

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



UNIVERSITE EL-HADJ LAKHDAR – BATNA
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat en sciences

Option: Physiologie Animale

Présentée par:

BOUROUBA Romyla

Thème

Etude prospective des gènes de prédisposition aux anomalies du tube neural dans une population algérienne

Jury:

Président :	YAHIA. M	Professeur, Université El hadj Lakhdar, Batna
Examineur :	SATTA. D	Professeur, Université Mentouri, Constantine
Examineur :	DJABI. F	Professeur, Université Ferhat Abbas, Sétif
Examineur :	HAMBABA. L	Professeur, Université El hadj Lakhdar, Batna
Rapporteur :	HOUCHER. B	Professeur, Université Ferhat Abbas, Sétif

2013-2014

Dédicaces

Je dédicace le fruit d'un long chemin de travail, de courage et de patience

A

Mes chers parents qui ont toujours cru en moi et m'ont donné l'espoir et le courage pour mener à bien mes études,

Merci pour votre amour

Ma très chère fille **Bouchra** qui a accepté tout ce temps soustrait à ma présence auprès d'elle,

Pardon

Mes sœurs et mon frère pour le temps consacré à me soutenir tout au long de mon travail,

Merci à toute ma famille d'être toujours là pour moi

Mes amies de Sétif, Bagdad, Batna, Ankara qui ont marqué à jamais ma vie.

Romya

Remerciements

Je remercie Dieu de m'avoir aidé dans le chemin de ma vie.

*Qu'il me soit permis ici de remercier toutes les personnes qui ont laissé leurs empreintes sur ma ligne de vie et, en particulier: mon directeur de thèse Monsieur le **Professeur HOUCHER BAKHOUCHE** qui m'a fait l'honneur d'accepter la direction de cette thèse et qui n'a pas cessé de m'encourager jusqu'à la fin de sa réalisation ; je tiens à lui témoigner ma gratitude pour tout ce qu'il a fait pour moi , Merci d'avoir eu confiance en moi et d'être là pas à pas et Merci pour votre patience et votre soutien tout au long de ce chemin d'études .*

*Je ne pourrais qu'exprimer mon profond respect et mes plus chaleureux remerciements et reconnaissances à l'égard de Monsieur le **Professeur AKAR NEJAT** , et de Madame le **Docteur AKAR ECE**, ainsi que toute l'équipe au sein du laboratoire de génétique pédiatrique (Ankara , Turquie) et particulièrement : **IDIL, EMEL ,YONÇA , AFIFE ,DIDEM, DILARA et KADIR** qui m'ont considérés comme un membre de leur grande famille et m'ont énormément aidé dans la réalisation d'une grande partie de cette thèse.*

*Je suis dans l'obligation de remercier aussi Madame le **Professeur DJABI FARIDA**, ainsi que son équipe à la maternité de Sétif pour son aide précieuse dans ma thèse.*

*J'adresse un remerciement particulier aux membres de jury, et à leur tête Monsieur le **professeur YAHIA MOULOUD** pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse et pour son soutien pour que ce travail voit le jour, ainsi qu'à Madame le **professeur HAMBABA LAILA**, Madame le **professeur SATTA DALILA**, et Madame le **professeur DJABI FARIDA**, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de participer à l'évaluation de cette thèse.*

*Je remercie également mes collègues et confrères au sein du Département SNV à la Faculté des Sciences à l'Université de Batna, et tout particulièrement Madame le **professeur HAMBABA LAILA** pour son immense soutien, ainsi que **M^{elle} ADJROUD SONIA**, **M^{elle} BOUDIAF KAOUTHAR** et **M^{elle} MESSAADIA NAOUAL** qui ont été à mes côtés, et qui sans elles, je n'aurais jamais pu garder le cap.*

*Enfin, je remercie toutes les personnes qui ont participé à cette étude et spécialement les **familles des enfants atteints d'anomalies du tube neural**.*

Publications

- ✓ Bakhouche Houcher, **Romya Bourouba**, Farida Djabi ,Erkan Yilmaz, Yonca Egin, and Nejat Akar. Polymorphisms of 5, 10-Methylenetetrahydrofolate Reductase and Cystathionine β –Synthase genes as a risk factor for Neural Tube Defects in Sétif, Algeria. *Pediatr Neurosurg* 2009;45(6):472-7.

- ✓ **Romya Bourouba**, Bakhouche Houcher, Farida Djabi, Yonca Egin, and Nejat Akar .The Prevalence of Methylenetetrahydrofolate Reductase 677 C-T, Factor V 1691 G-A, and Prothrombin 20210 G-A Mutations in Healthy Populations in Sétif, Algeria . *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 2009; 15 (5): 529-534.

- ✓ Bakhouche Houcher, **Romya Bourouba**, Farida Djabi, and Zahira Houcher. The Prevalence of Neural Tube Defects in Sétif University Maternity Hospital, Algeria-3 Years Review (2004-2006) .*Pteridines* 2008; 19: 12 – 18

Communications

- ✓ Houcher B, **Bourouba R**, Djabi F., Yilmaz E, Egin Y, Akar N. Etude des polymorphismes génétiques de la C677T de la methylenetetrahydrofolate réductase et de la cystathionine β synthétase, facteurs de risque des anomalies du tube neural dans une population algérienne. 1^{er} congrès algérien de biologie clinique et 2^{èmes} Journées Internationales Francophones de Médecine de Laboratoire. Alger 2 - 3 Mai, 2009.

Résumé

Les anomalies du tube neural (ATN) sont un groupe de malformations qui résultent d'un échec de fusion de la région crânienne ou de la colonne vertébrale du tube neural. Cette étude a pour but de déterminer la prévalence de ces anomalies dans la région de Sétif, ainsi que la relation des gènes soupçonnés d'être des facteurs de risques génétiques des ATN. Une étude rétrospective des dossiers de patients avec une ATN a été réalisée dans la région de Sétif, au cours d'une période de 3 ans. 147 participants apparemment sains, ainsi que 92 mères et 48 pères d'enfants atteints d'ATN ont été impliqués dans l'étude des mutations spécifiques sur le gène de la 5, 10 Méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR), de la cystathionine β - synthase (CBS), du gène ZIP 14 et ZnT4 en relation avec les ATN. Nos résultats montrent que la prévalence des ATN était de 7.5 pour 1000 naissances. La répartition selon le sexe ratio était significativement élevée chez les filles ayant une ATN ($p < 0.05$). L'investigation des mutations sur les gènes du facteur V Leiden G 1691-A et de la prothrombine PT 20210 G-A, a montré qu'elles sont rares dans la population témoins. La prévalence de la MTHFR 677TT (14.3) n'a montré aucune différence significative entre le groupe des mères d'enfants atteints d'ATN et les témoins, par contre, une différence statistiquement significative a été démontré chez les mères hétérozygotes ayant un enfant atteint d'ATN pour l'insertion sur le gène de la CBS par rapport aux témoins (Odds ratio 3.72 : 1.59–8.73). Toutefois, aucune interaction gène-gène entre le polymorphisme C677T de la MTHFR et le CBS 844ins68 n'a été identifiée pour les ATN, et aucune mutation dans les gènes ZIP 14 et ZnT4 n'a été détectée chez les mères d'enfants atteints d'ATN. En conclusion, cette étude montre que les ATN représentent un véritable problème de santé publique en Algérie. Malgré, l'absence de l'effet du polymorphisme de la MTHFR C677T et des gènes ZIP14 et ZnT4, qui n'ont montré aucune association pour le groupe d'ATN, nous suggérons une supplémentation en acide folique pour les femmes planifiant une grossesse pour prévenir ces anomalies, ainsi que l'investigation d'autres facteurs génétiques et environnementaux afin d'essayer de déterminer la pathogénie des ATN dans notre région et pays.

Mots clés : ATN, polymorphismes génétiques, MTHFR C677T, CBS844ins68, ZIP 14, ZnT4, Sétif, Algérie.

Abstract

Neural tube defects (NTDs) are a group of malformations resulting from a failure's fusion of the cranial region or the spinal column of the neural tube. This study was designed to determine the prevalence of these anomalies in the Setif region, as well as the relationship of genes suspected to be NTDs genetic risk factors. A retrospective study of the records of patients with NTD was performed in the region of Setif, during a period of 3 years. 147 healthy participants, 92 mothers and 48 fathers of children with NTDs were involved in the study of specific mutations on the gene of the 5, 10 Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), cystathionine β - synthase (CBS), gene ZIP 14 and ZnT4 in relation to NTDs .Our results show that the prevalence of NTDs was 7.5 per 1000 births. The distribution by sex ratio was significantly high among girls with NTD ($p < 0.05$). The investigation of the factor V Leiden gene G 1691-A and the prothrombin PT 20210 G - A mutations, showed that they are rare in our control population. The prevalence of MTHFR 677TT (14.3) showed no significant difference between the control and mother's NTDS groups , however, a statistically significant difference has been shown among heterozygous mothers with an NTD's child for the insertion on the CBS gene compared to controls (Odds ratio 3.72: 1.59-8.73).No gene-gene interaction between the MTHFR C677T polymorphism and CBS 844ins68 has been identified for NTDs , and no mutation in the ZIP 14 and ZnT4 genes was detected in mothers with an NTD child . In conclusion, this study shows that the neural tube defects represent a real problem of public health in Algeria. Despite, the absence of the effect of the polymorphism of MTHFR C677T, ZIP14 and ZnT4 genes, which haven't shown association for our NTD group, we suggest a supplementation with folic acid for women planning a pregnancy to prevent these defects, as well as the investigation of other genetic and environmental factors in an attempt to determine the pathogenesis of NTDs in our region and country.

Key words: ATN, genetic polymorphism, MTHFR C677T, CBS844ins68, ZIP 14, ZnT4, Setif, Algeria.

LISTE DES ABREVIATIONS

5-méthyl-THF : 5-méthyltétrahydrofolate

AE: Acrodermatitis enteropathica

AFP : Alpha-foetoprotéine

An: Anencéphalie

APC : Activated Protein C

Arg: Arginine

ATN: Anomalie du tube neural

BMPs: Bone Morphogenetic Proteins

CBS : Cystathionine β Synthétase

Cu: Cuivre

E: Encéphalocèle

EDTA: Acide Ethylène Diamine Tétracétique

FAD: Flavine Adénine Dinucléotide

FGF: Facteurs de croissance des fibroblastes

Folr: Folate receptor

CHKA: Choline Kinase Alpha

NAT1: N-acétyltransférase 1

PRMT1:ProteinArginine Methyltransferase 1

HC : Haptocorrin

Hey : Homocystéine

IC : Intervalle de confiance

Lys: Lysine

MS : Méthionine Synthase

MTHFR :Méthylènetétrahydrofolate Réductase

MTRR: Méthionine synthase réductase

NADPH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit

OR: Odds Ratio

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDGFRA: Platelet Derived Growth Factor Alfa Receptor

