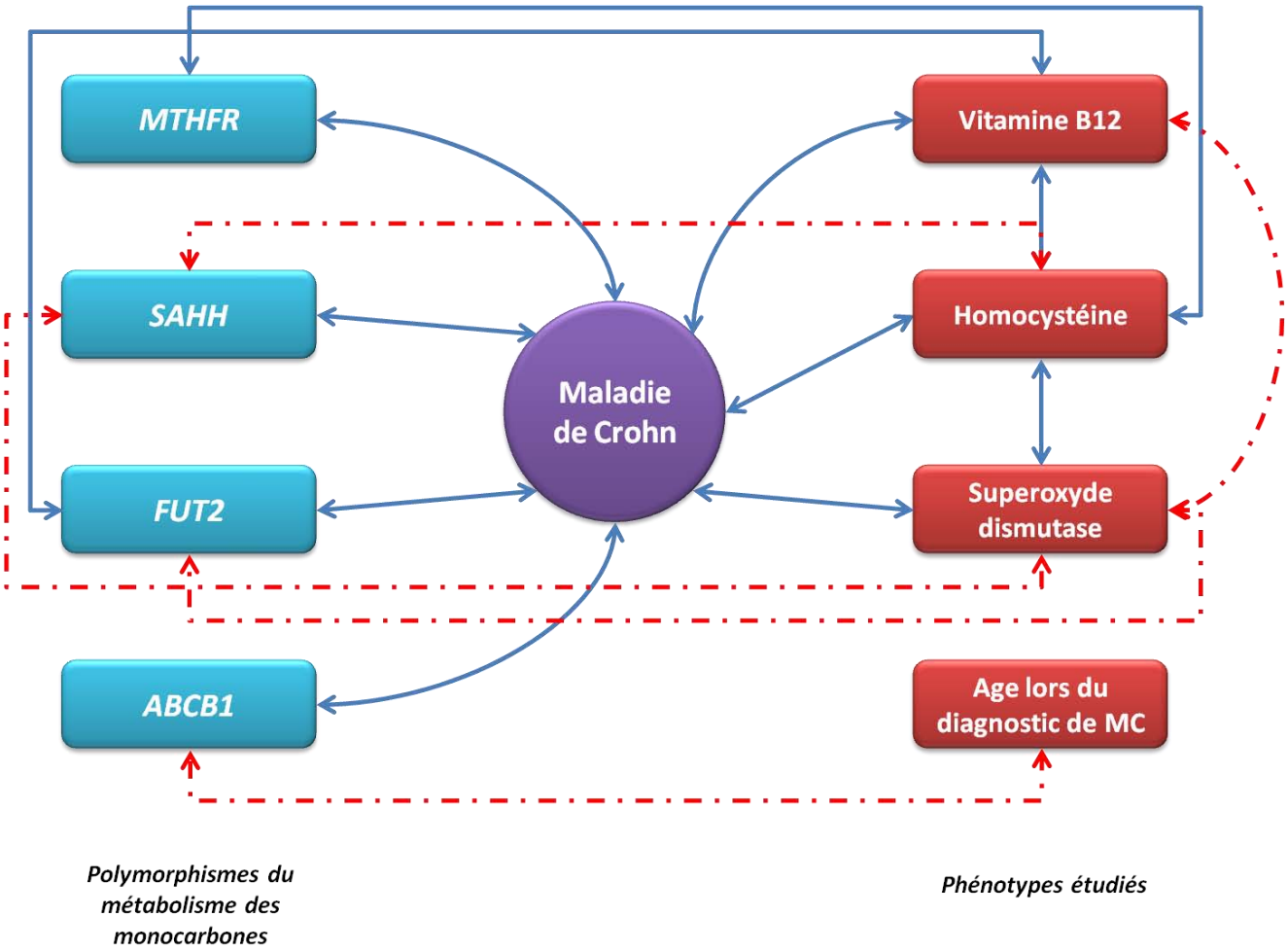


Figure 8. Synthèse des interactions entre, d'une part, certains gènes impliqués dans le métabolisme des monocarbones et d'autre part, les taux plasmatiques de vitamine B12, d'homocysteine, et de superoxyde dismutase ainsi que l'âge du diagnostic au cours de la maladie de Crohn. (Lignes continues : interactions établies dans la littérature ; lignes pointillées : interactions rapportées dans les résultats des études N°1 et 3). *MTHFR* : *méthylènetetrahydrofolate reductase* ; *SAHH* (*AHCY*) : *S-adénosylhomocystéine hydrolase* (*adénosylhomocystéinase*) ; *FUT2* : *Fucosyltransférase 2* ; *ABCB1* : *ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1*.

14 Annexe

14.1 **Manuscrit accepté pour publication dans: *"The American Journal of Clinical Nutrition"***

Helicobacter pylori serological status has no influence on the association between fucosyltransferase (FUT2 461G>A polymorphism) and vitamin B12 in Europe and West Africa

[AQ1] *Helicobacter pylori* serologic status has no influence on the association between fucosyltransferase 2 polymorphism (*FUT2 461G→A*) and vitamin B-12 in Europe and West Africa[1–4]

[AQ2] *Abderrahim Oussalah, Cyril Besseau, Céline Chery, Elise Jeannesson, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez, Guido Anello, Paolo Bosco, Maurizzio Elia, Antonino Romano, Jean-Pierre Bronowicki, Philippe Gerard, Justine Paoli, Patrice Hodonou Avogbe, Nicodème Chabi, Ambaliou Sanni, Emile Amouzou, Laurent Peyrin-Biroulet, and Jean-Louis Guéant*

ABSTRACT

Background: Genomewide association studies have shown a relation between plasma vitamin B-12 concentration and the *461G→A* [AQ5] polymorphism of fucosyltransferase 2 (*FUT2*), a gene associated with susceptibility to *Helicobacter pylori* infection.

Objective: We evaluated in 2 populations the association of *FUT2 461 G→A* polymorphism with vitamin B-12 and related metabolic markers and investigated whether the influence of *FUT2* on *H. pylori* serology is part of the mechanisms that underlie these associations.

Design: The study included 1282 ambulatory subjects from Europe and West Africa. Blood concentrations of vitamin B-12, folate, homocysteine, and methylmalonic acid were measured. Genotyping was performed by real-time polymerase chain reaction. *H. pylori* serology testing was performed by using ELISA.

Results: In univariate analysis, *FUT2 461*, *A/A* genotype was [AQ6] associated with higher plasma vitamin B-12 concentration in the total population ($P = 0.0007$) as well as in Europe ($P = 0.0009$) and in West Africa ($P = 0.0015$). Positivity for *H. pylori* serology was higher in West Africa ($P < 0.0001$) and was not associated with low plasma vitamin B-12. The prevalence of *H. pylori*–positive patients did not differ among *FUT2 461 G→A* genotypes ($P = 0.2068$). In multivariate analysis, *FUT2 461 G→A* genotype ($P = 0.0008$), but not positive *H. pylori* serology, was an independent predictor of plasma vitamin B-12 concentration.

[AQ7] **Conclusion:** This study confirms the influence of *FUT2 461 G→A* polymorphism on plasma vitamin B-12 concentration and showed no influence of *H. pylori* serologic status on this association in ambulatory subjects from Europe and West Africa. *Am J Clin Nutr* 2012;95:1–8.

INTRODUCTION

Vitamin B-12 (cobalamin) is a water-soluble vitamin that is required in one-carbon metabolism (1). Cobalamin is found in animal foods, meat, milk, egg, fish, and shellfish (2). Uptake of dietary vitamin B-12 and its delivery to cells is a complex process, requiring 3 cobalamin-binding proteins—intrinsic factor, haptocorrin (previously known as R-binder), and transcobalamin—and their cell membrane receptors (1). Vitamin B-12 is a cofactor required for the remethylation of homocysteine to methionine by methionine synthase and is part of one-carbon metabolism, which is essential for purine and thymidylate synthesis, which is necessary for maintenance of genomic integrity (3). Data from genomewide association studies suggested that plasma vitamin B-12 concentration could be influenced by genetic polymorphisms (4–6). Hazra et al (4) showed that white women who were homozygous for fucosyltransferase 2 (*FUT2*) rs492602 G (NG_007511.1, located on chromosome 19 at 19q13.3.), which is in strong linkage disequilibrium with the *FUT2* rs601338 [*461 G→A* (NM_000511) according to the Human Genome Variation Society, also known as *428 G→A*] nonsecretor variant allele (W143x variant), had higher plasma vitamin B-12 concentrations.

It has been suggested that the association between *FUT2* and low plasma vitamin B-12 concentration may be the consequence of susceptibility to *Helicobacter pylori* infection in carriers of the *FUT2* secretor status as compared with individuals with the nonsecretor status (5). However, no study to date has evaluated the relation between *FUT2* polymorphism and *H. pylori* serologic status. Furthermore, data regarding the influence of *FUT2* polymorphism on the overall profile of one-carbon metabolism markers are lacking, and no study has evaluated in multivariate analysis the influence of *FUT2* polymorphism on vitamin B-12 concentration.

[1] From INSERM U954, Cellular and Molecular Pathology in Nutrition, Henri Poincaré University Nancy 1, and University Hospital of Nancy, Vandoeuvre-lès-Nancy, France (AO, CB, CC, EJ, R-MG-R, LP-B, J-PB, PHA, PG, JP, and J-LG); the IRCCS, Oasi Maria SS–Institute for Research on [AQ3] Mental Retardation, Troina, Italy (GA, PB, ME, AR, and J-LG); the Department of Internal Medicine and Geriatrics, UCSC, CI Columbus, Rome, Italy (AR); the Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Université de Cotonou, Cotonou, Benin (NC and AS); and the Laboratory of Biochemistry and Nutrition, Lomé, Togo (EA).

[2] AO, CB, and CC contributed equally to this article.

[3] Supported by grants from the French National Institute for Health and Medical Research (INSERM) and the French National Agency for Research (ANR; Nutrivigène program). Mast Diagnostic (Amiens, France) kindly provided Mastazyme *Helicobacter pylori* IgG ELISA kits for *H. pylori* serology testing.

[4] Address correspondence to J-L Guéant, AGAF, INSERM U954, Cellular [AQ4] and Molecular Pathology in Nutrition, Henri Poincaré University Nancy 1, and University Hospital of Nancy, Rue du Morvan, 54500, Vandoeuvre-lès-Nancy, France. E-mail: jean-louis.gueant@medecine.uhp-nancy.fr.

Received March 22, 2011. Accepted for publication November 1, 2011.
doi: 10.3945/ajcn.111.016410.

Manuscript

The aims of the study were as follows: *1*) to appraise the distribution of *FUT2 461G→A* (rs601338) polymorphism and to assess its influence on one-carbon metabolism markers (vitamin B-12, folate, homocysteine, and methylmalonic acid) and *2*) to investigate the potential association between *H. pylori* infection and *FUT2 461G→A* polymorphism in the general population.

SUBJECTS AND METHODS

Study populations

Between January 1999 and December 2006, ambulatory subjects were included from 3 countries: Italy [OASI cohort, Sicily (7)], Benin (coastal urban area of Cotonou), and Togo (the coast, Lomé, and the Savanna). These populations have been previously reported on in 2 studies (8, 9). Italian subjects were considered representative of the European continent, and those from Benin and Togo were considered representative of the West African region. Institutional review board approval was obtained from the ethical committees of the Medical Centre of Troina (Instituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico, the Oasi Maria Institute, Institute for Research on Mental Retardation, Troina, Sicily, Italy), the University Hospital of Nancy (Vandoeuvre-lès-Nancy, France), the University of Benin (Cotonou, Benin), and the University of Lomé (Lomé, Togo) (8–10). Written informed consent was obtained from participants. All participants had received a systematic clinical evaluation to rule out cancer, cardiovascular, renal, hepatic, or genetic disease and any vitamin supplementation before inclusion in the study.

Blood sampling

Phlebotomy was performed, and fasting venous blood was collected in EDTA-containing tubes. Samples were centrifuged immediately at 2500 *g* for 15 min at room temperature. Aliquots were stored at −70°C until analysis.

Vitamin B-12, folate, homocysteine, and methylmalonic acid assays

All specimens were tested in a single laboratory (Vandoeuvre-lès-Nancy, France). Homocysteine and methylmalonic acid were determined by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry procedure as previously published (11), with an Acquity ultra-performance liquid chromatography bridged ethylsiloxane/silica hybrid (UPLC BEH) C18 column (1.7 μm, 2.1 × 50 mm; Waters Corporation). Methylmalonic acid was assessed only in the European population. Plasma vitamin B-12 and folate concentrations were assayed with a vitamin B-12 and folate immunoassay kit by means of automated chemiluminescence (ASC:180 Automated Chemiluminescence Systems; Chiron Diagnostics). The intraassay CVs for vitamin B-12, folate, homocysteine, and methylmalonate were 2.8%, 5.1%, 4.5%, and 7.3%, respectively.

H. pylori testing

Serum specimens were tested for the presence of IgG antibodies against *H. pylori* by using ELISA (Mastazyme *Helicobacter*; Mast Diagnostic) according to the manufacturer's instructions. Classification of infection status followed the manufacturer's instructions.

Analysis of genomic DNA

Genomic DNA was isolated from peripheral leukocytes by using a Qiagen kit (Qiagen-France). Fluorescence resonance energy transfer real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed for the genotyping of *FUT2 461G→A* (rs601338) polymorphism by using a LightCycler 480 instrument (Roche Molecular Biochemicals). The 5′ to 3′ DNA sequences of forward primer, reverse primer, sensor probe, and anchor probe used for the *FUT2 461G→A* polymorphism were AGATTCAAGCCATGTGGGAGTTA, CTTCCACACTTTTGGCATGAC, CCTGCTCCTACACCTTCTACC, and CCACCTCCGCCAGGAGATCCTC, respectively. PCR was performed in a 96-well plate in a total volume of 10 μL. The final reaction contained 10 ng genomic DNA, 0.5 μmol/L each of forward and reverse primers, 0.2 μmol/L each of the sensor and anchor probes (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH), and 2 μL LightCycler 480 Genotyping Master (kit for 384 reactions). Real-time PCR for *FUT2 461G→A* (rs601338) genotyping was performed by an initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of 95°C for 10 s, 59°C for 10 s, and 72°C for 20 s. To determine the melting points after the amplification phase, a melting curve analysis was performed at 95°C for 20 s and at 40°C for 20 s, followed by slow heating at the rate of 0.2°C/s until reaching 85°C.

Statistical analysis

All quantitative variables are described as medians and percentiles (IQR, 25th–75th percentile). All proportions and genotype frequencies are expressed as percentages with 95% CIs. Genotype distributions were tested for consistency with expected Hardy-Weinberg equilibrium proportions, including analysis for ascertainment bias, according to the method proposed by Rodriguez et al (12). Proportions were compared by using the chi-square test or Fisher's exact test, as appropriate. All correlations were studied by using Spearman's rank-order correlation coefficient. The comparison of plasma concentrations of vitamin B-12 (pmol/L), folate (nmol/L), homocysteine (μmol/L), and methylmalonic acid (μmol/L) between *FUT2 461G→A* genotypes, was performed by using the Kruskal-Wallis test; post hoc analysis for pairwise comparison of subgroups was performed according to Conover, to avoid multiple testing problems (13). To evaluate the influence of baseline characteristics and *FUT2 461G→A* polymorphism on plasma concentrations of vitamin B-12 (pmol/L), folate (nmol/L), homocysteine (μmol/L), and methylmalonic acid (μmol/L), univariate analyses were carried out by using Spearman's rank-order correlation coefficient, the Mann-Whitney *U* test, or the Kruskal-Wallis test, as appropriate. All significant items obtained in univariate analyses were integrated into a multiple regression model for multivariate analysis by using a stepwise method. All variables with a *P* value <0.1 were included in the model, and the variables with *P* values <0.05 were retained in the model. Correction for multiple comparisons was performed by using Bonferroni test. All of the reported *P* values were 2-sided, and *P* values <0.05 were

considered significant. Statistical analyses were performed by using MedCalc software, version 11.4.4 (MedCalc Software).

RESULTS

Baseline characteristics

A total of 1282 ambulatory participants were included in the study (Italy, n = 657; West Africa, n = 625: Benin, n = 517; Togo, n = 108). The median age of the study population at inclusion was 60 y, and the median plasma concentrations of vitamin B-12 and folate were within the reference values (**Table 1**). As expected, plasma concentrations of vitamin B-12 and folate were significantly and inversely correlated with those of homocysteine [$\rho = -0.259$ (95% CI: −0.310, −0.206; $P < 0.0001$) and $\rho = -0.286$ (95% CI: −0.336, −0.233; $P < 0.0001$) for vitamin B-12 and folate, respectively]. Vitamin B-12 was inversely correlated with methylmalonic acid concentration ($\rho = -0.187$; 95% CI: −0.261, −0.111; $P < 0.0001$). Homocysteine was positively correlated with methylmalonic acid (ρ = 0.180; 95% CI: 0.105, 0.254; $P < 0.0001$). As expected, positive *H. pylori* serology was more prevalent in West African subjects than in European subjects (92.1% compared with 81.0% for West Africa and Europe, respectively; $P < 0.0001$) (Table 1).

TABLE 1
Characteristics of the 1282 healthy individuals included in the study[1]

Characteristics	*n*	Values
Vitamin B-12 (pmol/L)[2]		
Total population	1226	345.0 (239.0–500.0)
Europe	650	297.0 (209.1–401.2)
West Africa	576	418.0 (293.1–589.5)
P (Europe compared with West Africa)		<0.0001[3]
Folate (nmol/L)[2]		
Total population	1225	10.0 (6.8–14.0)
Europe	648	12.0 (8.8–15.8)
West Africa	577	7.7 (5.4–11.5)
P (Europe compared with West Africa)		<0.0001[3]
Homocysteine (μmol/L)[2]		
Total population	1278	14.3 (11.4–18.7)
Europe	654	14.4 (11.8–18.1)
West Africa	624	14.1 (10.7–19.4)
P (Europe compared with West Africa)		0.11[3]
Methylmalonic acid (μmol/L)[2]		
Europe	648	0.205 (0.135–0.298)
West Africa	0	
Positive *Helicobacter pylori* serology[4]		
Total population	1036	85.1 (83.0, 87.3)
Europe	654	81.0 (78.0, 84.1)
West Africa	382	92.1 (89.4, 94.9)
P value (Europe compared with West Africa)		<0.0001[5]
Male sex[4]		
Total population	683	53.4 (50.6, 56.1)
Europe	262	39.9 (36.1, 43.6)
West Africa	421	67.6 (63.9, 71.3)
P (Europe compared with West Africa)		<0.0001[5]

[1] Total population (Europe and West Africa), n = 1280; Europe, n = 657; West Africa, n = 623.
[2] Values are medians; IQRs (25th–75th percentile) in parentheses.
[3] Mann-Whitney *U* test.
[4] Values are percentages; 95% CIs in parentheses.
[5] Chi-square test.

Influence of *H. pylori* serologic status on one-carbon metabolism markers in European and West African populations

Total population

In the total population, *H. pylori*–positive serology was not associated with a lower vitamin B-12 concentration. Conversely, plasma folate concentration was significantly higher in *H. pylori*–negative subjects (11.4 nmol/L; IQR: 8.5–15.9 nmol/L) than in *H. pylori*–positive subjects (9.8 nmol/L; IQR: 6.7–13.9 nmol/L) ($P < 0.0001$) (**Table 2**).

Europe

In Europe, *H. pylori*–positive subjects had significantly lower plasma folate (P = 0.03) and methylmalonate concentrations (P = 0.0008) than did *H. pylori*–negative subjects. Plasma concentrations of vitamin B-12 and homocysteine did not differ according to *H. pylori* serologic status (Table 2).

West Africa

In the West African population, *H. pylori* serologic status did not influence the plasma concentrations of vitamin B-12, folate, homocysteine, and methylmalonic acid (Table 2).

FUT2 461 G→A genotype frequency distribution

The distribution of *FUT2 461G→A* genotype frequencies in European and West African populations is reported in **Table 3**. This distribution of *FUT2 461G→A* genotype is consistent with the Hardy-Weinberg equilibrium model (*see* Supplemental Table 1 under "Supplemental data" in the online issue). The homozygous *FUT2* wild-type genotype (*G/G*) was more prevalent in West Africa than in Europe (36.0% compared with 21.2%, $P <$ 0.0001). Conversely, the heterozygous genotype (*FUT2 461 G/A*) was more frequent in Europe than in West Africa (52.0% compared with 42.7% for Europe and West Africa, respectively; P = 0.001) (Table 3). The proportion of the *FUT2* nonsecretor genotype (*A/A*) did not differ between European and West African participants (26.8% compared with 21.2% for Europe and West Africa, respectively; P = 0.0502) (Table 3). It should be noted that the prevalence of the FUT2 secretor phenotype— corresponding to *FUT2 461 G/G* or *G/A* genotypes—did not differ between European (73.2%) and West African (78.8%) populations (P = 0.0502) (Table 3).

Influence of *FUT2 461G→A* polymorphism on *H. pylori* serologic status in European and West African populations

The prevalence of positive *H. pylori* serology did not differ across *FUT2 461 G→A* genotypes in the total population or in Europe and West Africa (P = 0.2068, P = 0.4712, and P = 0.8785, respectively) (**Table 4**). Consistently, the prevalence of positive *H. pylori* serology did not differ between FUT2 secretor and FUT2 nonsecretor groups in the total population (P = 0.18) or in Europe (P = 0.27) and West Africa (P = 0.80) (Table 4).

Master Proof

TABLE 2
Influence of *Helicobacter pylori* serologic status on one-carbon metabolism markers in European and West African populations

	Negative *Helicobacter pylori* serology			Positive *Helicobacter pylori* serology			
One-carbon metabolism marker	*n*	Median	IQR[1]	*n*	Median	IQR[1]	*P*[2]
Total population							
Vitamin B-12 (pmol/L)	143	306.0	198.9–436.3	807	338.0	239.0–468.1	0.0500
Folate (nmol/L)	143	11.4	8.5–15.9	808	9.8	6.7–13.9	0.0001
Homocysteine (μmol/L)	144	14.6	11.9–19.0	844	14.3	11.6–18.0	0.4340
Methylmalonic acid (μmol/L)	—	—	—	—	—	—	—
Europe							
Vitamin B-12 (pmol/L)	119	281.3	188.0–398.4	524	298.5	216.0–402.3	0.2613
Folate (nmol/L)	119	12.8	9.8–16.5	524	11.6	8.6–15.5	0.0293
Homocysteine (μmol/L)	118	14.6	12.0–19.2	519	14.1	11.600–17.0	0.0591
Methylmalonic acid (μmol/L)	117	0.237	0.153–0.394	519	0.195	0.132–0.283	0.0008
West Africa							
Vitamin B-12 (pmol/L)	24	412.5	313.0–631.5	283	428.0	297.0–569.3	0.7410
Folate (nmol/L)	24	7.1	5.3–8.9	284	6.5	4.8–9.1	0.4528
Homocysteine (μmol/L)	26	12.9	11.3–17.1	325	14.8	11.7–19.8	0.3047
Methylmalonic acid (μmol/L)	0	—	—	0	—	—	—

[1] 25th–75th percentile.
[2] For positive compared with negative *Helicobacter pylori* serology (Mann-Whitney *U* test).

Influence of *FUT2 461G→A* polymorphism on one-carbon metabolism markers in European and West African populations

In the total population, vitamin B-12 concentration was influenced by *FUT2 461G→A* polymorphism, with median concentrations of 310, 325, and 378 pmol/L in subjects with *FUT2 461 G/G*, *G/A*, and *A/A* genotypes, respectively (P = 0.0007) (**Table 5**). The effect of *FUT2 461 G→A* polymorphism on the concentration of vitamin B-12 was consistently observed in both European (P = 0.0009) and West African (P = 0.0015) populations (Table 5). In *H. pylori*–positive participants, plasma vitamin B-12 concentration was significantly influenced by *FUT2 461 G→A* polymorphism in the total population (P = 0.0016) (Supplemental Table 2 under "Supplemental data" in the online issue). In the *H. pylori*–negative group, the limited sample size allowed the evaluation of this association only in the European subjects. In this *H. pylori*–negative European subgroup, there was an influence of *FUT2 461 G→A* alleles on plasma vitamin B-12 concentration, considering homozygous [**AQ13**] genotypes, with vitamin B-12 concentrations of 247.8 pmol/L (IQR: 181.8–299.0 pmol/L) and 323.5 pmol/L (IQR: 196.9–423.6 pmol/L) for *G* and *A* alleles, respectively (P = 0.0063). Plasma folate concentration was significantly associated with *FUT2 461 G→A* polymorphism in the total population but not in European (P = 0.14) and West African (P = 0.10) populations (Table 5). Plasma homocysteine concentration was significantly associated with *FUT2 461 G→A* polymorphism in West Africa (P = 0.02) but not in Europe (P = 0.21) (Table 5). Plasma methylmalonic acid concentration was not influenced by *FUT2 461G→A* polymorphisms in the European population (Table 5).

FUT2 secretor phenotype influenced only vitamin B-12 concentrations, with significantly higher vitamin B-12 concentrations in the FUT2 nonsecretor group than in the FUT2 secretor group in the total population (P = 0.0004) as well as in Europe (P = 0.0005) and West Africa (P = 0.0092) (Supplemental Table 3 under "Supplemental data" in the online issue).

TABLE 3
Distribution of *FUT2 461G→A* polymorphism and FUT2 secretor status according to geographic area[1]

		Genotype counts										
		FUT2 461, G/G			*FUT2 461, G/A*			*FUT2 461, A/A*[2]			*FUT2* secretor status[3]	
Geographic area	Total *n*	*n*	Percentage	95% CI	*n*	Percentage	95% CI	*n*	Percentage	95% CI	*n*	Percentage	95% CI
			%	%		%	%		%	%		%	%
Total population	1047	282	26.9	24.2, 29.6	507	48.4	45.4, 51.5	258	24.6	22.0, 27.3	789	75.4	72.7, 78.0
Europe	642	136	21.2	18.0, 24.4	334	52.0	48.2, 55.9	172	26.8	23.4, 30.2	470	73.2	69.8, 76.6
West Africa	405	146	36.0	31.4, 40.7	173	42.7	37.9, 47.6	86	21.2	17.2, 25.2	319	78.8	74.8, 82.8
P (Europe compared with West Africa)[4]			<0.0001			0.0014			0.0502			0.0502	

[1] FUT2, fucosyltransferase 2.
[2] *FUT2 461, A/A* genotype corresponds to FUT2 nonsecretor status.
[3] FUT2 secretor status corresponds to *FUT2 461, G/G* or *G/A* genotypes.
[4] Derived by using chi-square test.

Master Proof

TABLE 4
Prevalence of positive *Helicobacter pylori* serology according to *FUT2 461G→A* polymorphism or FUT2 secretor phenotype[1]

Geographic areas	*FUT2 461, G/G*				*FUT2 461, G/A*				*FUT2 461, A/A*[2]				FUT2 secretor status[4]				
	n	Hp+	Percentage	95% CI	*n*	Hp +	Percentage	95% CI	*n*	Hp +	Percentage	95% CI	*P*[3]	*n*	Hp +	Percentage	95% CI	*P*[5]
		n	%	%		*n*	%	%		*n*	%	%			*n*	%	%	
Total population	259	229	88.4	84.5, 92.3	475	407	85.7	82.5, 88.8	239	198	82.8	78.0, 87.7	0.2068	734	636	86.6	84.2, 89.1	0.1761
Europe	134	112	83.6	77.2, 89.9	325	269	82.8	78.6, 86.9	170	134	78.8	72.6, 85.0	0.4712	459	381	83.0	79.6, 86.5	0.2744
West Africa	125	117	93.6	89.2, 98.0	150	138	92.0	87.6, 96.4	69	64	92.8	86.5, 99.0	0.8785	275	255	92.7	89.6, 95.8	0.8012

[1] FUT2, fucosyltransferase 2; Hp+, patients with positive *Helicobacter pylori* serology in each group.
[2] *FUT2 461, A/A* genotype corresponds to FUT2 nonsecretor status.
[3] *FUT2 461, G/G* compared with *G/A* and *A/A* (chi-square test).
[4] FUT2 secretor status corresponds to *FUT2 461, G/G* or *G/A* genotypes.
[5] FUT2 secretor status compared with nonsecretor status (chi-square test).

[AQ22]

Independent predictors in multivariate analysis of vitamin B-12 concentration in European and West African populations

In multiple regression analysis, *FUT2 461 G/G* genotype was negatively and independently associated with plasma vitamin B-12 concentration in the total population (β coefficient = −57.64; SE: 17.19; $P = 0.0008$) (**Table 6**). Consistently, when the "*FUT2 461 G/G* or *G/A* genotype" item—which corresponds to FUT2 secretor phenotype—was considered in the regression model, it was independently and negatively associated with vitamin B-12 concentration in the total population (β coefficient = −57.89; SE: 17.13; $P = 0.0008$) (Supplemental Table 4 under "Supplemental data" in the online issue). Male sex was negatively and independently associated with plasma vitamin B-12 (Table 6). Conversely, the West African geographic area was positively and independently associated with plasma vitamin B-12 concentration (Table 6 and Supplemental Table 4 under "Supplemental data" in the online issue). Positive *H. pylori* serology was not an independent predictor of plasma vitamin B-12 concentration (Table 6 and Supplemental Table 4 under "Supplemental data" in the online issue). No interaction was found between *FUT2 461G→A* polymorphism and *H. pylori* serologic status.

DISCUSSION

This study, which was performed in a general population setting encompassing West African and European ambulatory subjects, showed that *FUT2 461 G→A* polymorphism was an independent predictor of plasma vitamin B-12 concentration. These results are consistent with the data from 2 genomewide association studies conducted in white populations (5, 6). The family of α-1,2-fucosyltransferases (also known as the Se enzyme) catalyzes the addition of fucose—a hexose deoxy sugar—in α-1,2 linkage to the galactose of types 1 and 2 disaccharide to form H type 1 and H type 2 antigens, respectively (14). The FUT2 variant is a physiologic trait that regulates the expression and secretion of ABH antigens in epithelial cells of glands (15). Approximately 20% of whites are nonsecretors who do not express ABO antigens in saliva because they are homozygous for the *FUT2 461* null allele (*A/A*) (15). In Europeans, Africans, and Iranians, the *FUT2* nonsecretor genotype variant was associated with higher vitamin B-12 concentrations than in carriers of the secretor genotype (5, 15). [AQ14]

Hazra et al (4) showed that white women who were homozygous for the *G* allele of rs492602, which is in strong linkage disequilibrium with rs601338, had higher vitamin B-12 concentrations. Here, we performed the direct genotyping of rs601338 and showed its association with plasma vitamin B-12 concentration among 1282 adult subjects from Europe and West Africa. Although significantly different, *H. pylori* prevalence in both groups was not dissimilar enough to be considered as contrasted. It has been suggested that the reduced vitamin B-12 concentration in carriers of the FUT2 secretor phenotype is a consequence of increased susceptibility to *H. pylori* infection (5). Indeed, *FUT2*-null mice displayed an altered glycosylation profile and impaired BabA-mediated *H. pylori* adhesion to gastric mucosa (16). In a prospective study in 304 *H. pylori*–infected individuals, Azevedo et al (17) showed that FUT2 secretor phenotype was associated with *H. pylori* infection and with severity of *H. pylori*–induced gastric lesions. [AQ15] [AQ16]

Master Proof

TABLE 5
Comparison of plasma concentration of vitamin B-12, folate, homocysteine, and methylmalonate according to *FUT2 461G→A* polymorphism

One-carbon metabolism markers	Geographic area	*FUT2 461, G/G*			*FUT2 461, G/A*			*FUT2 461, A/A*			
		n	Median	IQR[2]	*n*	Median	IQR[2]	*n*	Median	IQR[2]	*P*[3]
Vitamin B12 (pmol/L)	Total population	257	310.0	223.0–420.3	488	324.5	222.2–469.9	249	378.3	250.0–516.0	0.0007
	Europe	134	270.0	191.0–374.0	332	283.4	199.9–394.4	170	345.5	231.1–443.2	0.0009
	West Africa	123	382.0	263.8–505.5	156	443.5	309.5–580.0	79	486.0	328.3–645.0	0.0015
Folate (nmol/L)	Total population	256	8.7	5.8–12.4	488	10.7	7.1–14.2	249	10.0	6.8–14.4	0.0001
	Europe	132	11.0	8.6–14.4	332	12.2	9.4–15.9	170	11.7	8.3–16.3	0.1351
	West Africa	124	6.0	4.1–8.7	156	6.7	5.1–10.4	79	7.4	5.0–10.3	0.0986
Homocysteine (μmol/L)	Total population	281	15.0	12.1–19.3	505	14.2	11.3–17.9	258	14.8	12.2–19.7	0.0054
	Europe	136	14.8	12.3–17.5	332	14.2	11.6–17.9	172	14.6	12.1–19.7	0.2068
	West Africa	145	15.8	11.9–21.8	173	14.1	10.9–18.2	86	15.1	12.3–20.7	0.0148
Methylmalonic acid (μmol/L)	Europe	134	0.202	0.112–0.296	329	0.204	0.133–0.297	170	0.205	0.141–0.305	0.6129
	West Africa	0	—	—	0	—	—	0	—	—	—

[1] *FUT2,* fucosyltransferase 2.
[2] 25th–75th percentile.
[3] Kruskal-Wallis test.

During the gastric phase of vitamin B-12 absorption, the low [AQ17] pH of the stomach and the acid peptic digestion of food protein–bound cobalamin are necessary for the release of cobalamin (18–20). *H. pylori*–induced chronic atrophic gastritis may cause a disturbance of acid/peptic secretion, which can in turn cause food-cobalamin malabsorption (20, 21). This was suggested by a Finnish population-based study that reported a high prevalence of *H. pylori* infection among subjects with chronic atrophic gastritis and low vitamin B-12 status (22). By contrast, in a case-control study, Stettin et al (23) evaluated one-carbon metabolism markers in 90 healthy subjects, of whom 69 had positive *H. pylori* serology, and did not find any significant impact of *H. pylori*–positive serology on vitamin B status. Consistent with Stettin et al (23), vitamin B-12 concentration was not influenced by *H. pylori* serology in our study of ambulatory subjects with no reported digestive disorder. This can be explained by the fact that *H. pylori*–positive serologic status does not necessarily imply the presence of chronic atrophic gastritis. In a large, prospective, population-based cohort from Germany, among *H. pylori*–positive subjects only 2.7% developed chronic atrophic gastritis after 5 y of follow-up (24). Moreover, in a prospective study in 202 subjects, most *H. pylori*–positive subjects had normal egg yolk–cobalamin absorption test results (20).

TABLE 6
Predictors of plasma vitamin B-12 concentration in multivariate analysis in the total study population[1]

	P value			
	Univariate analysis	Multivariate analysis[2]	Coefficient (*β*)	SE
FUT2 461G→A	0.0007[3]	0.0008[4]	−57.64[4]	17.19[4]
Male sex	0.0035[5]	<0.0001	−63.19	15.48
Geographic area, Africa	<0.0001[5]	<0.0001	147.71	16.68
Age (y)	<0.0001[6]	Not retained	—	—
Positive *Hp* serology	0.0500[5]	Not retained	—	—

[1] *FUT2*, fucosyltransferase 2; *Hp*, *Helicobacter pylori* ; Not retained, not retained in the multiple regression model.
[2] Multiple regression analysis (stepwise method).
[3] Kruskal-Wallis test.
[4] For *FUT2 461, G/G* genotype.
[5] Mann-Whitney *U* test.
[6] Spearman's rank-order correlation coefficient.

In our study, *H. pylori*–positive subjects had lower plasma folate concentrations. This result is in agreement with a previous report (25), suggesting a role of *H. pylori*–related gastritis in modulating folate status. In our study, male sex was negatively and independently associated with plasma vitamin B-12 concentration. These results are in line with a previous study that reported a higher frequency of mild cobalamin deficiency in elderly white men in comparison with black and Asian American women (26).

To our knowledge, our study is the first that has examined the influence of *FUT2* polymorphism on *H. pylori* serologic status. Note that *FUT2 461 G→A* polymorphism as well as FUT2 secretor phenotype were not predictive of *H. pylori* positive serology. In addition, *FUT2 461 G/G* genotype was an independent predictor of vitamin B-12 concentration. It may be assumed that subjects with negative *H. pylori* serology had no reactive contact with *H. pylori*. Accordingly, a part of the influence of *FUT2* polymorphism on vitamin B-12 concentration was independent from *H. pylori*–related mechanisms. Hence, an alternative hypothesis could be that the reduced vitamin B-12 concentration in carriers of the *FUT2* secretor phenotype results in part from an influence of *FUT2* on other mechanisms related with either absorption or transport of vitamin B-12. This needs to be investigated further in experimental models.

It should be noted that, similar to our study, the study by Hazra et al (4) showed that vitamin B-12 concentration remained within the normal range in each of the 3 genotypes of the *FUT2* rs601338 polymorphism. Hence, even though the *FUT2* polymorphism is involved in the variation of vitamin B-12 concentration, it is not by itself a predictor of vitamin B-12 deficiency. In our study, *FUT2* polymorphism consistently showed no effect on methylmalonate concentration in the 2 populations; it had a very weak effect on homocysteine concentration in West African participants, and no effect in Europeans. Our results confirm those from 2 previous studies that found no influence of

Master Proof

FUT2 polymorphism on plasma homocysteine concentration (5, 6).

The higher concentration of vitamin B-12 observed in West African subjects, compared with Europeans, was presumably not related to environmental exposure, because this difference was previously observed between whites and Africans living in the United Kingdom (27). In line with our findings, a study in 30 Nigerians and 10 Europeans living in northern Nigeria found higher vitamin B-12 plasma concentrations in Nigerians than in Europeans (28). Interestingly, the plasma concentration of transcobalamin II was higher in Nigerian subjects than in Europeans subjects living in Nigeria (28). The reasons for this difference in the concentrations of vitamin B-12 have not been fully elucidated and might be related to genetic factors (29). Among these, *FUT2* would have had a limited influence to explain this higher concentration of vitamin B-12, because the frequency of FUT2 nonsecretor phenotype (*FUT2 461*, *A/A* genotype) was not significantly different in the 2 populations. Furthermore, *H. pylori* serologic status was not a contributing factor to this difference between Africans and Europeans, because it was not a predictor of vitamin B-12 concentration in either population. [AQ18]

In conclusion, this is the first study performed in a general population setting that evaluated the influence of *H. pylori* serologic status on the association between *FUT2 461 G→A* polymorphism and vitamin B-12 concentration. We found that *H. pylori* serologic status had no influence on this association. This suggests the involvement of another mechanism of *FUT2* in its influence on vitamin B-12 concentration, in addition to its possible effect on *H. pylori* gastritis, at least in ambulatory subjects from Europe and West Africa.