PT: Prothrombine

SAH: S-Adenosyl-L-Homocysteine

SAM: S-Adenosyl-L-Methionine

sb: spina bifida

SLC19A1: Solute carrier family 19 (folate transporter), member 1

SNC : Système Nerveux Central

TC: Transcobalamine

ZIP 14: Art- and It-like protein 14

Zn: Zinc

ZnT4: Zinc transporter

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Gastrulation	5
Figure 2 : Neurulation primaire.	6
Figure 3 : Représentation schématique des sites multiples de clôture du tube neural dans l'embryon humain	8
Figure 4 : Quelques anomalies dues à un défaut de fermeture du tube neural à plusieurs endroits.	9
Figure 5 : Nouveau-né avec spina bifida.	10
Figure 6 : Myéломéningocèle.	11
Figure 7 : Enfant avec une anencéphalie	12
Figure 8 : Photographie montrant un enfant en position latérale avec un grand encéphalocèle occipital.	13
Figure 9 : Représentation schématique de 41 mutations graves du gène MTHFR et de 2 polymorphismes particulièrement étudiés.	17
Figure 10 : Répercussions métaboliques de l'activité de la MTHFR.	18
Figure 11 : Diagramme simplifié des cycles métaboliques du folate et de l'homocystéine.	21
Figure 12 : Représentation schématique de l'absorption des folates provenant de l'intestin et son métabolisme dans l'organisme.	27
Figure 13: Principaux rôles métaboliques de l'acide folique et synergie d'action avec les vitamines B ₂ , B ₆ et B ₁₂ .	35
Figure 14: Courbe d'analyse des polymorphismes G 1691A du facteur V Leiden (A) et G 20210A de la Prothrombine (B) par la PCR en temps réel.	53
Figure 15 : Courbe d'analyse du polymorphisme MTHFR C677T par la méthode de PCR en temps réel.	54
Figure 16: Résultats de la PCR du gène de la CBS 844ins68.	58
Figure 17: Résultats de la PCR (A) et la purification (B) du gène ZIP 14 (promoteur 1).	60
Figure 18 : Séquençage du gène ZIP 14 (promoteur1) en utilisant l'amorce sens.	61
Figure 19: Séquençage du gène ZIP 14 (promoteur1) en utilisant l'amorce non sens.	62
Figure 20 : PCR du gène ZnT4 exon 5 (915 T-C) après restriction enzymatique	63

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Spectre des ATN	9
Tableau II : Etiologies des ATN	15
Tableau III : Supplémentation folique	36
Tableau IV : Caractéristiques des différents types d'ATN et prévalences respectives enregistrés à Setif (2004-2006)	52
Tableau V : Concomitance des mutations dans la population saine	55
Tableau VI : Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme (677C→T) de la MTHFR entre les mères témoins et celles ayant un enfant atteint d'ATN	56
Tableau VII : Distribution des fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme (677C→T) de la MTHFR entre les mères et les pères des enfants atteints d'ATN et les témoins	57
Tableau VIII : Distribution génotypique du polymorphisme de la CBS entre les mères témoins et celles ayant un enfant atteint	59
Tableau IX : Fréquences des mères ayant un enfant atteint et les témoins hétérozygotes pour la CBS (844ins68) et homozygotes pour le gène de la MTHFR (TT)	59
Tableau X : Distribution des fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme (915 T-C) du gène ZnT4 entre les mères témoin et celle avec un enfant atteint d'ATN	64

Table des matières

INTRODUCTION	1
Partie I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Définition des anomalies du tube neural	4
2. Embryologie du tube neural	4
2.1. Formation du tube neural	4
2.2. Fermeture du tube neural	7
3. Types des anomalies du tube neural	8
3.1. Spina bifida	9
3.2. Anencéphalie	12
3.3. Encéphalocèle	13
4. Prévalence des anomalies du tube neural	13
5. Etiologie des anomalies du tube neural	14
5.1. Facteurs génétiques	15
5.1.1. Gène du méthylène tetrahydrofolate réductase	16
5.1.2. Gène de la Cystathionine β Synthase	19
5.1.3. Gène de la méthionine Synthase réductase	21
5.1.4. Gène de la Méthylènetétrahydrofolate déshydrogénase	22
5.1.5. Gène de la Dihydrofolate réductase	22
5.1.6. Les gènes d'enzymes du cycle de l'acide folique nécessaires pour la biosynthèse des nucléotides	22
5.1.7. Les gènes du transport des Folates	22
5.1.8. Autres gènes	23
5.2. Facteurs nutritionnels	24
5.2.1. Carence en folates	24
5.2.2. Carence en Vitamine B ₁₂	25
5.2.3. Déficience en zinc	26
5.2.4. Déficience en cuivre	28
5.3. Facteurs environnementaux associés aux ATN	28
5.3.1. Les antiépileptiques	28
5.3.2. Les facteurs socioéconomiques	29
5.3.3. L'appartenance ethnique	29

5.3.4. Les fumonisines	29
5.3.5. Autres facteurs	30
6. Diagnostic	31
6.1. Echographie	31
6.2. Imagerie par Résonance Magnétique	31
6.3. Alpha foetoprotéine	31
7. Pronostic et complications des ATN	32
8. Traitement	33
9. Prévention des anomalies de fermeture du tube neural	33
9.1. L'acide folique	33
9.2. Autres facteurs	37

Partie II : MATERIEL ET METHODES

1. Population d'étude	38
2. Collecte de sang	38
3. Extraction de l'ADN	38
4. Détermination de la pureté de l'ADN	39
5. Détermination de la concentration de l'ADN	40
6. Recherche de mutations	40
6.1. Amplification de l'ADN par la méthode de PCR	40
6.2. Recherche de la mutation 1691 G-A sur le gène du facteur V Leiden	41
6.3. Evaluation de la mutation 20210G-A sur le gène de la prothrombine	43
4.4. Etude de la mutation 677C-T sur le gène de la MTHFR	44
4.5. Etude de la mutation sur gène de la CBS	45
4.6. Etude des mutations sur les gènes des transporteurs du Zinc	46
4.6.1. Le gène ZIP14	46
4.6.2. Le gène ZnT4	48
5. Analyse statistique	50

Partie III : RESULTATS

1. Prévalence des anomalies du tube neural	51
2. Recherche de mutations	53
2.1. Evaluation des mutations du facteur V Leiden 1691G-A et de la prothrombine 20210G-A	53
2.2. Mutation 677C-T sur le gène de la Méthylène-tétrahydrofolate Réductase	54

2.3. Etude de l'insertion de 68 paires de bases sur le gène de la CBS	58
2.4. Les gènes des transporteurs du zinc	60
2.4.1. Le gène ZIP 14	60
2.4.2. Le gène ZnT4	63

Partie IV : DISCUSSION

1. Prévalence des anomalies du tube neural	65
1.1. Distribution des ATN selon le type d'anomalies	66
1.2. Prévalence des ATN selon le sexe ratio	67
1.3. Prévalence des ATN selon l'âge maternel	67
1.4. Prévalence selon le degré de parenté	68
1.5. Prévalence selon la saison	68
2. Recherches des mutations génétiques	70
2.1. Evaluation des mutations du facteur V Leiden 1691G-A et de la prothrombine 20210G-A	70
2.2. Mutation 677C-T sur le gène de la Méthylènetétrahydrofolate Réductase	73
2.3. Mutations sur le gène de la CBS	77
2.4. Les gènes des transporteurs du Zinc	78

Partie V : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

REFERENCES	83
-------------------	----

INTRODUCTION

De nos jours, les malformations congénitales constituent dans plusieurs pays la première cause de mortalité infantile dès la première année de naissance. Elles forment un groupe de pathologies important en santé publique à cause de leur poids médical, sanitaire et socioéconomique.

Les malformations cardiaques sont la forme la plus fréquente des malformations congénitales à travers le monde, suivies par les anomalies du tube neural (ATN), avec une incidence de 1-10 par 1000 naissances (Au *et al.*, 2010). Ces ATN varient selon la race, la localisation géographique, la classe socioéconomique, l'état nutritionnel et d'autres facteurs de prédisposition (Detrait *et al.*, 2005; Chen, 2007).

Le terme ATN désigne généralement les malformations congénitales du système nerveux central qui se produisent suite à un échec de fermeture du tube neural situé dans la région supérieure appelé anencéphalie (forme létale de ces anomalies), ou dans la partie inférieure connu sous le nom de spina bifida (Au *et al.*, 2010). Le patient atteint d'une ATN peut souffrir, selon la taille et la localisation de la malformation de plusieurs handicaps tout au long de sa vie (Tolmie, 1996).

La plupart des cas d'ATN surviennent sporadiquement mais elles sont plus fréquentes dans les grossesses gémellaires, en particulier dans le cas de jumeaux monozygotes (Van Allen *et al.*, 1993_b). D'autre part, le risque accru d'avoir un enfant porteur d'une ATN dépend du taux de ces anomalies dans la population, ainsi les couples qui ont déjà eu un enfant atteint d'une ATN courent un risque de l'ordre de 2 à 5% d'avoir un autre enfant atteint. Ce risque est de 1 à 2 chez les frères, sœurs et les parents au deuxième degré d'un enfant porteur d'une ATN. Par contre, chez les parents au troisième degré, il est de 0,5% (Van Allen *et al.*, 2002).

Les études épidémiologiques des populations et des familles indiquent une étiologie complexe des ATN, impliquant des facteurs génétiques et environnementaux. Ces derniers comprennent la géographie, les tendances épidémiques, la classe socio-économique, l'âge et l'alimentation maternelle, en plus du diabète maternel ainsi que l'exposition aux médicaments et principalement les antiépileptiques (Mitchell, 2005).

Toutefois, les infections péri-conceptionnelles de la mère, le nombre de grossesses précédentes réussies, la consommation de caféine, le tabagisme et l'alcoolisme, n'ont montré aucune association significative avec les ATN (Detrait *et al.* , 2005) .

L'hypothèse la plus convaincante pour expliquer les interactions gènes – environnement a été l'association des ATN avec les déficiences en vitamines (Smithells *et al.* , 1976) , mais il fut observé que plusieurs mécanismes causant l'hyperplasie, la migration et la transformation des cellules du neuroectoderme impliqués dans la formation du tube neural ,sont gouvernés par des gènes influencés par plusieurs facteurs environnementaux mais la corrélation entre les deux est loin d'être élucidée (Pulikkunnel and Thomas, 2005) .

Certains facteurs génétiques peuvent intervenir dans la prévalence des ATN, très élevée chez les Irlandais, et basse dans les ethnies noires. Toutefois, si ces variations peuvent être attribuées à des sensibilités génétiques, leur première cause reste les différences d'habitudes et de qualité alimentaire (Potier de Courcy, 2005).Par ailleurs, de nombreuses études en génétique moléculaire ont déjà montré la relation entre le métabolisme de l'homocysteine et la survenue des anomalies du tube neural (Seller, 1995).

Malgré que l'étiologie des ATN reste un mystère, des recherches avancées ont été menées pour essayer d'établir la cause et les moyens de prévention de ces anomalies au cours de ces dernières décennies (Behrooz and Gorjizadeh , 2007).Cette prévention s'est longtemps appuyée sur le dépistage prénatal par la mesure de l'alpha-foetoprotéine , ainsi que sur l'ultrasonographie morphologique suivi d'un avortement le cas échéant(Marguerat *et al.* , 1994). D'autres stratégies de prévention ont été employées et principalement la supplémentation en acide folique, un composé largement répandu dans l'alimentation végétale mais qui est instable et résiste mal à la cuisson (Livingstone, 1991).

La recommandation préventive était d'offrir aux femmes désirant concevoir une supplémentation vitaminique entre 400 et 800 microgrammes par jour (Van Allen *et al.* , 2002), mais la difficulté de cette stratégie était que la plupart des grossesse ne sont pas planifiées , c'est pourquoi la possibilité d'une supplémentation en acide folique destinée à la population générale est plus convenable , en prenant en considération l'effet négatif de l'acide folique qui masquerait les signes hématologiques du déficit en vitamine B₁₂ (Wald and Bower, 1994) .

Malgré que la supplémentation maternelle en acide folique pourrait réduire le taux d'occurrence des ATN dans certaines populations (Czeizel and Dudas, 1992), après plus de deux décennies de recherches, le(s) mécanisme(s) par lesquels l'acide folique pourrait intervenir pour éviter les ATN n'est pas complètement élucidé (Beaudin and Stover, 2009; Harris ,2009). En revanche, si l'on sait que la carence en acide folique occupe un endroit précis dans l'étiologie des ATN, la supplémentation et la fortification en acide folique n'ont pas éliminé toutes les anomalies (Zeyrek *et al .*, 2009).

Ce travail a pour objectifs :

- ❖ Déterminer la prévalence des ATN dans la région de Sétif ainsi que des facteurs de risque épidémiologiques associés.
- ❖ Déterminer la fréquence des mutations liées aux pertes de grossesses comme le facteur V Leiden, la prothrombine G20210A, et de la méthylène tétrahydrofolate réductase C677T dans une population saine.
- ❖ Evaluer la contribution des polymorphismes des gènes impliqués dans la voie de l'homocystéine dépendante des folates (MTHFR) et la Cystathionine beta synthétase(CBS) dans l'étiologie des ATN.
- ❖ Investiguer le rôle des gènes des transporteurs du zinc (ZIP14 et ZnT4) soupçonnés dans la pathogénie ATN.
- ❖ Détecter les interactions possibles gènes –gènes dans l'étiologie des ATN.

1. Définition des anomalies du tube neural

Les anomalies du tube neural (ATN) sont un groupe complexe de malformations embryologiques du système nerveux central résultant d'un défaut de fusion des plis du tube nerveux en formation (Campbell *et al.*, 1996; De Marco *et al.*, 2000). Elles peuvent causer une perte fœtale ou un mort-né (Shurtleff *et al.*, 1994), et des handicaps considérables chez les enfants affectés qui souffriront à l'avenir de plusieurs invalidités (Pulikkunnel and Thomas, 2005).

Il a été proposé que ces anomalies pouvaient être le résultat d'une réouverture du tube neural (Campbell and Sohal, 1990), ou d'un échec de fermeture du tube neural, qui pourrait perturber la différenciation du système nerveux central et l'induction des arcs vertébraux et engendrer un grand nombre de malformations du développement le long du neuroaxis et à partir du cerveau jusqu'au sacrum (Pulikkunnel and Thomas, 2005).

Le taux de survie des enfants atteints d'anomalies du tube neural qui ne sont habituellement pas mortelles dont le lipoméningocèle, l'encéphalocèle et la spina bifida est de 90 % durant la première année de leur vie (Shurtleff *et al.*, 1994). Les cas syndromiques des ATN sont souvent associés à des anomalies chromosomiques mais elles ne représentent que 10 % de tous les défauts (Chen, 2007).

2. Embryologie du tube neural

2.1. Formation du tube neural

2.1.1. Gastrulation

Le processus par lequel le mésoderme intra-embryonnaire se forme est appelé gastrulation, au cours de laquelle, une zone du neuroectoderme s'épaissit et prend le nom de plaque neurale formée initialement par induction du mésoderme axial sous-jacent : la notochorde et la plaque pré-cordale (Figure 1) (Back and Plawner, 2012). Au 21^{ème} jour, les bords de cette plaque (les plis neuraux) augmentent par rapport au plan horizontal, changent de forme et se déplacent. Lorsqu'ils se joignent à la ligne médiane, ils forment le tube neural qui donne naissance au cerveau et à la moelle épinière (Ross, 2010).

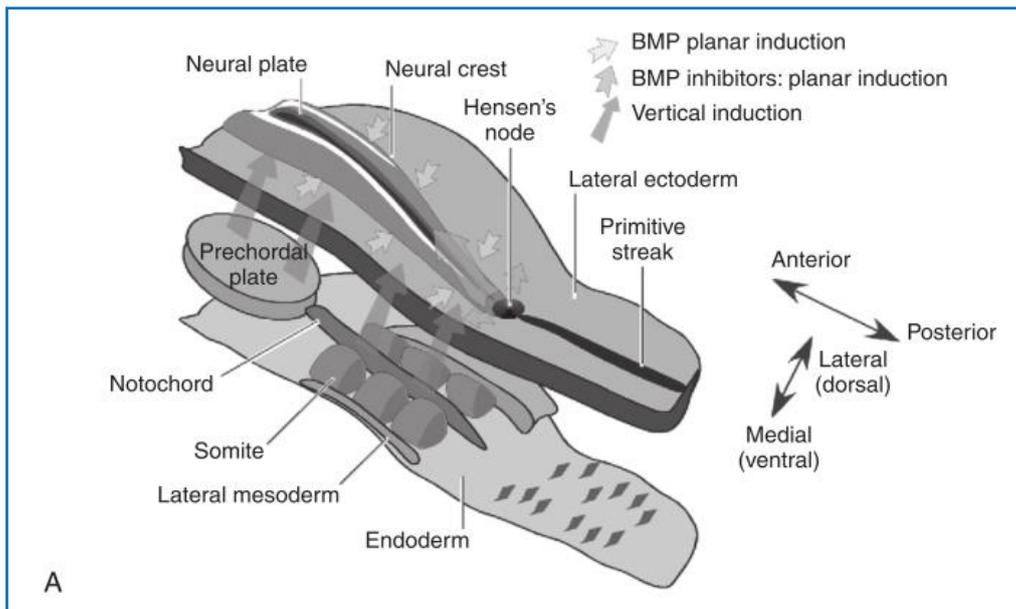


Figure 1 : Gastrulation (Vieira *et al.*, 2010).

BMP : protéines morphogénétiques osseuses

2.1.2. Neurulation primaire

Chez l'homme, la neurulation se produit en deux phases: une primaire et une autre secondaire. La neurulation primaire s'étend environ du 18^{ème} jour d'âge gestationnel à la fin de la 4^{ème} semaine de gestation. Il s'agit d'une série complexe d'événements morphogénétiques réalisée par prolifération cellulaire ainsi que par des changements dans la forme et l'adhésion des cellules qui régulent la migration cellulaire (Back and Plawner, 2012). Cette neurulation concerne la transformation d'une plaque neurale en tube neural cylindrique et comporte plusieurs processus morphogénétiques (Figure 2) qui se chevauchent dans l'espace et dans le temps (Van der put *et al.*, 2001).

Le dernier processus de la neurulation primaire consiste en la fermeture du sillon neural avec la formation du toit du tube neural, la crête neurale et l'épithélium au-dessus de la surface. Lorsque les plis neuraux sont rapprochés l'un de l'autre, ils adhèrent et par la suite fusionnent. Cette fermeture s'effectue par les molécules d'adhésion cellulaire, qui sont exprimées à la surface des cellules neuroépithéliales (Van der put *et al.*, 2001). La neurulation primaire est terminée après la fermeture du neuropore postérieur dans la région sacrée (Müller and O'Rahilly, 1987).

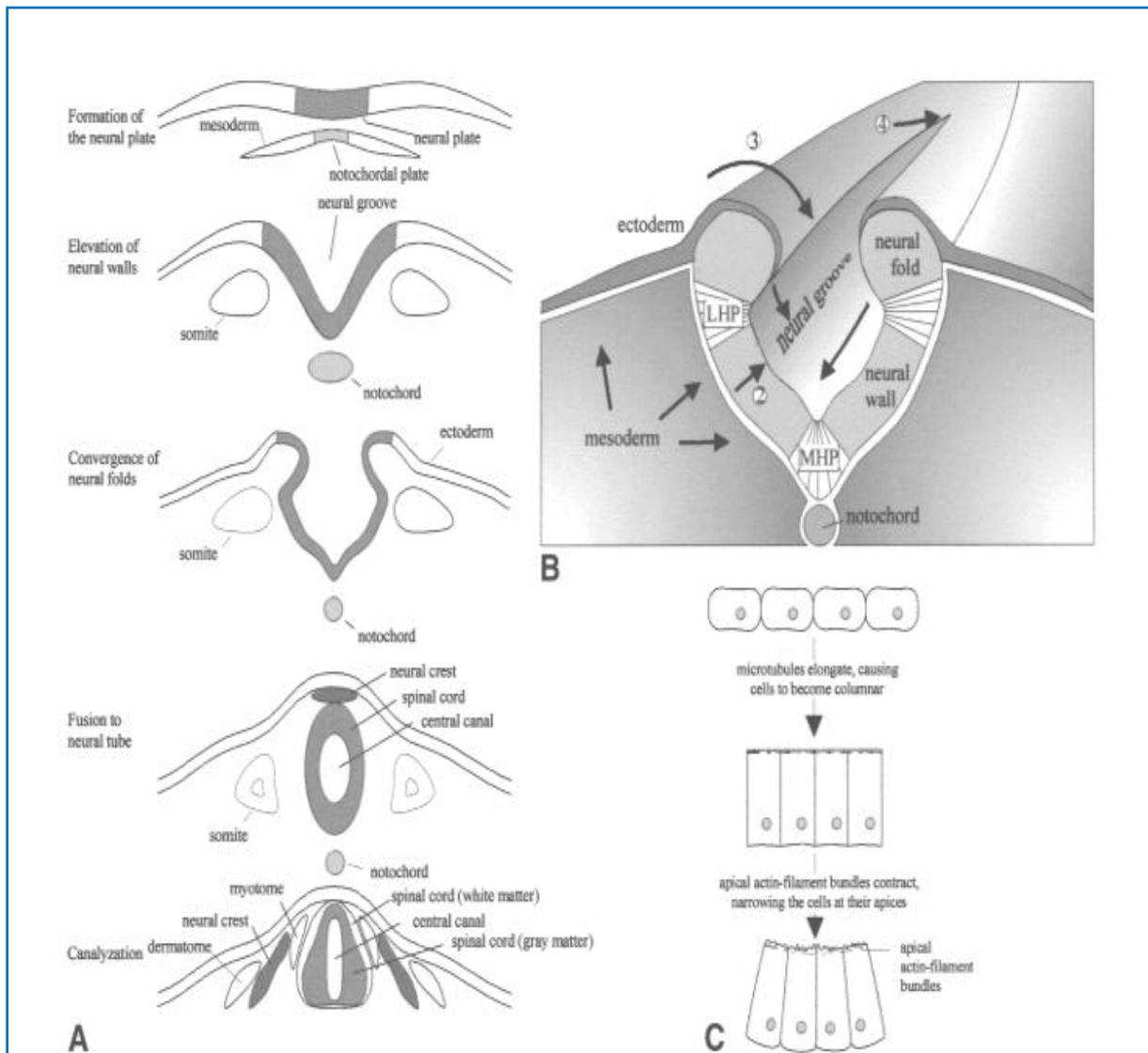


Figure 2: Neurulation primaire (Van der put *et al.*, 2001).

(A): Quatre phases de la neurulation primaire sont représentées dans une vue transversale.

(B) : plusieurs processus durant la neurulation primaire.

(C) Transformation des cellules neuroépithéliales durant la neurulation primaire.

1 : les flèches dans le sillon neural indiquent le rétrécissement et l'élongation, résultant en une extension convergente

2 : élévation de la paroi neuronale

3 : convergence des plis neuronaux ;

4 : fusion. Les flèches dans le mésoderme impliquent l'expansion mésodermique.

MHP : point charnière médial

LHP : point charnière dors latéral

2.1.3. Neurulation Secondaire

Elle se produit environ entre le 30^{ème} et le 50^{ème} j gestationnel, au cours duquel des vacuoles qui forment une masse cellulaire caudale se coalescent et se connectent avec le canal central du tube neural déjà présent. Du 41^{ème} jusqu'au 51^{ème} j, la partie la plus caudale du canal central du tube neural commence à régresser et la queue de l'embryon disparaît (Back and Plawner, 2012).