The authors' responsibilities were as follows—AO: conducted research, performed biochemical assays, analyzed data, performed statistical analyses, and contributed to writing the manuscript; CB: conducted research, analyzed data, performed genotyping analyses, and contributed to writing the manuscript; CC: analyzed data; performed genotyping analyses; and contributed to writing the manuscript; EJ: conducted research and performed biochemical assays; R-MG-R: conducted research, provided essential materials, participated in genotyping analyses, and analyzed data; GA: conducted research, recruited subjects, provided essential materials, and performed biochemical assays; PB: conducted research, recruited subjects, provided essential materials, and participated in genotyping analyses; ME, NC, AS, and EA: conducted research, recruited subjects, and provided essential materials; AR and PA: conducted research and provided essential materials; J-PB: conducted research; PG and JP: conducted research and performed biochemical assays; LP-B: conducted research, analyzed data, and contributed to writing the manuscript; and J-LG: designed and coordinated research, provided essential materials, analyzed data, contributed to writing the manuscript, and had primary responsibility for final content. None of the authors declared a conflict of interest. [AQ19]

REFERENCES

1. Li F, Watkins D, Rosenblatt DS. Vitamin B(12) and birth defects. Mol Genet Metab 2009;98(1-2):166–72.
2. Watanabe F. Vitamin B12 sources and bioavailability. Exp Biol Med (Maywood) 2007;232(10):1266–74.
3. Van den Veyver IB. Genetic effects of methylation diets. Annu Rev Nutr 2002;22:255–82.
4. Hazra A, Kraft P, Selhub J, et al. Common variants of FUT2 are associated with plasma vitamin B12 levels. Nat Genet 2008;40(10): 1160–2.
5. Hazra A, Kraft P, Lazarus R, et al. Genome-wide significant predictors of metabolites in the one-carbon metabolism pathway. Hum Mol Genet 2009;18(23):4677–87.
6. Tanaka T, Scheet P, Giusti B, et al. Genome-wide association study of vitamin B6, vitamin B12, folate, and homocysteine blood concentrations. Am J Hum Genet 2009;84(4):477–82.
7. Guéant JL, Elia M, Romano A. Associations between folate, vitamin B12, homocysteine and pathologies related to aging: the need to consider complex nutrient-nutrient and gene-nutrient interactions and the functional and socio-economic determinants in population-based studies. Clin Chem Lab Med 2007;45:127–9.
8. Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Debard R, et al. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. Am J Clin Nutr 2006;83(3):701–7.
9. Gueant JL, Chabi NW, Gueant-Rodriguez RM, et al. Environmental influence on the worldwide prevalence of a 776C->G variant in the transcobalamin gene (TCN2). J Med Genet 2007;44(6):363–7.
10. Amouzou EK, Chabi NW, Adjalla CE, et al. High prevalence of hyperhomocysteinemia related to folate deficiency and the 677C→T mutation of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase in coastal West Africa. Am J Clin Nutr 2004;79:619–24. [AQ20]
11. Battaglia-Hsu SF, Akchiche N, Noel N, et al. Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE. Proc Natl Acad Sci USA 2009;106(51):21930–5.
12. Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. Am J Epidemiol 2009;169(4):505–14.
13. Conover WJ. Practical nonparametric statistics. 3rd ed. New York, NY: John Wiley, 1999.
14. Mollicone R, Bara J, Le Pendu J, Oriol R. Immunohistologic pattern of type 1 (Lea, Leb) and type 2 (X, Y, H) blood group-related antigens in the human pyloric and duodenal mucosae. Lab Invest 1985;53:219–27.
15. Kelly RJ, Rouquier S, Giorgi D, Lennon GG, Lowe JB. Sequence and expression of a candidate for the human secretor blood group alpha (1,2)fucosyltransferase gene (FUT2): homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype. J Biol Chem 1995;270:4640–9.
16. Magalhaes A, Gomes J, Ismail MN, et al. Fut2-null mice display an altered glycosylation profile and impaired BabA-mediated Helicobacter pylori adhesion to gastric mucosa. Glycobiology 2009;19(12): 1525–36.
17. Azevedo M, Eriksson S, Mendes N, et al. Infection by Helicobacter pylori expressing the BabA adhesin is influenced by the secretor phenotype. J Pathol 2008;215:308–16.
18. Seetharam B, Alpers DH. Absorption and transport of cobalamin (vitamin B12). Annu Rev Nutr 1982;2:343–69.
19. Aimone-Gastin I, Pierson H, Jeandel C, et al. Prospective evaluation of protein bound vitamin B12 (cobalamin) malabsorption in the elderly using trout flesh labelled in vivo with 57Co-cobalamin. Gut 1997;41: 475–9.
20. Carmel R, Aurangzeb I, Qian D. Associations of food-cobalamin malabsorption with ethnic origin, age, Helicobacter pylori infection, and serum markers of gastritis. Am J Gastroenterol 2001;96(1):63–70.
21. Annibale B, Capurso G, Delle Fave G. Consequences of Helicobacter pylori infection on the absorption of micronutrients. Dig Liver Dis 2002;34(suppl 2):S72–7.
22. Sipponen P, Laxen F, Huotari K, Harkonen M. Prevalence of low vitamin B12 and high homocysteine in serum in an elderly male population: association with atrophic gastritis and Helicobacter pylori infection. Scand J Gastroenterol 2003;38:1209–16.
23. Stettin D, Waldmann A, Strohle A, Hahn A. Association between Helicobacter pylori-infection, C-reactive protein and status of B vitamins. Adv Med Sci 2008;53:205–13.
24. Adamu MA, Weck MN, Rothenbacher D, Brenner H. Incidence and risk factors for the development of chronic atrophic gastritis: five year follow-up of a population-based cohort study. Int J Cancer 2011;128: 1652–8.
25. Tamura A, Fujioka T, Nasu M. Relation of Helicobacter pylori infection to plasma vitamin B12, folic acid, and homocysteine levels in patients who underwent diagnostic coronary arteriography. Am J Gastroenterol 2002;97:861–6.

26. Carmel R, Green R, Jacobsen DW, Rasmussen K, Florea M, Azen C. Serum cobalamin, homocysteine, and methylmalonic acid concentrations in a multiethnic elderly population: ethnic and sex differences in cobalamin and metabolite abnormalities. Am J Clin Nutr 1999;70: 904–10.
27. Moore SE, Mansoor MA, Bates CJ, Prentice AM. Plasma homocysteine, folate and vitamin B(12) compared between rural Gambian and UK adults. Br J Nutr 2006;96:508–15.
28. Fleming AF, Ogunfunmilade YA, Carmel R. Serum vitamin B12 levels and vitamin B12-binding proteins of serum and saliva of healthy Nigerians and Europeans. Am J Clin Nutr 1978;31:1732–8.
29. Carmel R. Ethnic and racial factors in cobalamin metabolism and its disorders. Semin Hematol 1999;36:88–100.

Master Proof

FIGURES LEGEND

Figure 1. Plasma levels of vitamin B12 according to *fucosyltransferase 2 (FUT2) 461G>A* polymorphism in Europe and West Africa; [a] Kruskal-Wallis test; whole population, n=994; Europe, n=636; West Africa, n=358).

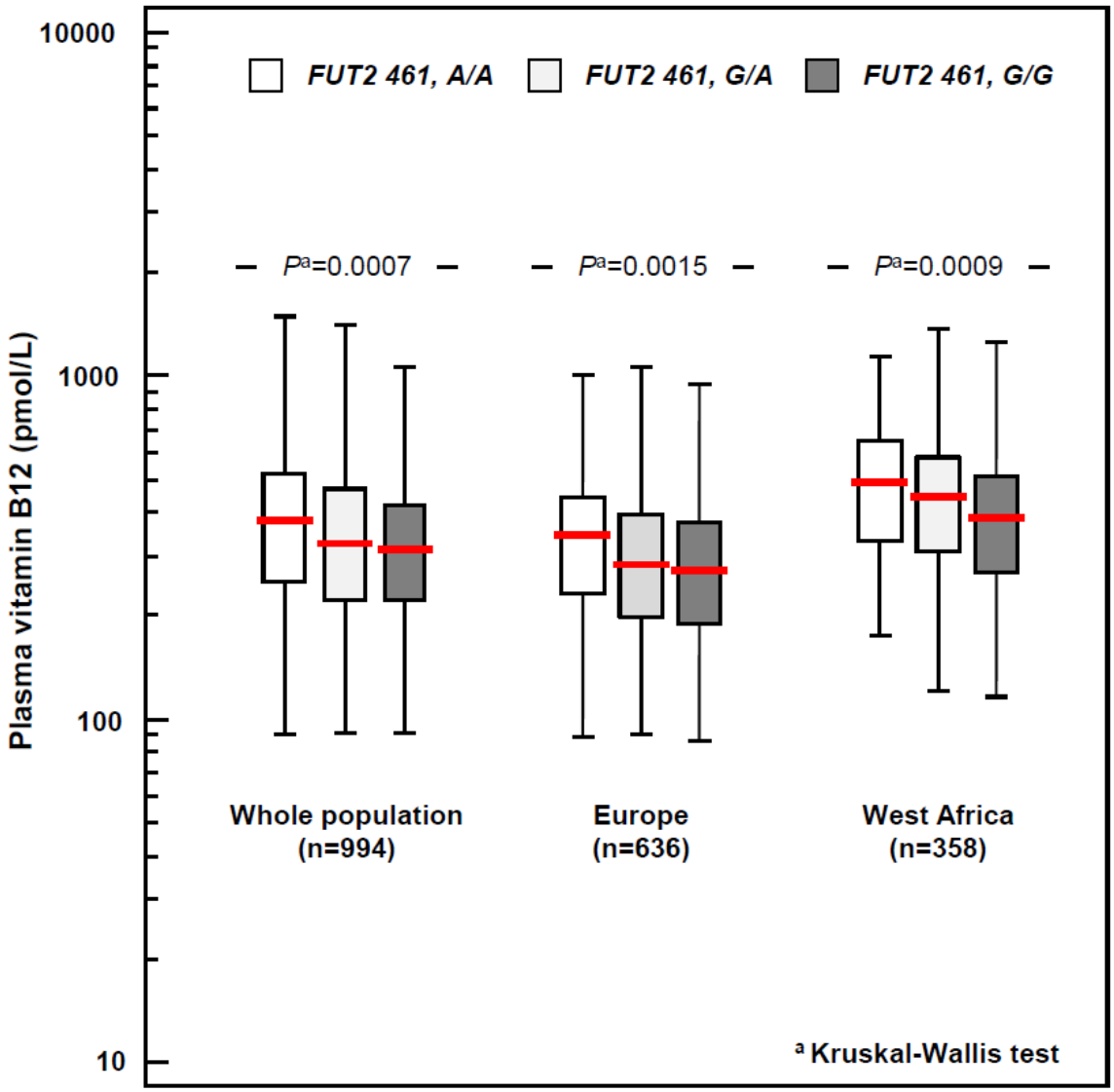


Figure 1. Plasma levels of vitamin B12 according to *fucosyltransferase 2 (FUT2) 461G>A* polymorphism in Europe and West Africa; [a] Kruskal-Wallis test; whole population, n=994; Europe, n=636; West Africa, n=358).

Supplemental Table 1 online. Influence of *Helicobacter pylori* serological status on one-carbon metabolism markers in European and West African populations

One-carbon metabolism marker	Negative *Helicobacter pylori* serology			Positive *Helicobacter pylori* serology			
	Whole population						
	N	**Median**	**IQR, 25th – 75th**	**N**	**Median**	**IQR, 25th – 75th**	***P*-value[a]**
B12	143	306.0	198.9 to 436.3	807	338.0	239.0 to 468.1	0.0500[b]
B9	143	11.4	8.5 to 15.9	808	9.8	6.7 to 13.9	0.0001[b]
HCY	144	14.6	11.9 to 19.0	844	14.3	11.6 to 18.0	0.4340[b]
MMA	–	–	–	–	–	–	–
	Europe						
	N	**Median**	**IQR, 25th – 75th**	**N**	**Median**	**IQR, 25th – 75th**	***P*-value[a]**
B12	119	281.3	188.0 to 398.4	524	298.5	216.0 to 402.3	0.2613[b]
B9	119	12.8	9.8 to 16.5	524	11.6	8.6 to 15.5	0.0293[b]
HCY	118	14.6	12.0 to 19.2	519	14.1	11.600 to 17.0	0.0591[b]
MMA	117	0.237	0.153 to 0.394	519	0.195	0.132 to 0.283	0.0008[b]
	West Africa						
	N	**Median**	**IQR, 25th – 75th**	**N**	**Median**	**IQR, 25th – 75th**	***P*-value[a]**
B12	24	412.5	313.0 to 631.5	283	428.0	297.0 to 569.3	0.7410[b]
B9	24	7.1	5.3 to 8.9	284	6.5	4.8 to 9.1	0.4528[b]
HCY	26	12.9	11.3 to 17.1	325	14.8	11.7 to 19.8	0.3047[b]
MMA	0	–	–	0	–	–	–

NOTE. N: Number of subjects; IQR: interquartile range;

[a] Positive vs. negative *Helicobacter pylori* serology ; [b] Mann-Whitney U test.

Supplemental Table 2 online. Hardy-Weinberg equilibrium *for Fucosyltransferase 2 461G>A* polymorphism

Hardy-Weinberg equilibrium for Fucosyltransferase 2 (461G>A) polymorphism		
Genotypes	Observed frequency (%)	Expected frequency (%)
Homozygote reference	26.9	26.1
Heterozygote	48.4	49.9
Homozygote variant	24.6	23.8
Chi-square	0.093036499	
Chi-square test, P-value	0.760352	

Supplemental Table 3 online. Comparison of plasma level of vitamin B12, folate, homocysteine, and methylmalonate according to FUT2 secretor phenotype

One-carbon metabolism markers	Geographical areas	FUT2 non-secretor phenotype			FUT2 secretor phenotype			*P*-value
		N	Median	IQR, 25th – 75th	N	Median	IQR, 25th – 75th	
B12 (pmol/L)	Whole population	249	378.3	250.0 to 516.0	745	318.2	222.9 to 455.8	0.0004[a]
	Europe	170	345.5	231.1 to 443.2	466	280.2	199.3 to 386.0	0.0005[a]
	West Africa	79	486.0	328.3 to 645.0	279	403.0	287.3 to 542.5	0.0092[a]
B9 (nmol/L)	Whole population	249	10.0	6.8 to 14.4	744	10.0	6.7 to 13.9	0.5682[a]
	Europe	170	11.7	8.3 to 16.3	464	11.9	9.0 to 15.4	0.7084[a]
	West Africa	79	7.4	5.0 to 10.3	280	6.5	4.7 to 9.5	0.2705[a]
Hcy (mmol/L)	Whole population	258	14.8	12.2 to 19.7	786	14.5	11.6 to 18.5	0.1037[a]
	Europe	172	14.6	12.0 to 19.7	468	14.4	11.8 to 17.8	0.1316[a]
	West Africa	86	15.1	12.3 to 20.7	318	14.6	11.5 to 19.8	0.3965[a]
MMA (µmol/l)	Europe	170	0.205	0.141 to 0.305	463	0.204	0.128 to 0.297	0.4931[a]
	West Africa	0			0			

NOTE. N: Number of subjects; IQR: interquartile range; *FUT2*: *Fucosyltransferase 2*;

[a] Wann-Whitney *U* test.

Supplemental Table 4 online. Predictors of plasma vitamin B12 level

	***P*-value, univariate analysis**	***P*-value, multivariate analysis[c]**	**Coefficient (β)**	**Standard error**
	Whole population			
FUT2 461G/G or *G/A* genotype (FUT2 secretor phenotype)	0.0004[a]	0.0009	-53.79	16.13
Hp serology, positive	0.0500[a]	–	–	–
Age (years)	<0.0001[b]	<0.0001	-3.25	0.40
Male gender	0.0035[a]	<0.0001	-61.74	14.53
	Europe			
FUT2 461G/G or *G/A* genotype (FUT2 secretor phenotype)	0.0005[a]	0.0215	-43.62	18.93
Hp serology, positive	0.2613[a]	–	–	–
Age (years)	0.0369 [b]	Not retained[d]	–	–
Male gender	<0.0001[a]	0.0014	-54.72	17.09
	West Africa			
FUT2 461G/G or *G/A* genotype (FUT2 secretor phenotype)	0.0092[a]	0.0128	-73.07	29.20
Hp serology, positive	0.7410[a]	–	–	–
Age (years)	0.7829[b]	–	–	–
Male gender	<0.0001[a]	0.0002	-99.88	26.82

NOTE. *FUT2*: *Fucosyltransferase 2*; Hp: *Helicobacter pylori*.

[a] Mann-Whitney *U* test;

[a] Spearman's rank-order correlation coefficient;

[c] Multiple regression analysis (stepwise method);

[d]Not retained in the multiple regression model.

Supplemental Table 5 online. Predictors of plasma folate level

	P-value, univariate analysis	P-value, multivariate analysis[d]	Coefficient (β)	Standard error
	Whole population			
FUT2 461G>A	0.0001[a]	Not retained[e]	–	–
Hp serology, positive	0.0001[b]	0.0240	-1.5223	0.6731
Age (years)	<0.0001[c]	<0.0001	0.1016	0.01381
Male gender	< 0.0001[b]	<0.0001	-2.7035	0.4890
	Europe			
FUT2 461G>A	0.1351[a]	–	–	–
Hp serology, positive	0.0293[b]	0.0226	-1.8428	0.8063
Age (years)	0.3328[c]	–	–	–
Male gender	< 0.0001[b]	<0.0001	-3.1016	0.6334
	Africa			
FUT2 461G>A	0.0986[a]	–	–	–
Hp serology, positive	0.4528[b]	–	–	–
Age (years)	0.0011[c]	Not retained[e]	–	–
Male gender	< 0.0001[b]	Not retained[e]	–	–

NOTE. FUT2: Fucosyltransferase 2; Hp: *Helicobacter pylori*.

[a] Kruskal-Wallis test

[b] Mann-Whitney *U* test

[c] Spearman's rank-order correlation coefficient

[d] Multiple regression analysis (stepwise method)

[e] Not retained in the multiple regression model

Supplemental Table 6 online. Predictors of plasma homocysteine level

	***P*-value, Univariate analysis**	***P*-value, multivariate analysis[c]**	**Coefficient (β)**	**Standard error**
	Whole population			
FUT2 461G/G or *G/A* genotype (FUT2 secretor phenotype)	0.1037[a]	–	–	–
Hp serology, positive	0.4340[a]	–	–	–
Folate (nmol/L)	<0.0001[b]	<0.0001	-0.31	0.051
Vitamin B12 (pmol/L)	<0.0001[b]	0.0001	-0.006	0.001
Age (years)	<0.0001[b]	Not retained[d]	–	–
Male gender	< 0.0001[a]	<0.0001	3.43	0.75
	Europe			
FUT2 461G/G or *G/A* genotype (FUT2 secretor phenotype)	0.1316[a]	–	–	–
Hp serology, positive	0.0591[a]	–	–	–
Folate (nmol/L)	<0.0001[b]	<0.0001	-0.15	0.04
Vitamin B12 (pmol/L)	<0.0001[b]	<0.0001	-0.005	0.001
Age (years)	<0.0001[b]	<0.0001	0.19	0.04
Male gender	0.0002[a]	0.0006	1.76	0.51
	West Africa			
FUT2 461G/G or *G/A* genotype (FUT2 secretor phenotype)	0.3965[a]	–	–	–
Hp serology, positive	0.3047[a]	–	–	–
Folate (nmol/L)	<0.0001[b]	<0.0001	-0.45	0.10
Vitamin B12 (pmol/L)	<0.0001[b]	0.0018	-0.007	0.003
Age (years)	0.0127[b]	Not retained[d]	–	–
Male gender	< 0.0001[a]	0.0003	5.10	1.39

NOTE. *FUT2*: *Fucosyltransferase 2*; Hp: *Helicobacter pylori*.

[a] Mann-Whitney *U* test

[b] Spearman's rank-order correlation coefficient

[c] Multiple regression analysis (stepwise method)

[d] Not retained in the multiple regression model

Supplemental Table 7 online. Predictors of plasma methylmalonate level

	P-value, univariate analysis	P-value, multivariate analysis[d]	Coefficient (β)	Standard error
	Europe			
FUT2 461G>A	0.6129[a]	–	–	–
Hp serology, positive	0.0008[b]	0.0006	-0.06504	0.01894
Folate (nmol/L)	0.0190[c]	0.0179	0.002198	0.0009255
Vitamin B12 (pmol/L)	<0.0001[c]	<0.0001	-0.0001545	0.00003264
Age (years)	<0.0001[c]	<0.0001	0.007313	0.001052
Male gender	0.5242[b]	–	–	–

NOTE. FUT2: Fucosyltransferase 2; Hp: Helicobacter pylori.

[a] Kruskal-Wallis test

[b] Mann-Whitney *U* test

[c] Spearman's rank-order correlation coefficient

[d] Multiple regression analysis (stepwise method)

14.2 Manuscrit accepté pour publication dans : *–Alimentary pharmacology and Therapeutics"*

Meta-analysis: hyperhomocysteinemia in inflammatory bowel diseases

AP&T Alimentary Pharmacology and Therapeutics

Meta-analysis: hyperhomocysteinaemia in inflammatory bowel diseases

A. Oussalah*,†, J-L. Guéant*,† & L. Peyrin-Biroulet†

*Inserm U954, Cellular and Molecular Pathology in Nutrition, Henri Poincaré University Nancy 1, and University Hospital of Nancy, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.
†Inserm U954 and Department of Hepato-Gastroenterology, University Hospital of Nancy, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

Correspondence to:
Prof. L. Peyrin-Biroulet, Department of Hepato-Gastroenterology, University Hospital of Nancy-Brabois, Rue du Morvan, 54511, Vandœuvre-lès-Nancy, France.
E-mail: peyrinbiroulet@gmail.com

Publication data
Submitted 23 June 2011
First decision 26 July 2011
Resubmitted 2 September 2011
Accepted 4 September 2011

As part of AP&T's peer-review process, a technical check of this meta-analysis was performed by Dr P. Collins.

SUMMARY

Background
The magnitude of association between homocysteine metabolism and inflammatory bowel diseases (IBD) remains unknown whereas the association between hyperhomocysteinaemia and thrombosis remains controversial in IBD.

Aim
To conduct a systematic review and meta-analysis to examine these issues.

Methods
The literature search was conducted using MEDLINE database and international conference abstracts from January 1966 to April 2011 and included all studies that evaluated plasma homocysteine level (PHL) in IBD.

Results
Twenty-eight studies evaluated the PHL and/or hyperhomocysteinaemia risk in IBD patients. Five studies assessed the association of hyperhomocysteinaemia with thrombosis. The mean PHL was significantly higher in IBD patients when compared with controls (weighted mean difference (WMD) = 3.75 μmol/L; 95% CI, 2.23–5.26 μmol/L; $P < 0.0001$; reference ranges for PHL: 5–12 μmol/L). The mean PHL did not differ between ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) (WMD = 0.41 μmol/L; 95% CI, −2.45 to 3.06 μmol/L; $P = 0.76$). The risk of hyperhomocysteinaemia was significantly higher in IBD patients when compared with controls [odds ratio (OR) = 4.65; 95% CI, 3.04–7.09; $P < 0.0001$]. The risk of hyperhomocysteinaemia was not higher among IBD patients who experienced thromboembolic complications (OR = 1.97; 95% CI, 0.83–4.67; $P = 0.12$). Plasma folate level was inversely correlated with IBD risk associated with *MTHFR C677T* polymorphism ($P = 0.006$).

Conclusions
The risk of hyperhomocysteinaemia is significantly higher in IBD patients when compared with controls. The risk assessment of hyperhomocysteinaemia–related thrombosis in IBD requires further investigation. Deficient folate status is associated with a higher impact of *MTHFR C677T* polymorphism on IBD risk.

© 2011 Blackwell Publishing Ltd
doi:10.1111/j.1365-2036.2011.04864.x

UNCORRECTED PROOF

Dispatch: 15.9.11 Journal: APT CE: Vijay
Author Received: No. of pages: 12 PE: Gayathri
APT 4 8 6 4 B
Journal Name Manuscript No.

INTRODUCTION

Homocysteine is a sulphur amino acid whose metabolism stands at the intersection of two pathways: remethylation to methionine, which requires folate and vitamin B12 and transsulphuration to cystathionine, which requires pyridoxal-50-phosphate.[1] Homocysteine is formed from methionine as a product of numerous *S*-adenosylmethionine-dependent transmethylation reactions.[2] Homocysteine can be metabolised by three enzymes depending on methionine balance status. When methionine is in excess, homocysteine is irreversibly converted to cysteine in the transsulphuration pathway, catalysed by the vitamin B6-dependent enzyme, cystathionine b-synthase (CBS).[2] In case of negative methionine balance, homocysteine is converted to methionine via two methionine conserving pathways. First, the betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) pathway, in liver and kidney, which uses betaine as a methyl donor. All betaine in the body is derived from choline, and unless supplemented, none is taken up from the diet.[3] Betaine is hydrolysed by BHMT to dimethylglycine when it transfers its methyl group to homocysteine to generate methionine.[3] Second, the methionine synthase (MTR) pathway, in most tissues, which uses vitamin B12 as a cofactor and methyltetrahydrofolate as a substrate. The production of methyltetrahydrofolate is catalysed by methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) (Figure 1).[2]

Hyperhomocysteinaemia, the accumulation of homocysteine in the circulation, is a well-known risk factor for venous thrombosis in the general population.[4] In this regard, hyperhomocysteinaemia has received attention as a possible contributor to the increased thrombotic risk in patients with inflammatory bowel disease (IBD).[5] Lamber *et al.* were the first to report an increased plasma homocysteine level (PHL) in patients with Crohn's disease when compared with controls.[6] Subsequently, several studies have evaluated PHL in small samples of patients with IBD and have led to mixed results. Hence, the magnitude of association between hyperhomocysteinaemia and IBD remains unknown. Furthermore, the relationship between hyperhomocysteinaemia and thrombosis remains debated in IBD. The MTHFR synthesises 5-methyltetrahydrofolate, the major carbon donor in remethylation of homocysteine to methionine.[7] The *MTHFR mutation 677T* (alanine-to-valine substitution at amino acid 222) encodes a thermolabile enzyme with reduced activity leading to homocysteine accumulation.[8] The

COLOR

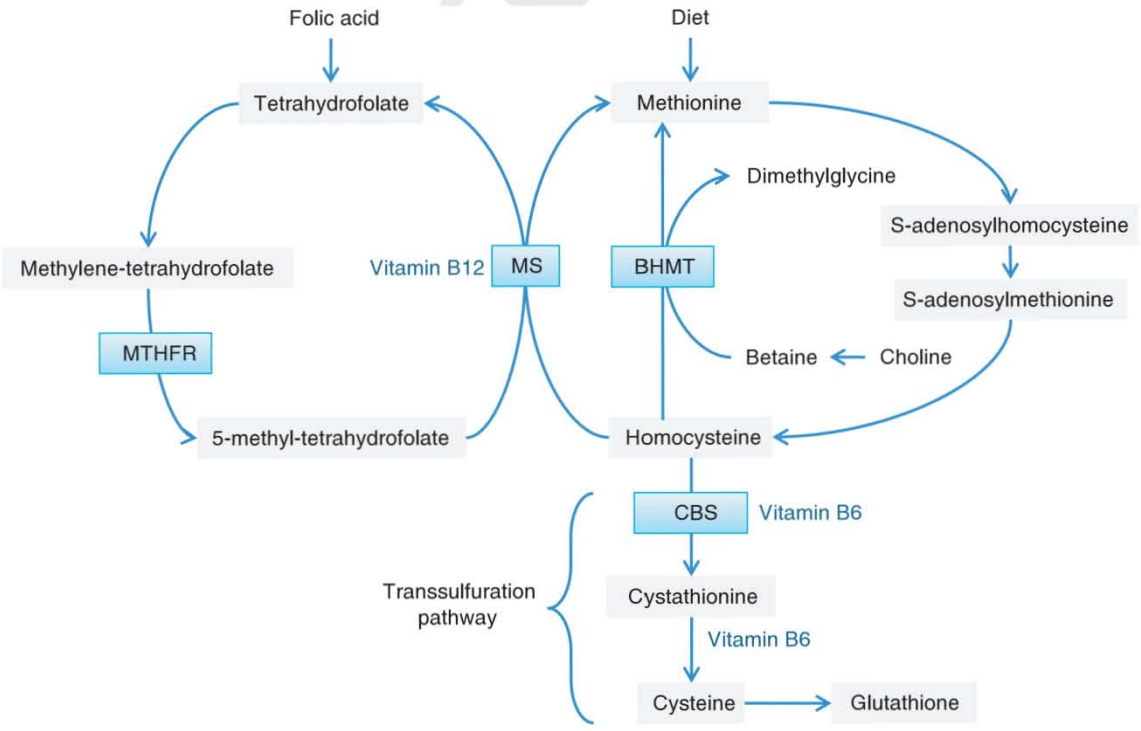


Figure 1 | Homocysteine metabolism. MTR, methionine synthase; BHMT, betaine-homocysteine methyltransferase; MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; CBS, cystathionine b-synthase.

© 2011 Blackwell Publishing Ltd

MTHFR 677TT (but not 677CC/CT) individuals with lower plasma folate levels are at risk for elevated PHLs.[7, 9] A meta-analysis on genetic variants of homocysteine metabolism pathway in IBD did not find a relationship between *MTHFR C677T* polymorphism and IBD risk.[10] However, this meta-analysis did not assess the impact of *MTHFR C677T* polymorphism on IBD risk according to plasma folate concentration.

We therefore performed a systematic review of the literature and meta-analysis on studies that evaluated the PHL in patients with IBD. The aims of this meta-analysis were: (i) the comparison of PHL between IBD patients and controls; (ii) the evaluation of hyperhomocysteinaemia risk in IBD; (iii) the evaluation of the relationship between hyperhomocysteinaemia and thromboembolic complications in IBD and (iv) the evaluation of the association between *MTHFR C677T* polymorphism and IBD risk according to plasma folate concentration.

MATERIALS AND METHODS

Selection criteria and data extraction

The literature search was conducted in MEDLINE-indexed literature using the PubMed search engine from the National Center for Biotechnology Information (http://www.pubmed.gov) (January 1966 to April 2011), with the following medical subject heading (MeSH) terms: ('homocysteine' [MeSH Terms] OR 'homocysteine' [All Fields]) AND (('crohn disease' [MeSH Terms] OR ('crohn' [All Fields] AND 'disease' [All Fields]) OR 'crohn disease' [All Fields]) OR ('colitis, ulcerative' [MeSH Terms] OR ('colitis' [All Fields] AND 'ulcerative' [All Fields]) OR 'ulcerative colitis' [All Fields] OR ('colitis' [All Fields] AND 'ulcerative' [All Fields]) OR 'colitis, ulcerative' [All Fields]) OR ('inflammatory bowel diseases' [MeSH Terms] OR ('inflammatory' [All Fields] AND 'bowel' [All Fields] AND 'diseases' [All Fields]) OR 'inflammatory bowel diseases' [All Fields])). We also conducted a manual search of abstracts from the European Crohn's and Colitis Organisation (from 2007 to 2010 inclusive), the American Digestive Disease Week (from 2007 to 2010 inclusive), and the United European Gastroenterology Week (from 2006 to 2010 inclusive) congresses. Additional articles were retrieved from primary search references. Two investigators (AO, LPB) independently reviewed the titles and abstracts of all citations identified by the literature search. Eligible articles were reviewed for duplicate in an independent manner by the two investigators. Disagreement in data extraction was resolved by consensus. This manuscript follows the criteria of the 'Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) Group'.[11] No language restrictions were applied.

Outcome measures

The outcome measures were defined *a priori*. The meta-analysis evaluated three outcome variables, namely PHL (with sample size and standard deviation in IBD patients and controls), the proportion of subjects with hyperhomocysteinaemia among IBD patients and controls, the proportion of subjects with hyperhomocysteinaemia among IBD patients with and without thromboembolic complications, and the proportion of the *MTHFR 677TT* genotype in IBD patients and controls.

Data synthesis and analysis

Data were collected and tabulated using Microsoft Office Excel 2007. Data were not used for analysis whenever outcomes of interest were not clearly stated. For the comparison of PHL between IBD, UC, CD and controls, a pooled weighted mean difference (WMD) together with 95% confidence interval (95% CI), was used for the meta-analysis. Categorical measures were summarised using counts and percentages. For the calculation of the hyperhomocysteinaemia risk between IBD, UC, or CD patients in one hand and controls in the other hand, the estimated effect measure was the Odds ratio (OR) with 95% CI. The overall summary from the meta-analysis was calculated by combining all studies, and the meta-analysis was performed with both fixed[12] and random-effects (Der-Simonian and Laird)[13] models. The average rate and 95% confidence interval were calculated for the outcomes previously outlined. The calculated summary effect was denoted by the solid diamond at the bottom of the forest plots, the width of which represents the 95% CI. The statistical significance for heterogeneity was assessed by use of the Chi squared-based Q statistic and the I-square statistic for the extent of heterogeneity. Heterogeneity was considered significant if $P < 0.1$ and I^2 was more than 50%.[14] Publication bias was assessed using funnel plots[15] and Rosenthal's Fail-safe N-test which computes the number of missing studies that would need to be added to the analysis to yield a statistically nonsignificant overall effect.[16] The robustness of results was assessed with a sensitivity analysis. Pooled weighted estimates for effect size were calculated, leaving out one study at a time, and then compared to identify influential studies. The relationship between plasma folate concentration (in nmol/L) and the risk of IBD according to *MTHFR C677T* polymorphism was evaluated by meta-regression using weighted linear regression. Results were

UNCORRECTED PROOF

© 2011 Blackwell Publishing Ltd

shown using mixed effects models (unrestricted maximum likelihood method). All reported *P*-values were two-sided with alpha set at 0.05. The meta-analysis and meta-regression were performed using the statistical software package Comprehensive Meta-Analysis, version 2.2.050 (BioStat Software, Engelwood, NJ, USA).

RESULTS

Literature search results

The search strategy generated 66 citations of which 46 appeared to be relevant to the systematic review and were assessed. Of these 46 studies, 17 were excluded leaving 29 eligible studies[6, 17–44] (Figure S1). The studies excluded from meta-analysis and the reasons for their exclusion are shown in the Table S1. Table 1 shows the studies that have evaluated the PHL in patients with IBD[6, 17–43] and had included 2370 IBD patients (UC = 950, CD = 1420) and 1972 controls. Table 2 shows the studies that have reported the proportion of subjects with hyperhomocysteinaemia among patients with IBD and controls.[17, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 31, 33, 35–37, 39, 42, 43]

Patients with inflammatory bowel disease have increased plasma homocysteine level and are at risk of hyperhomocysteinaemia when compared with controls

Twelve studies compared the mean PHL between patients with IBD and controls.[6, 17, 23, 29, 30, 32, 34, 36, 40–43] The mean PHL was significantly higher in patients with IBD when compared with controls with a WMD of 3.75 μmol/L (95% CI, 2.23–5.26 μmol/L; $P < 0.0001$) using random-effects model (Figure 2 and Figure S2). In the Rosenthal's Fail-safe *N*-test, the number of missing studies that would bring *P*-value to >0.05 was 659. Effect size and heterogeneity tests for studies that have assessed PHL in patients with IBD and controls are shown in Table 3.

Eleven studies evaluated the proportion of subjects with hyperhomocysteinaemia among patients with IBD and controls.[17, 21, 23, 24, 27, 29, 31, 35–37, 42] The risk of hyperhomocysteinaemia was significantly higher in patients with IBD compared with controls (OR = 4.65; 95% CI, 3.04–7.09; $P < 0.0001$; heterogeneity: *Q*-value = 20, *I*-squared = 51, $P = 0.03$) using random-effects model (Figure 3). In the Rosenthal's Fail-safe *N*-test, the number of missing studies that would bring *P*-value to >0.05 was 288.

Patients with ulcerative colitis have increased plasma homocysteine level when compared with controls

Six studies compared the mean PHL between patients with UC and controls.[20, 28, 30, 32, 40, 42] The mean PHL was significantly higher in patients with UC when compared with controls with a WMD of 5.01 μmol/L (95% CI, 2.87–7.16 μmol/L; $P < 0.0001$) using random-effects model (Figure 2, Figure S3 and Table 3). In the Rosenthal's Fail-safe *N*-test, the number of missing studies that would bring *P*-value to >0.05 was 288.

Patients with Crohn's disease have increased plasma homocysteine level when compared with controls

Five studies compared the mean PHL between patients with CD and controls.[6, 20, 28, 30, 43] The mean PHL was significantly higher in patients with CD when compared with controls with a WMD of 4.50 μmol/L (95% CI, 2.81–6.19 μmol/L; $P < 0.0001$) using random-effects model (Figure 2, Figure S4 and Table 3). In the Rosenthal's Fail-safe *N*-test, the number of missing studies that would bring *P*-value to >0.05 was 156.

Ulcerative colitis and Crohn's disease patients have the same plasma homocysteine levels

Five studies compared the mean PHL between UC and CD patients.[20, 28, 30, 33, 39] The mean PHL did not differ significantly between the two groups with a WMD of 0.41 μmol/L (95% CI, −2.45 to 3.06 μmol/L; $P = 0.76$) using random-effects model (Figure 2, Figure S5 and Table 3).

Hyperhomocysteinaemia is not associated with thromboembolic events in inflammatory bowel disease patients

Five studies, including 497 IBD patients, have assessed the proportion of patients with a hyperhomocysteinaemia among patients with IBD who presented thromboembolic complications or not.[21, 23, 29, 36, 44] The risk of hyperhomocysteinaemia was not significantly higher among IBD patients who experienced thromboembolic complications in comparison with IBD patients who did not experience thromboembolic complications (OR = 1.97; 95% CI, 0.83–4.67; $P = 0.12$; heterogeneity: *Q*-value = 6, *I*-squared = 32, $P = 0.21$) using random-effects model (Figure 4).

Association between *MTHFR C677T* polymorphism and the risk of inflammatory bowel diseases according to plasma folate concentration

Four studies evaluating the relationship between *MTHFR C677T* polymorphism and IBD risk have reported the mean plasma folate levels in IBD patients.[18, 23, 29, 34] Among these studies, three evaluated a sufficient number of patients (>100) and have been included in the

UNCORRECTED PROOF

© 2011 Blackwell Publishing Ltd

Table 1 | Studies that have evaluated plasma homocysteine level in patients with inflammatory bowel diseases and in controls

		Number of subjects				Hcy, IBD			Hcy, Ulcerative colitis			Hcy, Crohn's disease			Hcy, Controls			
First author	Year	IBD	UC	CD	C	Mean	s.d.	*n*	Mean	s.d.	*n*	Mean	s.d.	*n*	Mean	s.d.	*n*	References
Lambert D	1996	21	0	21	20	13.24	5.53	21				13.24	5.53	21	10.2	3.6	20	6
Cattaneo M	1998	61	29	32	183	12.2	7.7	61							10.5	4.6	183	17
Mahmud N	1999	174	91	83	89	10.85			11.09			10.19			8.99		89	18
Chowers Y	2000	105	0	105	106	10.9	4.8	105				10.9	4.8	105				19
Koutroubakis IE	2000	108	53	55	74				15.87	10.34	53	13.62	6.55	55	9.59	3.39	74	20
Oldenburg B	2000	231	89	142	102	12.3									11.1			21
Maire F	2001	171	0	171	0	14.8		171				14.8		171				22
Papa A	2001	64	39	25	121	11.7	5.7	64							7.8	2.5	121	23
Romagnuolo J	2001	65	9	56	138	8.7		65							6.6		138	24
Vasilopoulos S	2001	125	0	125	0	11.6	0.5	125				11.6	0.5	125				25
Bjerregaard LT	2002	106	52	54	0	10.7		106	10.7		52	10.7		54				26
Nakano E*	2003	43	9	27	46													27
Danese S	2005	166	83	83	70				11.1	4.9	83	13.7	6.1	83	7.1	1.7	70	28
Fernandez-Miranda C	2005	52	16	36	186	9.7	4.4	52							9.1	1.9	186	29
Mahmood A	2005	68	37	31	30	13.2	7.8	68	13.2	6.9	37	13.4	7.2	31	7.4	2.8	30	30
Zezos P	2005	40	40	0	50													31
Drzewoski J	2006	30	30	0	21	10.1	3.1	30	10.1	3.1	30				6.8	2.5	21	32
Roblin X	2006	81	21	60	0				13.6	11	21	13.8	11.5	60				33
Yilmaz S	2006	33	26	7	27	6.6	5.3	33							7.8	4.4	27	34
Banait VS	2008	28	28	0	100													35
Erzin Y	2008	105	57	48	85	16.35	8.7	105							9.6	2.21	85	36
Peyrin-Biroulet L	2008	140	0	140	248													37
Wiese D	2008	7	0	7	0	10.61		7										38
Zepeda-Gomez S	2008	82	56	26	0	7.3	6.8	82	9.7	7.8	56	6.2	6.1	26				39
Akbulut S	2010	55	55	0	45	13.3	1.93	55	13.3	1.93	55				11.3	3.58	45	40
Dagli N	2010	40	32	8	40	20.9	7.8	40							13.2	3.8	40	41
Jiang Y	2010	80	80	0	88	21.72	6.59	80	21.72	6.59	80				12.47	5.02	88	42
Kallel L	2011	89	0	89	103	13.69	4.84	89				13.69	4.84	89	10.77	2.8	103	43

IBD, inflammatory bowel diseases; UC, ulcerative colitis; CD, Crohn's disease; C, controls; s.d., standard deviation; *n*, number of subjects; Hcy, homocysteine (μmol/L).

* Seven IBD patients had indeterminate colitis.

UNCORRECTED PROOF

© 2011 Blackwell Publishing Ltd

Table 2 | Studies that have reported the proportion of subjects with hyperhomocysteinaemia among patients with inflammatory bowel disease and controls

First author	Year	Number of subjects				Cut-off* μmol/L	Proportion of subjects with hyperhomocysteinaemia								References
							IBD		UC		CD		C		
		IBD	UC	CD	C		*n*	%	*n*	%	*n*	%	*n*	%	
Cattaneo M	1998	61	29	32	183	NR	8	13					9	5	17
Oldenburg B	2000	231	89	142	102	21.9	25	11					5	5	21
Papa A	2001	64	39	25	121	12.8	17	27					4	3	23
Romagnuolo J	2001	65	9	56	138	12.1	10	15					3	2	24
Bjerregaard LT	2002	106	52	54	0	15	11	10	6	12	5	9			26
Nakano E†	2003	43	9	27	46	11.35	9	21					2	4	27
Fernandez-Miranda C	2005	52	16	36	186	13	9	17					7	4	29
Zezos P	2005	40	40	0	50	NR	12	30	12	30			5	10	31
Roblin X	2006	81	21	60	0	15	45	56	13	62	32	53			33
Banait VS	2008	28	28	0	100	15	11	39	11	39			15	15	35
Erzin Y	2008	105	57	48	85	‡	59	56					4	5	36
Peyrin-Biroulet L	2008	140	0	140	248	15	33	24			33	24	20	8	37
Zepeda-Gomez S	2008	82	56	26	0	12	18	22	11	20	7	27			39
Jiang Y	2010	80	80	0	88	15	36	45	36	45			23	26	42
Kallel L	2011	89	0	89	103	15					28	31	8	8	43

IBD, inflammatory bowel diseases; UC, ulcerative colitis; CD, Crohn's disease; C, controls; s.d., standard deviation; *n*, number of subjects; NR, not reported.

* Cut-off used for defining hyperhomocysteinaemia (μmol/L).

† Seven IBD patients had indeterminate colitis.

‡ <11.6 and <15.3 mmol/L for women and men respectively.

meta-analysis.[18, 23, 29] In overall analysis, the OR for IBD associated with *MTHFR 677TT* genotype was 1.45 (95% CI, 0.93–2.26, $P = 0.09$). The IBD risk associated with *MTHFR 677TT* genotype was significantly higher in patients with low folate status (<11 nmol/L) (OR = 2.64; 95% CI, 1.44–4.81, $P = 0.002$) when compared with those with high folate status (≥11 nmol/L) (OR = 0.73; 95% CI, 0.41–1.31, $P = 0.29$) ($P = 0.004$, OR for low vs. high folate status) (Figure 5). In meta-regression analysis, the OR of IBD risk associated with *MTHFR C677T* polymorphism was negatively correlated with plasma folate concentration in IBD patients (Mixed effects regression, slope = −0.16, 95% CI, −0.28 to −0.04; $P = 0.006$).

Sensitivity analyses

When sensitivity analyses were performed by leaving out one study at a time, all pooled weighted estimates for effect size were not materially altered (data not shown).

Publication bias

Publication bias was assessed on the funnel plots for: (i) PHL difference between IBD, UC, CD patients and controls and between UC and CD patients (Figures S6–S9 to respectively), (ii) the risk of hyperhomocysteinaemia for IBD vs. controls (Figure S10) and (iii) for the risk of hyperhomocysteinaemia among IBD patients with or without thromboembolic complications (Figure S11). Funnel plots were symmetrical, suggesting that there was no publication bias among studies. This is corroborated by results of the Rosenthal's Fail-safe *N*-test.

DISCUSSION

This meta-analysis demonstrated that UC and CD patients have higher PHL in comparison with controls and that IBD represent a risk factor for hyperhomocysteinaemia. Several studies have evaluated the role of homocysteine in the pathophysiology of IBD.[5] Homocysteine

© 2011 Blackwell Publishing Ltd

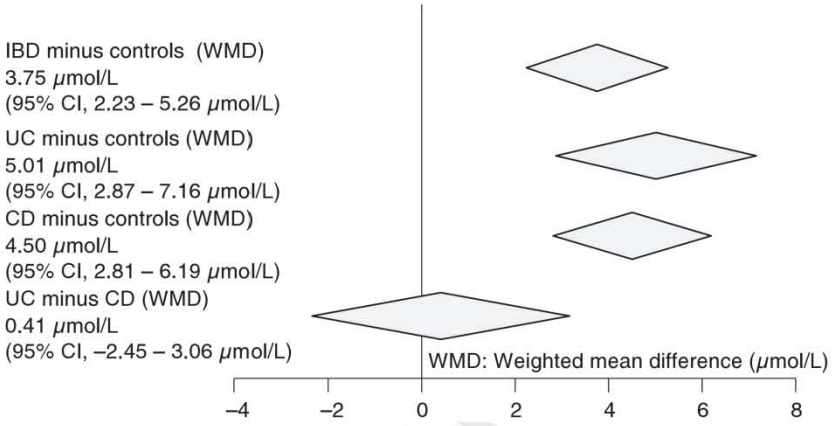


Figure 2 | Weighted mean difference in plasma homocysteine level (μmol/L) between patients with inflammatory bowel diseases and controls. The calculated summary effect is denoted by the solid diamond at the bottom of the forest plots, the width of which represents the 95% confidence interval (normal plasma homocysteine levels ranging from 5 to 12 μmol/L).

Table 3 | Weighted mean difference and 95% confidence interval in plasma homocysteine level (μmol/L)

		Effect size and 95% confidence interval				Heterogeneity			
	Number of studies	WMD	Lower limit	Upper limit	*P*-value	*Q*-value	*I*-squared	*P*-value	References
Plasma homocysteine level (μmol/L)									
IBD minus Controls	12	3.75	2.23	5.26	<0.0001	130	92	<0.0001	6, 17, 23, 29, 30, 32, 34, 36, 40–43
UC minus Controls	6	5.01	2.87	7.16	<0.0001	52	90	<0.0001	20, 28, 30, 32, 40, 42
CD minus Controls	5	4.50	2.81	6.19	<0.0001	18	77	0.001	6, 20, 28, 30, 43
UC minus CD	5	0.41	–2.25	3.06	0.76	14	72	0.007	20, 28, 30, 33, 39

WMD, weighted mean difference; PHL, plasma homocysteine level; IBD, inflammatory bowel diseases; UC, ulcerative colitis; CD, Crohn's disease.

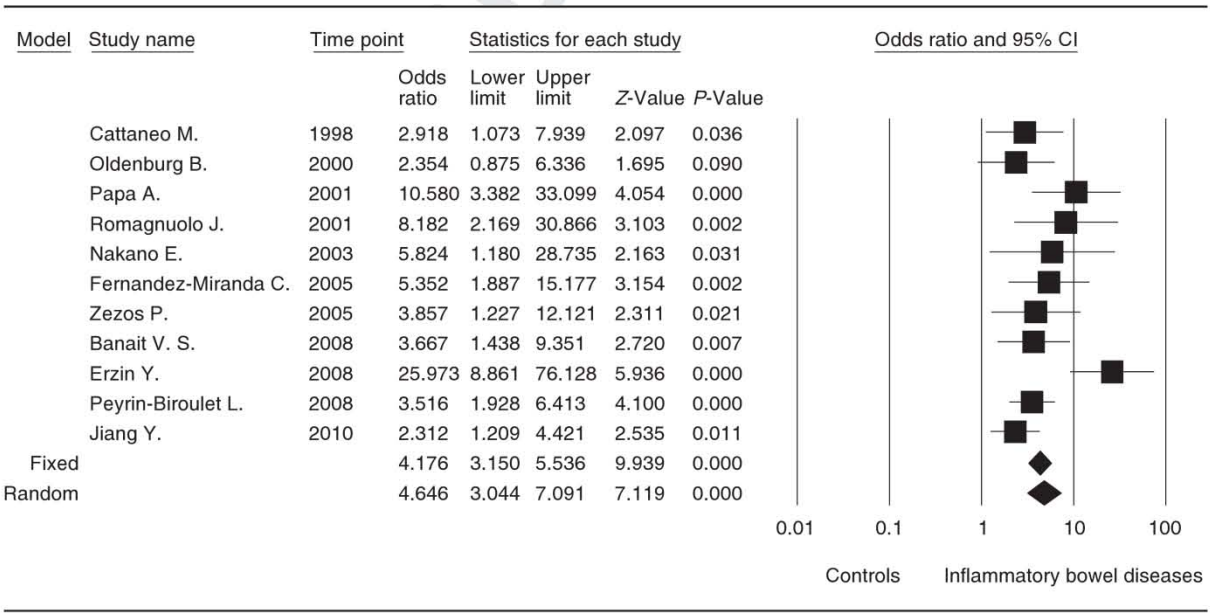


Figure 3 | Effect size for studies that have assessed the proportion of patients with hyperhomocysteinaemia among patients with inflammatory bowel disease and controls. The calculated summary effect is denoted by the solid diamond at the bottom of the forest plots, the width of which represents the 95% confidence interval.

© 2011 Blackwell Publishing Ltd

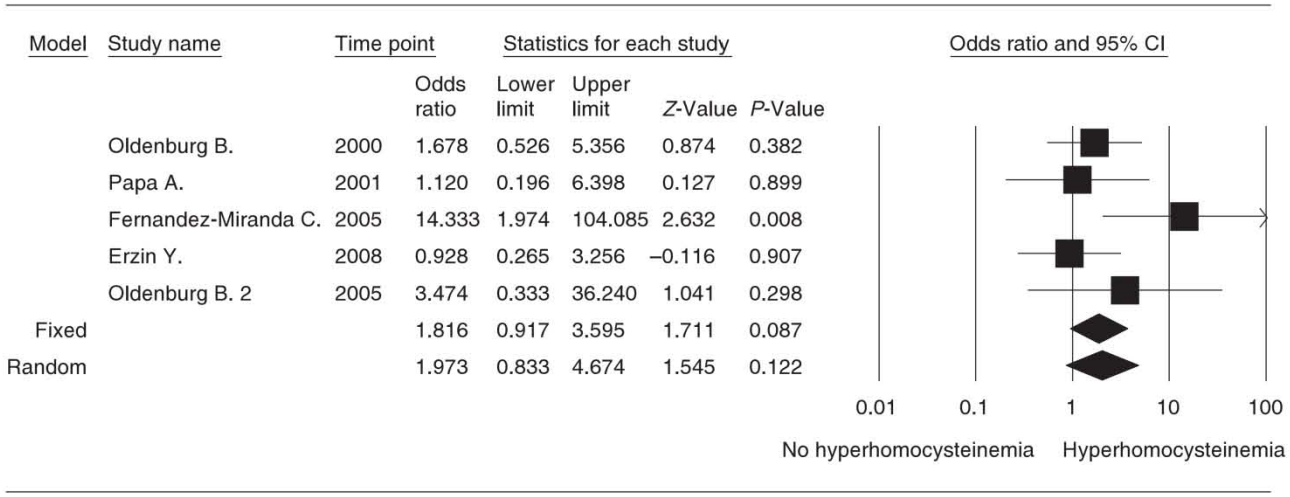


Figure 4 | Effect size for studies that have assessed the proportion of patients with a hyperhomocysteinaemia among patients with inflammatory bowel disease who presented thromboembolic complications or not. The calculated summary effect is denoted by the solid diamond at the bottom of the forest plots, the width of which represents the 95% confidence interval.

COLOR

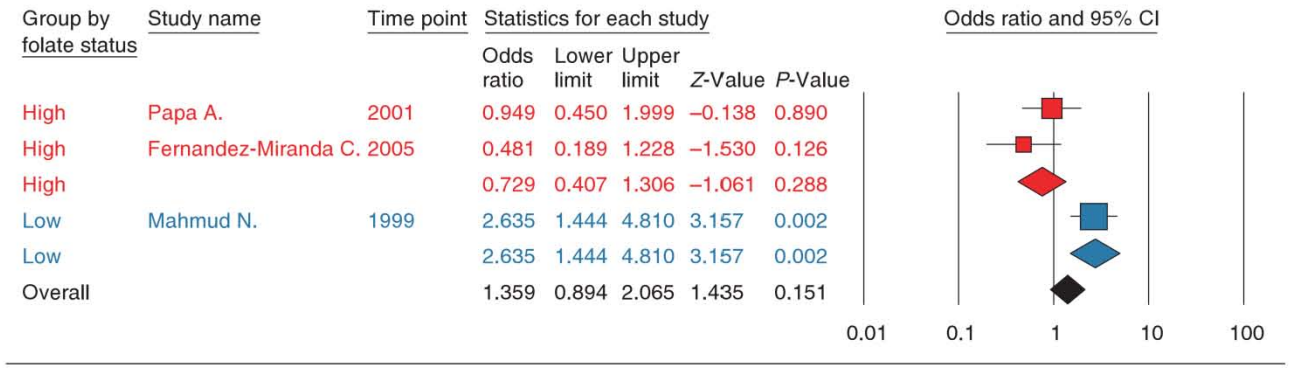


Figure 5 | Effect size for studies that have assessed the risk of IBD associated with *MTHFR 677TT* genotype according to plasma folate status. The calculated summary effect is denoted by the solid diamond at the bottom of the forest plots, the width of which represents the 95% confidence interval.

acts as a pro-oxidant[45] and has been implicated in the decrease of total antioxidant capacity in patients with IBD.[46] Homocysteine has also been involved in host immune response by inducing the production of several inflammatory cytokines and chemokines,[28, 47] endoplasmic reticulum stress,[48] and by regulating gene expression by the methylation of promoter regions in the genome.[49] Several studies have investigated the significance of hyperhomocysteinaemia in the context of nutritional alterations in IBD patients and most reports have linked hyperhomocysteinaemia to a low folate or vitamin B12 status.[50, 51] Malnutrition is common in patients with IBD, especially in active disease states.[52, 53] In a prospective study, 126 consecutive adult IBD patients completed anthropometric measures, 4-day food-record assessments and biochemical markers of nutrition.[54] Folate and vitamin B12 deficiencies were noted in 19% and 18% of patients respectively.[54] Interestingly, we found that methyl donor deficiency aggravates experimental colitis in rats.[55] Several reports illustrated the relationship between high PHL and IBD activity.[32, 36, 43, 56, 57] In a prospective study, Morgenstern *et al.* slowed markedly

© 2011 Blackwell Publishing Ltd

elevated concentrations of homocysteine in the colonic mucosa of patients with UC or CD in comparison with controls.[56] In a pilot study on 30 patients with UC, PHL was significantly higher in patients with active disease in comparison with patients in remission (11.2 ± 3.5 mmol/L vs. 9.0 ± 2.3 mmol/L respectively; $P = 0.048$).[32] Interestingly, patients who have multiple relapses of their disease had higher plasma homocysteine levels than those with low relapsing disease (11.5 ± 3.6 mmol/L vs. 9.0 ± 2.1 mmol/L respectively; $P = 0.035$).[32] Furthermore, PHL was significantly correlated with disease duration ($r = 0.6632$; $P < 0.05$).[32] These results were similar to those reported by Kallel *et al.* in a prospective study on 89 Crohn's disease patients.[43] In this study, the risk of hyperhomocysteinaemia was positively associated with active disease state (OR = 7.54; 95% CI, 1.15–49.3; $P = 0.03$) and disease duration more than 2 years (OR = 8.69; 95% CI, 1.53–49.3; $P = 0.002$).[43] Conversely, this risk was inversely associated with plasma folate (OR = 0.64; 95% CI, 0.48–0.84; $P = 0.002$) and vitamin B12 (OR=0.993; 95% CI, 0.987–0.999; $P = 0.02$) levels.[43] Finally, in a prospective study on 105 consecutive IBD patients, plasma cobalamin level, albumin, erythrocyte sedimentation rate and platelet count were independent predictors of elevated homocysteine level.[36] Taken together, these data suggest that hyperhomocysteinaemia is common in IBD patients and may be related to disease activity. They highlight the potential clinical relevance of screening IBD patients for folate and vitamin B12 status, in regard to the high prevalence of the deficit in vitamin B12 and folate in IBD and to its link with hyperhomocysteinaemia. Nevertheless, the significance of folate and vitamin B12 deficiency and of hyperhomocysteinaemia in IBD patients and the impact of their normalisation on disease activity require interventional studies. It has been demonstrated that choline and betaine-rich diets are associated with lower levels of several inflammatory markers, including C-reactive protein, homocysteine, interleukin-6 and tumour necrosis factor.[58] These data deserve to be confirmed in patients with IBD.

Hyperhomocysteinaemia is a demonstrated risk factor for venous thromboembolic disease[4, 59] and recurrent venous thromboembolism[60] in the general population. A prospective case–control cohort study based on the General Practice Research Database, including 13 756 patients with IBD matched with 71 672 controls, assessed the risk of venous thromboembolism during different activity phases of IBD.[61] Patients with IBD had a higher risk of venous thromboembolism in comparison with controls (hazard ratio (HR) = 3.4; 95% CI, 2.7–4.3).[61] These results were confirmed by a study conducted in the Danish population that included 49 799 adult and paediatric IBD patients (14 211 CD and 35 229 UC) and 477 504 members of the general population and confirmed a doubling of the thromboembolism risk (HR = 2.0; 95% CI, 1.8–2.1).[62] Taken together, these data further confirmed the increased risk of thromboembolic complications in IBD.[61, 62] Whether hyperhomocysteinaemia contributes to this risk remains controversial in IBD.[63] In our meta-analysis, the risk of hyperhomocysteinaemia among IBD patients with thromboembolic complications was increased but did not reach statistical significance. This might be related to a relative lack of statistical power due to the low number of studies that have addressed this issue and their relative small sample size. Overall, in contrast to the general population, causal risk factors for thrombosis remain poorly known in IBD.[64] Whether correction of any vitamin B12 and/or folate deficiency in IBD patients, especially those with severe disease, history of ileal resection (vitamin B12) and/or methotrexate therapy (folate) may reduce the development of thrombosis will require further investigation.[5, 18]

In this meta-analysis, *MTHFR 677TT* genotype was associated with higher IBD risk in patients with low plasma folate status. It has been demonstrated that individuals with thermolabile MTHFR may have a higher folate requirement for regulation of plasma homocysteine concentrations.[9] Furthermore, *MTHFR C677T* polymorphism was associated with neural tube defects and Down syndrome in northern Europe, a geographical region characterised by a low folate diet, but not in western and southwestern Europe, where both dietary folate intake and T allele frequency are much higher.[65] These results are in agreement with those of the present meta-analysis showing an inverse correlation between plasma folate levels and risk of IBD associated with *MTHFR C677T* polymorphism and further support the development of strategies aimed at normalising folate levels in IBD patients. However, this remains to be investigated in depth.

This meta-analysis has several strengths. First, the literature search of this meta-analysis was comprehensive and we identified all relevant studies that evaluated PHL in 2370 IBD patients and 1972 controls. Second, we used a random-effects model, which provides a more conservative result with wider confidence intervals and found no clear evidence of publication bias, as supported by funnel plots and Rosenthal's Fail-safe *N*-test which computes the number of missing studies that would

UNCORRECTED PROOF

© 2011 Blackwell Publishing Ltd

need to be added to the analysis to yield a statistically nonsignificant overall effect. Third, this meta-analysis is the first to compare the effect of *MTHFR C677T* polymorphism on IBD risk according to folate status. We need to acknowledge several limitations in this meta-analysis. The potential for statistical heterogeneity is always present when combining case–control studies. It is the reason why we used a random-effects model in the analysis, which provides conservative quantitative results. Moreover, the meta-analysis on studies that assessed the risk of thrombosis associated with hyperhomocysteinaemia in IBD has included only four studies that have assessed 497 IBD patients with a consequent risk of type II error. Therefore, one cannot draw firm evidence-based conclusions from currently available data regarding the risk of hyperhomocysteinaemia–related thrombosis in IBD.

In conclusion, this meta-analysis demonstrated that IBD patients had higher PHL than controls. Moreover, IBD patients have an increased risk of hyperhomocysteinaemia. The risk assessment of hyperhomocysteinaemia–related thrombosis in IBD requires further investigation. The value of the normalisation of elevated homocysteine levels in patients with active IBD, through folate and/or vitamin B12 supplementation, requires prospective interventional studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declaration of personal interests: The authors declare no conflict of interest. Writing Assistance: None. *Declaration of funding interests*: This work did not receive any financial support.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Flow diagram of the literature search and selection process of the studies.

Figure S2. Forest plot showing the weighted mean difference of the plasma homocysteine level between inflammatory bowel diseases patients and controls. The vertical line depicts the point of 'no difference' between the two groups, and the horizontal lines correspond to the 95% confidence intervals.

Figure S3. Forest plot showing the weighted mean difference of the plasma homocysteine level between ulcerative colitis patients and controls. The vertical line depicts the point of 'no difference' between the two groups, and the horizontal lines correspond to the 95% confidence intervals.

Figure S4. Forest plot showing the weighted mean difference of the plasma homocysteine level between Crohn's disease patients and controls. The vertical line depicts the point of 'no difference' between the two groups, and the horizontal lines correspond to the 95% confidence intervals.

Figure S5. Forest plot showing the weighted mean difference of the plasma homocysteine level between Ulcerative colitis and Crohn's disease patients. The vertical line depicts the point of 'no difference' between the two groups, and the horizontal lines correspond to the 95% confidence intervals. Diamonds represent the weighted mean difference for all studies.

Figure S6. Funnel plot assessing risk of publication bias. Each point represents a separate study. Funnel plot of standard error by difference in means (weighted mean difference between IBD patients and controls).

Figure S7. Funnel plot assessing risk of publication bias. Each point represents a separate study. Funnel plot of standard error by difference in means (weighted mean difference between ulcerative colitis patients and controls).

Figure S8. Funnel plot assessing risk of publication bias. Each point represents a separate study. Funnel plot of standard error by difference in means (weighted mean difference between Crohn's disease patients and controls).

Figure S9. Funnel plot assessing risk of publication bias. Each point represents a separate study. Funnel plot of standard error by difference in means (weighted mean difference between ulcerative colitis and Crohn's disease patients).

Figure S10. Funnel plot assessing risk of publication bias. Each point represents a separate study. Funnel plot of standard error by log odds ratio (odds ratio for hyperhomocysteinaemia between IBD patients and controls).

Figure S11. Funnel plot assessing risk of publication bias. Each point represents a separate study. Funnel plot of standard error by log odds ratio (odds ratio for hyperhomocysteinaemia between IBD patients with and without thromboembolic complication).

Table S1. Studies excluded from the meta-analysis.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

UNCORRECTED PROOF

© 2011 Blackwell Publishing Ltd

REFERENCES

1. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 1999; **19**: 217–46.
2. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998; **49**: 31–62.
3. Van den Veyver IB. Genetic effects of methylation diets. *Annu Rev Nutr* 2002; **22**: 255–82.
4. Ray JG. Meta-analysis of hyperhomocysteinemia as a risk factor for venous thromboembolic disease. *Arch Intern Med* 1998; **158**: 2101–6.
5. Peyrin-Biroulet L, Rodriguez-Gueant RM, Chamaillard M, *et al.* Vascular and cellular stress in inflammatory bowel disease: revisiting the role of homocysteine. *Am J Gastroenterol* 2007; **102**: 1108–15.
6. Lambert D, Benhayoun S, Adjalla C, *et al.* Crohn's disease and vitamin B12 metabolism. *Dig Dis Sci* 1996; **41**: 1417–22.
7. Gueant JL, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, *et al.* Genetic determinants of folate and vitamin B12 metabolism: a common pathway in neural tube defect and Down syndrome? *Clin Chem Lab Med* 2003; **41**: 1473–7.
8. Frosst P, Blom HJ, Milos R, *et al.* A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; **10**: 111–3.
9. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, *et al.* Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996; **93**: 7–9.
10. Zintzaras E. Genetic variants of homocysteine/folate metabolism pathway and risk of inflammatory bowel disease: a synopsis and meta-analysis of genetic association studies. *Biomarkers* 2010; **15**: 69–79.
11. Stroup DF, Berlin JA, Morton SC, *et al.* Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) group. *JAMA* 2000; **283**: 2008–12.
12. Mantel N, Haenszel W. Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *J Natl Cancer Inst* 1959; **22**: 719–48.
13. DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials* 1986; **7**: 177–88.
14. Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ* 2003; **327**: 557–60.
15. Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ* 1997; **315**: 629–34.
16. Rosenthal R. *Meta-Analytic Procedures for Social Research*. Beverly Hills: Sage Publications, 1984.
17. Cattaneo M, Vecchi M, Zighetti ML, *et al.* High prevalence of hyperchomocysteinemia in patients with inflammatory bowel disease: a pathogenic link with thromboembolic complications? *Thromb Haemost* 1998; **80**: 542–5.
18. Mahmud N, Molloy A, McPartlin J, *et al.* Increased prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase C677T variant in patients with inflammatory bowel disease, and its clinical implications. *Gut* 1999; **45**: 389–94.
19. Chowers Y, Sela BA, Holland R, Fidder H, Simoni FB, Bar-Meir S. Increased levels of homocysteine in patients with Crohn's disease are related to folate levels. *Am J Gastroenterol* 2000; **95**: 3498–502.
20. Koutroubakis IE, Dilaveraki E, Vlachonikolis IG, *et al.* Hyperhomocysteinemia in Greek patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2000; **45**: 2347–51.
21. Oldenburg B, Fijnheer R, van der Griend R, vanBerge-Henegouwen GP, Koningsberger JC. Homocysteine in inflammatory bowel disease: a risk factor for thromboembolic complications? *Am J Gastroenterol* 2000; **95**: 2825–30.
22. Maire F, Beaugerie L, Cohen M, *et al.* [Factors associated with hyperhomocysteinemia in Crohn's disease]. *Gastroenterol Clin Biol* 2001; **25**: 745–8.
23. Papa A, De Stefano V, Danese S, *et al.* Hyperhomocysteinemia and prevalence of polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001; **96**: 2677–82.
24. Romagnuolo J, Fedorak RN, Dias VC, Bamforth F, Teltscher M. Hyperhomocysteinemia and inflammatory bowel disease: prevalence and predictors in a cross-sectional study. *Am J Gastroenterol* 2001; **96**: 2143–9.
25. Vasilopoulos S, Saiean K, Emmons J, *et al.* Terminal ileum resection is associated with higher plasma homocysteine levels in Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol* 2001; **33**: 132–6.
26. Bjerregaard LT, Nederby NJ, Fredholm L, Brandslund I, Munkholm P, Hey H. Hyperhomocysteinaemia, coagulation pathway activation and thrombophilia in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2002; **37**: 62–7.
27. Nakano E, Taylor CJ, Chada L, McGaw J, Powers HJ. Hyperhomocystinemia in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; **37**: 586–90.
28. Danese S, Sgambato A, Papa A, *et al.* Homocysteine triggers mucosal microvascular activation in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2005; **100**: 886–95.
29. Fernandez-Miranda C, Martinez Prieto M, Casis Herce B, *et al.* Hyperhomocysteinemia and methylenetetrahydrofolate reductase 677C–>T and 1298A–>C mutations in patients with inflammatory bowel disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; **97**: 497–504.
30. Mahmood A, Needham J, Prosser J, *et al.* Prevalence of hyperhomocysteinaemia, activated protein C resistance and prothrombin gene mutation in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; **17**: 739–44.
31. Zezos P, Papaioannou G, Nikolaidis N, Vasiliadis T, Giouleme O, Evgenidis N. Hyperhomocysteinemia in ulcerative colitis is related to folate levels. *World J Gastroenterol* 2005; **11**: 6038–42.
32. Drzewoski J, Gasiorowska A, Malecka-Panas E, Bald E, Czupryniak L. Plasma total homocysteine in the active stage of ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; **21**: 739–43.
33. Roblin X, Germain E, Phelip JM, *et al.* [Factors associated with hyperhomocysteinemia in inflammatory bowel disease: prospective study in 81 patients]. *Rev Med Interne* 2006; **27**: 106–10.
34. Yilmaz S, Bayan K, Tuzun Y, Batun S, Altintas A. A comprehensive analysis of 12 thrombophilic mutations and related parameters in patients with inflammatory bowel disease: data from Turkey. *J Thromb Thrombolysis* 2006; **22**: 205–12.
35. Banait VS, Sandeep MS, Shetty S, *et al.* Hypercoagulable state in idiopathic ulcerative colitis: role of hyperhomocysteinemia and hyperfibrinogenemia. *Indian J Gastroenterol* 2008; **27**: 94–8.
36. Erzin Y, Uzun H, Celik AF, Aydin S, Dirican A, Uzunismail H. Hyperhomocysteinemia in inflammatory bowel disease patients without past intestinal resections: correlations with cobalamin, pyridoxine, folate concentrations, acute phase reactants, disease activity, and prior thromboembolic complications. *J Clin Gastroenterol* 2008; **42**: 481–6.
37. Peyrin-Biroulet L, Gueant-Rodriguez RM, Chen M, Bronowicki JP, Bigard MA, Gueant JL. Association of MTRR 66A>G polymorphism with superoxide dismutase and disease activity in patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2008; **103**: 399–406.

UNCORRECTED PROOF

© 2011 Blackwell Publishing Ltd

38. Wiese D, Lashner B, Seidner D. Measurement of nutrition status in Crohn's disease patients receiving infliximab therapy. *Nutr Clin Pract* 2008; **23**: 551–6.
39. Zepeda-Gomez S, Montano-Loza A, Zapata-Colindres JC, Vargas-Vorackova F, Majluf-Cruz A, Uscanga L. Oral challenge with a methionine load in patients with inflammatory bowel disease: a better test to identify hyperhomocysteinemia. *Inflamm Bowel Dis* 2008; **14**: 383–8.
40. Akbulut S, Altiparmak E, Topal F, Ozaslan E, Kucukazman M, Yonem O. Increased levels of homocysteine in patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2010; **16**: 2411–6.
41. Dagli N, Poyrazoglu OK, Dagli AF, *et al.* Is inflammatory bowel disease a risk factor for early atherosclerosis? *Angiology* 2010; **61**: 198–204.
42. Jiang Y, Zhao J, Jiang T, *et al.* Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase G1793A, hyperhomocysteinemia, and folate deficiency correlate with ulcerative colitis in central China. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; **25**: 1157–61.
43. Kallel L, Feki M, Sekri W, *et al.* Prevalence and risk factors of hyperhomocysteinemia in Tunisian patients with Crohn's disease. *J Crohn's Colitis* 2011; **5**: 110–4.
44. Oldenburg B, Van Tuyl BA, van der Griend R, Fijnheer R, van Berge Henegouwen GP. Risk factors for thromboembolic complications in inflammatory bowel disease: the role of hyperhomocysteinaemia. *Dig Dis Sci* 2005; **50**: 235–40.
45. Mansoor MA, Bergmark C, Svardal AM, Lonning PE, Ueland PM. Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with early-onset peripheral vascular disease. Homocysteine and peripheral vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; **15**: 232–40.
46. Koutroubakis IE, Malliaraki N, Dimoulios PD, Karmiris K, Castanas E, Kouroumalis EA. Decreased total and corrected antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2004; **49**: 1433–7.
47. Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello PM, Robinson K, Jacobsen DW. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation* 2001; **103**: 2717–23.
48. Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 2005; **74**: 739–89.
49. Kim YI. Nutritional epigenetics: impact of folate deficiency on DNA methylation and colon cancer susceptibility. *J Nutr* 2005; **135**: 2703–9.
50. Saibeni S, Cattaneo M, Vecchi M, *et al.* Low vitamin B(6) plasma levels, a risk factor for thrombosis, in inflammatory bowel disease: role of inflammation and correlation with acute phase reactants. *Am J Gastroenterol* 2003; **98**: 112–7.
51. Fernandez-Banares F, Abad-Lacruz A, Xiol X, *et al.* Vitamin status in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1989; **84**: 744–8.
52. Rocha R, Santana GO, Almeida N, Lyra AC. Analysis of fat and muscle mass in patients with inflammatory bowel disease during remission and active phase. *Br J Nutr* 2009; **101**: 676–9.
53. Hartman C, Eliakim R, Shamir R. Nutritional status and nutritional therapy in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2009; **15**: 2570–8.
54. Vagianos K, Bector S, McConnell J, Bernstein CN. Nutrition assessment of patients with inflammatory bowel disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2007; **31**: 311–9.
55. Chen M, Peyrin-Biroulet L, George A, *et al.* Methyl deficient diet aggravates experimental colitis in rats. *J Cell Mol Med* 2010. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01252.x.
56. Morgenstern I, Raijmakers MT, Peters WH, Hoensch H, Kirch W. Homocysteine, cysteine, and glutathione in human colonic mucosa: elevated levels of homocysteine in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2003; **48**: 2083–90.
57. Chiarello PG, Penaforte FR, Japur CC, Souza CD, Vannucchi H, Troncon LE. Increased folate intake with no changes in serum homocysteine and decreased levels of C-reactive protein in patients with inflammatory bowel diseases. *Dig Dis Sci* 2009; **54**: 627–33.
58. Zeisel SH, da Costa KA. Choline: an essential nutrient for public health. *Nutr Rev* 2009; **67**: 615–23.
59. den Heijer M, Rosendaal FR, Blom HJ, Gerrits WB, Bos GM. Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 1998; **80**: 874–7.
60. Eichinger S, Stumpflen A, Hirschl M, *et al.* Hyperhomocysteinemia is a risk factor of recurrent venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 1998; **80**: 566–9.
61. Grainge MJ, West J, Card TR. Venous thromboembolism during active disease and remission in inflammatory bowel disease: a cohort study. *Lancet* 2010; **375**: 657–63.
62. Kappelman MD, Horvath-Puho E, Sandler RS, *et al.* Thromboembolic risk among Danish children and adults with inflammatory bowel diseases: a population-based nationwide study. *Gut* 2011; **60**: 937–43.
63. Twig G, Zandman-Goddard G, Szyper-Kravitz M, Shoenfeld Y. Systemic thromboembolism in inflammatory bowel disease: mechanisms and clinical applications. *Ann N Y Acad Sci* 2005; **1051**: 166–73.
64. Murthy SK, Nguyen GC. Venous thromboembolism in inflammatory bowel disease: an epidemiological review. *Am J Gastroenterol* 2011; **106**: 713–8.
65. Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Debard R, *et al.* Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr* 2006; **83**: 701–7.

UNCORRECTED PROOF

© 2011 Blackwell Publishing Ltd

Section/topic	#	Checklist item	Reported on page #
TITLE			
Title	1	Identify the report as a systematic review, meta-analysis, or both.	1
ABSTRACT			
Structured summary	2	Provide a structured summary including, as applicable: background; objectives; data sources; study eligibility criteria, participants, and interventions; study appraisal and synthesis methods; results; limitations; conclusions and implications of key findings; systematic review registration number.	2
INTRODUCTION			
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of what is already known.	3-4
Objectives	4	Provide an explicit statement of questions being addressed with reference to participants, interventions, comparisons, outcomes, and study design (PICOS).	3-4
METHODS			
Protocol and registration	5	Indicate if a review protocol exists, if and where it can be accessed (e.g., Web address), and, if available, provide registration information including registration number.	N/A
Eligibility criteria	6	Specify study characteristics (e.g., PICOS, length of follow-up) and report characteristics (e.g., years considered, language, publication status) used as criteria for eligibility, giving rationale.	4-5
Information sources	7	Describe all information sources (e.g., databases with dates of coverage, contact with study authors to identify additional studies) in the search and date last searched.	4-5
Search	8	Present full electronic search strategy for at least one database, including any limits used, such that it could be repeated.	4-5
Study selection	9	State the process for selecting studies (i.e., screening, eligibility, included in systematic review, and, if applicable, included in the meta-analysis).	4-5, Suppl. Table 1, Suppl. Figure 1
Data collection process	10	Describe method of data extraction from reports (e.g., piloted forms, independently, in duplicate) and any processes for obtaining and confirming data from investigators.	5
Data items	11	List and define all variables for which data were sought (e.g., PICOS, funding sources) and any assumptions and simplifications made.	5-6
Risk of bias in individual studies	12	Describe methods used for assessing risk of bias of individual studies (including specification of whether this was done at the study or outcome level), and how this information is to be used in any data synthesis.	6

Summary measures	13	State the principal summary measures (e.g., risk ratio, difference in means).	6
Synthesis of results	14	Describe the methods of handling data and combining results of studies, if done, including measures of consistency (e.g., I^2) for each meta-analysis.	6

Section/topic	#	Checklist item	Reported on page #
Risk of bias across studies	15	Specify any assessment of risk of bias that may affect the cumulative evidence (e.g., publication bias, selective reporting within studies).	6
Additional analyses	16	Describe methods of additional analyses (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression), if done, indicating which were pre-specified.	6
RESULTS			
Study selection	17	Give numbers of studies screened, assessed for eligibility, and included in the review, with reasons for exclusions at each stage, ideally with a flow diagram.	7
Study characteristics	18	For each study, present characteristics for which data were extracted (e.g., study size, PICOS, follow-up period) and provide the citations.	7-10, 16-17
Risk of bias within studies	19	Present data on risk of bias of each study and, if available, any outcome level assessment (see item 12).	7-10
Results of individual studies	20	For all outcomes considered (benefits or harms), present, for each study: (a) simple summary data for each intervention group (b) effect estimates and confidence intervals, ideally with a forest plot.	7-10
Synthesis of results	21	Present results of each meta-analysis done, including confidence intervals and measures of consistency.	7-10
Risk of bias across studies	22	Present results of any assessment of risk of bias across studies (see Item 15).	7-10
Additional analysis	23	Give results of additional analyses, if done (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression [see Item 16]).	10
DISCUSSION			
Summary of evidence	24	Summarize the main findings including the strength of evidence for each main outcome; consider their relevance to key groups (e.g., healthcare providers, users, and policy makers).	11-13

Limitations	25	Discuss limitations at study and outcome level (e.g., risk of bias), and at review-level (e.g., incomplete retrieval of identified research, reporting bias).	13
Conclusions	26	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence, and implications for future research.	13-14
FUNDING			
Funding	27	Describe sources of funding for the systematic review and other support (e.g., supply of data); role of funders for the systematic review.	15

14.3 Manuscrit soumis (*under review*) dans : *–The American Journal of Gastroenterology"*

***ABCB1* and *CHDH* predict age-onset of Crohn's disease in a fine mapping SNP–array study of one-carbon metabolism genes**

THE AMERICAN JOURNAL OF Gastroenterology

ABCB1 and CHDH predict age-onset of Crohn's disease in a fine mapping SNP–array study of one-carbon metabolism genes

Journal:	American Journal of Gastroenterology
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Contributions
Keywords:	Crohns disease, Inflammatory bowel disease
Manuscript Section:	Inflammatory bowel disease

SCHOLARONE™ Manuscripts

For Review

ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

ABCB1 and *CHDH* predict age-onset of Crohn's disease in a fine mapping SNP–array study of one-carbon metabolism genes

Running head: ***ABCB1* and *CHDH* predict age-onset of Crohn's disease**

Laurent Peyrin-Biroulet[1,2]*, Abderrahim Oussalah[1,2]*, Laetitia Goffinet[2]*, Céline Chery[2], Philippe Gerard[2], Pierre Rouyer[2], Denise Forest-Tramoy[2], Jean-Baptiste Chevaux[1,2], Camille Zallot[2], Marc-André Bigard[1,2], and Jean-Louis Guéant[1,2]

* Equal contribution

[1]Inserm U954, Nutrition-Genetics and Exposure to Environmental Risks, Medical Faculty, Nancy University, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

[2]Inserm U954 and Department of Hepato-Gastroenterology, University Hospital of Nancy, Vandoeuvre-lès-Nancy.

Correspondence: Prof. Jean-Louis Guéant, MD, PhD, AGAF

Inserm U954, Nutrition-Genetics and Exposure to Environmental Risks,

Nancy University and University Hospital of Nancy,

Rue du Morvan, 54500, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Phone: + 33 3 83 68 32 71

Fax: + 33 3 83 68 32 79

E-mail: Jean-Louis.Gueant@medecine.uhp-nancy.fr

Word count (including references): 6665

ABSTRACT

OBJECTIVES:

Deficiency in methyl donors, folate and vitamin B12, promotes inflammation and oxidant stress of digestive mucosa and aggravates experimental colitis, in rodents. The genetic and metabolic determinants of the one-carbon metabolism (OCM) are associated with Crohn's disease (CD) risk. Therefore, we aimed to evaluate the associations of the most prominent variants of OCM-related genes with age at CD onset, including associations through their influence on nutritional and metabolic determinants of OCM and superoxide dismutase (SOD).

METHODS:

We designed a GoldenGate (Illumina) oligo pool assay of 384 SNPs corresponding to 77 OCM-related genes that was used to genotype 296 consecutive CD patients from the Nancy IBD cohort. SNPs were evaluated for their association with homocysteine, SOD and age at CD onset using additive, dominant and recessive genetic models. A subsequent multivariate analysis of OCM association with age at CD onset was performed in a model that retained the significant determinants of the univariate analyses.

RESULTS:

Two SNPs were independently associated with plasma homocysteine level, rs1801133 (*MTHFR*) and rs13043752 (*AHCY*), and five SNPs were independently associated with SOD level, rs719235 (*GGH),* rs9606756 (*TCN2*), rs41301825 (*AHCY*), rs492602 (*FUT2*), and rs11254363 (*CUBN*), in multivariate analyses. Two SNPs were independently associated with age at CD onset in multivariate analyses, rs9001 (*CHDH*, choline dehydrogenase; beta=-4.455, *P*=0.0093) and rs1045642 (*ABCB1*, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP),

member 1; beta=-2.4539, P=0.0285). The SNP–score based on alleles of these two SNPs was correlated with age at CD onset (*P*=0.0046).

CONCLUSIONS:

We reported the involvement of the *ABCB1* and *CHDH* genes in early CD onset, using for the first time a systematic assessment of OCM–related gene variants by a fine mapping SNP–array approach. This suggests a role for genetic contributors of methyl donor metabolism, in the early patho-mechanisms that lead to CD.