Dans le bourgeon de l'extrémité caudale de l'embryon se trouve une masse de cellules pluripotentes appelées masse cellulaire caudale, qui constituera l'extrémité inférieure de la moelle épinière et contribuera également au tractus gastro-intestinal et génito-urinaires inférieur. Ces cellules s'unissent autour d'une lumière centrale pour joindre l'extrémité inférieure du tube neural formé par la neurulation primaire, complétant ainsi la moelle épinière. Avec la croissance et la régression du bourgeon de la queue, la moelle épinière subit progressivement une involution, et ce qui reste constitue le ligament coccygien terminal de la moelle épinière (Thompson, 2010).

2.2. Fermeture du tube neural

Deux principales théories concernant les sites de fusion et le moment de la formation du tube neural ont été proposées. Le premier modèle dit de fermeture à glissière où le tube neural se ferme d'une façon continue et bidirectionnelle (Seller, 1990), est un modèle de fusion qui commence au 23^{ème} jour et procède dans les deux régions crânienne et caudale. Le neuropore antérieur se ferme au 25^{ème} et le postérieur au 27^{ème} jour. La fermeture du tube neural se complète des la fin de la 4^{ème} semaine du développement embryonnaire (Pulikkunnel and Thomas, 2005).

Van Allen *et al.* (1993_a) avaient déjà proposé la seconde théorie de fermeture affirmant que le tube neural humain se fermait à plusieurs endroits. Ce modèle de clôture à multipoints indique que la fusion du pli neural est initiée à 5 sites le long du futur tube neural. Par la suite, d'autres études ont fournis plusieurs évidences pour soutenir ce modèle de fermeture du tube neural (Martinez-Frias *et al.* , 1996; Urioste and Rosa ,1998; Juriloff and Harris , 2000) .

D'après ce modèle (Figure 3), le site initial de fermeture (1) est situé dans la région cervicale et se poursuit dans la partie craniale et caudale. La fermeture (2) commence à la limite du prosencéphale/mésencéphale et elle est bidirectionnelle, divisant le neuropore antérieur en prosencéphale et en neuropore au milieu du rhombencéphale. La fermeture (3) est unidirectionnelle, et débute adjacente au stomodéum, puis procède caudalement jusqu'à la

rencontre de la fermeture (2), fermant ainsi le neuropore prosencéphale. Enfin, la fermeture (4) prend place où elle rejoint la fermeture (2) pour fermer le neuropore au milieu du rhombencéphale. Le neuropore postérieur est fermé par une poursuite caudale de la fermeture (1) (Van der put *et al.* , 2001).

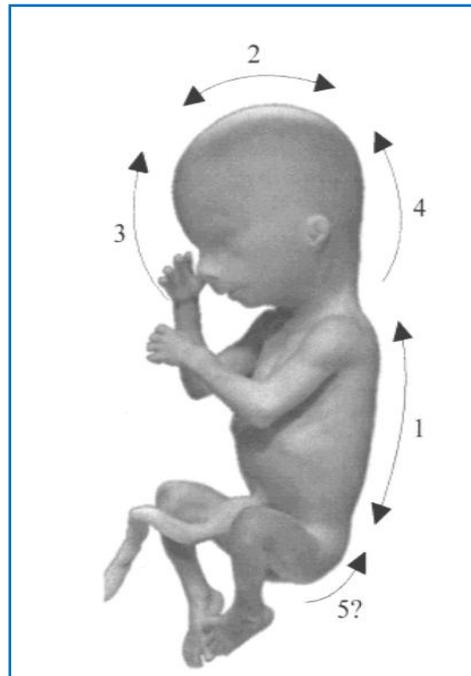


Figure 3: Représentation schématique des sites multiples de clôture du tube neural dans l'embryon humain (Van der put *et al.* , 2001)

3. Types des anomalies du tube neural

Les anomalies du tube neural pourraient être classées en 3 types (tableau I) (Pulikkunnel and Thomas, 2005). Les plus fréquents sont l'anencéphalie et le spina bifida qui inclut le méningocèle, le myéломéningocèle et le lipoméningocèle (Van Allen *et al.* , 1993_b ; Rossi *et al.* , 2004), quand aux autres ATN moins fréquentes sont : l'encéphalocèle, l'acrânie, l'exencéphalie, et le facio-craniorachischisis (Botto *et al.* , 1999; Van Allen *et al.* , 2002) (Figure 4) .

Tableau I: Spectre des ATN (Pulikkunnel and Thomas, 2005)

1. spina bifida (sb)	1.1. spina bifida occulta
	1.2. méningocèle
	1.3. myéломéningocèle
2. anencéphalie (an)	
3. encéphalocèle (e)	

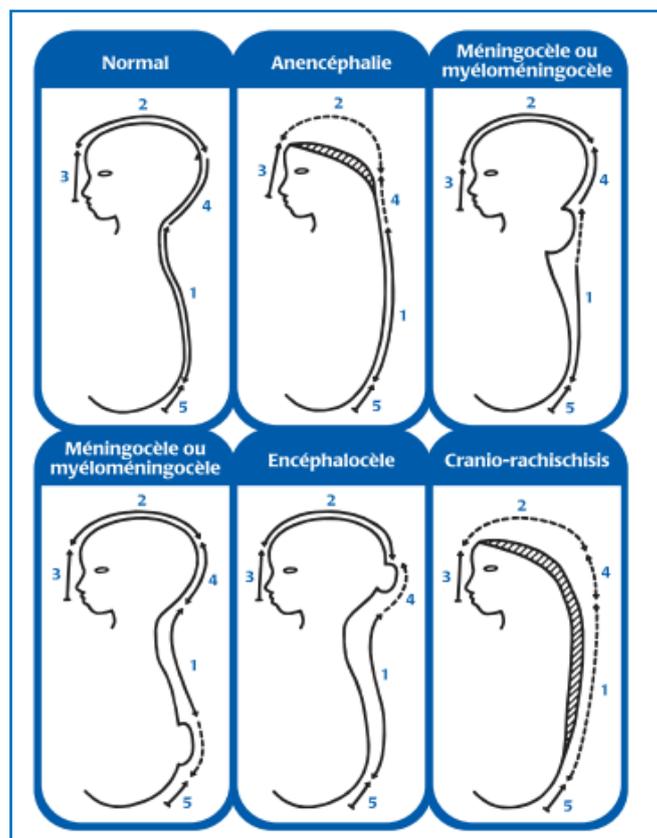


Figure 4 : Quelques anomalies dues à un défaut de fermeture du tube neural à plusieurs endroits (Van Allen *et al.* , 1993_a).

3.1. Spina bifida

Le terme spina bifida représente un groupe de conditions congénitales dont chacune d'elles possède sa propre origine à différents points dans le développement de la moelle épinière (Thompson, 2010). Ceci est dû à l'échec du développement du mésenchyme

entre le tube neural et l'ectoderme de surface pour former les arcs des vertèbres (Pulikkunnel and Thomas, 2005).

Les dysraphies spinales sont des malformations de gravité variable selon qu'elle soit ouverte (Aperta) ou fermée (Occulta) correspondant à un défaut de fermeture du tube neural sur plusieurs étages vertébraux, le plus souvent sur la partie lombo-sacrée de l'embryon (Poloce and Boisson-Gaudin, 2010) (Figure 5).



Figure 5 : Nouveau-né avec spina bifida (Poujade and Luton, 2008).

3.1.1. Myéломéningocèle

C'est de loin le type le plus commun de spina bifida avec 90% de cas (Au *et al.* , 2010). Le myéломéningocèle est une lésion ouverte due à une fermeture défectueuse du tube neural au niveau de la colonne vertébrale (Detrait *et al.*, 2005) et se caractérise par une hernie des méninges molles et du tissu nerveux à travers un défaut souvent étendu des arcs postérieurs des vertèbres (Texier and Arthuis, 1985) .

À la naissance, cette anomalie se présente généralement dans la région lombo-sacrée, où la peau est déficiente, comme une zone ulcérée et humide en raison de la sortie du liquide cérébro-spinal, en plus de la déformation des membres inférieurs (Thompson, 2010). (Figure 6).



Figure 6 : Myéloméningocèle (Thompson, 2010).

Le myéloméningocèle est rarement une malformation isolée, mais il est généralement accompagné d'autres anomalies cliniquement significatives du système nerveux central (SNC). D'une importance majeure se place l'hydrocéphalie, qui est souvent associée à la malformation d'Arnold-Chiari II qui peut expliquer les déficits cognitifs et l'épilepsie observés chez certains patients (Del Bigio, 2010).

Les anomalies du tronc cérébral incluent le déplacement vers le bas de la moelle et le quatrième ventricule à travers le trou occipital dans la partie supérieure du canal cervical, ce qui se traduit par une obstruction du quatrième ventricule et la compression de la moelle cervicale supérieure. L'étirement vers le bas qui en résulte des racines cervicales provoque leur projection craniale vers leur trou plutôt que de suivre leur cours latéral normale ou descendant (Friede, 1989).

3.1.2. Méningocèle

C'est une hernie limitée des méninges au niveau du site de l'anomalie, généralement recouverte par la peau (Texier and Arthuis, 1985). Le méningocèle se distingue par l'absence de participation des éléments nerveux à la poche, et même si la localisation lombaire est la plus fréquente, des localisations cervicales ou dorsales sont également possibles (Back and Plawner, 2012).

3.1.3. Spina bifida occulta

C'est la forme cachée, la moins sévère de sb, résultant d'un écartement dans un ou plusieurs arcs vertébraux, mais la moelle épinière et les méninges restent entièrement à l'intérieur du canal vertébral. Cette anomalie peut se manifester comme une petite cavité entre deux vertèbres adjacentes, indiquant que celles-ci ne fusionnent pas correctement, et la preuve

de ce défaut peut être une petite fossette avec une parcelle poilue au-dessus (Moore and Persaud, 1993).

Si cette anomalie consiste en un défaut de fusion d'une seule vertèbre, les symptômes neurologiques sont souvent absents. Le spina bifida occulta se trouve chez environ 10 % de personnes en bonne santé, donc peut être considérée comme une variation normale dans la population. (Müller and O'Rahilly, 1996). Toutefois, si plusieurs vertèbres sont impliquées dans ce type d'ATN, des problèmes d'intestins, vessie, ou des problèmes moteurs peuvent éventuellement se développer (Wynbrandt and Ludman, 1991).

3.2. Anencéphalie

C'est la forme gravissime létale des ATN qui correspond à la non fermeture du tube neural au pôle céphalique et se produit au plus tard le 24^{ème} jour de gestation (Poloce and Boisson-Gaudin, 2010). L'anencéphalie se caractérise par une absence partielle ou totale de la voûte crânienne et de l'hémisphère cérébrale (Detrait *et al.*, 2005) (Figure 7).

En effet, le cerveau antérieur normal est remplacé par une masse dorsale exposée d'un tissu nerveux indifférencié et la plupart des enfants affectés par l'anencéphalie meurent juste après la naissance ou dans les 2 premiers mois qui suivent (Baird and Sadovnick, 1984 ; Peabody *et al.*, 1989 ; Pulikkunnel and Thomas, 2005).

L'enfant anencéphale possède une période d'exencéphalie, dans laquelle le cerveau est expulsé à travers la calotte crânienne informée et il est dégradé par l'exposition au liquide amniotique. Dans certains cas, les restes des os crâniens sont présents, avec un cerveau normal sous les os de protection (Roessmann, 1995).

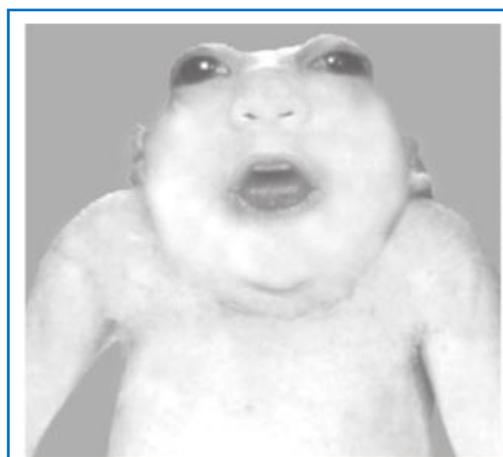


Figure 7: Enfant avec une anencéphalie (Back and Plawner, 2012).