INTRODUCTION

Inflammatory bowel diseases (IBD), including ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), are a group of chronic diseases characterized by inflammation of the gastrointestinal tract and altered interactions between the microbiota, the intestinal epithelium and the host immune system (1, 2).

The disturbance of one-carbon metabolism (OCM) has been implicated in the pathogenesis of IBD (3-7). Homocysteine is the hallmark of vitamin B12 and/or folate deficiencies, which are also prevalent in IBD patients (4, 7). Subsequently, several studies have evaluated the potential role of homocysteine in the pathogenesis of IBD (4, 7). Homocysteine acts as a pro-oxidant (8, 9) and has been implicated in the decrease of total antioxidant capacity in patients with IBD (10). Homocysteine has also been involved in host immune response by inducing the production of several inflammatory cytokines and chemokines (11, 12), endoplasmic reticulum stress (13), and by regulating gene expression by the methylation of promoter regions in the genome (14). Some studies evaluated several genetic variants of OCM (*MTHFR C6TTT*, *MTHFR A1298C*, *MTR A2756G* and *MTRR A66G*) in IBD and highlighted the influence of *MTHFR* and *MTRR* (3, 6, 7, 15-17) on IBD risk.

It has been suggested that mucosal tissue damage in IBD is partly caused by an enduring exposure to excessive amounts of reactive oxygen species (18, 19). Consistently, in patients with IBD, Kruidenier *et al*. have shown an altered expression profile of superoxide dismutase (SOD) isoforms particularly in the epithelium (19). We previously demonstrated that SOD, a biomarker of oxidative stress, was correlated with disease activity in CD patients carrying *MTRR 66, A/A* genotype (3).

Phenotypic heterogeneity between adult and pediatric onset CD is well documented but the causal mechanisms underlying these differences are unclear (20). There is some

evidence that in IBD patients a disease course that starts earlier in life may have a stronger genetic influence (21). Two genome-wide association studies have reported strong genetic similarities to adult disease (22, 23). Consistently, Essers *et al*. found that genetic effect of established CD risk variants was similar in early and later onset CD (20). Recently, Glas *et al*. demonstrated that the STAT4 single nucleotide polymorphism (SNP) rs7574865 was significantly associated with early CD onset (P=0.021) (24).

Interestingly, several studies have demonstrated the involvement of OCM–related genes in the early onset of various diseases including, coronary artery disease, thrombosis, ischemic stroke, Huntington's disease, acute lymphoblastic leukemia, and autism (25-35). To date, no study has been performed using a comprehensive assessment of OCM–related gene polymorphisms in patients with CD and using a SNP–array approach. Notably, the potential contribution of OCM–related genes to the determinism of early-onset CD was unknown.

The primary aim of the study was therefore to investigate the association of genetic determinants of OCM (using a SNP–array designed by a systematic *in silico* study) with age at disease onset in a cohort of CD patients from the Nancy IBD cohort (36). We also investigated the associations of nutritional, metabolic, and genetic determinants of OCM and of SOD activity with age at CD onset.

METHODS

Studied population

The study included patients with CD diagnosed on the basis of internationally admitted criteria (37). Patients were included during consultation or hospitalization at the University Hospital of Nancy and were part of the Nancy IBD cohort as reported previously (36). Informed consents were obtained from all patients. Information about the Nancy IBD cohort is reported to the *Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés* (no.

1404720), which supervises the implementation of the act regarding data processing, data files, and individual liberties that went effect on January 6, 1978, and amended on August 6, 2004, to protect the personal data of individuals.

Blood Sampling

Phlebotomy was performed and fasting venous blood was collected in EDTA-containing tubes. Samples were centrifuged immediately at 2500g for 15 minutes at room temperature. Aliquots were stored at -70 °C until analysis.

Vitamin B12, folate, homocysteine, and superoxyde dismutase assays

All specimens were tested in a single laboratory at the University Hospital of Nancy. Plasma homocysteine level was determined by UPLC-tandem mass spectrometry procedure as previously published (38), with an Acquity UPLC BEH C18 column (1.7 μm, 2.1 × 50 mm) (Waters Corporation, Versailles, France). Plasma vitamin B12 and folate concentrations were assayed by using a vitamin B12 and folate immunoassay kit by means of automated chemiluminescence (Chiron Diagnostics ASC:180® Automated Chemiluminescence Systems; East Walpole, MA, USA). The SOD activity assay was quantified by using the Ransod kit (Randox, Crumlin, UK) according to the manufacturer's instructions.

Analysis of genomic DNA

Genomic DNA was isolated from peripheral leukocytes using Qiagen kit (Qiagen-France, Courtaboeuf cedex France). Genotyping of polymorphisms involved in OCM was carried out on Illumina VeraCode BeadXpress platform (Illumina, San Diego, California) using a 384–SNP plex, 'Methylation plex', which was designed in the laboratory Inserm

(*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* for 'National Institute of Health and Medical Research') unit U954 by two investigators (LG and JLG), in a two-steps fashion.

In a first step, all SNPs included in the 'Methylation plex' were selected according to a comprehensive literature review according to previously defined search strategy by using NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide), HapMap (http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov), and Ensemble (http://www.ensembl.org/index.html) databases. SNPs were also selected if they were associated with a change in the function, the regulation, the splicing site or the turn-over of the transcript or if they were associated with a modification of the phenotype of OCM enzymes (**Supplemental Table 1 online**).

In a second step, using the Illumina Assay Design Tool (http://www.Illumina.com) we performed an *in silico* validation of all identified SNPs in order to determine their suitability for genotyping with the GoldenGate™ assay. The assessment was conducted based on the following criteria: 1) Illumina's in–house criteria where SNPs were assigned a designability score of 1 (highly designable), 0.5 (moderately designable) or zero (low designability) and 2) the 60-bp limitation because a given SNP cannot be closer than 60-bp to another SNP on the oligonucleotide pool assay). SNPs with zero designability scores were discarded and the final selection of the 384 SNPs was sent to Illumina for the synthesis of the GoldenGate™ genotyping assay. **Supplemental Table 2 online** reports the 384 SNPs corresponding to 77 genes retained in the 'Methylation plex' according to the above–mentioned strategy.

Statistical analysis

All quantitative variables are described as medians and percentiles [Interquartile range (IQR), 25–75th percentile]. All proportions and genotype frequencies are expressed as percentages with 95% confidence intervals (95% CI). All correlations were studied using the Spearman's rank-order correlation coefficient. SNPs quality controls were performed before

statistical analysis. All SNPs with a call-rate < 0.94 and those with a deviation from Hardy-Weinberg equilibrium were removed from the analysis. All analyses were performed according to additive, dominant, and recessive genetic models. We calculated pair-wise linkage disequilibrium (LD) for all SNPs and used the widely accepted measures r (39) and D' (40) to quantify LD. SNPs were considered to be in LD if D′ was greater than 0.75. In univariate analysis, the comparison of homocysteine, SOD, and age of CD onset between genotype subgroups was performed with the Kruskal-Wallis test. All significant SNPs retained in univariate analyses were integrated into a multiple regression model for multivariate analysis using a stepwise method. All variables with *P*-value < 0.1 were included in the model, and the variables with *P*-value < 0.05 were retained in the model. Multiple regression models for homocysteine and SOD were adjusted for age and sex. All SNPs in LD were not simultaneously integrated in the same multiple regression model. All SNPs independently associated with homocysteine, SOD, and age at CD onset, were tested for SNP-SNP interaction according to additive, dominant, and recessive genetic models. All the reported *P*-values were two-sided, and *P*-values < 0.05 were considered statistically significant. Statistical analyses were performed using Golden Helix' SNP & Variation Suite v7.5.2 (Bozeman, MT, USA) and MedCalc software, version 11.4.4 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

RESULTS

Baseline characteristics of patients

Between June 1st, 2005 and April 1st, 2011, 296 patients with CD were included in the study. Baseline characteristics of the 296 CD patients are reported in **Table 1**. The median age at inclusion was 31 years and men represented 38% of patients. It is noteworthy that median values of vitamin B12 (207 pmol/L) and folates (7.8 nmol/L) were in the normal range. The

majority of patients were in remission with a median Crohn's disease activity index (CDAI) of 122. As expected, plasma homocysteine level was negatively correlated with vitamin B12 (rho=-0.282, *P*<0.0001) and folates (rho=-0.379, *P*<0.0001).

According to recently published criteria (41, 42), subclinical cobalamin deficiency (vitamin B12 < 148 pmol/L, homocysteine > 15 µmol/L, and folate ≥ 7 nmol/L) was noted in 4.3% (95% CI, 1.8 to 6.8) of patients. The same figure for folate deficiency (folate < 7 nmol/L, homocysteine > 15 µmol/L, and vitamin B12 ≥ 148 pmol/L) was 12.4% (95% CI, 8.4 to 16.5).

Association of plasma homocysteine level with age onset and OCM-genetic polymorphisms

Plasma homocysteine level was not correlated with age at CD onset (rho=0.085, *P*=0.1659). In univariate analysis, nine SNPs belonging to 4 genes (*MTHFR*: *methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H)*; *LRP2*: *low density lipoprotein receptor-related protein 2*; *FOLH1*: *folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1*; *AHCY*: *adenosylhomocysteinase*) were significantly associated with plasma homocysteine level (**Supplemental Table 3 and 4 online**). The four SNPs on *LRP2* gene and the two SNPs on *FOLH1* gene were in LD (**Supplemental Figures 1 and 2 online, respectively**). In multivariate multiple regression analysis, two SNPs were independently associated with plasma homocysteine level in the additive genetic model: 1) rs1801133 (*MTHFR*; coefficient (β)=1.3769; *P*=0.0301 ; and 2) rs13043752 (*AHCY*; β=5.6163; *P*=0.014 (**Table 2)**. No epistatic interaction was found between these two SNPs. In the dominant genetic model only one SNP independently influenced plasma homocysteine level: rs13043752 (*AHCY*); β=5.9397; *P*=0.0098 (**Table 2**). In the recessive genetic model only one SNP was independently associated with plasma homocysteine level: rs1801133 (*MTHFR*; β=4.5055;

P=0.0009) (**Table 2**). Patients' age at inclusion was independently and positively associated with plasma homocysteine level and conversely, vitamin B12 and folate were independently and negatively associated with plasma homocysteine level (**Table 2**). None of the SNPs independently associated with the plasma homocysteine level was associated with age of CD onset in univariate analysis (data not shown).

Association of plasma superoxide dismutase activity with age onset and OCM-genetic polymorphisms

Plasma SOD activity was significantly correlated with age at CD onset (rho=-0.157, *P*=0.0214). In univariate analysis, eight SNPs belonging to seven genes (*CBS*, *cystathionine-beta-synthase*; *GGH*, *gamma-glutamyl hydrolase, conjugase, folylpolygammaglutamyl hydrolase*; *CUBN*, *cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)*; *TCN2*, *transcobalamin II*; *AHCY*, *adenosylhomocysteinase*; *FUT2*, *fucosyltransferase 2 (secretor status included)*; *NOS3*, *nitric oxide synthase 3*) were significantly associated with plasma SOD activity (**Supplemental Tables 5 and 6 online**). The two SNPs on *CBS* gene were in LD (**Supplemental Figure 3 online**). In multivariate multiple regression analysis, four SNPs were independently associated with plasma SOD level in the additive genetic model: 1) rs719235 (*GGH, gamma-glutamyl hydrolase, conjugase, folylpolygammaglutamyl hydrolase*); β=-61.6358; *P*=0.0197; 2) rs9606756 (*TCN2, transcobalamin II*); β=108.0493; *P*=0.001; 3) rs41301825 (*AHCY*, *adenosylhomocysteinase*); β=-210.7092; *P*=0.0424; and 4) rs492602 (*FUT2, fucosyltransferase 2*); β= 52.5656; *P*=0.0218 (**Table 3**). In the dominant genetic model, three SNPs were associated with plasma SOD level: 1) rs11254363 (*CUBN, cubilin, intrinsic factor-cobalamin receptor*); β=-81.4492; *P*=0.0143); 2) rs9606756 (*TCN2*); β=101.5839; *P*=0.0078; and 3) rs492602 (*FUT2, fucosyltransferase 2*); β=78.7124; *P*=0.0303 (**Table 3**). No epistatic interaction was found between SNPs in both additive and dominant

genetic models. In the recessive genetic model, only one SNP independently influenced plasma SOD activity: rs9606756 (*TCN2*); β=289.0633; *P*=0.007 (**Table 3**). Finally, none of the SNPs independently associated with the plasma SOD activity was associated with age at CD onset in univariate analysis (data not shown).

Genetic predictors of age at Crohn's disease onset

In univariate analysis, eight SNPs of seven genes were associated with age at CD onset. Among these genes, three were related to vitamin B12 metabolism, *FUT2*, *TCN2* and *MTRR*, one with folate, *FOLH1*, one with choline, *CHDH*, and two with a more marginal role in the OCM, *ABCB1* and *NAT2* (**Table 4 and Supplemental Table 7 online**). The two SNPs on *FOLH1*gene were in LD (**Supplemental Figure 4 online**).

Homocysteine, folate, and vitamin B12 were not included in the multivariate model as they were not associated with age of CD onset in univariate analysis. Neither SOD activity or their respective determinants were retained in the multivariate model of the prediction of age onset. Only genetic predictors of age at CD onset in univariate analysis were taken into account in the multivariate model. In multivariate multiple regression analysis, two SNPs were independently associated with an early CD onset in the additive genetic model: rs9001 (*CHDH, choline dehydrogenase*); β=-4.455; *P*=0.0093; and 2) rs1045642 (*ABCB1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1*); β=-2.4539; *P*=0.0285 (**Table 5**). In the dominant genetic model, the same SNPs were also associated with an early CD onset: rs9001 (*CHDH*); β=**-4.8214**; *P*=**0.0097**; and 2) rs1045642 (*ABCB1*); β=-3.6148; *P*=0.0405 (**Table 5**). No SNP was retained in the recessive genetic model. No epistatic interaction was found between the two SNPs.

A genetic risk score (SNP–score) was calculated from the total number of risk alleles (0, 1, or 2) across the two risk SNPs (rs9001,*CHDH* and rs1045642, *ABCB1*) with a

theoretical range from 0 to 4. Age at CD diagnosis was significantly and negatively correlated with the SNP–score (rho = -22.6; *P* = 0.0002; 95%CI: -0.336 to -0.110). Consistently, the distribution of age at CD onset was significantly influenced by the SNP–score (*P*=0.0046, Kruskal-Wallis test) (**Figure 1**).

DISCUSSION

This is the first study that reported a systematic assessment of OCM–related gene polymorphisms in patients with CD. Early onset disease is frequently examined in genetic studies because it is presumed to contain a more severe subset of patients under a higher influence of genetic effects (20).

In our study *ABCB1* and *CHDH* gene polymorphisms and a genetic risk score (SNP–score) calculated from the total number of risk alleles across the risk SNPs were significant predictors of early CD onset. The murine multiple drug resistance (mdr) *ABCB1* gene, also named *mdr1a*, encodes a 170-kDa transmembrane ATP-binding cassette protein (P-glycoprotein) that is expressed in many cells and tissues, including epithelial cells (43, 44). Alterations of DNA methylation of the mdr-1 gene promoter are known to be linked to mdr-1 gene expression and intracellular S-adenosyl-methionine (43, 44). In addition, we recently found that vitamin B12 influence its expression (43). Consistently with our results in CD patients, *ABCB1* polymorphisms *C1236T* and *G2677T/A* were associated with earlier age of onset (<29 years) in a case-control study that included 270 UC patients and 274 controls (45). The role of the *ABCB1* gene has been studied in IBD (45-58). Pinwala *et al.* reported the first description of spontaneous colitis in a gene *mdr1a* knockout (mdr1a-/-) mouse with an apparently intact immune system (46). Treating *mdr1a-/-* mice with oral antibiotics can both prevent the development of disease and resolve active inflammation (46). In a study of colonic biopsies of patients with UC, the mRNA expression and *ABCB1* gene proteins were

significantly and inversely correlated with UC activity and significantly reduced in patients with moderate to severe UC in comparison with patients in remission (54). Wilk *et al.* reported a model of *mdr1a(-/-)* knockout mice that developed spontaneous colitis at week 12 (59). Nones, *et al.* assessed at evaluated at 12 and 25 weeks of age cecal bacterial flora in a knockout *mdr1a(-/-)* mice model and wild type FVB mice to identify differences in the bacterial community that could influence intestinal inflammation (53). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) fingerprints of FVB and *mdr1a(-/-)* mice (with no apparent intestinal inflammation) at 12 weeks revealed differences in the presence of DNA fragments identified as *Bacteroides fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus* and an uncultured *alphaproteobacterium* (53). At week 25, *Escherichia coli* and *Acinetobacter sp.* were only identified in DGGE profiles of *mdr1a(-/-)* mice with severe intestinal inflammation (53). Furthermore, *mdr1a(-/-)* mice had a lower number of total bacteria in the cecum compared with FVB mice at week 25 (53). It is interesting to note that in the study by Nones, *et al.*, the alteration of the cecal flora preceded the onset of intestinal inflammation in *mdr1a(-/-)* mice (53). It has been demonstrated that *mdr1a(-/-)* mice had both increased intestinal permeability and bacterial translocation in comparison with wild type FVB mice (48) and they displayed a distinctive pattern of gene expression involving significant changes in a small number of genes (51). The majority of these upregulated genes was associated with bacterial recognition and the ubiquitin-proteasome system and were gamma-interferon responsive (51). Early epithelial changes associated with altered responsiveness to bacteria precede increased permeability and mucosal inflammation in *mdr1a(-/-)* colitis model (51). Taken together, these studies suggest that the lack of Abcb1 transporters in intestinal cells due to the disruption of the *mdr1a* gene might lead to changes in the intestinal microbiota, highlighting the importance of P-glycoprotein in regulating interactions with the commensal microflora. Interestingly, by using DGGE on families with at least three members affected with CD,

Joossens *et al.* demonstrated the presence of dysbiosis in unaffected relatives of patients with CD (60). This dysbiosis was not characterized by lack of butyrate producing-bacteria as classically observed in CD but suggested a role for microorganisms with mucin degradation capacity (60).

The second SNP involved in early CD onset in our study is the rs9001 of the *CDHD* gene. The protein encoded by this gene is a choline dehydrogenase that localizes to the mitochondrion (61). Variations in this gene can affect susceptibility to choline deficiency (61). It has been demonstrated that choline and betaine rich diets are associated with lower levels of several inflammatory markers including C-reactive protein and tumor necrosis factor (62). These data deserve to be confirmed in patients with IBD, however, we found that methyl donor deficiency —including choline deficiency— aggravates experimental colitis in rats (5). To date no study has reported this polymorphism in IBD or other inflammatory disorders.

In our study, two SNPs were independently associated with plasma homocysteine level, namely, rs1801133 corresponding to the *MTHFR* gene and rs13043752 corresponding to the *AHCY* gene. In a case-control study, *MTHFR 677, T/T* genotype was associated with a higher plasma homocysteine level among IBD patients (15). Consistently, in a prospective study on 96 patients with rheumatoid arthritis, plasma homocysteine was significantly higher in patients with *MTHFR 677, T/T* genotype (63).

The AHCY enzyme, also known as S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH), converts homocysteine to S-adenosylhomocysteine allowing the recycling of homocysteine into methionine in the homocysteine remethylation pathway (64). Transmethylation affects several cellular events, including T cell activation, and blockade of this pathway may curtail inflammatory responses (65). The role of SAHH during inflammatory disorders has been reported in several studies (65-70) and SAHH inhibition may represent a potential therapeutic target because its blockade can alter the methylation process of phospholipids, proteins, small

molecules, DNA and RNA (70). It has been demonstrated that SAHH inhibition could have immunosuppressive properties (69). In a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis —which serves as a Th1 cell-mediated inflammatory demyelinating autoimmune disease model of human multiple sclerosis— the administration of a SAHH inhibitor (DZ2002) resulted in the suppression of T cell activation with the down-regulation of cyclin-dependent kinase (68). Using *in vitro* and *in vivo* murine colitis models, Kominsky *et al.* evaluated the metabolic consequences of inflammation in the intestinal mucosa (66). They demonstrated an increased expression of SAHH in response to inflammation and showed a significant inhibition of NF-kappaB activity following treatment with DZ2002 (66). In the present study, we also demonstrated an independent association between *SAHH (AHCH)* polymorphism and plasma SOD activity. Taken together, these data underline the crucial role of *SAHH (AHCH)* in maintaining intestinal homeostasis through methylation status.

Our data showed the association of several OCM–related genes with SOD activity. It has been demonstrated that high plasma homocysteine levels was associated with an increased SOD activity, which is a reliable marker of oxidative stress (71, 72). IBD patients have higher plasma SOD levels in comparison with controls (73). In our study, among the five genes associated with SOD three are related to vitamin B12 (*FUT2*, *CUBN*, and *TCN2*), one with folate (*GGH*), and the last one to intracellular synthesis of homocysteine (*AHCY/SAHH*). This suggests that OCM may be associated with the CD severity through SOD.

In this study, *FUT2* gene polymorphism was independently associated with plasma SOD activity. The family of α-1,2-fucosyltransferases (also known as the Se enzyme) catalyzes the addition of fucose in α-1,2-linkage to the galactose of type 1 and 2 disaccharide to form H type 1 and H type 2 antigens, respectively (74). The *FUT2* variant is a physiological trait that regulates the expression and secretion of ABH antigens in epithelial

cells of glands (75). Approximately 20% of Caucasians are non-secretors who do not express ABO antigens in saliva as they are homozygous for *FUT2 461* null allele (*A/A*) (75). Mice transgenic for human alpha1,2-fucosyltransferase (hFUT1) have widespread disturbances in cell surface glycosylation and spontaneously develop colitis (76). A meta-analysis of six GWA studies that included 6,333 CD patients and 15,056 controls demonstrated a significant association between *FUT2* and CD (77). Recently, Suhre *et al*. reported a comprehensive analysis of genotype-dependent metabolic phenotypes using a GWA study on more than 37,000 non-targeted metabolomics and confirmed the involvement of the *FUT2* polymorphism both in the determination of plasma levels of vitamin B12 and the primary risk of CD (78). Morover, colonic mucosa-associated microbiota was influenced by an interaction of CD and *FUT2* (Secretor) genotype in a community profiling of the intestinal microbiota performed in healthy subjects and CD patients (79). Pathogens use surface molecules of host cells, including-oligosaccharides synthesized by fucosyltransferases, for cell invasion (80). *Lactobacilli*, a known commensal bacteria, bind to the precursor glycolipid FGA1, implying a role of the gastrointerstinal mucosal glycolipid profile in the adherence of commensal and 'beneficial' bacteria (80, 81). Commensal bacteria may exert their protective effects through preventing adherence or even displacing pathogenic bacteria, thus highlighting the potential role of *FUT2* and non-secretor status on gastrointestinal bacterial profile (80, 82). FUT2 non-secretor individuals may therefore have an interruption in the homeostasis of the intestinal immune system, making them susceptible to development of chronic mucosal inflammation. The alteration of the intestinal flora (dysbiosis) has been well described in patients with IBD (83) and represents a key pathogenic mechanism in IBD (1, 2). Taken together, our data highlight the potential pathogenic role of *FUT2* in IBD pathogenesis and provide additional arguments on the interaction between OCM and CD.

We report for the first time the prevalence of folate deficiency and vitamin B12 in IBD patients according to recently published criteria (41, 42) with respective frequencies of 4.3% and 12.4%. Malnutrition is common in patients with IBD, especially in active disease states (84, 85). In a prospective study on 126 consecutive adults IBD patients, the prevalence of subnormal serum levels for vitamin B12 was 18.4% (86). However, in this study the criteria of a subnormal vitamin B12 did not include the concomitant assessment of plasma homocysteine level, as currently recommended (42).

Aberrant epigenetic patterns have been linked to inflammatory bowel disease (87-90). Epigenetic modifications of DNA in cancer and precancerous lesions offer hope and the promise of novel biomarkers for early cancer detection, prediction, prognosis, and response to treatment. Furthermore, reversal of epigenetic changes represents a potential target of novel therapeutic strategies and medication design (91). We have previously showed that maternal vitamin B12 and/or folate deficiency aggravates experimental colitis in an experimental rat model and leads to pathological consequences related with fetal programming through epigenetic and epigenomic mechanisms (5, 92, 93). Whether these mechanisms influence also the onset of CD should deserve further interest, according to our results.

In conclusion, we demonstrated the role of several OCM-related genes in determining plasma homocysteine level and SOD activity in CD. We also reported for the first time an association of two OCM-related genes, *ABCB1* and *CHDH,* with age at CD onset, using a fine mapping SNP–array approach.

Table 1. Baseline characteristics of the 296 Crohn's disease patients included in the study

	Median	**IQR, 25th – 75th**
Age at inclusion (years)	**31**	24 – 42
Homocysteine (µmol/L)	**12.5**	9.7 – 16.7
Vitamin B12 (pmol/L)	**207**	160 – 279
Folate (nmol/l)	**7.8**	5.2 – 13.3
Albumin (g/L)	**39.2**	35.6 – 43.3
Superoxyde dismutase UI/g Hb	**1132**	1013 – 1286
Crohn's disease activity index	**122**	55 – 202
	%	**95% CI, %**
Male gender	38.2	32.6 – 43.7
Folate < 7 nmol/L	**42.2**	36.4 – 48.1
Folate < 7 nmol/L and homocysteine > 15 µmol/L and vitamin B12 ≥ 148 pmol/L	**12.4**	8.4 – 16.5
Vitamin B12 < 148 pmol/L	**18.1**	13.5 – 22.6
Vitamin B12 < 148 pmol/L and homocysteine > 15 µmol/L and folate ≥ 7 nmol/L	**4.3**	1.8 – 6.8

NOTE. IQR: interquartile range.

Table 2. Independent predictors of homocysteine plasma level in the 296 Crohn's disease patients

SNP	Chr.	Position	Gene Name	Additive genetic model[c]			Dominant genetic model[d]			Recessive genetic model[e]		
				P-value[a]	Coefficient (β)	Standard error	*P*-value[a]	Coefficient (β)	Standard error	*P*-value[a]	Coefficient (β)	Standard error
rs1801133	**1**	**11778964**	***MTHFR***	**0.0301**	**1.3769**	**0.631**	**Not retained[b]**	**—**	**—**	**0.0009**	**4.5055**	**1.3379**
rs41268685	2	169704315	*LRP2*	Not retained[b]	—	—	Not retained[b]	—	—	Not retained[b]	—	—
rs202700	11	49173274	*FOLH1*	Not retained[b]	—	—	Not retained[b]	—	—	Not retained[b]	—	—
rs17848169	2	169768848	*LRP2*	Not retained[b]	—	—	Not retained[b]	—	—	Not retained[b]	—	—
rs1999594	1	11881802	—	Not retained[b]	—	—	Not retained[b]	—	—	Not retained[b]	—	—
rs13043752	**20**	**32346968**	***AHCY***	**0.014**	**5.6163**	**2.2687**	**0.0098**	**5.9397**	**2.2818**	**Not retained[b]**	**—**	**—**
Age at inclusion (years)	**—**	**—**	**—**	**<0.0001**	**0.1231**	**0.02904**	**<0.0001**	**0.127**	**0.02922**	**0.0001**	**0.1136**	**0.02899**
Vitamin B12 (pmol/L)	**—**	**—**	**—**	**0.0093**	**-0.00791**	**0.003015**	**0.0033**	**-0.008915**	**0.003003**	**0.005**	**-0.008402**	**0.002965**
Folate (nmol/L)	**—**	**—**	**—**	**0.001**	**-0.1531**	**0.04588**	**0.0003**	**-0.1669**	**0.04581**	**0.0015**	**-0.1462**	**0.04539**
Male gender	—	—	—	Not retained[b]	—	—	Not retained[b]	—	—	Not retained[b]	—	—

NOTE. SNP: single nucleotide polymorphism; Chr.: chromosome; ***MTHFR****: methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H);* ***LRP2****: low density lipoprotein receptor-related protein 2;* ***FOLH1****: folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1;* ***AHCY****: adenosylhomocysteinase.*

[a] Multiple regression analysis (stepwise method);

[b] Not retained in the multiple regression model;

[c] Additive genetic model: having two minor alleles (DD) rather than having no minor alleles (dd) is twice as likely to affect the outcome as is having just one minor allele (Dd) rather than no minor alleles (dd).

[d] Dominant genetic model: (Dd or DD) versus dd;

[e] Recessive genetic model: DD versus (Dd or dd).

Table 3. Independent predictors of superoxide dismutase plasma level in the 296 Crohn's disease patients

SNP	Chr.	Position	Gene Name	Additive genetic model[c]			Dominant genetic model[d]			Recessive genetic model[e]		
				P-value[a]	Coefficient (β)	Standard error	*P*-value[a]	Coefficient (β)	Standard error	*P*-value[a]	Coefficient (β)	Standard error
rs4920037	21	43354959	*CBS*	Not retained[b]	—	—	Not retained[b]	—	—	—	—	—
rs719235	**8**	**64114234**	***GGH***	**0.0197**	**-61.6358**	**26.211**	**Not retained[b]**	—	—	—	—	—
rs11254363	**10**	**17170698**	***CUBN***	**Not retained[b]**	—	—	**0.0143**	**-81.4492**	**32.9349**	—	—	—
rs9606756	**22**	**29336859**	***TCN2***	**0.001**	**108.0493**	**32.2779**	**0.0078**	**101.5839**	**37.7707**	**0.007**	**289.0633**	**106.1499**
rs41301825	**20**	**32343902**	***AHCY***	**0.0424**	**-210.7092**	**103.1095**	**Not retained[b]**	—	—	—	—	—
rs492602	**19**	**53898228**	***FUT2***	**0.0218**	**52.5656**	**22.7366**	**0.0303**	**78.7124**	**36.0713**	—	—	—
rs3918232	7	150337572	*NOS3*	Not retained[b]	—	—	Not retained[b]	—	—	—	—	—
Age at inclusion (years)	—	—	—	Not retained[b]	—	—	Not retained[b]	—	—	Not retained[b]	—	—
Male gender	—	—	—	Not retained[b]	—	—	Not retained[b]	—	—	Not retained[b]	—	—

NOTE. SNP: single nucleotide polymorphism; Chr.: chromosome position; ***CBS****: cystathionine-beta-synthase;* ***GGH****: gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, folylpolygammaglutamyl hydrolase);* ***CUBN****: cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor);* ***TCN2****: transcobalamin II;* ***AHCY****: adenosylhomocysteinase;* ***FUT2****: fucosyltransferase 2 (secretor status included);* ***NOS3****: nitric oxide synthase 3 (endothelial cell).*

[a] Multiple regression analysis (stepwise method).

[b] Not retained in the multiple regression model;

[c] Additive genetic model: having two minor alleles (DD) rather than having no minor alleles (dd) is twice as likely to affect the outcome as is having just one minor allele (Dd) rather than no minor alleles (dd).

[d] Dominant genetic model: (Dd or DD) versus dd;

[e] Recessive genetic model: DD versus (Dd or dd).

Table 4. SNPs with significant association with age of disease onset in the 296 Crohn's disease patients

SNP	Chr.	Position	Gene Name	Major Allele (d)	Minor Allele (D)	Residue change	HGVS	Homozygous minor allele (DD)			Heterozygous (Dd)			Homozygous major allele (dd)			P-value[a]
								N	Median	IQR	N	Median	IQR	N	Median	IQR	
rs9001	3	53832957	*CHDH*	A	C	Glu40Ala	119A>C	3	17	4	57	20	11	214	24	14	0.0125
rs492602	19	53898228	*FUT2*	A	G	Ala68=	204A>G	62	20	7	124	24	15.25	86	23	12	0.0226
rs4820889	22	29349043	*TCN2*	G	A	Arg399Gln	1196G>A	0	—	—	15	32	17.5	259	23	14	0.0271
rs1045642	7	86976580	*ABCB1*	G	A	Ile1145=	87138645A>G	60	20	12	141	23	15	73	24	14.5	0.0281
rs1801394	5	7923972	*MTRR*	G	A	Ile22Met	66A>G	65	23	13.75	142	22	12	67	26	15.5	0.0423
rs202676	11	49184195	*FOLH1*	A	G	Tyr75His	49227620A>G	9	38.5	19.75	100	24	12	163	23	13.75	0.0444
rs202720	11	49148926	*FOLH1*	G	C	—	49192351G>C	9	38.5	19.75	101	24	12	164	23	13.5	0.0461
rs1208	8	18302595	*NAT2*	A	G	Arg268Lys	803G>A	48	21	12	138	24	15.75	86	23	11	0.0498

NOTE. SNP: single nucleotide polymorphism; Chr.: chromosome; HGVS: *Human Genome Variation Society*; N: number of subjects; IQR: interquartile range; ***CHDH****: choline dehydrogenase;* ***FUT2****: fucosyltransferase 2 (secretor status included);* ***TCN2****: transcobalamin II;* ***ABCB1****: ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1;* ***MTRR****: 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase;* ***FOLH1****: folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1;* ***NAT2****: N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase).*

[a] Kruskal-Wallis test.

Table 5. Independent predictors of age of disease onset in the 296 Crohn's disease patients

SNP	Chr.	Position	Gene Name	Additive genetic model[c]			Dominant genetic model[d]			Recessive genetic model[e]		
				P-value[a]	Coefficient (β)	Standard error	*P*-value[a]	Coefficient (β)	Standard error	*P*-value[a]	Coefficient (β)	Standard error
rs9001	**3**	**53832957**	***CHDH***	**0.0093**	**-4.455**	**1.7002**	**0.0097**	**-4.8214**	**1.8499**	**Not retained[b]**	—	—
rs492602	19	53898228	*FUT2*	Not retained[b]	—		Not retained[b]	—	—	Not retained[b]	—	—
rs4820889	**22**	**29349043**	***TCN2***	**0.0169**	**7.9759**	**3.3161**	**0.0193**	**7.8945**	**3.3531**	**Not retained[b]**	—	—
rs1045642	**7**	**86976580**	***ABCB1***	**0.0285**	**-2.4539**	**1.1141**	**0.0405**	**-3.6148**	**1.7561**	**Not retained[b]**	—	—
rs1801394	5	7923972	*MTRR*	Not retained[b]	—	—	Not retained[b]	—	—	Not retained[b]	—	—
rs202676	**11**	**49184195**	***FOLH1***	**0.0314**	**3.0406**	**1.4055**	**Not retained[b]**	**—**	**—**	**Not retained[b]**	**—**	**—**
rs1208	8	18302595	*NAT2*	Not retained[b]	—	—	Not retained[b]	—	—	Not retained[b]	—	—

NOTE. SNP: single nucleotide polymorphism; Chr.: chromosome position; ***CHDH****: choline dehydrogenase;* ***FUT2****: fucosyltransferase 2 (secretor status included);* ***TCN2****: transcobalamin II;* ***ABCB1****: ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1;* ***MTRR****: 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase;* ***FOLH1****: folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1;* ***NAT2****: N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase).*

[a] Multiple regression analysis (stepwise method);

[b] Not retained in the multiple regression model;

[c] Additive genetic model: having two minor alleles (DD) rather than having no minor alleles (dd) is twice as likely to affect the outcome as is having just one minor allele (Dd) rather than no minor alleles (dd);

[d] Dominant genetic model: (Dd or DD) versus dd;

[e] Recessive genetic model: DD versus (Dd or dd).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Distribution of age at Crohn's disease onset according to the SNP–score based on the two SNPs significantly associated with early age of Crohn's disease onset (rs9001, *CHDH, choline dehydrogenase* and rs1045642, ABCB1, *ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1*).

Study Highlights

1. WHAT IS CURRENT KNOWLEDGE

- The deficiency in vitamin B12 and/or folate (the main nutritional determinants of one-carbon metabolism and of blood homocysteine) is prevalent in inflammatory bowel disease (IBD) patients. Deficiency in folate and vitamin B12 promotes inflammation and oxidant stress of digestive mucosa and aggravate experimental colitis in rodents.
- Blood homocysteine and the polymorphisms of two genes of one-carbon metabolism (OCM), *MTR* and *MTRR*, have been implicated in the pathogenesis of IBD.
- The association of superoxide dismutase (SOD) activity with Crohn's disease (CD) severity is influenced by *MTRR* polymorphism.

2. WHAT IS NEW HERE

- Among 384 SNPs corresponding to 77 OCM–related genes, we find an association of rs1801133 (*MTHFR*) and rs13043752 (*AHCY*) with homocysteine, and an association of rs719235 (*GGH*), rs9606756 (*TCN2*), rs41301825 (*AHCY*), rs492602 (*FUT2*), and rs11254363 (*CUBN*) with SOD level.
- Among 384 SNPs corresponding to 77 OCM-related genes, we highlight the association of rs9001 (*CHDH*) and rs1045642 (*ABCB1*) with age at disease onset and the correlation between SNP–score based on alleles of these two SNPs and age at CD onset.
- Our study suggests that genetic contributors of methyl donor metabolism influence the early patho-mechanisms that lead to CD.

REFERENCES

1. Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. Nature 2011;474:298-306.

2. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature 2011;474:307-17.

3. Peyrin-Biroulet L, Gueant-Rodriguez RM, Chen M, et al. Association of MTRR 66A>G polymorphism with superoxide dismutase and disease activity in patients with Crohn's disease. Am J Gastroenterol 2008;103:399-406.

4. Peyrin-Biroulet L, Rodriguez-Gueant RM, Chamaillard M, et al. Vascular and cellular stress in inflammatory bowel disease: revisiting the role of homocysteine. Am J Gastroenterol 2007;102:1108-15.

5. Chen M, Peyrin-Biroulet L, George A, et al. Methyl deficient diet aggravates experimental colitis in rats. J Cell Mol Med 2010.

6. Chen M, Xia B, Rodriguez-Gueant RM, et al. Genotypes 677TT and 677CT+1298AC of methylenetetrahydrofolate reductase are associated with the severity of ulcerative colitis in central China. Gut 2005;54:733-4.

7. Oussalah A, Gueant JL, Peyrin-Biroulet L. Meta-analysis: hyperhomocysteinaemia in inflammatory bowel diseases. Aliment Pharmacol Ther 2011;34:1173-84.

8. Mansoor MA, Bergmark C, Svardal AM, et al. Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with early-onset peripheral vascular disease. Homocysteine and peripheral vascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995;15:232-40.

9. Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. J Clin Invest 1996;98:5-7.

10. Koutroubakis IE, Malliaraki N, Dimoulios PD, et al. Decreased total and corrected antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci 2004;49:1433-7.

11. Danese S, Sgambato A, Papa A, et al. Homocysteine triggers mucosal microvascular activation in inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol 2005;100:886-95.

12. Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello PM, et al. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. Circulation 2001;103:2717-23.

13. Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. Annu Rev Biochem 2005;74:739-89.

14. Kim YI. Nutritional epigenetics: impact of folate deficiency on DNA methylation and colon cancer susceptibility. J Nutr 2005;135:2703-9.

15. Mahmud N, Molloy A, McPartlin J, et al. Increased prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase C677T variant in patients with inflammatory bowel disease, and its clinical implications. Gut 1999;45:389-94.

16. Chen M, Peyrin-Biroulet L, Xia B, et al. Methionine synthase A2756G polymorphism may predict ulcerative colitis and methylenetetrahydrofolate reductase C677T pancolitis, in Central China. BMC Med Genet 2008;9:78.

17. Zintzaras E. Genetic variants of homocysteine/folate metabolism pathway and risk of inflammatory bowel disease: a synopsis and meta-analysis of genetic association studies. Biomarkers 2010;15:69-79.

18. Kruidenier L, Kuiper I, Van Duijn W, et al. Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. J Pathol 2003;201:17-27.

19. Kruidenier L, Kuiper I, van Duijn W, et al. Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease. J Pathol 2003;201:7-16.

20. Essers JB, Lee JJ, Kugathasan S, et al. Established genetic risk factors do not distinguish early and later onset Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 2009;15:1508-14.

21. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. N Engl J Med 2009;361:2033-45.

22. Imielinski M, Baldassano RN, Griffiths A, et al. Common variants at five new loci associated with early-onset inflammatory bowel disease. Nat Genet 2009;41:1335-40.

23. Kugathasan S, Baldassano RN, Bradfield JP, et al. Loci on 20q13 and 21q22 are associated with pediatric-onset inflammatory bowel disease. Nat Genet 2008;40:1211-5.

24. Glas J, Seiderer J, Nagy M, et al. Evidence for STAT4 as a common autoimmune gene: rs7574865 is associated with colonic Crohn's disease and early disease onset. PLoS One 2010;5:e10373.

25. Singh PR, Lele SS, Mukherjee MS. Gene Polymorphisms and Low Dietary Intake of Micronutrients in Coronary Artery Disease. J Nutrigenet Nutrigenomics 2011;4:203-209.

26. Kanth VV, Golla JP, Sastry BK, et al. Genetic interactions between MTHFR (C677T), methionine synthase (A2756G, C2758G) variants with vitamin B12 and folic acid determine susceptibility to premature coronary artery disease in Indian population. J Cardiovasc Dis Res 2011;2:156-63.

27. Di Minno MN, Pezzullo S, Palmieri V, et al. Genotype-independent in vivo oxidative stress following a methionine loading test: Maximal platelet activation in subjects with early-onset thrombosis. Thromb Res 2011;128:e43-8.

28. Safarinejad MR, Safarinejad S, Shafiei N. Role of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms (C677T, A1298C, and G1793A) in the development of early onset vasculogenic erectile dysfunction. Arch Med Res 2010;41:410-22.

29. Giusti B, Saracini C, Bolli P, et al. Early-onset ischaemic stroke: analysis of 58 polymorphisms in 17 genes involved in methionine metabolism. Thromb Haemost 2010;104:231-42.

30. Xin XY, Song YY, Ma JF, et al. Gene polymorphisms and risk of adult early-onset ischemic stroke: A meta-analysis. Thromb Res 2009;124:619-24.

31. Wiltshire EJ, Mohsin F, Chan A, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase gene polymorphisms and protection from microvascular complications in adolescents with type 1 diabetes. Pediatr Diabetes 2008;9:348-53.

32. Mager A, Koren-Morag N, Shohat M, et al. Impact of ethnicity and MTHFR genotype on age at onset of coronary artery disease in women in Israel. Isr Med Assoc J 2008;10:516-9.

33. Brune N, Andrich J, Gencik M, et al. Methyltetrahydrofolate reductase polymorphism influences onset of Huntington's disease. J Neural Transm Suppl 2004:105-10.

34. Metayer C, Scelo G, Chokkalingam AP, et al. Genetic variants in the folate pathway and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer Causes Control 2011;22:1243-58.

35. Schmidt RJ, Hansen RL, Hartiala J, et al. Prenatal vitamins, one-carbon metabolism gene variants, and risk for autism. Epidemiology 2011;22:476-85.

36. Peyrin-Biroulet L, Oussalah A, Williet N, et al. Impact of azathioprine and tumour necrosis factor antagonists on the need for surgery in newly diagnosed Crohn's disease. Gut 2011;60:930-6.

37. Van Assche G, Dignass A, Panes J, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. J Crohns Colitis 2010;4:7-27.

38. Battaglia-Hsu SF, Akchiche N, Noel N, et al. Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:21930-5.

39. Hill WG, Robertson A. Linkage disequilibrium in finite populations. TAG Theoretical and Applied Genetics 1968;38:226-231.

40. Lewontin RC. The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models. Genetics 1964;49:49-67.

41. Carmel R. Biomarkers of cobalamin (vitamin B-12) status in the epidemiologic setting: a critical overview of context, applications, and performance characteristics of cobalamin, methylmalonic acid, and holotranscobalamin II. Am J Clin Nutr 2011;94:348S-358S.

42. Yetley EA, Pfeiffer CM, Phinney KW, et al. Biomarkers of vitamin B-12 status in NHANES: a roundtable summary. Am J Clin Nutr 2011;94:313S-321S.

43. Marguerite V, Beri-Dexheimer M, Ortiou S, et al. Cobalamin potentiates vinblastine cytotoxicity through downregulation of mdr-1 gene expression in HepG2 cells. Cell Physiol Biochem 2007;20:967-76.

44. Linn SC, Giaccone G. MDR1/P-glycoprotein expression in colorectal cancer. Eur J Cancer 1995;31A:1291-4.

45. Juyal G, Midha V, Amre D, et al. Associations between common variants in the MDR1 (ABCB1) gene and ulcerative colitis among North Indians. Pharmacogenet Genomics 2009;19:77-85.

46. Panwala CM, Jones JC, Viney JL. A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, mdr1a, spontaneously develop colitis. J Immunol 1998;161:5733-44.

47. Potocnik U, Ferkolj I, Glavac D, et al. Polymorphisms in multidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with refractory Crohn disease and ulcerative colitis. Genes Immun 2004;5:530-9.

48. Resta-Lenert S, Smitham J, Barrett KE. Epithelial dysfunction associated with the development of colitis in conventionally housed mdr1a-/- mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2005;289:G153-62.

49. Ho GT, Soranzo N, Nimmo ER, et al. ABCB1/MDR1 gene determines susceptibility and phenotype in ulcerative colitis: discrimination of critical variants using a gene-wide haplotype tagging approach. Hum Mol Genet 2006;15:797-805.

50. Onnie CM, Fisher SA, Pattni R, et al. Associations of allelic variants of the multidrug resistance gene (ABCB1 or MDR1) and inflammatory bowel disease and their effects on disease behavior: a case-control and meta-analysis study. Inflamm Bowel Dis 2006;12:263-71.

51. Collett A, Higgs NB, Gironella M, et al. Early molecular and functional changes in colonic epithelium that precede increased gut permeability during colitis development in mdr1a(-/-) mice. Inflamm Bowel Dis 2008;14:620-31.

52. Krupoves A, Seidman EG, Mack D, et al. Associations between ABCB1/MDR1 gene polymorphisms and Crohn's disease: a gene-wide study in a pediatric population. Inflamm Bowel Dis 2009;15:900-8.

53. Nones K, Knoch B, Dommels YE, et al. Multidrug resistance gene deficient (mdr1a-/-) mice have an altered caecal microbiota that precedes the onset of intestinal inflammation. J Appl Microbiol 2009;107:557-66.

54. Ufer M, Hasler R, Jacobs G, et al. Decreased sigmoidal ABCB1 (P-glycoprotein) expression in ulcerative colitis is associated with disease activity. Pharmacogenomics 2009;10:1941-53.

55. Yamamoto-Furusho JK, Villeda-Ramirez MA, Fonseca-Camarillo G, et al. High gene expression of MDR1 (ABCB1) is associated with medical treatment response and long-term remission in patients with ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis 2010;16:541-2.

56. Krupoves A, Mack D, Seidman E, et al. Associations between variants in the ABCB1 (MDR1) gene and corticosteroid dependence in children with crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 2011.

57. Saito S, Kato J, Hiraoka S, et al. DNA methylation of colon mucosa in ulcerative colitis patients: Correlation with inflammatory status. Inflamm Bowel Dis 2011;17:1955-65.

58. Zintzaras E. Is there evidence to claim or deny association between variants of the multidrug resistance gene (MDR1 or ABCB1) and inflammatory bowel disease? Inflamm Bowel Dis 2011.

59. Wilk JN, Bilsborough J, Viney JL. The mdr1a-/- mouse model of spontaneous colitis: a relevant and appropriate animal model to study inflammatory bowel disease. Immunol Res 2005;31:151-9.

60. Joossens M, Huys G, Cnockaert M, et al. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. Gut 2011;60:631-7.

61. da Costa KA, Kozyreva OG, Song J, et al. Common genetic polymorphisms affect the human requirement for the nutrient choline. FASEB J 2006;20:1336-44.

62. Zeisel SH, da Costa KA. Choline: an essential nutrient for public health. Nutr Rev 2009;67:615-23.

63. Fujimaki C, Hayashi H, Tsuboi S, et al. Plasma total homocysteine level and methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T genetic polymorphism in Japanese patients with rheumatoid arthritis. Biomarkers 2009;14:49-54.

64. Van den Veyver IB. Genetic effects of methylation diets. Annu Rev Nutr 2002;22:255-82.

65. Lawson BR, Manenkova Y, Ahamed J, et al. Inhibition of transmethylation down-regulates CD4 T cell activation and curtails development of autoimmunity in a model system. J Immunol 2007;178:5366-74.

66. Kominsky DJ, Keely S, MacManus CF, et al. An endogenously anti-inflammatory role for methylation in mucosal inflammation identified through metabolite profiling. J Immunol 2011;186:6505-14.

67. Qin S, Ni M, De Vries GW. Implication of S-adenosylhomocysteine hydrolase in inhibition of TNF-alpha- and IL-1beta-induced expression of inflammatory mediators by AICAR in RPE cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 2008;49:1274-81.

68. Fu YF, Zhu YN, Ni J, et al. A reversible S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitor ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting T cell activation. J Pharmacol Exp Ther 2006;319:799-808.

69. Saso Y, Conner EM, Teegarden BR, et al. S-Adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitor mediates immunosuppressive effects in vivo: suppression of delayed type hypersensitivity ear swelling and peptidoglycan polysaccharide-induced arthritis. J Pharmacol Exp Ther 2001;296:106-12.

70. Chiang PK. Biological effects of inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase. Pharmacol Ther 1998;77:115-34.

71. Nishio E, Watanabe Y. Homocysteine as a modulator of platelet-derived growth factor action in vascular smooth muscle cells: a possible role for hydrogen peroxide. Br J Pharmacol 1997;122:269-74.

72. Moat SJ, Bonham JR, Cragg RA, et al. Elevated plasma homocysteine elicits an increase in antioxidant enzyme activity. Free Radic Res 2000;32:171-9.

73. Dincer Y, Erzin Y, Himmetoglu S, et al. Oxidative DNA damage and antioxidant activity in patients with inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci 2007;52:1636-41.

74. Mollicone R, Bara J, Le Pendu J, et al. Immunohistologic pattern of type 1 (Lea, Leb) and type 2 (X, Y, H) blood group-related antigens in the human pyloric and duodenal mucosae. Lab Invest 1985;53:219-27.

75. Kelly RJ, Rouquier S, Giorgi D, et al. Sequence and expression of a candidate for the human Secretor blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene (FUT2). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype. J Biol Chem 1995;270:4640-9.

76. Brown SJ, Miller AM, Cowan PJ, et al. Altered immune system glycosylation causes colitis in alpha1,2-fucosyltransferase transgenic mice. Inflamm Bowel Dis 2004;10:546-56.

77. Franke A, McGovern DP, Barrett JC, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. Nat Genet 2010;42:1118-25.

78. Suhre K, Shin SY, Petersen AK, et al. Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research. Nature 2011;477:54-60.

79. Rausch P, Rehman A, Kunzel S, et al. Colonic mucosa-associated microbiota is influenced by an interaction of Crohn disease and FUT2 (Secretor) genotype. Proc Natl Acad Sci U S A 2011;108:19030-5.

80. McGovern DP, Jones MR, Taylor KD, et al. Fucosyltransferase 2 (FUT2) non-secretor status is associated with Crohn's disease. Hum Mol Genet 2010;19:3468-76.

81. Yamamoto K, Miwa T, Taniguchi H, et al. Binding specificity of Lactobacillus to glycolipids. Biochem Biophys Res Commun 1996;228:148-52.

82. Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. Lett Appl Microbiol 2007;45:454-60.

83. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Vaneechoutte M, et al. Active Crohn's disease and ulcerative colitis can be specifically diagnosed and monitored based on the biostructure of the fecal flora. Inflamm Bowel Dis 2008;14:147-61.

84. Rocha R, Santana GO, Almeida N, et al. Analysis of fat and muscle mass in patients with inflammatory bowel disease during remission and active phase. Br J Nutr 2009;101:676-9.

85. Hartman C, Eliakim R, Shamir R. Nutritional status and nutritional therapy in inflammatory bowel diseases. World J Gastroenterol 2009;15:2570-8.

86. Vagianos K, Bector S, McConnell J, et al. Nutrition assessment of patients with inflammatory bowel disease. JPEN J Parenter Enteral Nutr 2007;31:311-9.

87. Gonsky R, Deem RL, Landers CJ, et al. Distinct IFNG methylation in a subset of ulcerative colitis patients based on reactivity to microbial antigens. Inflamm Bowel Dis 2011;17:171-8.

88. Tahara T, Shibata T, Nakamura M, et al. Effect of MDR1 gene promoter methylation in patients with ulcerative colitis. Int J Mol Med 2009;23:521-7.

89. Nimmo ER, Prendergast JG, Aldhous MC, et al. Genome-wide methylation profiling in Crohn's disease identifies altered epigenetic regulation of key host defense mechanisms including the Th17 pathway. Inflamm Bowel Dis 2011.

90. Tahara T, Shibata T, Nakamura M, et al. Promoter methylation of protease-activated receptor (PAR2) is associated with severe clinical phenotypes of ulcerative colitis (UC). Clin Exp Med 2009;9:125-30.

91. Hamilton JP. Epigenetics: principles and practice. Dig Dis 2011;29:130-5.

92. Bossenmeyer-Pourie C, Blaise S, Pourie G, et al. Methyl donor deficiency affects fetal programming of gastric ghrelin cell organization and function in the rat. Am J Pathol 2010;176:270-7.

93. Garcia MM, Gueant-Rodriguez RM, Pooya S, et al. Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1alpha by PRMT1 and SIRT1. J Pathol 2011;225:324-35.

CONFLICT OF INTEREST/STUDY SUPPORT

Guarantor of the article:

- JLG accepts full responsibility for the conduct of the study and has access to the data and has control of the decision to publish.

Specific author contributions:

- Laurent Peyrin-Biroulet[1] : study concept and design, acquisition and interpretation of data, drafting of the manuscript, study supervision
- Abderrahim Oussalah[1,2] : Study concept and design, statistical analysis, acquisition and interpretation of data, and drafting of the manuscript
- Laetitia Goffinet[2]: Study concept and design, acquisition and interpretation of data, and drafting of the manuscript
- Céline Chery[2]: Acquisition and interpretation of data
- Philippe Gerard[2]: Acquisition of biological data
- Pierre Rouyer[2]: Acquisition of genotyping data
- Denise Forest-Tramoy[2]: Acquisition of genotyping data
- Jean-Baptiste Chevaux[1]: Acquisition and interpretation of clinical data
- Camille Zallot[1]: Acquisition and interpretation of clinical data
- Marc-André Bigard[1]: Acquisition and interpretation of clinical data, critical review of the manuscript
- Jean-Louis Guéant[1,2]: study concept and design, acquisition and interpretation of data, drafting of the manuscript, study supervision, accepts full responsibility for the conduct of the study, and decision to publish

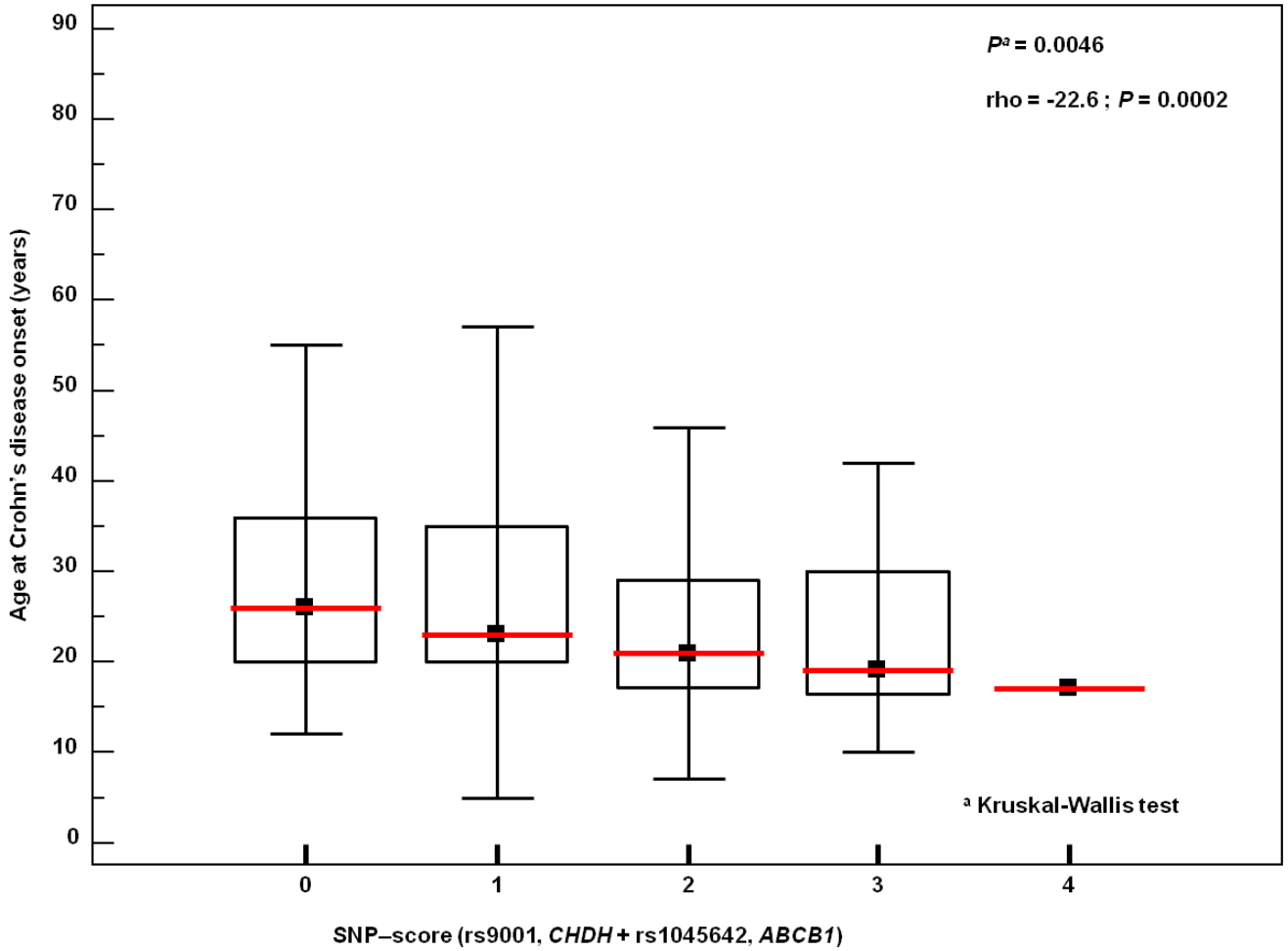
Financial support: None

Potential competing interests:

1. **Authors' declaration of personal interests:**
    - DL has acted as speaker for, or received research support from Abbott, Schering-Plough, Norgine, and Ferring.
    - LPB has received consulting fees from Abbott Laboratories and UCB Pharma; lecture fees from speaking at continuing medical education events from Centocor; and grant support from UCB Pharma;
    - AO, LE, XR, GB, SN, JF, BF, XH, MAB and JLG declare no conflict of interest.

2. **Declaration of funding interests:** This work received financial support from Inserm and the Region Lorraine (France).

Figure 1.


Pa = 0.0046
rho = -22.6 ; P = 0.0002
a Kruskal-Wallis test
Age at Crohn's disease onset (years)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
SNP–score (rs9001, CHDH + rs1045642, ABCB1)

Supplemental Table 1 online. One-carbon metabolism pathways and genes included in the GoldenGate™ genotyping assay (Methylation plex)

Metabolic pathway	Gene product	Chromosome	Gene name (old names)	Gene ID on NCBI
Vitamin B12 transport and metabolism	Intrinsic factor	11q13	*GIF (IF; INF; IFMH; TCN3)*	2694
	Intrinsic factor - cobalamin receptor (cubilin)	10p12.31	*CUBN (IFCR; MGA1; gp280; FLJ90055; FLJ90747)*	8029
	Low density lipoprotein-related protein 2 (Megalin)	2q24-q31	*LRP2 (DBS; gp330; LRP2)*	4036
	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	16p13.1	*ABCC1 (ABC29, ABCC, DKFZp686N04233, DKFZp781G125, GS-X, MRP, MRP1)*	4363
	Amnionless homolog (mouse)	14q32.3	*AMN (PRO1028)*	81693
	Fucosyltransferase 2	19q13.3	*FUT2 (SE; Se2; sej; SEC2; B12QTL1)*	2524
	Galectin, galactoside-binding, soluble, 3	14q21-q22	*LGALS3 (GAL3; MAC2; CBP35; GALBP; GALIG; LGALS2)*	3958
	CD320	19p13.3-p13.2	*CD320 (8D6; 8D6A, TCblR)*	51293
	LMBR1 domain containing 1	6q13	*LMBRD1*	55788
	Methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblC type, with homocystinuria	1p34.1	*MMACHC (DKFZp564I122, FLJ25671, RP11-291L19.3, cblC)*	25974
	Methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblD type, with homocystinuria	2q23.2	*MMADHC (cblD; C2orf25; CL25022; MMADHC)*	27249
	Methylmalonyl Coenzyme A mutase	6p12.3	*MUT*	4594
	Centromere protein Q	6p12.3	*CENPQ (CENP-Q; C6orf139;*	55166

			FLJ10545)	
	Transcobalamin 1	11q11-q12	*TCN1 (TC1, TCI)*	6947
	Transcobalamin 2	22q12.2	*TCN2 (TC2; D22S676; D22S750)*	6948
Choline metabolism	Choline dehydrogenase	3p21.1	*CHDH*	55349
	Choline kinase alpha	11q13.2	*CHKA*	1119
	Betaine homocysteine methyltransferase	5q13.1-q15	*BHMT*	635
	Betaine homocysteine methyltransferase 2	5q13	*BHMT2 (FLJ20001)*	23743
	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	17p11.2	*PEMT (MGC2483, PEAMT, PEMPT, PEMT2, PNMT)*	10400
	Phosphate cytidylyltransferase 1	3q29	*PCYT1A (CCTA, CT, CTA, CTPCT)*	5130
Vitamin B6 metabolism	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	1p36.12	*ALPL*	249
	Neuroblastoma breakpoint family, member 3	1p36.12	*NBPF3*	84224
Folates Transport and metabolism	Folate receptor alpha	11q13.3-q14.1	*FOLR1 (FBP; FOLR; MOv18; FR-alpha)*	2348
	Folate receptor beta	11q13.3-q13.5	*FOLR2 (FR-P3; FR-BETA; BETA-HFR; FBP/PL-1)*	2350
	Reduced folate carrier 1	21q22.3	*SLC19A1 (CHMD; FOLT; IFC1; REFC; RFC1)*	6573
	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	7q21.12	*ABCB1 (ABC20, CD243, CLCS, GP170, MDR1, MGC163296, P-GP, PGY1)*	5243

	Solute carrier family 46 (folate transporter), member 1	17q11.2	*SLC46A1 (HCP1; PCFT; MGC9564)*	113235
	Folate-binding protein 3	11q13	*FOLR3 (FR-G; FR-gamma; gamma-hFR)*	2352
	Dihydrofolate reductase	5q11.2-q13	*DHFR*	1719
	Folylpolyglutamate synthase	9q34.1	*FPGS*	2356
	Serine hydroxymethyltransferase 1	17p11.2	*SHMT1 (SHMT; CSHMT; MGC15229; MGC24556)*	6470
	Serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)	12q12-q14	*SHMT2 (GLYA; SHMT)*	6472
	Neurexophilin 4	12q13.3	*NXPH4*	11247
	Mitochondrial methionyl-tRNA formyltransferase	15q22.31	*MTFMT (FMT1)*	123263
	Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	2q35	*ATIC (PURH; AICAR; AICARFT; FLJ93545; IMPCHASE)*	471
	10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	3q21.2	*ALDH1L1 (FTHFD; DKFZp781N0997)*	10840
	Gamma-glutamyl hydrolase	8q12.3	*GGH (GH)*	8836
	Formimino-transferase-cyclodeaminase	21q22.3	*FTCD (LCHC1)*	10841
	NAD-dependent methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase 1methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase	14q24	*MTHFD1 (MTHFC; MTHFD, FTHFS)*	4522

	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1-like	6q25.1	*MTHFD1L (RP1-292B18.2, DKFZp586G1517, FLJ21145, FTHFSDC1, MTC1THFS, dJ292B18.2)*	25902
	NAD-dependent methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2	2p13.1	*MTHFD2 (NMDMC)*	10797
	5,10-methenyltetrahydrofolate synthetase	15q25.1	*MTHFS (FLJ 30410; HsT 19268)*	10588
	Folate hydrolase	11p11.2	*FOLH1 (FGCP, FOLH, GCP2, GCPII, NAALAD1, NAALAdase, PSM, PSMA, mGCP)*	2346
	Carbamoyl-phosphate synthetase 1, mitochondrial	2q35	*CPS1 (CPSase I)*	1373
	NADPH oxidase 4	11q14.2-q21	*NOX4*	50507
	Synaptotagmin IX	11p15.4	*SYT9*	143425
	Prickle homolog 2	3p14.1	*PRICKLE 2 (DKFZp686D143, DKFZp686H1748, DKFZp686M031)*	166336
	Chloride channel 6	1p36	*CLCN6*	1185
	5,10-methylene-tetrahydrofolate reductase	1p36.3	*MTHFR*	4524
Homocysteine methylation pathway and S-adenosyl-methionine (SAM) metabolism	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine S-methyltransferase (methionine synthase)	1q43	*MTR (FLJ33168, FLJ43216, FLJ45386, MS, cblG)*	4548
	5-methyl-tetrahydrofolate-homocysteine methyl-transferase reductase	5p15.3-p15.2	*MTRR (MGC129643, MSR, cblE)*	4552
	Betaine homocysteine methyltransferase	5q13.1-q15	*BHMT*	635

	Betaine homocysteine methyltransferase 2	5q13	*BHMT2 (FLJ20001)*	23743
	Aminomethyl-transferase	3p21.2-p21.1	*AMT (GCE; NKH; GCST)*	275
	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	17p11.2	*PEMT (MGC2483, PEAMT, PEMPT, PEMT2, PNMT)*	10400
	Choline dehydrogenase	3p21.1	*CHDH*	55349
	S-adenosyl homocysteine hydrolase	20cen-q13.1	*AHCY (SAHH)*	191
	Methionine adenosyl-transferase 1 alpha	10q22	*MAT1A (RP11-36D19.2, MAT, MATA1, SAMS, SAMS1)*	4143
	Methionine adenosyltransferase 2 alpha	2p11.2	*MAT2A (MATA2, MATII, SAMS2)*	4144
	Methionine adenosyltransferase II, beta	5q34-q35	*MAT2B (MAT-II, MATIIbeta, MGC12237, Nbla02999, SDR23E1, TGR)*	27430
Homocysteine transsulfuration	Cystathionine gamma-lyase	1p31.1	*CTH*	1491
	Cystathionine beta-synthase	21q22.3	*CBS (HIP4)*	875
DNA, RNA, proteins, coenzymes, and metabolites transmethylation	DNA N-methyltransferase 1	19p13.2	*DNMT1 (AIM; DNMT; MCMT; CXXC9; FLJ16293; MGC104992)*	1786
	DNA N-methyltransferase 3A	2p23	*DNMT3A (M.HsaIIIA)*	1788
	DNA N-methyltransferase 3B	20q11.2	*DNMT3B (ICF, M.HsaIIIB)*	1789
	DNA N-methyltransferase 3L	21q22.3	*DNMT3L*	29947

	RNA (guanine-7-) methyltransferase	18p11.22-p11.23	*RNMT (DKFZp686H1252, KIAA0398, MET, RG7MT1, hCMT1c)*	8731
	O-6 methylguanine-DNA methyltransferase	10q26	*MGMT*	4255
	Protein arginine N-methyltransferase	19q13.3	*PRMT1 (ANM1, HCP1, HRMT1L2, IR1B4)*	3276
	Protein arginine N-methyltransferase	21q22.3	*PRMT2 (HRMT1L1, MGC111373)*	3275
	Protein carboxyl methyltransferase 1 = L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyltransferase	6q24-q25	*PCMT1*	5110
	Guanidinoacetate N-methyltransferase	19p13.3	*GAMT (PIG2, TP53I2)*	2593
	tRNA aspartic acid methyltransferase 1	10p15.1	*TRDMT1 (DNMT2; PuMet; RNMT1; M.HsaIIP)*	1787
	Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase	1p36.21	*ICMT (PCMT; PPMT; PCCMT; HSTE14; MST098; MSTP098; MGC39955; ICMT)*	23463
	RNA, U5E small nuclear	1p36.22	*RNU5E*	26829
	Methyltransferase COQ3	6q16.3	*COQ3 (DHHBMT; bA9819.1; DHHBMTASE; UG0215E05; COQ3)*	51805
	Coactivator-associated arginine methyltransferase 1	19p13.2	*CARM1 (PRMT4)*	10498
	Nicotinamide N-methyltransferase	11q23.1	*NNMT*	4837
Polyamines synthesis	S-adenosyl-methionine decarboxylase 3	6q21-q22	*AMD1*	262

Purine, pyrimidin, and xenobiotics metabolism	N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase)	8p23.1-p21.3	*NAT1 (AAC1; NAT)*	9
	N-acetyltransferase 2	8p22	*NAT2 (AAC2, PNAT)*	10
	Dimethylglycine dehydrogenase	5q14.1	*DMGDH*	29958
	Thymidylate synthase	18p11.32	*TYMS (HST422, MGC88736, TMS, TS)*	7298
	Chromosome 18 open reading frame 56, hypothetical protein LOC494514	18p11.32	*C18orf56*	494514
	Thiopurine methyltransferase	6p22.3	*TPMT*	7172
	Sarcosine dehydrogenase	9q33-q34	*SARDH (SAR; SDH; SARD; DMGDHL1; FLJ 36475)*	1757
	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	21q22.11	*GART (AIRS, GARS, GARTF, MGC47764, PAIS, PGFT, PRGS)*	2618
	Catechol-O-methyltransferases	22q11.21	*COMT*	1312

NOTE. NCBI: National Center for Biotechnology Information.

Supplemental Table 2 online. SNPs (n=384) included in the GoldenGate™ genotyping assay (Methylation plex)

SNP ID	Chromosome	Chromosome position	SNP	Illumina® Strand	IllumiCode name
rs57035602	1	45747455	[A/C]	TOP	1688
rs11545267	1	150151857	[A/G]	TOP	3927
rs11545269	1	150144329	[A/G]	TOP	265
rs11545270	1	150144402	[T/C]	BOT	3011
rs61750442	1	150146954	[T/G]	BOT	215
rs61755260	1	150140523	[A/G]	TOP	1689
rs3927589	1	11777080	[T/G]	BOT	130
rs56182143	1	11777799	[T/C]	BOT	442
rs72552099	1	11777061	[T/C]	BOT	2915
rs2229274	1	235056764	[T/C]	BOT	5131
rs60599724	1	235092196	[G/C]	BOT	1671
rs61736326	1	235125366	[A/G]	TOP	2152
rs61736440	1	235082920	[A/G]	TOP	33
rs61736441	1	235046387	[T/C]	BOT	1042
rs61736442	1	235033501	[A/G]	TOP	5968
rs61739582	1	235126995	[A/G]	TOP	2954
rs1021737	1	70677387	[T/G]	BOT	2297
rs11799647	1	235127543	[A/G]	TOP	682
rs12060264	1	235054985	[A/G]	TOP	4931
rs12085006	1	11881309	[T/C]	BOT	23
rs1256335	1	21762972	[T/C]	BOT	5800
rs12749581	1	235033470	[A/G]	TOP	3906
rs1801131	1	11777062	[A/C]	TOP	2733
rs1801133	1	11778964	[T/C]	BOT	3625
rs1802353	1	6207266	[A/G]	TOP	814

SNP ID	Chromosome	Chromosome position	SNP	Illumina® Strand	IllumiCode name
rs1805087	1	235115122	[T/C]	BOT	4002
rs1999594	1	11881802	[T/C]	BOT	5003
rs2066472	1	11785557	[T/C]	BOT	3057
rs2274974	1	11773905	[A/G]	TOP	2091
rs2274976	1	11773513	[T/C]	BOT	1111
rs28595301	1	70656224	[A/G]	TOP	5350
rs35219601	1	45747435	[A/G]	TOP	4111
rs35737219	1	11773336	[A/G]	TOP	1272
rs3737965	1	11789037	[A/G]	TOP	4283
rs45449298	1	11774997	[T/C]	BOT	2322
rs45550133	1	11783879	[A/G]	TOP	113
rs4654748	1	21658654	[T/C]	BOT	2257
rs663649	1	70669770	[A/C]	TOP	2208
rs6662272	1	45745710	[G/C]	BOT	4071
rs56117859	2	215919817	[T/C]	BOT	3606
rs2228171	2	169761751	[A/G]	TOP	54
rs2229263	2	169883580	[A/G]	TOP	4075
rs56204990	2	169808247	[A/T]	TOP	4908
rs61995913	2	169781133	[C/G]	TOP	2753
rs71430659	2	169735322	[A/G]	TOP	4950
rs73035708	2	169771538	[T/C]	BOT	2166
rs73971823	2	169803056	[A/T]	TOP	3979
rs10175961	2	215917775	[C/G]	TOP	813
rs11674973	2	169756587	[A/C]	TOP	2966
rs13391626	2	169781009	[T/G]	BOT	1063
rs17848140	2	169823861	[A/C]	TOP	3470
rs17848149	2	169805952	[A/C]	TOP	1749

SNP ID	Chromosome	Chromosome position	SNP	Illumina® Strand	IllumiCode name
rs17848169	2	169768848	[T/C]	BOT	3031
rs17848188	2	169738794	[A/G]	TOP	1893
rs2075252	2	169719230	[A/G]	TOP	4997
rs2119289	2	164206191	[G/C]	BOT	2960
rs2228168	2	169776809	[A/G]	TOP	5188
rs2302691	2	169809629	[T/G]	BOT	1588
rs2372536	2	215898264	[G/C]	BOT	1601
rs28735621	2	169802015	[T/C]	BOT	2906
rs3213760	2	169747006	[T/C]	BOT	5348
rs34041086	2	169776897	[T/C]	BOT	5221
rs34052957	2	169772002	[A/C]	TOP	559
rs34291900	2	169837792	[T/C]	BOT	5310
rs34355135	2	169737902	[A/G]	TOP	153
rs34564141	2	169693583	[T/C]	BOT	10
rs34592807	2	169872072	[T/C]	BOT	2999
rs34693334	2	169855747	[G/C]	BOT	1493
rs34886916	2	150141246	[A/C]	TOP	2651
rs35086590	2	169750690	[T/C]	BOT	4969
rs35413340	2	169771625	[A/G]	TOP	989
rs35642533	2	169883528	[A/G]	TOP	4107
rs35734447	2	169750490	[A/G]	TOP	6123
rs35942532	2	169711580	[T/C]	BOT	5285
rs36082715	2	169820905	[T/C]	BOT	1711
rs41268685	2	169704315	[A/G]	TOP	1335
rs41268689	2	169778610	[T/C]	BOT	5290
rs4667591	2	169711677	[T/G]	BOT	3972
rs4667596	2	169778417	[A/G]	TOP	3938

SNP ID	Chromosome	Chromosome position	SNP	Illumina® Strand	IllumiCode name
rs4673993	2	215920583	[A/G]	TOP	2738
rs7422339	2	211248751	[T/G]	BOT	4099
rs9646779	2	169735392	[T/C]	BOT	3814
rs982393	2	164198774	[A/T]	TOP	2163
rs72965956	3	127307409	[T/G]	BOT	2180
rs9282693	3	127338334	[T/C]	BOT	4008
rs9001	3	53832957	[A/C]	TOP	1590
rs2229525	3	74291914	[T/C]	BOT	1319
rs62147682	3	74289354	[A/C]	TOP	3461
rs7639752	3	197457641	[T/C]	BOT	1753
rs939883	3	197449512	[T/A]	BOT	5057
rs1127717	3	127308748	[A/G]	TOP	5184
rs12676	3	53832842	[T/G]	BOT	4072
rs13088615	3	127359959	[A/G]	TOP	2879
rs153734	3	64053048	[T/C]	BOT	5815
rs2276724	3	127337098	[A/G]	TOP	5123
rs2886059	3	127348455	[T/G]	BOT	5930
rs34812788	3	49434646	[T/C]	BOT	5874
rs34974961	3	53828048	[T/C]	BOT	2461
rs3796191	3	127355073	[A/G]	TOP	4161
rs4646750	3	127308692	[A/G]	TOP	6117
rs9282691	3	127338354	[T/G]	BOT	2808
rs9282697	3	127338297	[A/G]	TOP	3987
rs2713280	4	134785907	[A/G]	TOP	718
rs56709544	5	78447358	[A/G]	TOP	4020
rs60947960	5	78452908	[A/G]	TOP	3468
rs651852	5	78444816	[C/G]	TOP	3498

SNP ID	Chromosome	Chromosome position	SNP	Illumina® Strand	IllumiCode name
rs73769969	5	78452040	[A/G]	TOP	2831
rs56053829	5	78420079	[T/C]	BOT	6030
rs58580238	5	78414400	[A/C]	TOP	233
rs60158007	5	78410978	[A/G]	TOP	1002
rs60797063	5	78414825	[T/C]	BOT	5366
rs60815816	5	78414881	[T/C]	BOT	1777
rs62342555	5	7950284	[T/C]	BOT	5394
rs10037809	5	78459392	[T/G]	BOT	2205
rs10064631	5	7938906	[G/C]	BOT	969
rs10380	5	7950190	[A/G]	TOP	1841
rs1050825	5	78462587	[A/C]	TOP	1647
rs13189440	5	78401371	[A/C]	TOP	331
rs1532268	5	7931178	[T/C]	BOT	5177
rs162036	5	7938958	[T/C]	BOT	5118
rs1643649	5	79975204	[T/C]	BOT	5898
rs16879334	5	7944505	[G/C]	BOT	747
rs16879355	5	7946012	[T/C]	BOT	3484
rs1801394	5	7923972	[A/G]	TOP	2807
rs1805073	5	78362505	[G/C]	BOT	1241
rs1805074	5	78360107	[T/C]	BOT	6016
rs2287780	5	7942303	[T/C]	BOT	51
rs2303080	5	7931423	[A/T]	TOP	4092
rs3733890	5	78457714	[T/C]	BOT	3704
rs41283145	5	7945936	[T/C]	BOT	5058
rs532964	5	78376041	[A/G]	TOP	5894
rs542721	5	78394187	[G/C]	BOT	1790
rs626105	5	78405656	[A/G]	TOP	5449

SNP ID	Chromosome	Chromosome position	SNP	Illumina® Strand	IllumiCode name
rs672346	5	78457655	[A/C]	TOP	619
rs7703033	5	7932949	[A/G]	TOP	5846
rs9332	5	7953711	[A/G]	TOP	5133
rs11555881	6	70508413	[T/C]	BOT	585
rs17854411	6	70467383	[A/G]	TOP	300
rs61748674	6	151311924	[T/C]	BOT	1955
rs61753800	6	151378413	[T/G]	BOT	952
rs61754784	6	151288992	[T/C]	BOT	2360
rs1136145	6	49515882	[T/C]	BOT	3804
rs1141321	6	49520392	[A/G]	TOP	2277
rs2228282	6	49531827	[A/G]	TOP	4069
rs2229395	6	49523407	[T/C]	BOT	1439
rs8589	6	49511241	[A/G]	TOP	5328
rs12214456	6	70515996	[T/C]	BOT	4116
rs35829704	6	151378481	[T/C]	BOT	101
rs4144164	6	99924321	[A/G]	TOP	2062
rs4267943	6	49547763	[T/C]	BOT	5021
rs4816	6	150156437	[T/C]	BOT	5052
rs6925344	6	99926099	[A/G]	TOP	2369
rs9354880	6	70464185	[A/T]	TOP	515
rs9473555	6	49517445	[C/G]	TOP	1661
rs9473556	6	49517527	[A/G]	TOP	5958
rs56331996	7	150337454	[T/G]	BOT	3789
rs61747096	7	150338763	[A/G]	TOP	5297
rs61760646	7	150321855	[T/G]	BOT	1375
rs61760657	7	150328549	[A/G]	TOP	3962
rs61761725	7	150329282	[A/G]	TOP	2861

SNP ID	Chromosome	Chromosome position	SNP	Illumina® Strand	IllumiCode name
rs61761728	7	150329439	[T/C]	BOT	3399
rs61761756	7	150337483	[A/G]	TOP	5257
rs61761758	7	150338628	[A/G]	TOP	162
rs61762632	7	150342111	[A/T]	TOP	2789
rs6947833	7	150338995	[C/G]	TOP	5176
rs10248420	7	87002921	[T/C]	BOT	2927
rs1045642	7	86976580	[T/C]	BOT	1030
rs1202184	7	87051836	[A/G]	TOP	4057
rs17327442	7	87050925	[T/A]	BOT	234
rs2235046	7	87012001	[A/G]	TOP	674
rs3918166	7	150324488	[A/G]	TOP	732
rs3918201	7	150338276	[T/G]	BOT	3896
rs3918232	7	150337572	[A/G]	TOP	3934
rs3918234	7	150338967	[A/T]	TOP	6004
rs41508746	7	150327367	[T/C]	BOT	1311
rs7792133	7	150335178	[T/C]	BOT	1987
rs11545077	8	64113791	[A/G]	TOP	1145
rs15073	8	64092632	[A/T]	TOP	5076
rs11545076	8	64114004	[A/C]	TOP	5140
rs11545078	8	64101317	[A/G]	TOP	2232
rs1208	8	18302595	[A/G]	TOP	3014
rs1799930	8	18302382	[T/C]	BOT	5817
rs1799931	8	18302649	[A/G]	TOP	2320
rs1800909	8	64113865	[T/C]	BOT	3049
rs1801280	8	18302133	[T/C]	BOT	3913
rs719235	8	64114234	[T/G]	BOT	3440
rs10986018	9	100163156	[A/G]	TOP	1382