3.3. Encéphalocèle

C'est une anomalie dans la quelle le cerveau et les méninges font hernie à travers une malformation dans la calotte crânienne, et le plus souvent dans la région occipitale (Figure 8) , suivi par le type ethmoïdo-frontal et le pariétal (Siffel *et al.* , 2003 ; Mahapatra and Agrawal, 2006).L'encéphalocèle semble découler d'un échec restreint plutôt que diffus de la fermeture du neuropore antérieur autour du 26^{ème} jour gestationnel (Back and Plawner, 2012) .

Dans l'ensemble, environ la moitié des nourrissons avec un encéphalocèle ont d'autres anomalies congénitales qui incluent la microcéphalie, l'anophtalmie, des fentes labiale ou palatine, des cardiopathies congénitales complexes et autres anomalies systémiques (Brown and Sheridan-Pereira, 1992).



Figure 8 : Photographie montrant un enfant en position latérale avec un grand encéphalocèle occipital (Raja *et al.* , 2008) .

4. Prévalence des anomalies du tube neural

Les anomalies du tube neural se produisent dans 1-6.5 cas pour 1000 naissances, avec des variations géographiques et ethniques remarquables (Dolk *et al.* , 1991 ; Feuchtbaum *et al.* , 1999 ; Aqrabawi , 2005) .Le spina bifida d'une incidence de 2.6/ 10000 est la malformation la plus fréquente, qu'elle soit ouverte ou fermée (Poloce and Boisson-Gaudin, 2010) .

En chine, la prévalence des ATN était très haute avec un taux de 10/1000 naissances (Moore *et al.* , 1997) .En Europe, l'incidence des ATN variait entre 0.4 et 3 pour 1000 naissances (Goujard, 1988), elle est particulièrement haute en Grande-Bretagne, mais plutôt basse en Suisse avec 0.9 cas pour 1000 notés entre 1980 et 1990 (Marguerat *et al.* , 1994). En

France, la prévalence de ces anomalies est estimée à 10/10000 naissances et le risque de récurrence a été estimé à 5 % (Poujade and Luton, 2008). En revanche, l'incidence des ATN en Pologne a été 2.05-2.68 cas par 1000 nouveau-nés sans aucun changement durant les vingt dernières années (Gos and Szpecht-Potocka, 2002).

Aux États-Unis, la prévalence des ATN a été estimée à 1 pour 1 000 naissances, le spina bifida et l'anencéphalie représentaient 0.5-0.8/1000 naissances vivantes (Weindling and Rennie, 2005). Au Canada, le taux d'ATN enregistré en 1999 était 5.6 /10000 naissances, dont les plus fréquentes sont le spina bifida et l'anencéphalie, mais nettement inférieur aux taux observés en 1989 (Kohut and Rusen, 2002).

5. Etiologie des anomalies du tube neural

L'étiologie des ATN est multifactorielle impliquant aussi bien des carences nutritionnelles, une prédisposition génétique (Rengasamy, 2006) et des facteurs environnementaux (Brzeziński, 1998), en plus de certains éléments traces et des vitamines qui pourraient partiellement expliquer ces anomalies (Cengiz *et al.*, 2004).

Certains chercheurs ont décrit la relation entre la prédisposition génétique, les facteurs environnementaux et les ATN dans un modèle appelé le modèle de seuil d'héritage multigénique. Selon ce modèle, les conditions environnementales extrêmes, qui agissent sur une personne ayant une prédisposition génétique spécifique, peuvent conduire à la violation du seuil, après quoi un effet spécifique se présente et dans ce cas, une ATN se produit. S'il n'existait aucun autre cas d'anomalies dans la famille, le risque de sa survenue est le même que dans la population générale (environ 0.1 %), en revanche, si l'anomalie s'est produite dans la famille, ses membres ont donc une prédisposition génétique spécifique, et la courbe de sensibilité décale vers le haut augmentant le risque du défaut de fermeture du tube neural (Connor and Ferguson-Smith, 1998).

De nombreuses étiologies ont été associées aux ATN, comme le montre le tableau II (Wilson *et al.*, 2003). Néanmoins, des études à l'échelle du génome à l'aide de collections de petites familles ont impliqué les chromosomes 2, 7 et 10 comme candidats de risque pour le spina bifida (Stamm *et al.*, 2008).

Tableau II : Etiologies des ATN (Wilson *et al.* , 2003)

Hyperhomocystéinémie
Génétique
Syndrome de Fraser
Syndrome de Fanconi
Syndrome de Schinzel
Chromosomique
Triploïdie
Trisomie 9, 13, 18
Tératogène
Valproate, Carbamazépine
Idiopathique

5.1.Facteurs génétiques

Plusieurs observations concernant certains facteurs de risque génétiques ont permis de les impliquer dans la formation d'une ATN. Tout d'abord, à priori le risque de ces anomalies pour certains groupes ethniques ou raciaux est plus élevé que pour d'autres. En second lieu, l'anomalie revient avec un risque de 3 à 5 % au sein des familles ayant des parents de premier degré proche d'un patient atteint, en revanche, le risque d'avoir des descendants atteints d'une ATN au deuxième degré est de 1 à 2 % (Au *et al.* , 2010).

L'activité anormale des gènes qui affectent l'équilibre des activités biologiques comprenant les enzymes du cycle métabolique de l'homocystéine (Van Allen *et al.* , 2002) , le recyclage des folates (Dunlevy *et al.* , 2007 ; Molloy *et al.* , 2009) , le métabolisme de la méthionine, la trans-sulfuration, la synthèse des purines et pyrimidines, la synthèse de la sérine/glycine, la méthylation de biomolécules, la synthèse des lipides membranaires et métabolismes peut conduire à une défaillance de la fermeture du tube neural entraînant ainsi une ATN (Beaudin and Stover, 2009) .

5.1.1. Gène de la Méthylène Tétrahydrofolate Réductase

Le gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) humain a été localisé à la position 1p36.3 et possède 11 exons (Goyette *et al.* , 1994). Il partage la similitude avec les régions promotrices d'autres gènes comme celui de la Cystathionine β synthase, de la Méthionine Synthase et de la Méthionine Synthase Réductase (Hombberger *et al.*, 2000).

La caractérisation de l'ADNc de la MTHFR a permis de répertorier plusieurs mutations de MTHFR chez des patients homocystinuriques, ainsi qu'un variant commun, 677C \rightarrow T (A222V), correspondant à la forme thermolabile de l'enzyme (Frosst *et al.* , 1995). Bien que les mécanismes par lesquels ce polymorphisme influence la progression de plusieurs maladies n'ont pas été bien établis, ils incluent différentes possibilités :

- ❖ Une augmentation des taux d'homocystéine peut avoir des effets sur la vascularisation ou le développement des embryons (Junien *et al.* , 2005).
- ❖ La perturbation de la synthèse de la méthionine et de la S-adénosyl méthionine peut également avoir des répercussions sur la synthèse des protéines ou les réactions de méthylation. De plus, l'homocystéine peut être convertie en S-adénosyl homocystéine considéré comme étant un inhibiteur de plusieurs méthyltransférases. Puisque des changements de méthylation de l'ADN affectent l'expression des gènes, une déficience en MTHFR peut influencer l'amorce puis le développement de processus oncogéniques (Deltour *et al.* , 2005).
- ❖ Une redistribution des métabolites de l'acide folique peut affecter la synthèse des purines et des pyrimidines (Figure 9), avec des conséquences sur la synthèse ou la réparation de l'ADN (Leclerc and Rozen, 2007).

Une seconde mutation dans le gène MTHFR, A1298C, résultant en une baisse de l'activité de la MTHFR, a été aussi identifié comme un facteur de risque putatif (Van der Put *et al.*, 1998). Ce polymorphisme pouvait augmenter le risque de spina bifida surtout en combinaison avec l'altération MTHFR C677T (Akar *et al.*, 2000).

La (MTHFR) est une enzyme clé dans le métabolisme de l'homocystéine (Hcy) dépendant des folates, qui catalyse la réduction du 5, 10-méthylène tétrahydrofolate en un donneur du méthyle le 5-méthyle-tétrahydrofolate, un Co-substrat pour la méthylation de l'Hcy en méthionine (Homberger *et al.*, 2000) (Figure 10).

Une digestion de la trypsine de MTHFR ne conduit pas à la perte de l'activité catalytique, mais rend la protéine insensible à la régulation allostérique par l'inhibiteur allostérique de la MTHFR qui est le S-adenosyl méthionine (SAM). Par ailleurs, le S-adenosyl homocystéine (SAH) montre également un effet régulateur sur l'activité de la MTHFR, il est en concurrence avec le SAM pour les sites régulateurs de la protéine, mais il n'a pas d'influence sur son activité (Finkelstein, 1998).

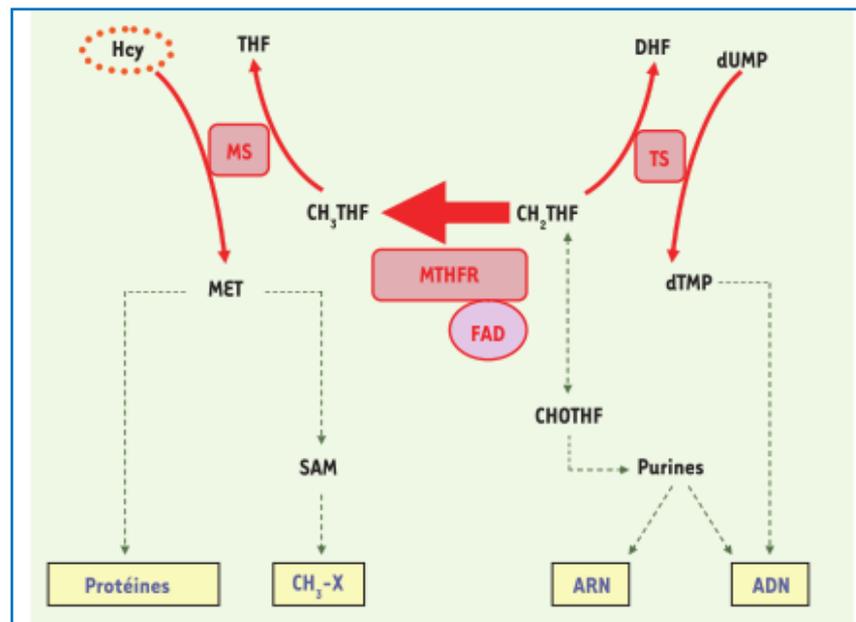


Figure 10: Répercussions métaboliques de l'activité de la MTHFR.

(Leclerc and Rozen, 2007)

MS : méthionine synthase; **TS** : thymidylate synthase; **THF** : tétrahydrofolate; **DHF** : Dihydrofolate; **SAM**: S-adenosyl méthionine. **CHOTHF**: 10-formyltétrahydrofolate

Le rôle de la MTHFR dans certaines maladies a d'abord été rapporté par Mudd *et al.* (1972) qui avaient identifié une altération fonctionnelle majeure de cette enzyme chez un patient présentant une homocystinurie. En 1988, une variante commune et thermolabile de la protéine MTHFR fut repérée (Kang *et al.*., 1988).