SNP ID	Chromosome	Chromosome position	SNP	Illumina® Strand	IllumiCode name
rs12686275	9	129613066	[T/A]	BOT	4133
rs2073817	9	135549280	[A/G]	TOP	2312
rs34354111	9	129615522	[G/C]	BOT	2081
rs35559818	9	135589052	[T/G]	BOT	1826
rs35789560	9	129615335	[A/G]	TOP	3562
rs41306702	9	129606498	[A/G]	TOP	1824
rs886016	9	135545449	[A/G]	TOP	1740
rs1801220	10	17208783	[T/A]	BOT	4305
rs1801224	10	17187527	[T/G]	BOT	1682
rs1801227	10	17147558	[T/C]	BOT	2043
rs1801237	10	16983456	[A/G]	TOP	4061
rs2228053	10	17185148	[G/C]	BOT	1954
rs57163243	10	16933412	[C/G]	TOP	634
rs57335729	10	17192936	[T/C]	BOT	5381
rs62619939	10	17007592	[C/G]	TOP	1227
rs74116778	10	17029277	[T/C]	BOT	2729
rs1143693	10	82030464	[A/C]	TOP	119
rs61734474	10	82024336	[C/G]	TOP	1587
rs72558181	10	82024913	[A/G]	TOP	4029
rs2020893	10	131224594	[A/G]	TOP	2420
rs3750824	10	131447564	[A/G]	TOP	1808
rs11254274	10	16997056	[A/G]	TOP	2204
rs11254354	10	17150171	[C/G]	TOP	1693
rs11254363	10	17170698	[T/C]	BOT	5799
rs11254385	10	17211767	[T/G]	BOT	1037
rs11254413	10	17244192	[T/C]	BOT	2057
rs12259370	10	17211181	[A/G]	TOP	1888

SNP ID	Chromosome	Chromosome position	SNP	Illumina® Strand	IllumiCode name
rs1276708	10	17029258	[T/C]	BOT	1990
rs1276712	10	17007406	[T/C]	BOT	2398
rs12917	10	131396272	[A/G]	TOP	1269
rs1801222	10	17196156	[A/G]	TOP	2934
rs1801229	10	17064620	[A/T]	TOP	1644
rs1801230	10	16917115	[A/G]	TOP	614
rs1801231	10	17064508	[T/C]	BOT	3858
rs1801240	10	16959002	[T/C]	BOT	913
rs1907362	10	17125598	[T/C]	BOT	2994
rs2271460	10	17002000	[T/G]	BOT	1151
rs2271462	10	17022066	[T/C]	BOT	1173
rs2282164	10	131396217	[G/C]	BOT	3981
rs2295809	10	17239876	[T/A]	BOT	3500
rs2308321	10	131455053	[A/G]	TOP	398
rs2308327	10	131455159	[A/G]	TOP	5009
rs2356590	10	17019611	[T/G]	BOT	3072
rs2796835	10	16983376	[G/C]	BOT	209
rs35597944	10	17250918	[A/G]	TOP	2402
rs3740168	10	16988395	[G/C]	BOT	5091
rs41289305	10	17019719	[T/C]	BOT	5858
rs45474496	10	16972495	[T/G]	BOT	6062
rs45551835	10	16972389	[T/C]	BOT	5237
rs45569534	10	16970424	[C/G]	TOP	2983
rs45588636	10	17127013	[T/G]	BOT	1225
rs4748353	10	17186672	[A/G]	TOP	742
rs7905349	10	17166388	[T/C]	BOT	4136
rs7928739	11	67590119	[A/C]	TOP	629

SNP ID	Chromosome	Chromosome position	SNP	Illumina® Strand	IllumiCode name
rs61886492	11	49142850	[T/C]	BOT	3968
rs13908	11	71607379	[T/C]	BOT	1959
rs2229185	11	71528223	[T/C]	BOT	3453
rs61734430	11	7152778	[T/C]	BOT	2485
rs150884181	11	59366403	[T/C]	BOT	1935
rs10839236	11	49149242	[A/G]	TOP	1776
rs11018628	11	88846158	[A/G]	TOP	4125
rs11041321	11	7310444	[A/G]	TOP	5104
rs11268	11	71610356	[T/G]	BOT	1772
rs11825834	11	59367990	[A/G]	TOP	5854
rs1801932	11	71584425	[G/C]	BOT	2249
rs1803128	11	49124955	[A/T]	TOP	5246
rs1803569	11	71609946	[A/C]	TOP	2016
rs202676	11	49184195	[T/C]	BOT	2932
rs202700	11	49173274	[A/G]	TOP	5985
rs202720	11	49148926	[C/G]	TOP	2342
rs2298444	11	71610061	[A/G]	TOP	4974
rs2851557	11	49154029	[A/G]	TOP	2901
rs34324219	11	59379953	[T/G]	BOT	1000
rs34528912	11	59388110	[A/G]	TOP	607
rs35211634	11	59369434	[A/G]	TOP	2892
rs35287646	11	59386687	[T/C]	BOT	4951
rs35867471	11	59361329	[T/C]	BOT	5157
rs36044892	11	59378841	[G/C]	BOT	480
rs508114	11	71528310	[T/G]	BOT	2216
rs526934	11	59390068	[A/G]	TOP	859
rs7128652	11	49178398	[T/C]	BOT	5784

SNP ID	Chromosome	Chromosome position	SNP	Illumina® Strand	IllumiCode name
rs7928649	11	71580946	[A/G]	TOP	2962
rs17851654	11	59377056	[A/C]	TOP	3160
rs12319666	12	55911047	[A/C]	TOP	5073
rs7311958	12	55899691	[A/G]	TOP	1876
rs11557162	12	55911788	[T/G]	BOT	3901
rs11557163	12	55911544	[C/G]	TOP	2898
rs11557165	12	55914091	[T/G]	BOT	1931
rs73338162	12	55910968	[T/C]	BOT	1060
rs1134469	14	102464922	[A/G]	TOP	4004
rs61731158	14	102460027	[A/G]	TOP	1595
rs11125	14	54681592	[T/A]	BOT	1407
rs11538647	14	54674657	[T/C]	BOT	5127
rs10813	14	63985918	[A/G]	TOP	4022
rs1803950	14	63994743	[A/G]	TOP	753
rs1803951	14	63986016	[A/C]	TOP	1746
rs10148371	14	54679170	[A/G]	TOP	1886
rs11551058	14	63963853	[A/C]	TOP	901
rs1950902	14	63952132	[A/G]	TOP	6110
rs2236224	14	63978903	[A/G]	TOP	6021
rs2236225	14	63978597	[T/C]	BOT	3826
rs34181110	14	63962222	[T/C]	BOT	1333
rs4644	14	54674687	[A/C]	TOP	3811
rs4652	14	54674788	[T/G]	BOT	1938
rs4902283	14	63954364	[A/G]	TOP	4041
rs2946655	15	63108990	[A/G]	TOP	3857
rs34507711	15	63082493	[T/G]	BOT	67
rs35302908	15	63095843	[A/G]	TOP	3027

SNP ID	Chromosome	Chromosome position	SNP	Illumina® Strand	IllumiCode name
rs6495446	15	77942036	[T/C]	BOT	3038
rs8923	15	77924614	[A/G]	TOP	2158
rs28364006	16	16135750	[A/G]	TOP	3908
rs35529209	16	16112826	[T/C]	BOT	2328
rs60782127	16	16049580	[A/C]	TOP	6107
rs8187844	16	16011183	[A/G]	TOP	430
rs8187848	16	16037841	[T/C]	BOT	3734
rs13337489	16	16116183	[G/C]	BOT	6130
rs28706727	16	16123377	[A/G]	TOP	1267
rs35587	16	16047214	[A/G]	TOP	2442
rs41395947	16	16009252	[G/C]	BOT	5933
rs4148356	16	16084775	[T/C]	BOT	2308
rs41494447	16	16009342	[A/G]	TOP	1326
rs45511401	16	16080732	[A/C]	TOP	3980
rs45517537	16	16091882	[A/G]	TOP	2059
rs8057331	16	16137911	[A/G]	TOP	720
rs4646406	17	17357894	[T/A]	BOT	1838
rs70959686	17	17421045	[A/G]	TOP	656
rs70965427	17	17349850	[A/G]	TOP	1340
rs1979277	17	18172820	[A/G]	TOP	1628
rs2168781	17	18181470	[G/C]	BOT	1634
rs41297067	17	23757174	[A/G]	TOP	1309
rs41297069	17	23757101	[T/C]	BOT	756
rs41297081	17	23756111	[T/A]	BOT	3030
rs7215148	17	18177240	[G/C]	BOT	4012
rs7946	17	17350284	[A/G]	TOP	5790
rs73291881	17	18184782	[T/C]	BOT	895

SNP ID	Chromosome	Chromosome position	SNP	Illumina® Strand	IllumiCode name
rs1001761	18	652102	[T/C]	BOT	984
rs11540153	18	659116	[A/G]	TOP	1276
rs2853533	18	648063	[C/G]	TOP	178
rs502396	18	649235	[A/G]	TOP	1862
rs59755869	18	652164	[G/C]	BOT	4046
rs57195458	19	8275999	[A/G]	TOP	5342
rs2228612	19	10134372	[T/C]	BOT	4044
rs1047781	19	53898443	[A/T]	TOP	2358
rs1800025	19	53898539	[T/C]	BOT	1825
rs1800028	19	53898629	[T/C]	BOT	2122
rs16999593	19	10152180	[A/G]	TOP	5293
rs17851582	19	1348442	[A/G]	TOP	5829
rs1800021	19	53898097	[T/C]	BOT	1331
rs1800022	19	53898436	[A/G]	TOP	2995
rs1800030	19	53898906	[T/C]	BOT	102
rs2232775	19	8279151	[T/C]	BOT	3481
rs2232786	19	8273426	[A/G]	TOP	2501
rs2336573	19	8273708	[T/C]	BOT	1550
rs492602	19	53898228	[T/C]	BOT	6140
rs602662	19	53898796	[A/G]	TOP	1078
rs975484	19	54872077	[G/C]	BOT	1563
rs11552694	20	32342323	[A/G]	TOP	2828
rs11552695	20	32345569	[A/T]	TOP	1079
rs13043752	20	32346968	[T/C]	BOT	186
rs41301825	20	32343902	[T/C]	BOT	1006
rs61735858	21	43358837	[T/C]	BOT	2794
rs71322503	21	43361732	[A/C]	TOP	5413

SNP ID	Chromosome	Chromosome position	SNP	Illumina® Strand	IllumiCode name
rs56829757	21	46398561	[A/C]	TOP	2776
rs61735838	21	46381661	[G/C]	BOT	2632
rs8788	21	33818983	[T/C]	BOT	1882
rs1051266	21	45782221	[A/G]	TOP	154
rs2124459	21	43348782	[T/C]	BOT	651
rs234705	21	43356840	[T/C]	BOT	764
rs234709	21	43360032	[A/G]	TOP	950
rs34040148	21	43361699	[A/C]	TOP	5074
rs35786590	21	45760102	[T/C]	BOT	2833
rs4920037	21	43354959	[T/C]	BOT	1559
rs5742905	21	43356252	[A/G]	TOP	2862
rs6586282	21	43351565	[A/G]	TOP	5397
rs7354779	21	44495197	[A/G]	TOP	1312
rs8133955	21	46398517	[A/G]	TOP	2913
rs8971	21	33805487	[T/C]	BOT	3937
rs56822323	21	45775241	[T/C]	BOT	3262
rs58836581	21	45760212	[T/C]	BOT	56
rs59841046	21	45760409	[T/C]	BOT	4086
rs11544670	22	18330076	[T/G]	BOT	5035
rs165599	22	18336781	[T/C]	BOT	2361
rs5031015	22	18331103	[A/G]	TOP	2406
rs737865	22	18310121	[A/G]	TOP	915
rs769224	22	18331804	[T/C]	BOT	2179
rs8192488	22	18331237	[A/G]	TOP	1046
rs1131603	22	29348974	[A/G]	TOP	6131
rs1801198	22	29341609	[G/C]	BOT	2298
rs35838082	22	29341349	[T/C]	BOT	3780

SNP ID	Chromosome	Chromosome position	SNP	Illumina® Strand	IllumiCode name
rs35915865	22	29338866	[A/G]	TOP	1989
rs4680	22	18331270	[A/G]	TOP	3919
rs4820889	22	29349043	[T/C]	BOT	1953
rs6267	22	18330262	[T/G]	BOT	920
rs9606756	22	29336859	[T/C]	BOT	3495
rs9621049	22	29343418	[A/G]	TOP	1784
rs17849434	22	29341387	[T/C]	BOT	5906
rs61743653	22	29341618	[C/G]	TOP	1850

Supplemental Table 3. SNPs with significant association with plasma homocysteine level in the 296 Crohn's disease patients

SNP	Chr.	Position	Gene Name	Major Allele (d)	Minor Allele (D)	Residue change	HGVS	Homozygous minor allele (DD)			Heterozygous (Dd)			Homozygous major allele (dd)			*P*-value[a]
								N	Median	IQR	N	Median	IQR	N	Median	IQR	
rs1801133	1	11778964	*MTHFR*	G	A	Ala222Val	665C>T	30	**16.1**	9.0	124	**12.5**	6.8	119	**11.3**	5.9	0.0006
rs41268685	2	169704315	*LRP2*	G	A	Gly4417Asp	13250G>A	0	—	—	11	**9.1**	2.7	262	**12.6**	7.0	0.0109
rs202700	11	49173274	*FOLH1*	G	A	—	412-2253G>A	14	**17.0**	5.7	117	**12.5**	6.5	142	**12.3**	6.9	0.0232
rs34564141	2	169693583	*LRP2*	G	A	Met4601Ile	13803G>A	0	—	—	7	**8.9**	2.9	267	**12.6**	7.0	0.0248
rs17848169	2	169768848	*LRP2*	A	G	Asn2632Asp	7894A>G	0	—	—	19	**10.7**	3.4	255	**12.6**	7.0	0.0293
rs1999594	1	11881802	—	G	A	—	—	47	**10.8**	5.7	136	**12.0**	6.6	90	**13.5**	6.7	0.0322
rs34291900	2	169837792	*LRP2*	G	A	Gly669Asp	2006G>A	0	—	—	13	**10.0**	3.4	260	**12.6**	7.0	0.0386
rs10839236	11	49149242	*FOLH1*	A	G	—	1308+80G>A	39	**14.5**	8.2	128	**11.8**	5.6	107	**12.5**	7.0	0.0398
rs13043752	20	32346968	*AHCY*	G	A	Arg10Trp	112C>T	0	—	—	8	**15.1**	7.0	266	**12.3**	6.9	0.0484

NOTE. SNP: single nucleotide polymorphism; Chr.: chromosome; HGVS: *Human Genome Variation Society*; N: number of subjects; IQR: interquartile range; ***MTHFR****: methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H);* ***LRP2****: low density lipoprotein receptor-related protein 2;* ***FOLH1****: folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1;* ***AHCY****: adenosylhomocysteinase.*

[a] Kruskal-Wallis test.

Supplemental Table 4. Marker statistics of the SNPs significantly associated with plasma homocysteine level in the 296 Crohn's disease patients

SNP	Chr.	Position	Gene Name	Call Rate	Number of Alleles	Minor Allele (D)	Minor Allele Freq.	Major Allele (d)	Major Allele Freq.	HWE *P*-value	Genotype Count				Allele count		
											DD	Dd	dd	Missing	D	d	Missing
rs1801133	1	11778964	*MTHFR*	0.944	2	A	0.331	G	0.669	0.680	26	114	111	15	166	336	30
rs41268685	2	169704315	*LRP2*	0.944	2	A	0.018	G	0.982	0.772	0	9	242	15	9	493	30
rs202700	11	49173274	*FOLH1*	0.944	2	A	0.263	G	0.737	0.081	12	108	131	15	132	370	30
rs34564141	2	169693583	*LRP2*	0.947	2	A	0.012	G	0.988	0.848	0	6	246	14	6	498	28
rs17848169	2	169768848	*LRP2*	0.947	2	G	0.034	A	0.966	0.579	0	17	235	14	17	487	28
rs1999594	1	11881802	—	0.947	2	A	0.415	G	0.585	0.387	40	129	83	14	209	295	28
rs34291900	2	169837792	*LRP2*	0.944	2	A	0.022	G	0.978	0.723	0	11	240	15	11	491	30
rs10839236	11	49149242	*FOLH1*	0.947	2	G	0.371	A	0.629	0.852	34	119	99	14	187	317	28
rs13043752	20	32346968	*AHCY*	0.947	2	A	0.016	G	0.984	0.798	0	8	244	14	8	496	28

NOTE. SNP: single nucleotide polymorphism; Chr.: chromosome; DD: homozygous minor allele; Dd: heterozygous; dd: homozygous major allele; WHE: Hardy-Weinberg Equilibrium; ***MTHFR****: methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H);* ***LRP2****: low density lipoprotein receptor-related protein 2;* ***FOLH1****: folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1;* ***AHCY****: adenosylhomocysteinase.*

Supplemental Table 5. SNPs with significant association with plasma superoxide dismutase level in the 296 Crohn's disease patients

SNP	Chr.	Position	Gene Name	Major Allele	Minor Allele	Residue change	HGVS	Homozygous minor allele (DD)			Heterozygous (Dd)			Homozygous major allele (dd)			*P*-value[a]
								N	Median	IQR	N	Median	IQR	N	Median	IQR	
rs4920037	21	43354959	*CBS*	G	A	—	44481891G>A	11	1063.5	151.75	92	1198	257	171	1098	232	0.01601
rs719235	8	64114234	*GGH*	C	A	—	63951681C>A	15	1078	168	110	1098	280	148	1183	277.25	0.01916
rs11254363	10	17170698	*CUBN*	A	G	—	17130693A>G	23	1101	241.5	111	1080	244	140	1185	278	0.01978
rs9606756	22	29336859	*TCN2*	A	G	Ile23Val	67A>G	6	1420	276	59	1187.5	309.25	209	1106	265.75	0.02412
rs41301825	20	32343902	*AHCY*	G	A	Gly123Arg	367G>A	0	—	—	6	987	208	266	1130	272	0.02920
rs492602	19	53898228	*FUT2*	A	G	Ala68=	204A>G	62	1198	303	124	1140	232	86	1093	311	0.03686
rs234709	21	43360032	*CBS*	G	A	—	317-477G>A	41	1092.5	296.5	149	1181	261	84	1067.5	206.75	0.03852
rs3918232	7	150337572	*NOS3*	G	A	—	2479G>A	0	—	—	2	872	18	272	1125	272	0.04032

NOTE. SNP: single nucleotide polymorphism; Chr.: chromosome; HGVS: *Human Genome Variation Society*; N: number of subjects; IQR: interquartile range; ***CBS****: cystathionine-beta-synthase;* ***GGH****: gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, folylpolygammaglutamyl hydrolase) ;* ***CUBN****: cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor);* ***TCN2****: transcobalamin II;* ***AHCY****: adenosylhomocysteinase;* ***FUT2****: fucosyltransferase 2 (secretor status included);* ***NOS3****: nitric oxide synthase 3 (endothelial cell).*

[a] Kruskal-Wallis test.

Supplemental Table 6. Marker statistics of the SNPs significantly associated with plasma superoxide dismutase level in the 296 Crohn's disease patients

SNP	Chr.	Position	Gene Name	Call Rate	Number of Alleles	Minor Allele (D)	Minor Allele Freq.	Major Allele (d)	Major Allele Freq.	HWE *P*-value	Genotype Count				Allele count		
											DD	Dd	dd	Missing	D	d	Missing
rs4920037	21	43354959	*CBS*	0.947	2	A	0.224	G	0.776	0.546	11	91	150	14	113	391	28
rs719235	8	64114234	*GGH*	0.944	2	A	0.265	C	0.735	0.241	14	105	132	15	133	369	30
rs11254363	10	17170698	*CUBN*	0.947	2	G	0.282	A	0.718	0.534	22	98	132	14	142	362	28
rs9606756	22	29336859	*TCN2*	0.947	2	G	0.137	A	0.863	0.496	6	57	189	14	69	435	28
rs41301825	20	32343902	*AHCY*	0.940	2	A	0.012	G	0.988	0.848	0	6	244	16	6	494	32
rs492602	19	53898228	*FUT2*	0.940	2	G	0.462	A	0.538	0.677	55	121	74	16	231	269	32
rs234709	21	43360032	*CBS*	0.947	2	A	0.425	G	0.575	0.055	38	138	76	14	214	290	28
rs3918232	7	150337572	*NOS3*	0.947	2	A	0.004	G	0.996	0.950	0	2	250	14	2	502	28

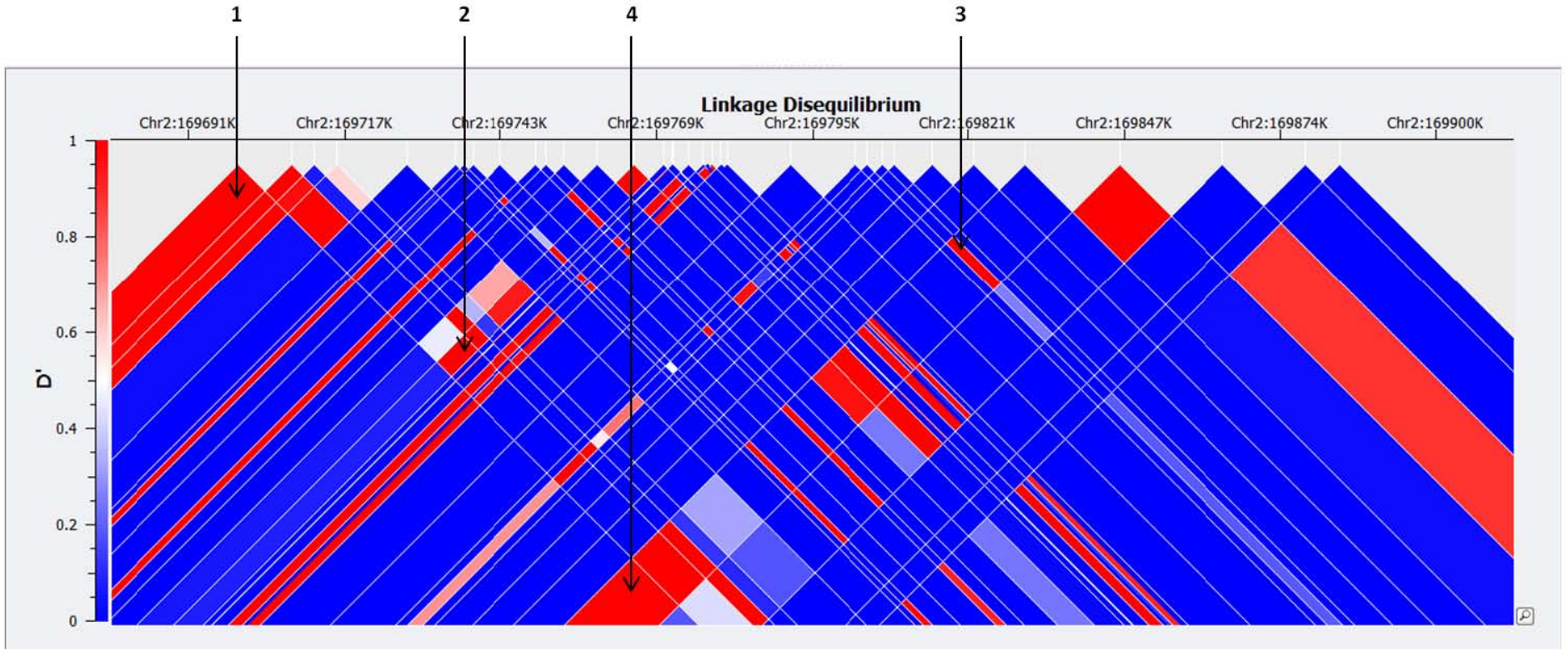
NOTE. SNP: single nucleotide polymorphism; Chr.: chromosome; DD: homozygous minor allele; Dd: heterozygous; dd: homozygous major allele; WHE: Hardy-Weinberg Equilibrium; ***CBS****: cystathionine-beta-synthase;* ***GGH****: gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, folylpolygammaglutamyl hydrolase) ;* ***CUBN****: cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor);* ***TCN2****: transcobalamin II;* ***AHCY****: adenosylhomocysteinase;* ***FUT2****: fucosyltransferase 2 (secretor status included);* ***NOS3****: nitric oxide synthase 3 (endothelial cell).*

Supplemental Table 7 online. Marker statistics of the SNPs significantly associated with age of disease onset in the 296 Crohn's disease patients

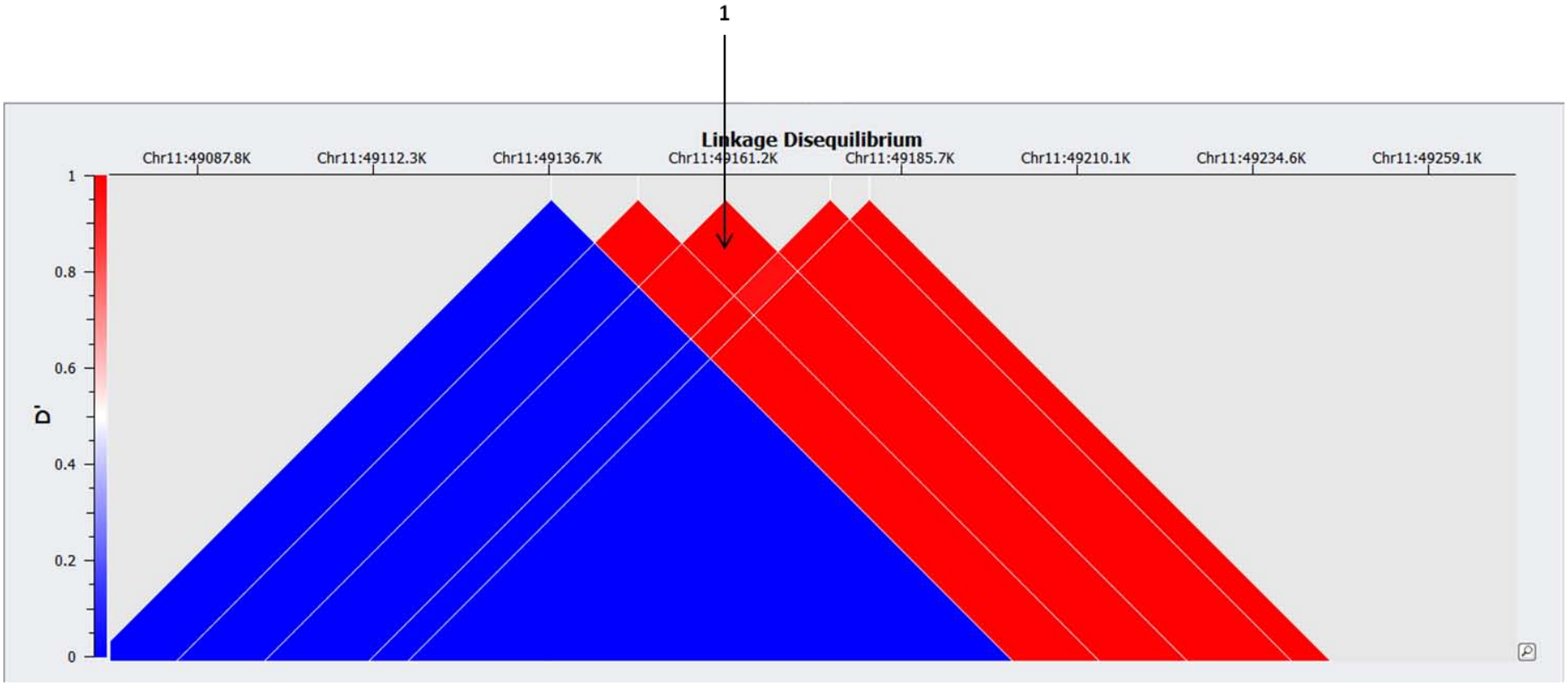
SNP	Chr.	Position	Gene Name	Call Rate	Number of Alleles	Minor Allele (D)	Minor Allele Freq.	Major Allele (d)	Major Allele Freq.	HWE P-value	Genotype Count				Allele Count		
											DD	Dd	dd	Missing	D	d	Missing
rs9001	3	53832957	CHDH	0.947	2	C	0.117	A	0.883	0.782	3	53	196	14	59	445	28
rs492602	19	53898228	FUT2	0.940	2	G	0.462	A	0.538	0.677	55	121	74	16	231	269	32
rs4820889	22	29349043	TCN2	0.947	2	A	0.026	G	0.974	0.674	0	13	239	14	13	491	28
rs1045642	7	86976580	ABCB1	0.947	2	A	0.476	G	0.524	0.427	54	132	66	14	240	264	28
rs1801394	5	7923972	MTRR	0.947	2	A	0.498	G	0.502	0.257	58	135	59	14	251	253	28
rs202676	11	49184195	FOLH1	0.940	2	G	0.216	A	0.784	0.171	8	92	150	16	108	392	32
rs202720	11	49148926	FOLH1	0.947	2	C	0.216	G	0.784	0.159	8	93	151	14	109	395	28
rs1208	8	18302595	NAT2	0.940	2	G	0.418	A	0.582	0.224	39	131	80	16	209	291	32

NOTE. SNP: single nucleotide polymorphism; Chr.: chromosome; DD: homozygous minor allele; Dd: heterozygous; dd: homozygous major allele; WHE: Hardy-Weinberg Equilibrium; ***CHDH****: choline dehydrogenase;* ***FUT2****: fucosyltransferase 2 (secretor status included);* ***TCN2****: transcobalamin II;* ***ABCB1****: ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1;* ***MTRR****: 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase;* ***FOLH1****: folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1;* ***NAT2****: N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase)*

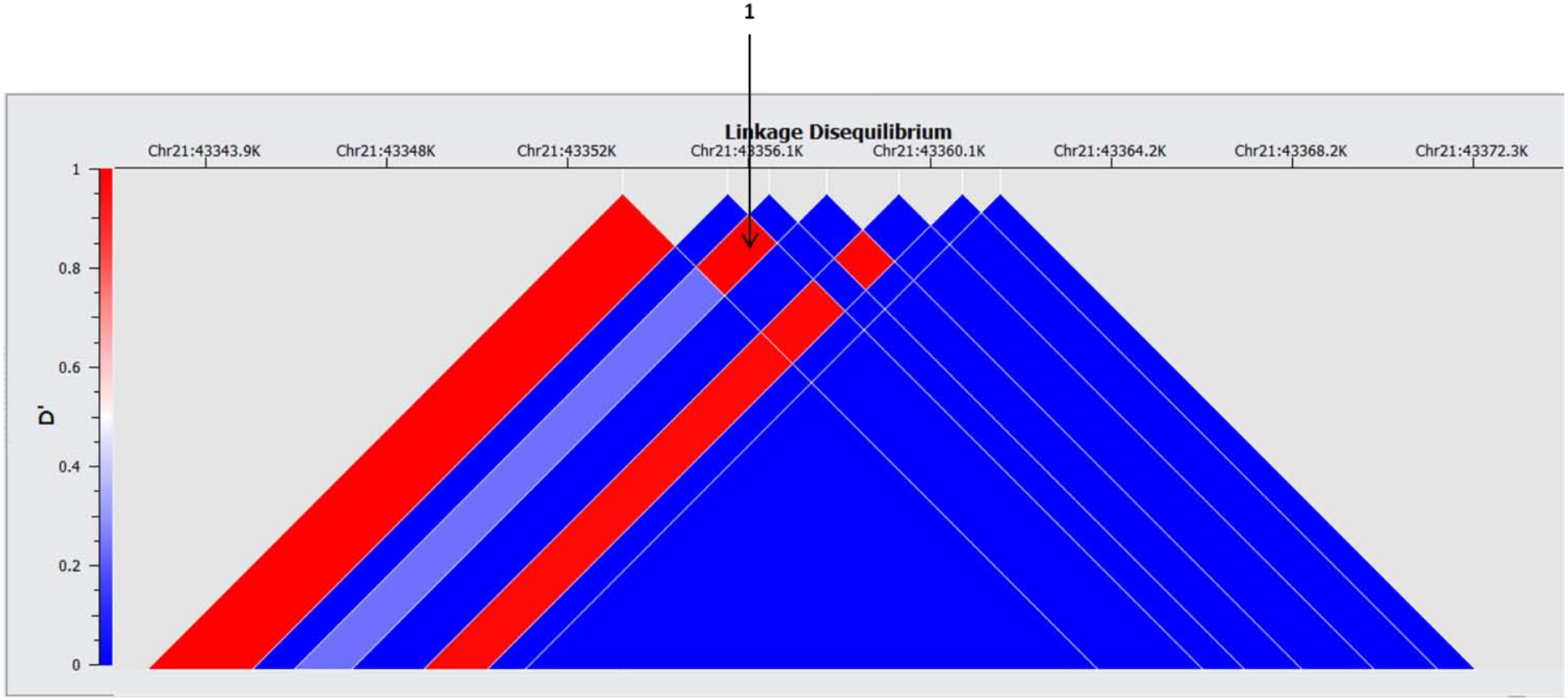
Supplemental Figure 1 online



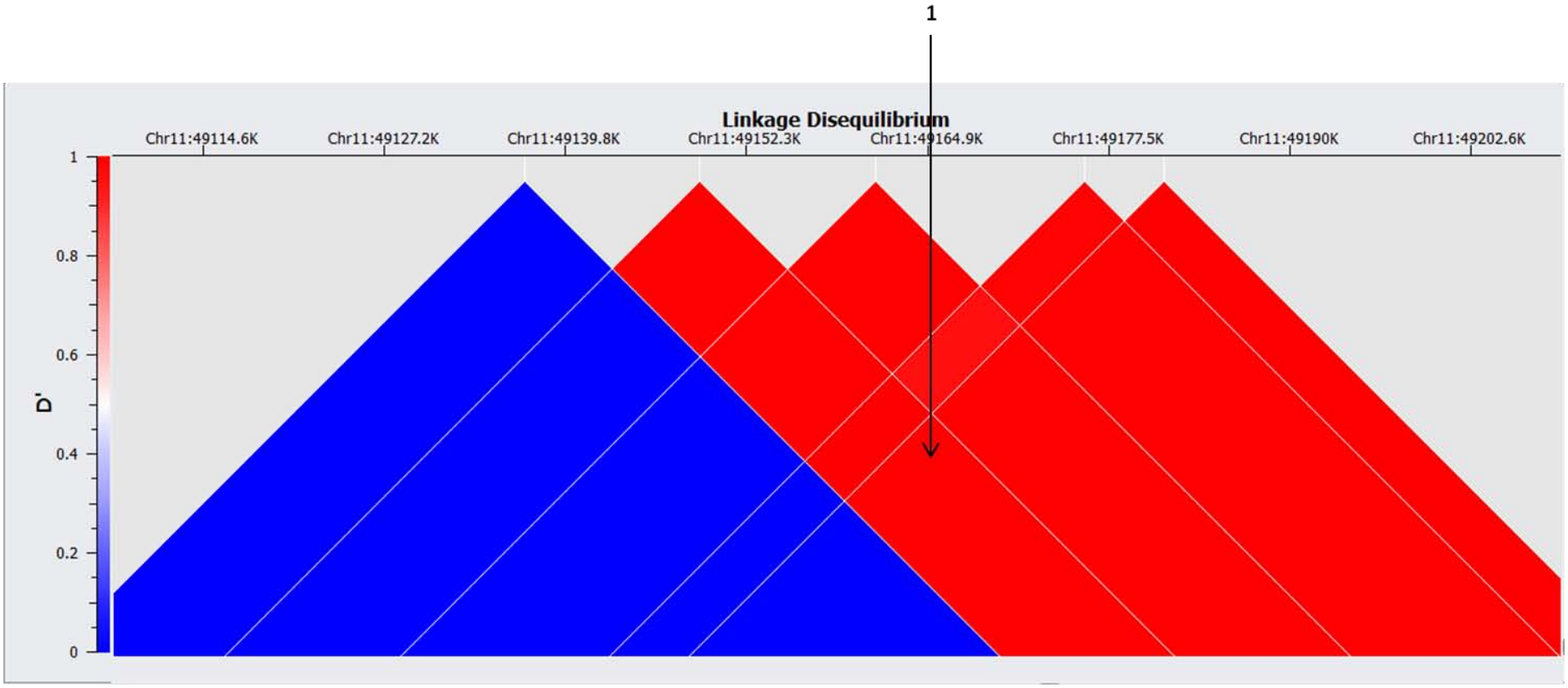
Supplemental Figure 2 online.



Supplemental Figure 3 online.



Supplemental Figure 4 online.



Supplemental Figures online legends

Supplemental Figure 1 online. SNPs in linkage disequilibrium on the *LRP2* gene (Chromosome 2); 1: rs34564141 – rs41268685, EM D' = 1; 2: rs41268685 – rs17848169, EM D' = 1; 3: rs17848149 – rs34291900; EM D' = 1; rs34564141 – rs34291900; EM D' = 1.

Supplemental Figure 2 online. SNPs in linkage disequilibrium on the *FOLH1* gene (Chromosome 11); 1: rs10839236 – rs202700; EM D' = 0.999958.

Supplemental Figure 3 online. SNPs in linkage disequilibrium on the *CBS* gene (Chromosome 21); 1: rs4920037 – rs234705; EM D' = 0.999928.

Supplemental Figure 4 online. SNPs in linkage disequilibrium on the *FOLH1* gene (Chromosome 11); 1: rs202720 – rs202676; EM D' = 1.

15 Références bibliographiques

1. Van den Veyver IB. Genetic effects of methylation diets. Annu Rev Nutr 2002;22:255-82.
2. Bailey RL, Carmel R, Green R, Pfeiffer CM, Cogswell ME, Osterloh JD, Sempos CT, Yetley EA. Monitoring of vitamin B-12 nutritional status in the United States by using plasma methylmalonic acid and serum vitamin B-12. Am J Clin Nutr 2011;94:552-61.
3. Perez-Perez GI, Rothenbacher D, Brenner H. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. Helicobacter 2004;9 Suppl 1:1-6.
4. Pounder RE, Ng D. The prevalence of Helicobacter pylori infection in different countries. Aliment Pharmacol Ther 1995;9 Suppl 2:33-9.
5. Malaty HM, Graham DY. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of Helicobacter pylori infection. Gut 1994;35:742-5.
6. Fiedorek SC, Malaty HM, Evans DL, Pumphrey CL, Casteel HB, Evans DJ, Jr., Graham DY. Factors influencing the epidemiology of Helicobacter pylori infection in children. Pediatrics 1991;88:578-82.
7. Kappelman MD, Rifas-Shiman SL, Kleinman K, Ollendorf D, Bousvaros A, Grand RJ, Finkelstein JA. The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States. Clin Gastroenterol Hepatol 2007;5:1424-9.
8. Loftus CG, Loftus EV, Jr., Harmsen WS, Zinsmeister AR, Tremaine WJ, Melton LJ, 3rd, Sandborn WJ. Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. Inflamm Bowel Dis 2007;13:254-61.
9. Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. Gastroenterology 2004;126:1504-17.

10. Sonnenberg A, Chang J. Time trends of physician visits for Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States, 1960-2006. Inflamm Bowel Dis 2008;14:249-52.

11. Nguyen GC, Tuskey A, Dassopoulos T, Harris ML, Brant SR. Rising hospitalization rates for inflammatory bowel disease in the United States between 1998 and 2004. Inflamm Bowel Dis 2007;13:1529-35.

12. Bodger K. Cost of illness of Crohn's disease. Pharmacoeconomics 2002;20:639-52.

13. Feagan BG, Vreeland MG, Larson LR, Bala MV. Annual cost of care for Crohn's disease: a payor perspective. Am J Gastroenterol 2000;95:1955-60.

14. Bernstein CN, Nabalamba A. Hospitalization, surgery, and readmission rates of IBD in Canada: a population-based study. Am J Gastroenterol 2006;101:110-8.

15. Faubion WA, Jr., Loftus EV, Jr., Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. Gastroenterology 2001;121:255-60.

16. Peyrin-Biroulet L, Cieza A, Sandborn WJ, Coenen M, Chowers Y, Hibi T, Kostanjsek N, Stucki G, Colombel JF. Development of the first disability index for inflammatory bowel disease based on the international classification of functioning, disability and health. Gut 2011.

17. Hazra A, Kraft P, Selhub J, Giovannucci EL, Thomas G, Hoover RN, Chanock SJ, Hunter DJ. Common variants of FUT2 are associated with plasma vitamin B12 levels. Nat Genet 2008;40:1160-2.

18. Hazra A, Kraft P, Lazarus R, Chen C, Chanock SJ, Jacques P, Selhub J, Hunter DJ. Genome-wide significant predictors of metabolites in the one-carbon metabolism pathway. Hum Mol Genet 2009;18:4677-87.

19. Tanaka T, Scheet P, Giusti B, Bandinelli S, Piras MG, Usala G, Lai S, Mulas A, Corsi AM, Vestrini A, Sofi F, Gori AM, Abbate R, Guralnik J, Singleton A, Abecasis GR, Schlessinger D, Uda M, Ferrucci L. Genome-wide association study of vitamin B6, vitamin B12, folate, and homocysteine blood concentrations. Am J Hum Genet 2009;84:477-82.

20. Kelly RJ, Rouquier S, Giorgi D, Lennon GG, Lowe JB. Sequence and expression of a candidate for the human Secretor blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene (FUT2). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype. J Biol Chem 1995;270:4640-9.

21. Selhub J. Homocysteine metabolism. Annu Rev Nutr 1999;19:217-46.

22. Nishio E, Watanabe Y. Homocysteine as a modulator of platelet-derived growth factor action in vascular smooth muscle cells: a possible role for hydrogen peroxide. Br J Pharmacol 1997;122:269-74.

23. Moat SJ, Bonham JR, Cragg RA, Powers HJ. Elevated plasma homocysteine elicits an increase in antioxidant enzyme activity. Free Radic Res 2000;32:171-9.

24. Peyrin-Biroulet L, Gueant-Rodriguez RM, Chen M, Bronowicki JP, Bigard MA, Gueant JL. Association of MTRR 66A>G polymorphism with superoxide dismutase and disease activity in patients with Crohn's disease. Am J Gastroenterol 2008;103:399-406.

25. Chen M, Peyrin-Biroulet L, George A, Coste F, Bressenot A, Bossenmeyer-Pourie C, Alberto JM, Xia B, Namour B, Gueant JL. Methyl deficient diet aggravates experimental colitis in rats. J Cell Mol Med 2010.

26. McPherson RA, Pincus MR, Henry JB. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. Saunders Elsevier, 2007.

27. Stabler SP, Allen RH. Vitamin B12 deficiency as a worldwide problem. Annu Rev Nutr 2004;24:299-326.

28. Antony AC. Vegetarianism and vitamin B-12 (cobalamin) deficiency. Am J Clin Nutr 2003;78:3-6.

29. Chitambar CR AA*Naohd*ISM, Shike M, Ross AC, Caballero C, Cousins RJ, ed. Modern nutrition in health and disease. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

30. Antony AC: *Megaloblastic anemias*. In: Hoffman R. Hematology : basic principles and practice. Churchill Livingstone/Elsevier, 2009.

31. Birn H. The kidney in vitamin B12 and folate homeostasis: characterization of receptors for tubular uptake of vitamins and carrier proteins. Am J Physiol Renal Physiol 2006;291:F22-36.

32. Beedholm-Ebsen R, van de Wetering K, Hardlei T, Nexo E, Borst P, Moestrup SK. Identification of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) as a molecular gate for cellular export of cobalamin. Blood 2010;115:1632-9.

33. Shah NP, Beech CM, Sturm AC, Tanner SM. Investigation of the ABC transporter MRP1 in selected patients with presumed defects in vitamin B12 absorption. Blood 2011;117:4397-8.

34. Carmel R. Ethnic and racial factors in cobalamin metabolism and its disorders. Semin Hematol 1999;36:88-100.

35. Olteanu H, Banerjee R. Human methionine synthase reductase, a soluble P-450 reductase-like dual flavoprotein, is sufficient for NADPH-dependent methionine synthase activation. J Biol Chem 2001;276:35558-63.

36. O'Leary VB, Parle-McDermott A, Molloy AM, Kirke PN, Johnson Z, Conley M, Scott JM, Mills JL. MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome? Am J Med Genet 2002;107:151-5.

37. Moestrup SK, Verroust PJ. Megalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia. Annu Rev Nutr 2001;21:407-28.

38. Chakravarty I, Sinha RK. Prevalence of micronutrient deficiency based on results obtained from the national pilot program on control of micronutrient malnutrition. Nutr Rev 2002;60:S53-8.

39. Misra A, Vikram NK, Pandey RM, Dwivedi M, Ahmad FU, Luthra K, Jain K, Khanna N, Devi JR, Sharma R, Guleria R. Hyperhomocysteinemia, and low intakes of folic acid and vitamin B12 in urban North India. Eur J Nutr 2002;41:68-77.

40. Sirotnak FM, Tolner B. Carrier-mediated membrane transport of folates in mammalian cells. Annu Rev Nutr 1999;19:91-122.

41. Balamurugan K, Said HM. Role of reduced folate carrier in intestinal folate uptake. Am J Physiol Cell Physiol 2006;291:C189-93.

42. Liu M, Ge Y, Cabelof DC, Aboukameel A, Heydari AR, Mohammad R, Matherly LH. Structure and regulation of the murine reduced folate carrier gene: identification of four noncoding exons and promoters and regulation by dietary folates. J Biol Chem 2005;280:5588-97.

43. Said HM, Chatterjee N, Haq RU, Subramanian VS, Ortiz A, Matherly LH, Sirotnak FM, Halsted C, Rubin SA. Adaptive regulation of intestinal folate uptake: effect of dietary folate deficiency. Am J Physiol Cell Physiol 2000;279:C1889-95.

44. Xiao S, Hansen DK, Horsley ET, Tang YS, Khan RA, Stabler SP, Jayaram HN, Antony AC. Maternal folate deficiency results in selective upregulation of folate receptors and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-E1 associated with multiple subtle aberrations in fetal tissues. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 2005;73:6-28.

45. Birn H, Zhai X, Holm J, Hansen SI, Jacobsen C, Christensen EI, Moestrup SK. Megalin binds and mediates cellular internalization of folate binding protein. FEBS J 2005;272:4423-30.

46. Antony AC. Folate receptors. Annu Rev Nutr 1996;16:501-21.

47. Hooijberg JH, Peters GJ, Assaraf YG, Kathmann I, Priest DG, Bunni MA, Veerman AJ, Scheffer GL, Kaspers GJ, Jansen G. The role of multidrug resistance proteins MRP1, MRP2 and MRP3 in cellular folate homeostasis. Biochem Pharmacol 2003;65:765-71.

48. Kerb R, Hoffmeyer S, Brinkmann U. ABC drug transporters: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2. Pharmacogenomics 2001;2:51-64.

49. Kooloos WM, Wessels JA, van der Straaten T, Allaart CF, Huizinga TW, Guchelaar HJ. Functional polymorphisms and methotrexate treatment outcome in recent-onset rheumatoid arthritis. Pharmacogenomics 2010;11:163-75.

50. van der Heijden JW, Oerlemans R, Tak PP, Assaraf YG, Kraan MC, Scheffer GL, van der Laken CJ, Lems WF, Scheper RJ, Dijkmans BA, Jansen G. Involvement of breast cancer resistance protein expression on rheumatoid arthritis synovial tissue macrophages in resistance to methotrexate and leflunomide. Arthritis Rheum 2009;60:669-77.

51. Bohanec Grabar P, Logar D, Lestan B, Dolzan V. Genetic determinants of methotrexate toxicity in rheumatoid arthritis patients: a study of polymorphisms affecting methotrexate transport and folate metabolism. Eur J Clin Pharmacol 2008;64:1057-68.

52. Ranganathan P, Culverhouse R, Marsh S, Mody A, Scott-Horton TJ, Brasington R, Joseph A, Reddy V, Eisen S, McLeod HL. Methotrexate (MTX) pathway gene

polymorphisms and their effects on MTX toxicity in Caucasian and African American patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol 2008;35:572-9.

53. Takatori R, Takahashi KA, Tokunaga D, Hojo T, Fujioka M, Asano T, Hirata T, Kawahito Y, Satomi Y, Nishino H, Tanaka T, Hirota Y, Kubo T. ABCB1 C3435T polymorphism influences methotrexate sensitivity in rheumatoid arthritis patients. Clin Exp Rheumatol 2006;24:546-54.

54. da Costa M, Rothenberg SP, Sadasivan E, Regec A, Qian L. Folate deficiency reduces the GPI-anchored folate-binding protein in rat renal tubules. Am J Physiol Cell Physiol 2000;278:C812-21.

55. Xiao X, Tang YS, Mackins JY, Sun XL, Jayaram HN, Hansen DK, Antony AC. Isolation and characterization of a folate receptor mRNA-binding trans-factor from human placenta. Evidence favoring identity with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1. J Biol Chem 2001;276:41510-7.

56. Low PS, Antony AC. Folate receptor-targeted drugs for cancer and inflammatory diseases. Advanced Drug Delivery Reviews 2004;56:1055-1058.

57. Matherly LH. Molecular and cellular biology of the human reduced folate carrier. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 2001;67:131-62.

58. Matherly LH, Goldman DI. Membrane transport of folates. Vitam Horm 2003;66:403-56.

59. Zhao R, Diop-Bove N, Visentin M, Goldman ID. Mechanisms of membrane transport of folates into cells and across epithelia. Annu Rev Nutr 2011;31:177-201.

60. Antony AC: *Megaloblastic anemias.* In: Cecil RL, Goldman, Lee, Schafer, Andrew I. Goldman's Cecil medicine. Elsevier/Saunders, 2012.

61. Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, Sandoval C, Zhao R, Akabas MH, Goldman ID. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. Cell 2006;127:917-28.

62. Suh JR, Herbig AK, Stover PJ. New perspectives on folate catabolism. Annu Rev Nutr 2001;21:255-82.

63. Cook R: *Folate metabolism*. In: Carmel R JD, ed. Homocysteine in health and disease. Cambridge University Press, 2001.

64. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. Am J Pathol 1969;56:111-28.

65. Wilcken DE, Wilcken B. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. J Clin Invest 1976;57:1079-82.

66. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. JAMA 1995;274:1049-57.

67. Kirke PN, Molloy AM, Daly LE, Burke H, Weir DG, Scott JM. Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. Q J Med 1993;86:703-8.

68. Bell IR, Edman JS, Selhub J, Morrow FD, Marby DW, Kayne HL, Cole JO. Plasma homocysteine in vascular disease and in nonvascular dementia of depressed elderly people. Acta Psychiatr Scand 1992;86:386-90.

69. Joosten E, Lesaffre E, Riezler R, Ghekiere V, Dereymaeker L, Pelemans W, Dejaeger E. Is metabolic evidence for vitamin B-12 and folate deficiency more frequent in elderly patients with Alzheimer's disease? J Gerontol A Biol Sci Med Sci 1997;52:M76-9.

70. McCaddon A, Davies G, Hudson P, Tandy S, Cattell H. Total serum homocysteine in senile dementia of Alzheimer type. Int J Geriatr Psychiatry 1998;13:235-9.

71. Riggs KM, Spiro A, 3rd, Tucker K, Rush D. Relations of vitamin B-12, vitamin B-6, folate, and homocysteine to cognitive performance in the Normative Aging Study. Am J Clin Nutr 1996;63:306-14.

72. Mudd SH, Ebert MH, Scriver CR. Labile methyl group balances in the human: the role of sarcosine. Metabolism 1980;29:707-20.

73. Mudd SH, Poole JR. Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. Metabolism 1975;24:721-35.

74. Eloranta TO, Martikainen V, Smith TK. Adaptation of adenosylmethionine metabolism and methionine recycling to variations in dietary methionine in the rat. Proc Soc Exp Biol Med 1990;194:364-71.

75. Finkelstein JD, Martin JJ. Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. J Biol Chem 1984;259:9508-13.

76. Koracevic D, Djordjevic V. Effect of trypsin, S-adenosylmethionine and ethionine on L-serine sulfhydrase activity. Experientia 1977;33:1010-1.

77. Kutzbach C, Stokstad EL. Feedback inhibition of methylene-tetrahydrofolate reductase in rat liver by S-adenosylmethionine. Biochim Biophys Acta 1967;139:217-20.

78. Kutzbach C, Stokstad EL. Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase. Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. Biochim Biophys Acta 1971;250:459-77.

79. Cabrero C, Duce AM, Ortiz P, Alemany S, Mato JM. Specific loss of the high-molecular-weight form of S-adenosyl-L-methionine synthetase in human liver cirrhosis. Hepatology 1988;8:1530-4.

80. Cabrero C, Puerta J, Alemany S. Purification and comparison of two forms of S-adenosyl-L-methionine synthetase from rat liver. Eur J Biochem 1987;170:299-304.

81. Okada G, Teraoka H, Tsukada K. Multiple species of mammalian S-adenosylmethionine synthetase. Partial purification and characterization. Biochemistry 1981;20:934-40.

82. Balaghi M, Horne DW, Wagner C. Hepatic one-carbon metabolism in early folate deficiency in rats. Biochem J 1993;291 (Pt 1):145-9.

83. Cook RJ, Wagner C. Glycine N-methyltransferase is a folate binding protein of rat liver cytosol. Proc Natl Acad Sci U S A 1984;81:3631-4.

84. Wagner C, Briggs WT, Cook RJ. Inhibition of glycine N-methyltransferase activity by folate derivatives: implications for regulation of methyl group metabolism. Biochem Biophys Res Commun 1985;127:746-52.

85. Miller JW, Nadeau MR, Smith J, Smith D, Selhub J. Folate-deficiency-induced homocysteinaemia in rats: disruption of S-adenosylmethionine's co-ordinate regulation of homocysteine metabolism. Biochem J 1994;298 (Pt 2):415-9.

86. Miller JW, Ribaya-Mercado JD, Russell RM, Shepard DC, Morrow FD, Cochary EF, Sadowski JA, Gershoff SN, Selhub J. Effect of vitamin B-6 deficiency on fasting plasma homocysteine concentrations. Am J Clin Nutr 1992;55:1154-60.

87. Smolin LA, Benevenga NJ. Factors affecting the accumulation of homocyst(e)ine in rats deficient in vitamin B-6. J Nutr 1984;114:103-11.

88. Miller JW, Nadeau MR, Smith D, Selhub J. Vitamin B-6 deficiency vs folate deficiency: comparison of responses to methionine loading in rats. Am J Clin Nutr 1994;59:1033-9.

89. Scriver CR. The metabolic & molecular bases of inherited disease. McGraw-Hill, 2001.

90. Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. Am J Hum Genet 1988;43:414-21.

91. Kanwar YS, Manaligod JR, Wong PW. Morphologic studies in a patient with homocystinuria due to 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. Pediatr Res 1976;10:598-609.

92. Levy HL, Mudd SH, Schulman JD, Dreyfus PM, Abeles RH. A derangement in B12 metabolism associated with homocystinemia, cystathioninemia, hypomethioninemia and methylmalonic aciduria. Am J Med 1970;48:390-7.

93. Mudd SH, Levy H, Morrow G, 3rd. Deranged B 12 metabolism: effects on sulfur amino acid metabolism. Biochem Med 1970;4:193-214.

94. Mudd SH, Uhlendorf BW, Freeman JM, Finkelstein JD, Shih VE. Homocystinuria associated with decreased methylenetetrahydrofolate reductase activity. Biochem Biophys Res Commun 1972;46:905-12.

95. Takenaka T, Shimomura T, Nakayasu H, Urakami K, Takahashi K. [Effect of folic acid for treatment of homocystinuria due to 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency]. Rinsho Shinkeigaku 1993;33:1140-5.

96. Selhub J, Miller JW. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. Am J Clin Nutr 1992;55:131-8.

97. Applegarth DA, Hardwick DF, Ingram F, Auckland NL, Bozoian G. Excretion of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in homocystinuria. N Engl J Med 1971;285:1265-6.

98. Brattstrom L, Israelsson B, Norrving B, Bergqvist D, Thorne J, Hultberg B, Hamfelt A. Impaired homocysteine metabolism in early-onset cerebral and peripheral occlusive

arterial disease. Effects of pyridoxine and folic acid treatment. Atherosclerosis 1990;81:51-60.

99. Brattstrom LE, Israelsson B, Jeppsson JO, Hultberg BL. Folic acid--an innocuous means to reduce plasma homocysteine. Scand J Clin Lab Invest 1988;48:215-21.

100. Dillon MJ, England JM, Gompertz D, Goodey PA, Grant DB, Hussein HA, Linnell JC, Matthews DM, Mudd SH, Newns GH, Seakins JW, Uhlendorf BW, Wise IJ. Mental retardation, megaloblastic anaemia, methylmalonic aciduria and abnormal homocysteine metabolism due to an error in vitamin B12 metabolism. Clin Sci Mol Med 1974;47:43-61.

101. Dudman NP, Wilcken DE, Wang J, Lynch JF, Macey D, Lundberg P. Disordered methionine/homocysteine metabolism in premature vascular disease. Its occurrence, cofactor therapy, and enzymology. Arterioscler Thromb 1993;13:1253-60.

102. Hollowell JG, Jr., Hall WK, Coryell ME, McPherson J, Jr., Hahn DA. Homocystinuria and organic aciduria in a patient with vitamin-B12 deficiency. Lancet 1969;2:1428.

103. Kang SS, Wong PW, Norusis M. Homocysteinemia due to folate deficiency. Metabolism 1987;36:458-62.

104. Kang SS, Wong PW, Zhou JM, Sora J, Lessick M, Ruggie N, Grcevich G. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in patients with coronary artery disease. Metabolism 1988;37:611-3.

105. Lin JY, Kang SS, Zhou JM, Wong PW. Homocysteinemia in rats induced by folic acid deficiency. Life Sci 1989;44:319-25.

106. Lindenbaum J, Healton EB, Savage DG, Brust JC, Garrett TJ, Podell ER, Marcell PD, Stabler SP, Allen RH. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. N Engl J Med 1988;318:1720-8.

107. Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J. Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry. J Clin Invest 1988;81:466-74.

108. Wilcken DE, Gupta VJ, Betts AK. Homocysteine in the plasma of renal transplant recipients: effects of cofactors for methionine metabolism. Clin Sci (Lond) 1981;61:743-9.

109. Boers GH, Fowler B, Smals AG, Trijbels FJ, Leermakers AI, Kleijer WJ, Kloppenborg PW. Improved identification of heterozygotes for homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency by the combination of methionine loading and enzyme determination in cultured fibroblasts. Hum Genet 1985;69:164-9.

110. Brattstrom L, Israelsson B, Lindgarde F, Hultberg B. Higher total plasma homocysteine in vitamin B12 deficiency than in heterozygosity for homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. Metabolism 1988;37:175-8.

111. Park YK, Linkswiler H. Effect of vitamin B6 depletion in adult man on the excretion of cystathionine and other methionine metabolites. J Nutr 1970;100:110-6.

112. Dalery K, Lussier-Cacan S, Selhub J, Davignon J, Latour Y, Genest J, Jr. 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.

113. Franken DG, Boers GH, Blom HJ, Trijbels JM. Effect of various regimens of vitamin B6 and folic acid on mild hyperhomocysteinaemia in vascular patients. J Inherit Metab Dis 1994;17:159-62.

114. Giannini MJ, Coleman M, Innerfield I. Letter: Antithrombin activity in homocystinuria. Lancet 1975;1:1094.

115. Girelli D, Friso S, Trabetti E, Olivieri O, Russo C, Pessotto R, Faccini G, Pignatti PF, Mazzucco A, Corrocher R. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation, plasma homocysteine, and folate in subjects from northern Italy with or without angiographically documented severe coronary atherosclerotic disease: evidence for an important genetic-environmental interaction. Blood 1998;91:4158-63.

116. Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AM, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. Nat Genet 1994;7:195-200.

117. Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. Am J Hum Genet 1991;48:536-45.

118. Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Boers GH, Frosst P, Stevens EM, van Oost BA, den Heijer M, Trijbels FJ, Rozen R, Blom HJ. 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.

119. Kluijtmans LA, Boers GH, Verbruggen B, Trijbels FJ, Novakova IR, Blom HJ. Homozygous cystathionine beta-synthase deficiency, combined with factor V Leiden or thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in the risk of venous thrombosis. Blood 1998;91:2015-8.

120. Kokame K, Kato H, Miyata T. Homocysteine-respondent genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis. GRP78/BiP and novel genes. J Biol Chem 1996;271:29659-65.

121. Kostulas K, Crisby M, Huang WX, Lannfelt L, Hagenfeldt L, Eggertsen G, Kostulas V, Hillert J. A methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in ischaemic stroke and in carotid artery stenosis. Eur J Clin Invest 1998;28:285-9.

122. Kozich V, Kraus E, de Franchis R, Fowler B, Boers GH, Graham I, Kraus JP. Hyperhomocysteinemia in premature arterial disease: examination of cystathionine beta-synthase alleles at the molecular level. Hum Mol Genet 1995;4:623-9.

123. Kozich V, Kraus JP. Screening for mutations by expressing patient cDNA segments in E. coli: homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. Hum Mutat 1992;1:113-23.

124. Naurath HJ, Joosten E, Riezler R, Stabler SP, Allen RH, Lindenbaum J. Effects of vitamin B12, folate, and vitamin B6 supplements in elderly people with normal serum vitamin concentrations. Lancet 1995;346:85-9.

125. Pancharuniti N, Lewis CA, Sauberlich HE, Perkins LL, Go RC, Alvarez JO, Macaluso M, Acton RT, Copeland RB, Cousins AL, et al. Plasma homocyst(e)ine, folate, and vitamin B-12 concentrations and risk for early-onset coronary artery disease. Am J Clin Nutr 1994;59:940-8.

126. Ubbink JB, Vermaak WJ, van der Merwe A, Becker PJ. Vitamin B-12, vitamin B-6, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. Am J Clin Nutr 1993;57:47-53.

127. van den Berg M, Franken DG, Boers GH, Blom HJ, Jakobs C, Stehouwer CD, Rauwerda JA. Combined vitamin B6 plus folic acid therapy in young patients with arteriosclerosis and hyperhomocysteinemia. J Vasc Surg 1994;20:933-40.

128. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. JAMA 1993;270:2693-8.

129. Goyette P, Frosst P, Rosenblatt DS, Rozen R. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. Am J Hum Genet 1995;56:1052-9.

130. Kang SS, Passen EL, Ruggie N, Wong PW, Sora H. Thermolabile defect of methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. Circulation 1993;88:1463-9.

131. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet 1995;10:111-3.

132. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. Circulation 1996;93:7-9.

133. Adams M, Smith PD, Martin D, Thompson JR, Lodwick D, Samani NJ. Genetic analysis of thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for myocardial infarction. QJM 1996;89:437-44.

134. Christensen B, Frosst P, Lussier-Cacan S, Selhub J, Goyette P, Rosenblatt DS, Genest J, Jr., Rozen R. Correlation of a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with plasma homocysteine in patients with premature coronary artery disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997;17:569-73.

135. Schwartz SM, Siscovick DS, Malinow MR, Rosendaal FR, Beverly RK, Hess DL, Psaty BM, Longstreth WT, Jr., Koepsell TD, Raghunathan TE, Reitsma PH. Myocardial infarction in young women in relation to plasma total homocysteine,

folate, and a common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. Circulation 1997;96:412-7.

136. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. Annu Rev Med 1998;49:31-62.

137. Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. J Clin Invest 1996;98:5-7.

138. Krieglstein CF, Cerwinka WH, Laroux FS, Salter JW, Russell JM, Schuermann G, Grisham MB, Ross CR, Granger DN. Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergent roles of superoxide and nitric oxide. J Exp Med 2001;194:1207-18.

139. McKenzie SJ, Baker MS, Buffinton GD, Doe WF. Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. J Clin Invest 1996;98:136-41.

140. Middleton SJ, Shorthouse M, Hunter JO. Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. Lancet 1993;341:465-6.

141. Tuzun A, Erdil A, Inal V, Aydin A, Bagci S, Yesilova Z, Sayal A, Karaeren N, Dagalp K. Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. Clin Biochem 2002;35:569-72.

142. Outinen PA, Sood SK, Pfeifer SI, Pamidi S, Podor TJ, Li J, Weitz JI, Austin RC. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. Blood 1999;94:959-67.

143. Upchurch GR, Jr., Welch GN, Fabian AJ, Freedman JE, Johnson JL, Keaney JF, Jr., Loscalzo J. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. J Biol Chem 1997;272:17012-7.

144. Koutroubakis IE, Malliaraki N, Dimoulios PD, Karmiris K, Castanas E, Kouroumalis EA. Decreased total and corrected antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci 2004;49:1433-7.

145. Collins T, Cybulsky MI. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? J Clin Invest 2001;107:255-64.

146. Au-Yeung KK, Woo CW, Sung FL, Yip JC, Siow YL, O K. Hyperhomocysteinemia activates nuclear factor-kappaB in endothelial cells via oxidative stress. Circ Res 2004;94:28-36.

147. Danese S, Sgambato A, Papa A, Scaldaferri F, Pola R, Sans M, Lovecchio M, Gasbarrini G, Cittadini A, Gasbarrini A. Homocysteine triggers mucosal microvascular activation in inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol 2005;100:886-95.

148. Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello PM, Robinson K, Jacobsen DW. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. Circulation 2001;103:2717-23.

149. Xu D, Neville R, Finkel T. Homocysteine accelerates endothelial cell senescence. FEBS Lett 2000;470:20-4.

150. Jones SC, Banks RE, Haidar A, Gearing AJ, Hemingway IK, Ibbotson SH, Dixon MF, Axon AT. Adhesion molecules in inflammatory bowel disease. Gut 1995;36:724-30.

151. Ratter F, Gassner C, Shatrov V, Lehmann V. Modulation of tumor necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity by changes of the cellular methylation state: mechanism and in vivo relevance. Int Immunol 1999;11:519-27.

152. Holven KB, Aukrust P, Retterstol K, Hagve TA, Morkrid L, Ose L, Nenseter MS. Increased levels of C-reactive protein and interleukin-6 in hyperhomocysteinemic subjects. Scand J Clin Lab Invest 2006;66:45-54.

153. Peyrin-Biroulet L, Vignal C, Dessein R, Simonet M, Desreumaux P, Chamaillard M. NODs in defence: from vulnerable antimicrobial peptides to chronic inflammation. Trends Microbiol 2006;14:432-8.

154. Fang FC. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. Nat Rev Microbiol 2004;2:820-32.

155. De Groote MA, Testerman T, Xu Y, Stauffer G, Fang FC. Homocysteine antagonism of nitric oxide-related cytostasis in Salmonella typhimurium. Science 1996;272:414-7.

156. Keller L, Surette MG. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. Nat Rev Microbiol 2006;4:249-58.

157. Brattstrom L, Lindgren A, Israelsson B, Andersson A, Hultberg B. Homocysteine and cysteine: determinants of plasma levels in middle-aged and elderly subjects. J Intern Med 1994;236:633-41.

158. Franken DG, Boers GH, Blom HJ, Trijbels FJ, Kloppenborg PW. Treatment of mild hyperhomocysteinemia in vascular disease patients. Arterioscler Thromb 1994;14:465-70.

159. Landgren F, Israelsson B, Lindgren A, Hultberg B, Andersson A, Brattstrom L. Plasma homocysteine in acute myocardial infarction: homocysteine-lowering effect of folic acid. J Intern Med 1995;237:381-8.

160. Ubbink JB, Vermaak WJ, van der Merwe A, Becker PJ, Delport R, Potgieter HC. Vitamin requirements for the treatment of hyperhomocysteinemia in humans. J Nutr 1994;124:1927-33.

161. Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. Nat Genet 1994;7:536-40.

162. Post WS, Goldschmidt-Clermont PJ, Wilhide CC, Heldman AW, Sussman MS, Ouyang P, Milliken EE, Issa JP. Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system. Cardiovasc Res 1999;43:985-91.

163. Issa JP, Ahuja N, Toyota M, Bronner MP, Brentnall TA. Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. Cancer Res 2001;61:3573-7.

164. Stancheva I, Meehan RR. Transient depletion of xDnmt1 leads to premature gene activation in Xenopus embryos. Genes Dev 2000;14:313-27.

165. Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, Torfs CP, Hine RJ, Pogribna M, Rozen R, James SJ. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. Am J Hum Genet 2000;67:623-30.

166. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, Yi P, Tafoya DL, Swenson DH, Wilson VL, Gaylor DW. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. Am J Clin Nutr 1999;70:495-501.

167. Juriloff DM, Harris MJ. Mouse models for neural tube closure defects. Hum Mol Genet 2000;9:993-1000.

168. Reynolds EH, Carney MW, Toone BK. Methylation and mood. Lancet 1984;2:196-8.

169. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. Nature 1986;321:209-13.

170. Costello JF, Plass C. Methylation matters. J Med Genet 2001;38:285-303.

171. Bestor T, Laudano A, Mattaliano R, Ingram V. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. J Mol Biol 1988;203:971-83.

172. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. Hum Mol Genet 2000;9:2395-402.

173. Hsieh CL. In vivo activity of murine de novo methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b. Mol Cell Biol 1999;19:8211-8.

174. Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. Nat Genet 1998;19:219-20.

175. Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. Cell 1992;71:865-73.

176. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. Cell 1992;69:915-26.

177. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. Cell 1999;99:247-57.

178. Howell CY, Bestor TH, Ding F, Latham KE, Mertineit C, Trasler JM, Chaillet JR. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. Cell 2001;104:829-38.

179. Kass SU, Pruss D, Wolffe AP. How does DNA methylation repress transcription? Trends Genet 1997;13:444-9.

180. Boyes J, Bird A. DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. Cell 1991;64:1123-34.

181. Meehan RR, Lewis JD, Bird AP. Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. Nucleic Acids Res 1992;20:5085-92.

182. Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL, Bird AP. Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. Cell 1989;58:499-507.

183. Nan X, Campoy FJ, Bird A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. Cell 1997;88:471-81.

184. Nan X, Tate P, Li E, Bird A. DNA methylation specifies chromosomal localization of MeCP2. Mol Cell Biol 1996;16:414-21.

185. Antequera F, Macleod D, Bird AP. Specific protection of methylated CpGs in mammalian nuclei. Cell 1989;58:509-17.

186. Keshet I, Lieman-Hurwitz J, Cedar H. DNA methylation affects the formation of active chromatin. Cell 1986;44:535-43.

187. Jones PA, Wolkowicz MJ, Rideout WM, 3rd, Gonzales FA, Marziasz CM, Coetzee GA, Tapscott SJ. De novo methylation of the MyoD1 CpG island during the establishment of immortal cell lines. Proc Natl Acad Sci U S A 1990;87:6117-21.

188. Larsen F, Solheim J, Prydz H. A methylated CpG island 3' in the apolipoprotein-E gene does not repress its transcription. Hum Mol Genet 1993;2:775-80.

189. Jones PA. The DNA methylation paradox. Trends Genet 1999;15:34-7.

190. Lopez-Serrano M, Fernandez MD, Pomar F, Pedreno MA, Ros Barcelo A. Zinnia elegans uses the same peroxidase isoenzyme complement for cell wall lignification in both single-cell tracheary elements and xylem vessels. J Exp Bot 2004;55:423-31.

191. Rougier N, Bourc'his D, Gomes DM, Niveleau A, Plachot M, Paldi A, Viegas-Pequignot E. Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. Genes Dev 1998;12:2108-13.

192. Monk M, Boubelik M, Lehnert S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. Development 1987;99:371-82.

193. Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W, Walter J. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. Curr Biol 2000;10:475-8.

194. Ng HH, Bird A. Histone deacetylases: silencers for hire. Trends Biochem Sci 2000;25:121-6.

195. Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. Nature 2001;410:120-4.

196. Nielsen SJ, Schneider R, Bauer UM, Bannister AJ, Morrison A, O'Carroll D, Firestein R, Cleary M, Jenuwein T, Herrera RE, Kouzarides T. Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. Nature 2001;412:561-5.

197. Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. Cell 1999;99:451-4.

198. Bird AP. Gene number, noise reduction and biological complexity. Trends Genet 1995;11:94-100.

199. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. Trends Genet 1997;13:335-40.

200. Finkelstein JD, Martin JJ, Harris BJ, Kyle WE. Regulation of hepatic betaine-homocysteine methyltransferase by dietary betaine. J Nutr 1983;113:519-21.

201. McKeever MP, Weir DG, Molloy A, Scott JM. Betaine-homocysteine methyltransferase: organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat. Clin Sci (Lond) 1991;81:551-6.

202. Chadwick LH, McCandless SE, Silverman GL, Schwartz S, Westaway D, Nadeau JH. Betaine-homocysteine methyltransferase-2: cDNA cloning, gene sequence, physical mapping, and expression of the human and mouse genes. Genomics 2000;70:66-73.

203. Jones PA. DNA methylation errors and cancer. Cancer Res 1996;56:2463-7.

204. Zingg JM, Jones PA. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. Carcinogenesis 1997;18:869-82.

205. Christman JK, Sheikhnejad G, Dizik M, Abileah S, Wainfan E. Reversibility of changes in nucleic acid methylation and gene expression induced in rat liver by severe dietary methyl deficiency. Carcinogenesis 1993;14:551-7.

206. Pascale RM, Marras V, Simile MM, Daino L, Pinna G, Bennati S, Carta M, Seddaiu MA, Massarelli G, Feo F. Chemoprevention of rat liver carcinogenesis by S-adenosyl-L-methionine: a long-term study. Cancer Res 1992;52:4979-86.

207. Wainfan E, Poirier LA. Methyl groups in carcinogenesis: effects on DNA methylation and gene expression. Cancer Res 1992;52:2071s-2077s.

208. Scott JM. Folate and vitamin B12. Proc Nutr Soc 1999;58:441-8.

209. Rozen R. Molecular genetics of methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. J Inherit Metab Dis 1996;19:589-94.

210. Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Hine RJ, James SJ. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. J Biol Chem 2000;275:29318-23.

211. Achon M, Reyes L, Alonso-Aperte E, Ubeda N, Varela-Moreiras G. High dietary folate supplementation affects gestational development and dietary protein utilization in rats. J Nutr 1999;129:1204-8.

212. Calvet JP, Chadwick LJ. Primary and secondary genetic responses after folic acid-induced acute renal injury in the mouse. J Am Soc Nephrol 1994;5:1324-32.

213. Zeisel SH. Choline: essential for brain development and function. Adv Pediatr 1997;44:263-95.

214. Zeisel SH, Zola T, daCosta KA, Pomfret EA. Effect of choline deficiency on S-adenosylmethionine and methionine concentrations in rat liver. Biochem J 1989;259:725-9.

215. Wolff GL, Kodell RL, Moore SR, Cooney CA. Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. FASEB J 1998;12:949-57.

216. Millian NS, Garrow TA. Human betaine-homocysteine methyltransferase is a zinc metalloenzyme. Arch Biochem Biophys 1998;356:93-8.

217. Essien FB, Wannberg SL. Methionine but not folinic acid or vitamin B-12 alters the frequency of neural tube defects in Axd mutant mice. J Nutr 1993;123:27-34.

218. Bottiglieri T, Hyland K, Reynolds EH. The clinical potential of ademetionine (S-adenosylmethionine) in neurological disorders. Drugs 1994;48:137-52.

219. Scott JM, Weir DG. The methyl folate trap. A physiological response in man to prevent methyl group deficiency in kwashiorkor (methionine deficiency) and an explanation for folic-acid induced exacerbation of subacute combined degeneration in pernicious anaemia. Lancet 1981;2:337-40.

220. Seetharam B, Alpers DH. Absorption and transport of cobalamin (vitamin B12). Annu Rev Nutr 1982;2:343-69.

221. Aimone-Gastin I, Pierson H, Jeandel C, Bronowicki JP, Plenat F, Lambert D, Nabet-Belleville F, Gueant JL. Prospective evaluation of protein bound vitamin B12 (cobalamin) malabsorption in the elderly using trout flesh labelled in vivo with 57Co-cobalamin. Gut 1997;41:475-9.

222. Carmel R, Aurangzeb I, Qian D. Associations of food-cobalamin malabsorption with ethnic origin, age, Helicobacter pylori infection, and serum markers of gastritis. Am J Gastroenterol 2001;96:63-70.

223. Annibale B, Capurso G, Delle Fave G. Consequences of Helicobacter pylori infection on the absorption of micronutrients. Dig Liver Dis 2002;34 Suppl 2:S72-7.

224. Peura DA CS*Hp*IS, Marvin H. Feldman, Mark Friedman, Lawrence S. Brandt, Lawrence J. Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease : pathophysiology, diagnosis, management. Saunders/Elsevier, 2010.

225. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. Clin Microbiol Rev 2006;19:449-90.

226. Ernst PB, Peura DA, Crowe SE. The translation of Helicobacter pylori basic research to patient care. Gastroenterology 2006;130:188-206; quiz 212-3.

227. Schubert ML, Peura DA. Control of gastric acid secretion in health and disease. Gastroenterology 2008;134:1842-60.

228. Suerbaum S, Michetti P. Helicobacter pylori infection. N Engl J Med 2002;347:1175-86.

229. Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interactions in Helicobacter pylori infection. Gastroenterology 2008;134:306-23.

230. Gillen D, McColl KE. Gastroduodenal disease, Helicobacter pylori, and genetic polymorphisms. Clin Gastroenterol Hepatol 2005;3:1180-6.

231. Kuipers EJ, Pena AS, van Kamp G, Uyterlinde AM, Pals G, Pels NF, Kurz-Pohlmann E, Meuwissen SG. Seroconversion for Helicobacter pylori. Lancet 1993;342:328-31.

232. Crabtree JE, Peichl P, Wyatt JI, Stachl U, Lindley IJ. Gastric interleukin-8 and IgA IL-8 autoantibodies in Helicobacter pylori infection. Scand J Immunol 1993;37:65-70.

233. Crowe SE, Alvarez L, Dytoc M, Hunt RH, Muller M, Sherman P, Patel J, Jin Y, Ernst PB. Expression of interleukin 8 and CD54 by human gastric epithelium after Helicobacter pylori infection in vitro. Gastroenterology 1995;108:65-74.

234. Dixon MF. Patterns of inflammation linked to ulcer disease. Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol 2000;14:27-40.

235. Karttunen R. Blood lymphocyte proliferation, cytokine secretion and appearance of T cells with activation surface markers in cultures with Helicobacter pylori. Comparison of the responses of subjects with and without antibodies to H. pylori. Clin Exp Immunol 1991;83:396-400.

236. Robinson K, Kenefeck R, Pidgeon EL, Shakib S, Patel S, Polson RJ, Zaitoun AM, Atherton JC. Helicobacter pylori-induced peptic ulcer disease is associated with inadequate regulatory T cell responses. Gut 2008;57:1375-85.

237. McColl KE. Clinical practice. Helicobacter pylori infection. N Engl J Med 2010;362:1597-604.

238. Smoot DT, Mobley HL, Chippendale GR, Lewison JF, Resau JH. Helicobacter pylori urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. Infect Immun 1990;58:1992-4.

239. Goggin PM, Marrero JM, Spychal RT, Jackson PA, Corbishley CM, Northfield TC. Surface hydrophobicity of gastric mucosa in Helicobacter pylori infection: effect of clearance and eradication. Gastroenterology 1992;103:1486-90.

240. Hills BA. Gastric mucosal barrier: evidence for Helicobacter pylori ingesting gastric surfactant and deriving protection from it. Gut 1993;34:588-93.

241. Mauch F, Bode G, Ditschuneit H, Malfertheiner P. Demonstration of a phospholipid-rich zone in the human gastric epithelium damaged by Helicobacter pylori. Gastroenterology 1993;105:1698-704.

242. Figura N, Guglielmetti P, Rossolini A, Barberi A, Cusi G, Musmanno RA, Russi M, Quaranta S. Cytotoxin production by Campylobacter pylori strains isolated from patients with peptic ulcers and from patients with chronic gastritis only. J Clin Microbiol 1989;27:225-6.

243. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Jr., Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. J Biol Chem 1995;270:17771-7.

244. Atherton JC. The clinical relevance of strain types of Helicobacter pylori. Gut 1997;40:701-3.

245. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. cag, a pathogenicity island of Helicobacter pylori, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93:14648-53.

246. van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer W, Quint W. Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of Helicobacter pylori. Gastroenterology 1998;115:58-66.

247. Peek RM, Jr., Miller GG, Tham KT, Perez-Perez GI, Zhao X, Atherton JC, Blaser MJ. Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA+ Helicobacter pylori strains. Lab Invest 1995;73:760-70.

248. Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Boren T, Rad R, Schepp W, Miehlke S, Classen M, Prinz C. Clinical relevance of the Helicobacter pylori gene for blood-group antigen-binding adhesin. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:12778-83.

249. Yamaoka Y, Kikuchi S, el-Zimaity HM, Gutierrez O, Osato MS, Graham DY. Importance of Helicobacter pylori oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. Gastroenterology 2002;123:414-24.

250. Boren T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S. Attachment of Helicobacter pylori to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. Science 1993;262:1892-5.

251. Ernst PB, Gold BD. The disease spectrum of Helicobacter pylori: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. Annu Rev Microbiol 2000;54:615-40.

252. Kuipers EJ. Review article: exploring the link between Helicobacter pylori and gastric cancer. Aliment Pharmacol Ther 1999;13 Suppl 1:3-11.

253. Kuipers EJ, Thijs JC, Festen HP. The prevalence of Helicobacter pylori in peptic ulcer disease. Aliment Pharmacol Ther 1995;9 Suppl 2:59-69.