La déficience de l'enzyme MTHFR est une maladie autosomale récessive caractérisée par des taux élevés d'homocystéine qui peuvent excéder 100 $\mu\text{mol/L}$ et des taux anormaux ou bas de la méthionine (Özer *et al.*., 2011). Cette déficience peut être la cause de plusieurs pathologies telle la thrombose veineuse et l'infertilité masculine chez les adultes ; en plus de l'augmentation du risque d'ostéoporose chez les personnes âgées ; et peut même être la cause d'un avortement durant la grossesse (Bezold *et al.*., 2001 ; Lopaciuk *et al.*., 2001; Trabetti, 2008). Chez les enfants, ce polymorphisme a été associé à un retard du développement intra-utérin, aux maladies congénitales cardiaques, aux ATN, et aux anomalies chromosomiques (Akar *et al.*., 1999 ; Akar *et al.*., 2001 ; Infante- Rivard *et al.*., 2002 ; Van Beynum *et al.*., 2007).

5.1.2. Gène de la Cystathionine β Synthase

Le gène codant pour la Cystathionine β Synthase (CBS) est localisé sur le chromosome 21 (Kraus, 1998), et quatre-vingt-douze mutations de ce gène ont été identifiées. La plupart d'entre eux est en corrélation avec l'homocystinurie et seulement 14 mutations ont été trouvées dans plus de deux allèles, et les autres ne sont que des modifications individuelles. Pour un 1/3 de toutes les mutations, l'activité enzymatique a été analysée et la plupart d'entre elles conduisent à une diminution de l'activité catalytique de l'enzyme (Kraus, 1999).

La mutation de l'allèle de la CBS qui contient une insertion de 68 paires de bases dans l'exon 8 a été identifiée pour la première fois chez un patient avec une homocystinurie par Sebastio *et al.* (1995), qui pensaient que ce polymorphisme était dû à l'utilisation d'un codon stop prématuré lié à l'insertion dans l'ARNm de CBS menant à la traduction d'une enzyme courte inactive.

Par la suite, Tsai *et al.* (1996), ont montré que l'insertion de 68 paires de bases génère un site d'épissage alternatif permettant l'élimination de toute la région insérée, permettant ainsi la formation d'un ARNm normal transcrit et une enzyme CBS entièrement fonctionnelle.

Dans une étude plus large en Europe, De Stefano *et al.* (1998) ont rapporté que les individus homozygotes pour la mutation MTHFR 677TT portant l'allèle CBS 844ins68, avaient des taux faibles en homocystéine (similaires à celles observées chez des sujets

MTHFR 677 CT ou CC) comparés aux non-porteurs, cependant les niveaux de folates n'étaient pas présentés dans ce rapport.

Plus tard, Dekou *et al.* (2001) ont également signalé que l'allèle CBS 844ins68 semblait avoir un effet abaissant de l'homocystéine chez les homozygotes MTHFR 677TT, mais aucune donnée n'a été signalée pour l'effet sur les niveaux de folate. D'un autre côté, un taux élevé de pertes fœtales a été rapporté chez les mères avec une homocystéinurie due à la déficience en CBS (Mudd *et al.* , 1985).

Une étude menée sur des individus du Nord d'Irlande ,a non seulement soutenu ce qui a été déjà démontré par rapport aux taux d'homocystéine significativement bas chez les porteurs de la mutation MTHFR C677T à l'état homozygote en plus de l'allèle CBS ins68 , alors que ces personnes possédaient des concentrations plasmatiques élevées en folates par rapport aux autres non-porteurs (Summers *et al.* , 2008) .

La synthèse irréversible de la CBS à partir de l'homocystéine et de la sérine est catalysée par la (CBS) qui est une protéine cytoplasmique (Figure 11). La forme active est un tétramère, constitué de 4 monomères identiques avec des poids moléculaires de 63kDa. Chaque sous-unité peut lier le phosphate de pyridoxal (dérivé de la vitamine B₆), la molécule de SAM et la molécule d'hème (Kraus ,1998).

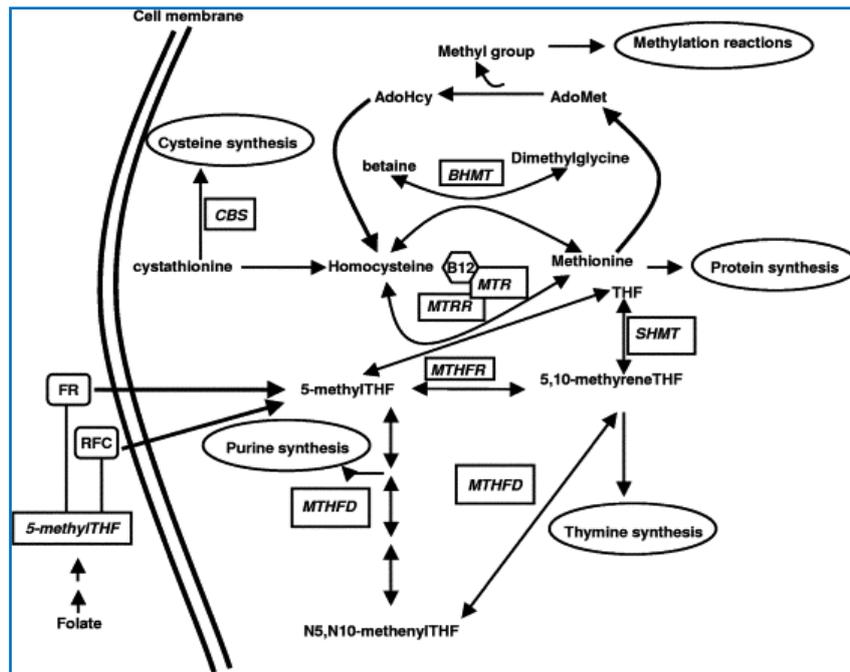


Figure 11 : Diagramme simplifié des cycles métaboliques du folate et de l'homocystéine (Bassuk and Kibar, 2009).

Ado Hcy: S-adenosyl homocysteine; **Ado Met**: S-adenosyl méthionine; **BHMT**: betaine-homocysteine méthyltransférase; **CBS**: cystathionine β -synthase; **FR**: folate receptor; **MTHFD**: méthylènetétrahydrofolate déshydrogénase; **MTHFR**: méthylènetétrahydrofolate réductase; **MTR**: méthionine synthase; **MTRR**: méthionine synthase réductase; **RFC**: reduced folate carrier; **SHMT**: serine hydroxyl methyltransférase; **THF**: tétrahydrofolate.

5.1.3. Gène de la Méthionine Synthase Réductase

Le gène de la méthionine synthase réductase (MTRR) est localisé sur le chromosome 5, avec une expression faible et commune à tous les tissus examinés (Gos and Szpecht-Potocka, 2002). Cette enzyme est responsable de la régulation de la méthionine synthase (MTR) par la méthylation réductive.

Le polymorphisme le plus commun dans le gène de la méthionine synthase réductase est la substitution A66 G, conduisant à un changement d'isoleucine en méthionine, l'acide aminé 22 (I22M). Bien que le polymorphisme A66G ne change pas l'activité catalytique de l'enzyme, la fréquence du génotype 66 GG était plus élevée chez les personnes atteintes d'ATN ainsi que leur mère par rapport au groupe témoin (Wilson *et al.*, 1999).

5.1.4. Gène de la Méthylènetétrahydrofolate Déshydrogénase

Le gène codant pour la méthylènetétrahydrofolate déshydrogénase (MTHFD) a été localisé sur le chromosome 14 (Hol *et al.* , 1998). L'analyse des mutations de ce gène chez les patients ayant une ATN a mené à la découverte de la substitution G878A dans un allèle chez un patient atteint de spina bifida, responsable de la substitution de l'arginine en histidine de la protéine MTHFD. Une autre substitution G1958A de l'arginine en glutamine a été isolée chez plusieurs patients atteints d'ATN mais avec des fréquences semblables dans les groupes de patients et témoins, donc son influence sur l'étiologie des ATN est loin d'être déterminée (Hol *et al.*, 1998).

5.1.5. Gène de la Dihydrofolate Réductase

Il a été signalé que les mères d'enfants atteints d'ATN homozygotes pour la délétion du gène de la dihydrofolate réductase (DHFR) 19-paires de bases ont un double risque d'ATN par rapport aux témoins dans la population turque (Akar *et al.* , 2008).

5.1.6. Les gènes des enzymes du cycle de l'acide folique nécessaires pour la biosynthèse des nucléotides

Le gène de la méthylènetétrahydrofolate déshydrogénase (MTHFD1) code pour l'enzyme cytoplasmique Synthase. Le polymorphisme 1958G/A qui donne lieu à une substitution dans le domaine de la synthétase du 10-formyle THF a été observé comme facteur de risque pour la mère et l'enfant atteint d'ATN dans les populations Irlandaises et Italiennes (De Marco *et al.* , 2006), mais pas chez les Néerlandais (Van der Linden *et al.* , 2007_a) ou les Britanniques (Doudney *et al.* , 2009). Ce polymorphisme provoque une activité réduite de l'enzyme THF synthase dans les lignées cellulaires, résultant en la diminution de la biosynthèse des purines (Christensen *et al.* , 2009).

5.1.7. Les gènes des transporteurs des Folates

Le transport du folate alimentaire au sérum, puis vers le cytoplasme des cellules implique un certain nombre de protéines produites par les gènes de transporteur/récepteurs des folates comme le SLC19A1. Aucun risque d'une augmentation ou une diminution d'ATN n'a été associée avec les polymorphismes testés pour ce gène sauf pour l'allèle 80G>A du gène SLC19A1. Malgré qu'une telle association fut trouvée

dans les populations Chinoises, Italiennes et Néerlandaises , elle n'existe pas dans d'autres pays tel l'Irlande , la Grande Bretagne et l'Amérique (De Marco *et al.*, 2003 ; Pei *et al.*, 2009). Les gènes qui codent pour des protéines de transport, capture et rétention cellulaire des folates, comme le FRa, FRb et FRg, RFC1 (transporteur du folate réduit), GCPII (Folyl-g-glutamate carboxypeptidase) et FPGS (Folylpolyglutamate synthétase) ont été proposé comme candidats dans l'étiologie des ATN mais avec des résultats non concluants pour toutes les études (Beaudin and Stover, 2009 ; Greene *et al.* , 2009 ; Molloy *et al.* , 2009) .

5.1.8. Autres gènes

✓ Certaines études ont conclu que plusieurs gènes nécessaire au transport et au métabolisme du glucose sont des facteurs de risque potentiels pour le méningomyélocèle (Au *et al.* , 2008).

✓ Les variations fonctionnelles des divers méthyltransférases qui jouent un rôle important dans la croissance, la différenciation et la prolifération des cellules, peuvent également être des facteurs de risque susceptibles à la formation des ATN (Blom, 2009). Plusieurs études ont été menées pour vérifier l'association des gènes impliqués dans la transméthylation d'acides nucléiques, de protéines et acides aminés, du métabolisme des lipides , comme facteurs potentiel causant les ATN, mais cette association n'a été signalée que pour les gènes de la biosynthèse des lipides membranaires (CHKA), et trois des gènes de méthyltransférase des protéines (PRMT1) (Au *et al.* , 2010).

✓ Le gène VANGL2 code pour un homologue d'une protéine de la polarité cellulaire impliquée initialement dans la voie de polarité des tissus chez la drosophile et il s'exprime le long du tube neural au moment de sa fermeture (Kibar *et al.* , 2001), mais il existe chez les vertébrés un second gène VANGL1. Chez les humains, l'hétérozygotie pour les variantes mutantes du gène VANGL1 a été associée avec les ATN. Par ailleurs, des mutations indépendantes dans le gène VANGL1 humain ont été identifiées chez trois patients dans une étude qui a porté sur 144 patients représentant des cas sporadiques et familiaux d'ATN (Kibar *et al.* , 2007) . En outre, chez une fille italienne de 10 ans avec un syndrome de régression caudale, une malformation ano-rectale, et une moelle épinière attachée, Kibar *et al.* . (2007) ont détecté une mutation V239I, résultant en une substitution de la valine avec l'isoleucine dans le gène VANGL1, qui était présente chez sa mère sans aucun signe clinique d'ATN et chez son frère qui avait seulement des sinus dermiques.