254. Graham DY, Alpert LC, Smith JL, Yoshimura HH. Iatrogenic Campylobacter pylori infection is a cause of epidemic achlorhydria. Am J Gastroenterol 1988;83:974-80.

255. Marshall BJ, Armstrong JA, McGechie DB, Glancy RJ. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric Campylobacter. Med J Aust 1985;142:436-9.

256. Morris A, Nicholson G. Ingestion of Campylobacter pyloridis causes gastritis and raised fasting gastric pH. Am J Gastroenterol 1987;82:192-9.

257. Sobala GM, Crabtree JE, Dixon MF, Schorah CJ, Taylor JD, Rathbone BJ, Heatley RV, Axon AT. Acute Helicobacter pylori infection: clinical features, local and

systemic immune response, gastric mucosal histology, and gastric juice ascorbic acid concentrations. Gut 1991;32:1415-8.

258. Graham DY, Opekun AR, Osato MS, El-Zimaity HM, Lee CK, Yamaoka Y, Qureshi WA, Cadoz M, Monath TP. Challenge model for Helicobacter pylori infection in human volunteers. Gut 2004;53:1235-43.

259. Malaty HM, Engstrand L, Pedersen NL, Graham DY. Helicobacter pylori infection: genetic and environmental influences. A study of twins. Ann Intern Med 1994;120:982-6.

260. Kuipers EJ, Uyterlinde AM, Pena AS, Hazenberg HJ, Bloemena E, Lindeman J, Klinkenberg-Knol EC, Meuwissen SG. Increase of Helicobacter pylori-associated corpus gastritis during acid suppressive therapy: implications for long-term safety. Am J Gastroenterol 1995;90:1401-6.

261. El-Omar EM, Oien K, El-Nujumi A, Gillen D, Wirz A, Dahill S, Williams C, Ardill JE, McColl KE. Helicobacter pylori infection and chronic gastric acid hyposecretion. Gastroenterology 1997;113:15-24.

262. Ruiz B, Correa P, Fontham ET, Ramakrishnan T. Antral atrophy, Helicobacter pylori colonization, and gastric pH. Am J Clin Pathol 1996;105:96-101.

263. Verdu EF, Armstrong D, Fraser R, Viani F, Idstrom JP, Cederberg C, Blum AL. Effect of Helicobacter pylori status on intragastric pH during treatment with omeprazole. Gut 1995;36:539-43.

264. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF, Jr., Rabkin CS. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. Nature 2000;404:398-402.

265. Seetharam B: *Gastrointestinal absorption and transport of cobalamin (vitamin B12)*. In: Johnson LR, ed. Physiology of the Gastrointestinal Tract, New York: Raven Press; 1994:1997-2026.

266. Howden CW. Vitamin B12 levels during prolonged treatment with proton pump inhibitors. J Clin Gastroenterol 2000;30:29-33.

267. Kaptan K, Beyan C, Ural AU, Cetin T, Avcu F, Gulsen M, Finci R, Yalcin A. Helicobacter pylori--is it a novel causative agent in Vitamin B12 deficiency? Arch Intern Med 2000;160:1349-53.

268. Marino MC, de Oliveira CA, Rocha AM, Rocha GA, Clementino NC, Antunes LF, Oliveira RA, Martins AS, Del Puerto HL, D'Almeida V, Galdieri L, Pedroso ER, Cabral MM, Nogueira AM, Queiroz DM. Long-term effect of Helicobacter pylori eradication on plasma homocysteine in elderly patients with cobalamin deficiency. Gut 2007;56:469-74.

269. Sipponen P, Laxen F, Huotari K, Harkonen M. Prevalence of low vitamin B12 and high homocysteine in serum in an elderly male population: association with atrophic gastritis and Helicobacter pylori infection. Scand J Gastroenterol 2003;38:1209-16.

270. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barmada MM, Bitton A, Dassopoulos T, Datta LW, Green T, Griffiths AM, Kistner EO, Murtha MT, Regueiro MD, Rotter JI, Schumm LP, Steinhart AH, Targan SR, Xavier RJ, Libioulle C, Sandor C, Lathrop M, Belaiche J, Dewit O, Gut I, Heath S, Laukens D, Mni M, Rutgeerts P, Van Gossum A, Zelenika D, Franchimont D, Hugot JP, de Vos M, Vermeire S, Louis E, Cardon LR, Anderson CA, Drummond H, Nimmo E, Ahmad T, Prescott NJ, Onnie CM, Fisher SA, Marchini J, Ghori J, Bumpstead S, Gwilliam R, Tremelling M, Deloukas P, Mansfield J, Jewell D, Satsangi J, Mathew CG, Parkes M, Georges M, Daly MJ. Genome-wide association

defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. Nat Genet 2008;40:955-62.

271. Rocha R, Santana GO, Almeida N, Lyra AC. Analysis of fat and muscle mass in patients with inflammatory bowel disease during remission and active phase. Br J Nutr 2009;101:676-9.

272. Hartman C, Eliakim R, Shamir R. Nutritional status and nutritional therapy in inflammatory bowel diseases. World J Gastroenterol 2009;15:2570-8.

273. Saibeni S, Cattaneo M, Vecchi M, Zighetti ML, Lecchi A, Lombardi R, Meucci G, Spina L, de Franchis R. Low vitamin B(6) plasma levels, a risk factor for thrombosis, in inflammatory bowel disease: role of inflammation and correlation with acute phase reactants. Am J Gastroenterol 2003;98:112-7.

274. Fernandez-Banares F, Abad-Lacruz A, Xiol X, Gine JJ, Dolz C, Cabre E, Esteve M, Gonzalez-Huix F, Gassull MA. Vitamin status in patients with inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol 1989;84:744-8.

275. Kornbluth A, Sachar DB. Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American College Of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. Am J Gastroenterol 2010;105:501-23; quiz 524.

276. Meyers S, Janowitz HD. The "natural history" of ulcerative colitis: an analysis of the placebo response. J Clin Gastroenterol 1989;11:33-7.

277. Kappelman MD, Rifas-Shiman SL, Porter CQ, Ollendorf DA, Sandler RS, Galanko JA, Finkelstein JA. Direct health care costs of Crohn's disease and ulcerative colitis in US children and adults. Gastroenterology 2008;135:1907-13.

278. Hanauer SB, Sandborn W. Management of Crohn's disease in adults. Am J Gastroenterol 2001;96:635-43.

279. Sands BE. From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. Gastroenterology 2004;126:1518-32.

280. Lichtenstein GR, Yan S, Bala M, Hanauer S. Remission in patients with Crohn's disease is associated with improvement in employment and quality of life and a decrease in hospitalizations and surgeries. Am J Gastroenterol 2004;99:91-6.

281. Geboes K, Rutgeerts P, Opdenakker G, Olson A, Patel K, Wagner CL, Marano CW. Endoscopic and histologic evidence of persistent mucosal healing and correlation with clinical improvement following sustained infliximab treatment for Crohn's disease. Curr Med Res Opin 2005;21:1741-54.

282. Rutgeerts PJ. An historical overview of the treatment of Crohn's disease: why do we need biological therapies? Rev Gastroenterol Disord 2004;4 Suppl 3:S3-9.

283. Vermeire S, van Assche G, Rutgeerts P. Review article: Altering the natural history of Crohn's disease--evidence for and against current therapies. Aliment Pharmacol Ther 2007;25:3-12.

284. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. Nature 1996;379:821-3.

285. Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, Terwilliger JD, Lathrop GM, Bell JI, Jewell DP. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. Nat Genet 1996;14:199-202.

286. Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, Fields CT, LaBuda MC, Rohal PM, Pickles MR, Qin L, Fu Y, Mann JS, Kirschner BS, Jabs EW, Weber J, Hanauer SB, Bayless TM, Brant SR. Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on

chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:7502-7.

287. Ma Y, Ohmen JD, Li Z, Bentley LG, McElree C, Pressman S, Targan SR, Fischel-Ghodsian N, Rotter JI, Yang H. A genome-wide search identifies potential new susceptibility loci for Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 1999;5:271-8.

288. Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, Pfutzer R, Weeks DE. High-density genome scan in Crohn disease shows confirmed linkage to chromosome 14q11-12. Am J Hum Genet 2000;66:1857-62.

289. Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, McLeod RS, Griffiths AM, Green T, Brettin TS, Stone V, Bull SB, Bitton A, Williams CN, Greenberg GR, Cohen Z, Lander ES, Hudson TJ, Siminovitch KA. Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. Am J Hum Genet 2000;66:1863-70.

290. Budarf ML, Labbe C, David G, Rioux JD. GWA studies: rewriting the story of IBD. Trends Genet 2009;25:137-46.

291. Cho JH. Genome-wide association studies: present status and future directions. Gastroenterology 2010;138:1668-1672 e1.

292. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, De La Vega FM, Briggs J, Gunther S, Prescott NJ, Onnie CM, Hasler R, Sipos B, Folsch UR, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M, Schreiber S. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. Nat Genet 2007;39:207-11.

293. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, Green T, Kuballa P, Barmada MM, Datta LW, Shugart YY, Griffiths AM, Targan SR, Ippoliti AF, Bernard EJ, Mei L, Nicolae DL, Regueiro M, Schumm LP, Steinhart AH, Rotter

JI, Duerr RH, Cho JH, Daly MJ, Brant SR. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. Nat Genet 2007;39:596-604.

294. Yakut M, Ustun Y, Kabacam G, Soykan I. Serum vitamin B12 and folate status in patients with inflammatory bowel diseases. Eur J Intern Med 2010;21:320-3.

295. Headstrom PD, Rulyak SJ, Lee SD. Prevalence of and risk factors for vitamin B(12) deficiency in patients with Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 2008;14:217-23.

296. Vagianos K, Bector S, McConnell J, Bernstein CN. Nutrition assessment of patients with inflammatory bowel disease. JPEN J Parenter Enteral Nutr 2007;31:311-9.

297. Pedersen NT, Rannem T. A triple isotope technique for estimation of fat and vitamin B12 malabsorption in Crohn's disease. Scand J Gastroenterol 1991;26:307-12.

298. Imes S, Pinchbeck BR, Dinwoodie A, Walker K, Thomson AB. Iron, folate, vitamin B-12, zinc, and copper status in outpatients with Crohn's disease: effect of diet counseling. J Am Diet Assoc 1987;87:928-30.

299. Farivar S, Fromm H, Schindler D, McJunkin B, Schmidt FW. Tests of bile-acid and vitamin B12 metabolism in ileal Crohn's disease. Am J Clin Pathol 1980;73:69-74.

300. Lenz K. The effect of the site of lesion and extent of resection on duodenal bile acid concentration and vitamin B12 absorption in Crohn's disease. Scand J Gastroenterol 1975;10:241-8.

301. Dyer NH, Dawson AM. Malnutrition and malabsorption in Crohn's disease with reference to the effect of surgery. Br J Surg 1973;60:134-40.

302. Dotevall G, Kock NG. Absorption studies in regional enterocolitis (Mb. Crohn). Scand J Gastroenterol 1968;3:293-8.

303. Duerksen DR, Fallows G, Bernstein CN. Vitamin B12 malabsorption in patients with limited ileal resection. Nutrition 2006;22:1210-3.

304. O'Mahony S SF*EMaSIBO*IS, Marvin H. Feldman, Mark Friedman, Lawrence S. Brandt, Lawrence J. Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease : pathophysiology, diagnosis, management. Saunders/Elsevier, 2010.

305. Faber K: Perniciöse Anämie bei Dunndarmstricturen. Berl Klin Wochenschr 1897; 34:643.

306. King CE, Toskes PP. Small intestine bacterial overgrowth. Gastroenterology 1979;76:1035-55.

307. Giannella RA, Broitman SA, Zamcheck N. Competition between bacteria and intrinsic factor for vitamin B 12 : implications for vitamin B 12 malabsorption in intestinal bacterial overgrowth. Gastroenterology 1972;62:255-60.

308. Welkos SL, Toskes PP, Baer H. Importance of anaerobic bacteria in the cobalamin malabsorption of the experimental rat blind loop syndrome. Gastroenterology 1981;80:313-20.

309. Brandt LJ, Bernstein LH, Wagle A. Production of vitamin B 12 analogues in patients with small-bowel bacterial overgrowth. Ann Intern Med 1977;87:546-51.

310. Mollicone R, Bara J, Le Pendu J, Oriol R. Immunohistologic pattern of type 1 (Lea, Leb) and type 2 (X, Y, H) blood group-related antigens in the human pyloric and duodenal mucosae. Lab Invest 1985;53:219-27.

311. Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, Stewart P, LePendu J, Baric R. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. Nat Med 2003;9:548-53.

312. Peyrin-Biroulet L, Rodriguez-Gueant RM, Chamaillard M, Desreumaux P, Xia B, Bronowicki JP, Bigard MA, Gueant JL. Vascular and cellular stress in inflammatory bowel disease: revisiting the role of homocysteine. Am J Gastroenterol 2007;102:1108-15.

313. Mansoor MA, Bergmark C, Svardal AM, Lonning PE, Ueland PM. Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with early-onset peripheral vascular disease. Homocysteine and peripheral vascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995;15:232-40.

314. Mahmud N, Molloy A, McPartlin J, Corbally R, Whitehead AS, Scott JM, Weir DG. Increased prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase C677T variant in patients with inflammatory bowel disease, and its clinical implications. Gut 1999;45:389-94.

315. Li F, Watkins D, Rosenblatt DS. Vitamin B(12) and birth defects. Mol Genet Metab 2009;98:166-72.

316. Watanabe F. Vitamin B12 sources and bioavailability. Exp Biol Med (Maywood) 2007;232:1266-74.

317. Gueant JL, Elia M, Romano A. Associations between folate, vitamin B12, homocysteine and pathologies related to aging: the need to consider complex nutrient-nutrient and gene-nutrient interactions and the functional and socio-economic determinants in population-based studies. Clin Chem Lab Med 2007;45:127-9.

318. Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Debard R, Thirion S, Hong LX, Bronowicki JP, Namour F, Chabi NW, Sanni A, Anello G, Bosco P, Romano C, Amouzou E, Arrieta HR, Sanchez BE, Romano A, Herbeth B, Guilland JC, Mutchinick OM. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. Am J Clin Nutr 2006;83:701-7.

319. Gueant JL, Chabi NW, Gueant-Rodriguez RM, Mutchinick OM, Debard R, Payet C, Lu X, Villaume C, Bronowicki JP, Quadros EV, Sanni A, Amouzou E, Xia B, Chen M, Anello G, Bosco P, Romano C, Arrieta HR, Sanchez BE, Romano A, Herbeth B,

Anwar W, Namour F. Environmental influence on the worldwide prevalence of a 776C->G variant in the transcobalamin gene (TCN2). J Med Genet 2007;44:363-7.

320. Amouzou EK, Chabi NW, Adjalla CE, Rodriguez-Gueant RM, Feillet F, Villaume C, Sanni A, Gueant JL. High prevalence of hyperhomocysteinemia related to folate deficiency and the 677C-->T mutation of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase in coastal West Africa. Am J Clin Nutr 2004;79:619-24.

321. Battaglia-Hsu SF, Akchiche N, Noel N, Alberto JM, Jeannesson E, Orozco-Barrios CE, Martinez-Fong D, Daval JL, Gueant JL. Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:21930-5.

322. Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. Am J Epidemiol 2009;169:505-14.

323. Conover WJ. Practical nonparametric statistics. John Wiley, 1999.

324. Magalhaes A, Gomes J, Ismail MN, Haslam SM, Mendes N, Osorio H, David L, Le Pendu J, Haas R, Dell A, Boren T, Reis CA. Fut2-null mice display an altered glycosylation profile and impaired BabA-mediated Helicobacter pylori adhesion to gastric mucosa. Glycobiology 2009;19:1525-36.

325. Azevedo M, Eriksson S, Mendes N, Serpa J, Figueiredo C, Resende LP, Ruvoen-Clouet N, Haas R, Boren T, Le Pendu J, David L. Infection by Helicobacter pylori expressing the BabA adhesin is influenced by the secretor phenotype. J Pathol 2008;215:308-16.

326. Stettin D, Waldmann A, Strohle A, Hahn A. Association between Helicobacter pylori-infection, C-reactive protein and status of B vitamins. Adv Med Sci 2008;53:205-13.

327. Adamu MA, Weck MN, Rothenbacher D, Brenner H. Incidence and risk factors for the development of chronic atrophic gastritis: five year follow-up of a population-based cohort study. Int J Cancer 2011;128:1652-8.

328. Moore SE, Mansoor MA, Bates CJ, Prentice AM. Plasma homocysteine, folate and vitamin B(12) compared between rural Gambian and UK adults. Br J Nutr 2006;96:508-15.

329. Ray JG. Meta-analysis of hyperhomocysteinemia as a risk factor for venous thromboembolic disease. Arch Intern Med 1998;158:2101-6.

330. Lambert D, Benhayoun S, Adjalla C, Gelot MA, Renkes P, Felden F, Gerard P, Belleville F, Gaucher P, Gueant JL, Nicolas JP. Crohn's disease and vitamin B12 metabolism. Dig Dis Sci 1996;41:1417-22.

331. Gueant JL, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Bosco P, Brunaud L, Romano C, Ferri R, Romano A, Candito M, Namour B. Genetic determinants of folate and vitamin B12 metabolism: a common pathway in neural tube defect and Down syndrome? Clin Chem Lab Med 2003;41:1473-7.

332. Zintzaras E. Genetic variants of homocysteine/folate metabolism pathway and risk of inflammatory bowel disease: a synopsis and meta-analysis of genetic association studies. Biomarkers 2010;15:69-79.

333. Stroup DF, Berlin JA, Morton SC, Olkin I, Williamson GD, Rennie D, Moher D, Becker BJ, Sipe TA, Thacker SB. Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) group. JAMA 2000;283:2008-12.

334. Mantel N, Haenszel W. Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. J Natl Cancer Inst 1959;22:719-48.

335. DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. Control Clin Trials 1986;7:177-88.

336. Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. Measuring inconsistency in meta-analyses. BMJ 2003;327:557-60.

337. Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. BMJ 1997;315:629-34.

338. Rosenthal R. Meta-analytic procedures for social research. Sage Publications, 1984.

339. Cattaneo M, Vecchi M, Zighetti ML, Saibeni S, Martinelli I, Omodei P, Mannucci PM, de Franchis R. High prevalence of hyperchomocysteinemia in patients with inflammatory bowel disease: a pathogenic link with thromboembolic complications? Thromb Haemost 1998;80:542-5.

340. Chowers Y, Sela BA, Holland R, Fidder H, Simoni FB, Bar-Meir S. Increased levels of homocysteine in patients with Crohn's disease are related to folate levels. Am J Gastroenterol 2000;95:3498-502.

341. Koutroubakis IE, Dilaveraki E, Vlachonikolis IG, Vardas E, Vrentzos G, Ganotakis E, Mouzas IA, Gravanis A, Emmanouel D, Kouroumalis EA. Hyperhomocysteinemia in Greek patients with inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci 2000;45:2347-51.

342. Oldenburg B, Fijnheer R, van der Griend R, vanBerge-Henegouwen GP, Koningsberger JC. Homocysteine in inflammatory bowel disease: a risk factor for thromboembolic complications? Am J Gastroenterol 2000;95:2825-30.

343. Maire F, Beaugerie L, Cohen M, Deschamps A, Cosnes J, Capeau J, Gendre JP. [Factors associated with hyperhomocysteinemia in Crohn's disease]. Gastroenterol Clin Biol 2001;25:745-8.

344. Papa A, De Stefano V, Danese S, Chiusolo P, Persichilli S, Casorelli I, Zappacosta B, Giardina B, Gasbarrini A, Leone G, Gasbarrini G. Hyperhomocysteinemia and

prevalence of polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes in patients with inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol 2001;96:2677-82.

345. Romagnuolo J, Fedorak RN, Dias VC, Bamforth F, Teltscher M. Hyperhomocysteinemia and inflammatory bowel disease: prevalence and predictors in a cross-sectional study. Am J Gastroenterol 2001;96:2143-9.

346. Vasilopoulos S, Saiean K, Emmons J, Berger WL, Abu-Hajir M, Seetharam B, Binion DG. Terminal ileum resection is associated with higher plasma homocysteine levels in Crohn's disease. J Clin Gastroenterol 2001;33:132-6.

347. Bjerregaard LT, Nederby NJ, Fredholm L, Brandslund I, Munkholm P, Hey H. Hyperhomocysteinaemia, coagulation pathway activation and thrombophilia in patients with inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol 2002;37:62-7.

348. Nakano E, Taylor CJ, Chada L, McGaw J, Powers HJ. Hyperhomocystinemia in children with inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2003;37:586-90.

349. Fernandez-Miranda C, Martinez Prieto M, Casis Herce B, Sanchez Gomez F, Gomez Gonzalez P, Martinez Lopez J, Saenz-Lopez Perez S, Gomez de la Camara A. Hyperhomocysteinemia and methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T and 1298A-->C mutations in patients with inflammatory bowel disease. Rev Esp Enferm Dig 2005;97:497-504.

350. Mahmood A, Needham J, Prosser J, Mainwaring J, Trebble T, Mahy G, Ramage J. Prevalence of hyperhomocysteinaemia, activated protein C resistance and prothrombin gene mutation in inflammatory bowel disease. Eur J Gastroenterol Hepatol 2005;17:739-44.

351. Zezos P, Papaioannou G, Nikolaidis N, Vasiliadis T, Giouleme O, Evgenidis N. Hyperhomocysteinemia in ulcerative colitis is related to folate levels. World J Gastroenterol 2005;11:6038-42.

352. Drzewoski J, Gasiorowska A, Malecka-Panas E, Bald E, Czupryniak L. Plasma total homocysteine in the active stage of ulcerative colitis. J Gastroenterol Hepatol 2006;21:739-43.

353. Roblin X, Germain E, Phelip JM, Ducros V, Pofelski J, Heluwaert F, Oltean P, Faucheron JL, Bonaz B. [Factors associated with hyperhomocysteinemia in inflammatory bowel disease: prospective study in 81 patients]. Rev Med Interne 2006;27:106-10.

354. Yilmaz S, Bayan K, Tuzun Y, Batun S, Altintas A. A comprehensive analysis of 12 thrombophilic mutations and related parameters in patients with inflammatory bowel disease: data from Turkey. J Thromb Thrombolysis 2006;22:205-12.

355. Banait VS, Sandeep MS, Shetty S, Bapat MR, Rathi PM, Ghosh K, Mohanty D, Abraham P. Hypercoagulable state in idiopathic ulcerative colitis: role of hyperhomocysteinemia and hyperfibrinogenemia. Indian J Gastroenterol 2008;27:94-8.

356. Erzin Y, Uzun H, Celik AF, Aydin S, Dirican A, Uzunismail H. Hyperhomocysteinemia in inflammatory bowel disease patients without past intestinal resections: correlations with cobalamin, pyridoxine, folate concentrations, acute phase reactants, disease activity, and prior thromboembolic complications. J Clin Gastroenterol 2008;42:481-6.

357. Wiese D, Lashner B, Seidner D. Measurement of nutrition status in Crohn's disease patients receiving infliximab therapy. Nutr Clin Pract 2008;23:551-6.

358. Zepeda-Gomez S, Montano-Loza A, Zapata-Colindres JC, Vargas-Vorackova F, Majluf-Cruz A, Uscanga L. Oral challenge with a methionine load in patients with inflammatory bowel disease: a better test to identify hyperhomocysteinemia. Inflamm Bowel Dis 2008;14:383-8.

359. Akbulut S, Altiparmak E, Topal F, Ozaslan E, Kucukazman M, Yonem O. Increased levels of homocysteine in patients with ulcerative colitis. World J Gastroenterol 2010;16:2411-6.

360. Dagli N, Poyrazoglu OK, Dagli AF, Sahbaz F, Karaca I, Kobat MA, Bahcecioglu IH. Is inflammatory bowel disease a risk factor for early atherosclerosis? Angiology 2010;61:198-204.

361. Jiang Y, Zhao J, Jiang T, Ge L, Zhou F, Chen Z, Lei Y, Huang S, Xia B. Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase G1793A, hyperhomocysteinemia, and folate deficiency correlate with ulcerative colitis in central China. J Gastroenterol Hepatol 2010;25:1157-61.

362. Kallel L, Feki M, Sekri W, Segheir L, Fekih M, Boubaker J, Kaabachi N, Filali A. Prevalence and risk factors of hyperhomocysteinemia in Tunisian patients with Crohn's disease. Journal of Crohn's and Colitis 2011;5:110-114.

363. Oldenburg B, Van Tuyl BA, van der Griend R, Fijnheer R, van Berge Henegouwen GP. Risk factors for thromboembolic complications in inflammatory bowel disease: the role of hyperhomocysteinaemia. Dig Dis Sci 2005;50:235-40.

364. Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. Annu Rev Biochem 2005;74:739-89.

365. Kim YI. Nutritional epigenetics: impact of folate deficiency on DNA methylation and colon cancer susceptibility. J Nutr 2005;135:2703-9.

366. Morgenstern I, Raijmakers MT, Peters WH, Hoensch H, Kirch W. Homocysteine, cysteine, and glutathione in human colonic mucosa: elevated levels of homocysteine in patients with inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci 2003;48:2083-90.

367. Chiarello PG, Penaforte FR, Japur CC, Souza CD, Vannucchi H, Troncon LE. Increased folate intake with no changes in serum homocysteine and decreased levels of C-reactive protein in patients with inflammatory bowel diseases. Dig Dis Sci 2009;54:627-33.

368. Zeisel SH, da Costa KA. Choline: an essential nutrient for public health. Nutr Rev 2009;67:615-23.

369. den Heijer M, Rosendaal FR, Blom HJ, Gerrits WB, Bos GM. Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. Thromb Haemost 1998;80:874-7.

370. Eichinger S, Stumpflen A, Hirschl M, Bialonczyk C, Herkner K, Stain M, Schneider B, Pabinger I, Lechner K, Kyrle PA. Hyperhomocysteinemia is a risk factor of recurrent venous thromboembolism. Thromb Haemost 1998;80:566-9.

371. Grainge MJ, West J, Card TR. Venous thromboembolism during active disease and remission in inflammatory bowel disease: a cohort study. Lancet 2010;375:657-63.

372. Kappelman MD, Horvath-Puho E, Sandler RS, Rubin DT, Ullman TA, Pedersen L, Baron JA, Sorensen HT. Thromboembolic risk among Danish children and adults with inflammatory bowel diseases: a population-based nationwide study. Gut 2011.

373. Twig G, Zandman-Goddard G, Szyper-Kravitz M, Shoenfeld Y. Systemic thromboembolism in inflammatory bowel disease: mechanisms and clinical applications. Ann N Y Acad Sci 2005;1051:166-73.

374. Murthy SK, Nguyen GC. Venous thromboembolism in inflammatory bowel disease: an epidemiological review. Am J Gastroenterol 2011;106:713-8.

375. Roblin X, Chartier A, Ducros V, Durand A, Bessard G, Bonaz B. MON-G-253 INTERACTION BETWEEN HOMOCYSTEIN METABOLISM AND TPMT ACTIVITY IN IBD PATIENTS UNDER AZATHIOPRINE. Gut 2006.

376. Bermejo F, Algaba A, López-Sanromán A, Carneros JA, Alvarez JA, Piqueras B, Valer M, García S, Sánchez S, García F, Tomás E, Guerra I, Rodríguez JL. P105 - Folate and B12 vitamin deficiency in Crohn's disease: prospective controlled analysis of their prevalence and risk factors. Journal of Crohn's and Colitis 2009;3:S52-S53.

377. Bermejo F, Algaba A, Román AL-S, Carneros JA, Piqueras B, Valer P, Prudencio SS, Durán FG, García-Garzón S, Tomás E, Guerra I, Rodriguez JL. S1156 Folate and B12 Vitamin Deficiency in Crohn's Disease: Prospective Controlled Analysis of Their Prevalence and Risk Factors. Gastroenterology 2009;136:A-202.

378. Bichard P, Phelip J, Pokelski J, Roblin X. Hyperhomocysteinemia Is a Risk Factor of Stenosis in Crohn's Disease Patients. Gastroenterology 2007;132:A-186.

379. Chen M, Peyrin-Biroulet L, Xia B, Gueant-Rodriguez RM, Bronowicki JP, Bigard MA, Gueant JL. Methionine synthase A2756G polymorphism may predict ulcerative colitis and methylenetetrahydrofolate reductase C677T pancolitis, in Central China. BMC Med Genet 2008;9:78.

380. Coll P, Guttormsen AB, Berstad A. [Gastrointestinal disease with elevated plasma homocysteine level]. Tidsskr Nor Laegeforen 1999;119:3577-9.

381. Kao A, Dlugos D, Hunter JV, Mamula P, Thorarensen O. Anticoagulation therapy in cerebral sinovenous thrombosis and ulcerative colitis in children. J Child Neurol 2002;17:479-82.

382. Owczarek D, Cibor D, Salapa K, Mach T. P1733 INFLUENCE OF SMOKING HABITS ON HOMOCYSTEINE LEVEL IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASES. Gut 2009.

383. Phelip J, Bichard P, Roblin X. MON-G-170 HYPERHOMOCYSTEINEMIA IS A RISK FACTOR OF STENOSIS IN CROHN'S DISEASE PATIENTS. Gut 2007.

384. Roblin X, Phelip JM, Genevois M, Ducros V, Bonaz B. Hyperhomocysteinaemia is associated with osteoporosis in patients with Crohn's disease. Aliment Pharmacol Ther 2007;25:797-804.

385. Ventura P, Panini R, Verlato C, Scarpetta G, Salvioli G. Hyperhomocysteinemia and related factors in 600 hospitalized elderly subjects. Metabolism 2001;50:1466-71.

386. Yi J, Zhao J, Chen Z, Ge L, Jiang T, Zhou F, Xia B. S1202 Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms Are Associated with Ulcerative Colitis in Chinese Patients in Central China. Gastroenterology 2009;136:A-212.

387. Kallel L, Ben Romdhane S, Fekih M, Karoui S, Sghaier L, Feki M, Boubaker J, Filali A, Kaabachi N. P0986 PREVALENCE AND DETERMINANTS OF HYPERHOMOCYSTEINEMIA IN CROHN'S DISEASE : RESULTS OF A CONTROLLED STUDY. Gut 2009.

388. Eren M, Nur Saltik-Temizel I, Kocak N. Serum homocysteine concentrations in children with inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2004;39:215-6.

389. Van Assche G, Dignass A, Panes J, Beaugerie L, Karagiannis J, Allez M, Ochsenkuhn T, Orchard T, Rogler G, Louis E, Kupcinskas L, Mantzaris G, Travis S, Stange E. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. J Crohns Colitis 2010;4:7-27.

390. Peyrin-Biroulet L, Oussalah A, Williet N, Pillot C, Bresler L, Bigard MA. Impact of azathioprine and tumour necrosis factor antagonists on the need for surgery in newly diagnosed Crohn's disease. Gut 2011;60:930-6.

391. Fujimaki C, Hayashi H, Tsuboi S, Matsuyama T, Kosuge K, Yamada H, Inoue K, Itoh K. Plasma total homocysteine level and methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T genetic polymorphism in Japanese patients with rheumatoid arthritis. Biomarkers 2009;14:49-54.

392. Kominsky DJ, Keely S, MacManus CF, Glover LE, Scully M, Collins CB, Bowers BE, Campbell EL, Colgan SP. An endogenously anti-inflammatory role for methylation in mucosal inflammation identified through metabolite profiling. J Immunol 2011;186:6505-14.

393. Qin S, Ni M, De Vries GW. Implication of S-adenosylhomocysteine hydrolase in inhibition of TNF-alpha- and IL-1beta-induced expression of inflammatory mediators by AICAR in RPE cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 2008;49:1274-81.

394. Lawson BR, Manenkova Y, Ahamed J, Chen X, Zou JP, Baccala R, Theofilopoulos AN, Yuan C. Inhibition of transmethylation down-regulates CD4 T cell activation and curtails development of autoimmunity in a model system. J Immunol 2007;178:5366-74.

395. Fu YF, Zhu YN, Ni J, Zhong XG, Tang W, Re YD, Shi LP, Wan J, Yang YF, Yuan C, Nan FJ, Lawson BR, Zuo JP. A reversible S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitor ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting T cell activation. J Pharmacol Exp Ther 2006;319:799-808.

396. Saso Y, Conner EM, Teegarden BR, Yuan CS. S-Adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitor mediates immunosuppressive effects in vivo: suppression of delayed type hypersensitivity ear swelling and peptidoglycan polysaccharide-induced arthritis. J Pharmacol Exp Ther 2001;296:106-12.

397. Chiang PK. Biological effects of inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase. Pharmacol Ther 1998;77:115-34.

398. Dincer Y, Erzin Y, Himmetoglu S, Gunes KN, Bal K, Akcay T. Oxidative DNA damage and antioxidant activity in patients with inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci 2007;52:1636-41.

399. Brown SJ, Miller AM, Cowan PJ, Slavin J, Connell WR, Moore GT, Bell S, Elliott PR, Desmond PV, d'Apice AJ. Altered immune system glycosylation causes colitis in alpha1,2-fucosyltransferase transgenic mice. Inflamm Bowel Dis 2004;10:546-56.

400. McGovern DP, Jones MR, Taylor KD, Marciante K, Yan X, Dubinsky M, Ippoliti A, Vasiliauskas E, Berel D, Derkowski C, Dutridge D, Fleshner P, Shih DQ, Melmed G, Mengesha E, King L, Pressman S, Haritunians T, Guo X, Targan SR, Rotter JI. Fucosyltransferase 2 (FUT2) non-secretor status is associated with Crohn's disease. Hum Mol Genet 2010;19:3468-76.

401. Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, Lees CW, Balschun T, Lee J, Roberts R, Anderson CA, Bis JC, Bumpstead S, Ellinghaus D, Festen EM, Georges M, Green T, Haritunians T, Jostins L, Latiano A, Mathew CG, Montgomery GW, Prescott NJ, Raychaudhuri S, Rotter JI, Schumm P, Sharma Y, Simms LA, Taylor KD, Whiteman D, Wijmenga C, Baldassano RN, Barclay M, Bayless TM, Brand S, Buning C, Cohen A, Colombel JF, Cottone M, Stronati L, Denson T, De Vos M, D'Inca R, Dubinsky M, Edwards C, Florin T, Franchimont D, Gearry R, Glas J, Van Gossum A, Guthery SL, Halfvarson J, Verspaget HW, Hugot JP, Karban A, Laukens D, Lawrance I, Lemann M, Levine A, Libioulle C, Louis E, Mowat C, Newman W, Panes J, Phillips A, Proctor DD, Regueiro M, Russell R, Rutgeerts P, Sanderson J, Sans M, Seibold F, Steinhart AH, Stokkers PC, Torkvist L, Kullak-Ublick G, Wilson D, Walters T, Targan SR, Brant SR, Rioux JD, D'Amato M, Weersma RK, Kugathasan S, Griffiths AM, Mansfield JC, Vermeire S, Duerr RH, Silverberg MS, Satsangi J, Schreiber S, Cho JH, Annese V, Hakonarson H, Daly MJ,

Parkes M. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. Nat Genet 2010;42:1118-25.

402. Juyal G, Midha V, Amre D, Sood A, Seidman E, Thelma BK. Associations between common variants in the MDR1 (ABCB1) gene and ulcerative colitis among North Indians. Pharmacogenet Genomics 2009;19:77-85.

403. Potocnik U, Ferkolj I, Glavac D, Dean M. Polymorphisms in multidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with refractory Crohn disease and ulcerative colitis. Genes Immun 2004;5:530-9.

404. Ho GT, Soranzo N, Nimmo ER, Tenesa A, Goldstein DB, Satsangi J. ABCB1/MDR1 gene determines susceptibility and phenotype in ulcerative colitis: discrimination of critical variants using a gene-wide haplotype tagging approach. Hum Mol Genet 2006;15:797-805.

405. Krupoves A, Seidman EG, Mack D, Israel D, Morgan K, Lambrette P, Costea I, Deslandres C, Grimard G, Law L, Levy E, Amre DK. Associations between ABCB1/MDR1 gene polymorphisms and Crohn's disease: a gene-wide study in a pediatric population. Inflamm Bowel Dis 2009;15:900-8.

406. Nones K, Knoch B, Dommels YE, Paturi G, Butts C, McNabb WC, Roy NC. Multidrug resistance gene deficient (mdr1a-/-) mice have an altered caecal microbiota that precedes the onset of intestinal inflammation. J Appl Microbiol 2009;107:557-66.

407. Ufer M, Hasler R, Jacobs G, Haenisch S, Lachelt S, Faltraco F, Sina C, Rosenstiel P, Nikolaus S, Schreiber S, Cascorbi I. Decreased sigmoidal ABCB1 (P-glycoprotein) expression in ulcerative colitis is associated with disease activity. Pharmacogenomics 2009;10:1941-53.

408. Yamamoto-Furusho JK, Villeda-Ramirez MA, Fonseca-Camarillo G, Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Barreto-Zuniga R, Uribe M. High gene expression of MDR1

(ABCB1) is associated with medical treatment response and long-term remission in patients with ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis 2010;16:541-2.

409. Krupoves A, Mack D, Seidman E, Deslandres C, Amre D. Associations between variants in the ABCB1 (MDR1) gene and corticosteroid dependence in children with crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 2011.

410. Saito S, Kato J, Hiraoka S, Horii J, Suzuki H, Higashi R, Kaji E, Kondo Y, Yamamoto K. DNA methylation of colon mucosa in ulcerative colitis patients: Correlation with inflammatory status. Inflamm Bowel Dis 2011;17:1955-65.

411. Zintzaras E. Is there evidence to claim or deny association between variants of the multidrug resistance gene (MDR1 or ABCB1) and inflammatory bowel disease? Inflamm Bowel Dis 2011.

412. Wilk JN, Bilsborough J, Viney JL. The mdr1a-/- mouse model of spontaneous colitis: a relevant and appropriate animal model to study inflammatory bowel disease. Immunol Res 2005;31:151-9.

413. Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P, Vandamme P, Vermeire S. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. Gut 2011;60:631-7.

414. Suhre K, Shin SY, Petersen AK, Mohney RP, Meredith D, Wagele B, Altmaier E, Deloukas P, Erdmann J, Grundberg E, Hammond CJ, de Angelis MH, Kastenmuller G, Kottgen A, Kronenberg F, Mangino M, Meisinger C, Meitinger T, Mewes HW, Milburn MV, Prehn C, Raffler J, Ried JS, Romisch-Margl W, Samani NJ, Small KS, Wichmann HE, Zhai G, Illig T, Spector TD, Adamski J, Soranzo N, Gieger C, Assimes TL, Holm H, Kathiresan S, Konig IR, McPherson R, Reilly MP, Roberts R, Schunkert H, Stewart AF. Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research. Nature 2011;477:54-60.

415. Ikehara Y, Nishihara S, Yasutomi H, Kitamura T, Matsuo K, Shimizu N, Inada K, Kodera Y, Yamamura Y, Narimatsu H, Hamajima N, Tatematsu M. Polymorphisms of two fucosyltransferase genes (Lewis and Secretor genes) involving type I Lewis antigens are associated with the presence of anti-Helicobacter pylori IgG antibody. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2001;10:971-7.

416. Evans DA, Horwich L, McConnell RB, Bullen MF. Influence of the ABO blood groups and secretor status on bleeding and on perforation of duodenal ulcer. Gut 1968;9:319-22.

417. Yamamoto K, Miwa T, Taniguchi H, Nagano T, Shimamura K, Tanaka T, Kumagai H. Binding specificity of Lactobacillus to glycolipids. Biochem Biophys Res Commun 1996;228:148-52.

418. Lee YJ, Yu WK, Heo TR. Identification and screening for antimicrobial activity against Clostridium difficile of Bifidobacterium and Lactobacillus species isolated from healthy infant faeces. Int J Antimicrob Agents 2003;21:340-6.

419. Moorthy G, Murali MR, Devaraj SN. Lactobacilli facilitate maintenance of intestinal membrane integrity during Shigella dysenteriae 1 infection in rats. Nutrition 2009;25:350-8.

420. Iwamori M, Domino SE. Tissue-specific loss of fucosylated glycolipids in mice with targeted deletion of alpha(1,2)fucosyltransferase genes. Biochem J 2004;380:75-81.

421. Lin B, Saito M, Sakakibara Y, Hayashi Y, Yanagisawa M, Iwamori M. Characterization of three members of murine alpha1,2-fucosyltransferases: change in the expression of the Se gene in the intestine of mice after administration of microbes. Arch Biochem Biophys 2001;388:207-15.

422. Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. Lett Appl Microbiol 2007;45:454-60.

423. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Vaneechoutte M, Doerffel Y. Active Crohn's disease and ulcerative colitis can be specifically diagnosed and monitored based on the biostructure of the fecal flora. Inflamm Bowel Dis 2008;14:147-61.