✓ L'oxyde nitrique (NO) inhibe l'activité de la méthionine synthase et interfère avec la reméthylation de l'homocystéine (Danishpajooch *et al.* , 2001) et la

neurulation appropriée (Nachmany *et al.* , 2006). L'oxyde nitrique synthase endothéliale 3 (NOS3) est exprimé constitutivement dans les cellules endothéliales et elle est responsable de la production vasculaire du NO.

Brown *et al.* (2004) ont constaté que le polymorphisme G894T au niveau du gène NOS3 chez l'embryon était associé de manière significative avec le risque de spina bifida. En revanche , Van der Linden *et al.*(2007_b) ont observé que le génotype 894TT NOS3 n'augmente pas le risque de spina bifida chez les mères ou chez leurs enfants atteints , sauf en cas de combinaison des génotypes maternelles 894GT/TT et MTHFR 677TT qui augmente ce risque significativement en association avec des taux plasmatique d'homocystéine élevés .

5.2.Facteurs nutritionnels

Les facteurs nutritionnels semblent aussi être importants dans l'étiologie des ATN. En revanche, le rôle exact de la vitamine B₁₂ et les éléments traces comme le cuivre (Cu) et le zinc (Zn) est encore incertain et il n'y a qu'une quantité limitée de la littérature publiée sur ce thème (Zeyrek *et al.* , 2009).

5.2.1. Carence en folates

Du fait du rôle des folates dans la synthèse de l'ADN et de l'ARN, la carence en acide folique provoque un ralentissement des mitoses dans les systèmes à multiplication rapide. C'est le cas par exemple pour les globules rouges (anémie macrocytaire due à la carence en folates et/ou en vitamine B₁₂) (Potier de Courcy, 2005).

Plusieurs hypothèses ont tenté d'expliquer l'implication d'un déficit en folates à un moment critique du développement du SNC, ce phénomène est alors observé au moment de la division rapide des cellules où la disponibilité du tissu nerveux pourrait être limité et pourrait conduire à un défaut de fusion des feuilletts nerveux, produisant ainsi l'ATN (Schorah *et al.* , 1993).

Certaines études ont démontré que les taux de folates chez les mères et leurs enfants atteints d' ATN ne sont pas déficients , cependant les valeurs sont généralement plus basses par rapport à la marge contrôle (Kirke *et al.*, 1993 ; Mills *et al.* , 1995) .Les femmes appartenant à des milieux défavorisés sur le plan économique et/ou culturel sont les plus exposées au déficit en folates (Hernandez-Diaz *et al.* , 2002). Ces observations suggèrent que la réduction des fonctions des enzymes de l'homéostasie du métabolisme du folate et de l'Hcy peut servir à modifier le risque des ATN (De Marco *et al.*, 2000).

Compatible avec l'observation clinique, les données des expérimentations animales indiquent que l'insuffisance en folate intracellulaire prédispose aux ATN. Par exemple, les souris qui manquent de récepteurs de liaison des folates *Folr1*, nécessaires pour le transport des folates dans les cellules affichent des embryopathies sévères et des ATN qui peuvent être largement améliorés avec l'acide folique à doses élevées (Gelineau-van Waes *et al.*, 2008).

5.2.2. Carence en Vitamine B₁₂

L'homocysteine est reméthylée en Méthionine par la méthionine synthase (MS) qui catalyse le transfert du groupement méthyle du 5-méthyltétrahydrofolate (5-méthyle-THF), et ce par l'intermédiaire de la vitamine B₁₂ qui agit comme un Co-transporteur à l'homocysteine (Potier de Courcy, 2005).

Les troubles maternels entraînant une carence en vitamine B₁₂, y compris l'anémie pernicieuse, les troubles de l'absorption comme la maladie cœliaque et les entéropathies inflammatoires, peuvent entraîner un risque accru d'ATN. Les femmes qui, à cause de leurs préférences culturelles et alimentaires, excluent les viandes rouges et d'autres sources de vitamine B₁₂ de leur alimentation, courent un risque accru de donner naissance à des enfants atteints d'ATN qui ne peut être corrigé par l'administration de fortes doses d'acide folique (Van Allen *et al.*, 2002).

Plusieurs chercheurs ont examiné l'association possible entre les concentrations de la vitamine B₁₂ au niveau du sérum ou dans le liquide amniotique et les ATN, mais avec des résultats ambigus (Mills *et al.*, 1992; Kirke *et al.*, 1993; Steen *et al.*, 1998). En outre, une étude a rapporté que les taux plasmatiques élevés en homocysteine et au contraire très faibles en vitamine B₁₂ chez les mères et leurs enfants atteints d'ATN sont des facteurs de risques indépendants pour ces anomalies (Stegers-Theunissen *et al.*, 1995).

Il a été remarqué que dans le plasma, environ 20 % de la vitamine B₁₂ est lié à la transcobalamine (TC) et environ 80 % lié à l'haptocorrine (HC). L'Holo-TC est la proportion de TC qui contient la vitamine B₁₂, par opposition à Apo-TC auquel aucune vitamine n'est liée. TC transporte la vitamine B₁₂ à la cellule, alors que le rôle du HC est incertain. Une disponibilité cellulaire réduite de la vit B₁₂ peut être détectée plus tôt par la détermination des niveaux de holo-TC plasmatiques que par le niveau de la vit B₁₂ totale, qui est la somme des holo-TC et holo-HC (Afman *et al.*, 2002).

Selon une étude réalisée par Afman *et al.* (2001), des niveaux plasmatiques bas de holo-TC ont été trouvés en association avec un risque accru pour avoir un enfant

atteint d'une ATN, alors qu'aucune telle association n'a été observée avec les niveaux plasmatiques de la vitamine B₁₂ totale. En outre, ces chercheurs ont constaté qu'un faible pourcentage de la vitamine B₁₂ lié à TC (Holo-TC/total-TC) est associé à un risque très élevé d'ATN. Comme les niveaux de la vitamine B₁₂ totale n'ont pas diminués chez les personnes ayant des niveaux faibles en holo-TC, ils ont suggéré une liaison perturbée entre cette vitamine et son transporteur TC en se basant sur l'hypothèse que les variations génétiques dans le gène du TC pourraient expliquer une altération de sa fonction.

Certains des polymorphismes nucléotidiques simples semblent affecter les concentrations de TC ou sa fonction, cependant, le nombre relativement restreint des personnes définies dans l'étude exclut la conclusion que ces polymorphismes affectent aussi bien les taux plasmatiques d'homocystéine que la vit B₁₂. De plus amples recherches devraient se concentrer sur la région non codante de ce gène pour trouver une explication de la liaison perturbée de la vitamine B₁₂ à TC chez les mères ayant un enfant atteint d'anomalie du tube neural (Afman *et al.*, 2002).

5.2.3. Déficience en zinc

Le zinc (Zn) est un nutriment essentiel pour la croissance cellulaire normale et pour la différenciation chez toutes les espèces. Il est particulièrement nécessaire pour la fermeture du tube neural humain. Par ailleurs, il peut également jouer un rôle en influençant le métabolisme du cuivre dans le développement des ATN (Zeyrek *et al.*, 2009).

Le Zn joue un rôle dans l'absorption des folates dans le tractus gastro-intestinal, car les folates alimentaires sous forme de ptéroylpolyglutmates sont hydrolysés par la c-glutamyl hydrolase, une enzyme activé par le zinc, dans la membrane de frontière en brosse de l'intestin humain. Par conséquent, l'insuffisance de zinc peut entraîner une malabsorption du folate alimentaire (Canton and Cremin, 1990). Par ailleurs, cet élément est aussi impliqué dans le métabolisme des folates, comme cofacteur pour les enzymes du métabolisme des folates (Figure 12), la dihydrofolate réductase ainsi que la méthionine synthase qui ont besoin de vitamine B₁₂ (Ebisch *et al.*, 2006).

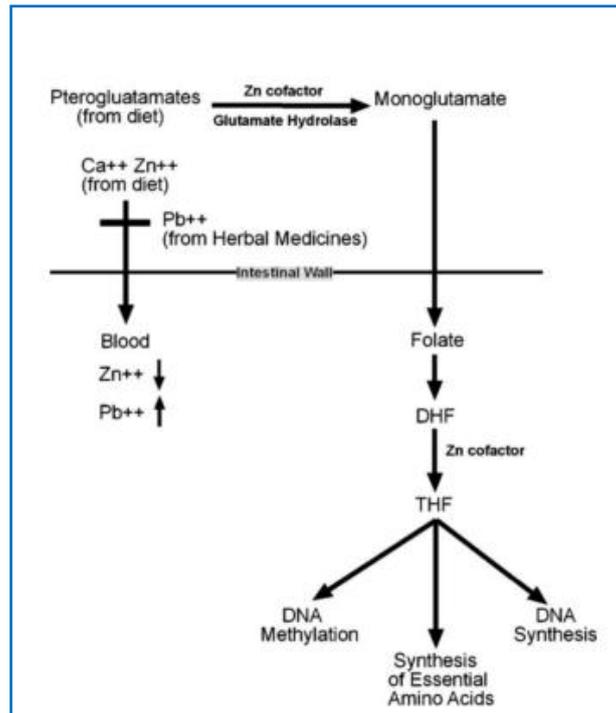


Figure 12: Représentation schématique de l'absorption des folates provenant de l'intestin et son métabolisme dans l'organisme (Singla *et al.* , 2009).

La déficience ou carence en zinc pourrait jouer un rôle dans l'étiologie des ATN (Velie *et al.* , 1999 ; Golalipour *et al.* , 2006) .Ceci a été prouvé par plusieurs recherches menées en Turquie (Cengiz *et al.* , 2004) ; aux Pays bas (Groenen *et al.* , 2003) , ainsi que par d'autres (Shaw *et al.* , 1999) . En Revanche d'autres études n'ont pas pu établir une telle relation (Weekes *et al.* , 1992 ; Hambidge *et al.* , 1993 ; Nikolov *et al.* , 1993).

Plusieurs études ont constaté des niveaux sériques bas en Zn chez les nouveau-nés avec des ATN mais aussi chez leurs mères par rapport au groupe témoin (Carrillo-Ponce *et al.* , 2004 ; Zeyrek *et al.* , 2009 ; Dey *et al.* , 2010) .Cependant, les niveaux d'acide folique, vitamine B₁₂ et de fer n'étaient pas significativement différents entre les deux groupes.

D'un autre côté, certaines études effectuées en Turquie (Çavdar *et al.* , 1991), Pays bas (Groenen *et al.* , 2003) , et au Mexique (Carrillo-Ponce *et al.* , 2004) ont démontré que le statut du zinc au niveau des cheveux des nouveau-né est associé aux ATN . Une autre étude menée en Inde a rapportée une relation entre les taux faibles en zinc au niveau des cheveux des nouveau-nés atteints d'une ATN en Inde, mais sans aucune différence au niveau sérique (Srinivas *et al.* , 2001). Ceci est probablement dû aux diverses méthodes d'analyse du zinc (Golalipour *et al.* , 2006).

En revanche, d'autres études ont trouvé une concentration élevée de zinc dans le cordon ombilical chez les nouveau-nés atteints d'ATN. Le zinc sérique total était similaire à celui des témoins, mais il y avait un changement dans la distribution du Zn. L'hyper-zincémie fœtale et le zinc lié à l'albumine maternel élevé constaté dans cette étude suggèrent que les fœtus atteints d'ATN reçoivent le Zn mais ne l'utilise pas normalement (Zimmerman, 1984).

5.2.4. Déficience en cuivre

Le cuivre (Cu) est une composante importante des protéines essentielles pour la fonction neurale. Son rôle dans le développement des ATN est plausible en raison de sa participation dans le stress oxydatif (Burkitt, 2001 ;Cengiz *et al.* , 2004) .

Une étude précédente a montré que le niveau sérique du cuivre dans les grossesses pathologiques était significativement plus élevé comparé aux grossesses normales (Alebic-Juretic and Frkovic, 2005).

D'autres recherches ont constaté que les enfants atteints d'ATN, ainsi que leur mères avaient des niveaux plasmatiques élevés en cuivre comparés aux témoins. Ceci peut être expliquer par l'interaction Cu-Zn au cours de l'absorption intestinale, car lorsqu'il y a une diminution du Zn, se produit une augmentation de l'absorption du Cu, donc son augmentation au niveau de sérum (Zeyrek *et al.* , 2009).

5.3.Facteurs environnementaux associés aux ATN

La majorité des ATN est d'origine multifactorielle ; autrement dit, elles résultent de l'effet combiné des facteurs génétiques et environnementaux. La pauvreté, la famine, les guerres, les variations saisonnières et les préférences alimentaires ont contribué à montrer qu'une alimentation de mauvaise qualité est un facteur environnemental important de ces anomalies (Van Allen *et al.* , 2002).

5.3.1. Les antiépileptiques

La plupart, sinon tous les antiépileptiques sont connus pour avoir des effets tératogènes (Ornoy, 2006).En outre, l'administration de médicaments antiépileptiques aux femmes enceintes induit des malformations congénitales avec une incidence s'élevant de 3% à 9% après l'administration (Kaneko *et al.* , 1999). Ces chiffres peuvent augmenter jusqu'à 28% quand trois ou plus d'antiépileptiques sont administrés aux mères malades (Holmes *et al.* , 2001).Le Carbamazépine (Tegretol) est associé avec les ATN dans 0.5 – 1 % des grossesses chez les femmes prenant cette médication, ainsi qu'une augmentation des anomalies cardiovasculaires et des fentes labiale/palais (Ross, 2010) . D'un autre côté, l'acide

Valproïque possède l'une des plus fortes associations avec les ATN, et les deux médicaments accroissent 10 fois le risque de ces anomalies de 2 % des grossesses conçues sous ces traitements (Dansky and Finnell, 1991).

Plusieurs mécanismes ont été proposés, mais il existe un consensus général que la prédisposition génétique à l'effet tératogène du Valproate est requise pour promouvoir ces ATN (Duncan *et al.* , 2001 ; Zhu *et al.* , 2009). Parmi les mécanismes tératogènes associés au Valproate la génération de composés réactifs de l'oxygène (Defoort *et al.* , 2006) , les changements dans l'expression des gènes induits (Stodgell *et al.* , 2006) et la reprogrammation épigénétique à travers une inhibition directe des histones désacétylases (Milutinovic *et al.* , 2007) .

5.3.2. Les facteurs socioéconomiques

L'éducation reflète la capacité d'accéder et d'interpréter les informations relatives à la santé ; l'occupation influe sur la santé par le biais de l'exposition aux risques du lieu de travail, et aux facteurs psychosociaux et réseau social ; quant au revenu, il influe sur la santé maternelle, soins médicaux et mode de vie (Yang *et al.* , 2008).

Plusieurs études ont rapporté une augmentation du risque d' ATN en relation avec le statut socioéconomique de femmes au foyer , à leur éducation et à leur revenu (Canfield *et al.* , 1996 ; Farley *et al.* , 2002 ; Blanco Muñoz *et al.* , 2005 ; Li *et al.* , 2006 ; Grewal *et al.* , 2008) .Ceci peut être expliqué par l'utilisation de l'acide folique en période pré-conceptionnelle et pendant la période de fermeture du tube neural par les femmes ayant un niveau éducatif et social élevé (Brough *et al.* , 2009).

5.3.3. L'appartenance ethnique

Certaines études ont démontré que la prévalence des ATN variait selon la race. Aux Etats Unies, d'après une recherche durant la période 2003-2005, les prévalences des ATN étaient de 2/1000 naissances chez les blancs non-hispaniques, 1.96 pour les hispaniques, et 1.74 chez les noirs non-hispaniques (Boulet *et al.* , 2009). Dans une autre étude similaire, la prévalence des noirs du Sahara était de 1.99 / 1000 naissances, plus élevée de celle chez les noirs américains, ceci est probablement due à un déficit en supplémentation en acide folique (Njamnshi *et al.* , 2008).

5.3.4. Les fumonisines

La consommation de maïs contaminé par les fumonisines, qui sont une famille de mycotoxines produites par le champignon *Fusarium verticillioides* (Munkvold, 2003) peut

entraîner le cancer ou des ATN, surtout en combinaison avec d'autres facteurs de risque tel que la susceptibilité génétique et la carence en folates (Sadler *et al.* , 2002 ; Marasas *et al.* , 2004) . Ces toxines inhibent la biosynthèse des sphingolipides par l'inhibition de la céramide Synthase (Wang *et al.* , 1991), affectant ainsi le transport du 5- méthyltétrahydrofolate et entraînant une carence en folates et des ATN (Stevens and Tang ,1997).

La relation entre la consommation maternelle de fumonisine et les ATN est plus évidente chez les populations qui consomment une quantité plus élevée de maïs , tels que ceux de la frontière Texas - Mexique, Amérique centrale et du Sud, Afrique du Sud et des provinces du Nord de la Chine (Moore *et al.* , 1997 ; Hendricks , 1999 ; Hendricks *et al.* , 1999 ; Missmer *et al.* , 2006).

5.3.5. Autres facteurs

✓ Il est évident que le risque d'avoir un enfant atteint d' ATN est associé à l'exposition paternelle ou maternelle aux pesticides , produits d'entretien chimique et/ou travaux d'agriculture durant le mois qui précède la conception et dans le premier trimestre de grossesse (Garcia *et al.* ,1999 ; Blatter *et al.* , 2000 ; Shaw *et al.*, 2002 ; Lacasaña *et al.* , 2006 ; Rull *et al.* , 2006 Brender *et al.*, 2010 ;Herdt-Losavio *et al.*, 2010).

✓ La consommation du tabac, la prise de médicaments anticonvulsivants, et d'alcool en plus de l'état de santé général de la mère ont une influence sur le développement d'une anomalie du tube neural (Kan *et al.*, 1998 ; Iqbal, 2000) .

✓ D'après une étude en Israël, un risque accru d'ATN a été associé à une exposition à un ou plusieurs antagonistes de l'acide folique au cours du premier trimestre de la grossesse (Matok *et al.*, 2009).

✓ Les médicaments à base de plantes avec des compositions inconnues et des métaux lourds sont facilement disponibles partout dans le monde (Saper *et al.* , 2004) , et comme près de la moitié des grossesses sont non planifiées (Forrest,1994) , il est donc raisonnable de supposer qu'un grand pourcentage de femmes sont exposées à ces herbes médicinales pendant le début de leur grossesse. Ces médicaments à base de plantes contenant du plomb ou autres bivalents cationiques comme le mercure, le cadmium, ou l'arsenic contribuent en partie à l'insuffisance de folates sériques maternelles conduisant à des ATN. Ils pourraient être considérés comme des antagonistes indirectes des folates. Par ailleurs, le plomb pourrait induire des ATN en réduisant la biodisponibilité du zinc à partir des aliments et cause indirectement la déficience en zinc (Bound *et al.* , 1997) . Il est envisageable que

l'ingestion de plantes médicinales chez les femmes d'un certain milieu socioéconomique peut aggraver leur situation et contribuer à des anomalies du tube neural (Singla *et al.* , 2009).

6. Diagnostic

Les techniques de dépistage des ATN sont représentées par l'échographie effectuée systématiquement au cours de la grossesse pour détecter la malformation si elle a une taille suffisante et/ou le dosage d'alpha-foeto-protéine (AFP) dans le liquide amniotique ou dans le sang qui pourra ainsi dépister 80% des ATN pour des valeurs sériques supérieures à 2.5 fois la normale entre les 16^{ème} et 18^{ème} premières semaines de grossesse, et seulement si la concentration de l'AFP est élevée et que l'échographie ne permet pas d'en connaître la cause, une amniocentèse est généralement envisagée à des fins diagnostiques (Texier and Arthuis, 1985).

6.1. Echographie

Dans la période néonatale et jusqu'à l'âge de 3 mois environ, l'échographie spinale peut fournir une imagerie excellente de la moelle épinière terminale et offre un test sensible des dysraphies présumées de la colonne vertébrale (Thompson, 2010). L'anencéphalie peut aussi être diagnostiquée par l'échographie fœtale au cours du deuxième trimestre de la gestation (Crane, 1992).

L'échographie ne doit pas être pratiquée sur des lésions ouvertes, alors qu'en cas d'anomalies fermées, elle montre un méningocèle cloisonné et échogène en continuité avec une moelle attachée basse. L'échographie crânienne doit toujours être réalisée chez ces nourrissons à la recherche d'une hydrocéphalie associée (De Bruyn, 2007).

6.2. Imagerie par Résonance Magnétique

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) demeure la modalité d'imagerie définitive, elle peut visualiser le contenu des hernies dans le sac et aider à détecter les autres anomalies du cerveau (Naidich *et al.* , 1993).

La terminaison de la moelle épinière, l'anomalie précise ainsi que toute association des malformations squelettiques sont bien démontrées (Thompson, 2010).

6.3. Alpha foetoprotéine

L'alpha-foetoprotéine (AFP) est une glycoprotéine oncofoetale dont la masse moléculaire est de 69 kDa. L'AFP est constituée d'une chaîne polypeptidique de 590 acides aminés comportant 15 ponts disulfures. Le gène codant pour l'AFP est sur le bras long du chromosome 4 (Denis *et al.* , 2000).

L'AFP passe normalement du sérum fœtal dans les urines du fœtus, puis dans le liquide amniotique, là où elle est avalée et métabolisée dans le tractus gastro-intestinal fœtal (Brock, 1976). Elle exerce différentes activités physiologiques comme transporteur d'ions, de bilirubine et facteur de croissance cellulaire. Pendant la vie fœtale, l'AFP est d'abord synthétisée par la vésicule vitelline puis par le foie. Sa concentration sérique chez le fœtus atteint 3 à 4 g/l vers la 13^{ème} semaine de gestation. Au même moment, le taux sérique maternel est d'environ 200 µg/l car l'AFP passe la barrière placentaire (Denis *et al.*, 2000).

L'examen de l'AFP est généralement réalisé au cours du deuxième trimestre avec trois marqueurs additionnels : gonadotrophines chorioniques humaines (hCG), oestriol non conjugué et inhibine A, qui constituent collectivement l'examen quadruple. Ce dernier est conçu pour détecter les ATN ouvertes et le syndrome de Down (Anderson and Brown, 2009).

En cas ATN ouvertes, il y a fuite du sérum fœtal directement dans le liquide amniotique, et le niveau de l'AFP est élevé dans ce liquide tout comme les protéines sériques maternelles (Milunsky *et al.*, 1980). Ainsi en cas de Sb, l'AFP est généralement comprise entre 2,00 et 2,50 MoM (Poloce and Boisson-Gaudin, 2010). Par contre, lorsqu'une anomalie du tube neural est fermée, le niveau de l'AFP n'est pas élevé, ceci se produit dans seulement 5 % des cas (Milunsky *et al.*, 1980).

7. Pronostic et complications des ATN

Les conséquences sur la vie des personnes atteintes d'ATN et leurs familles peuvent représenter tout un défi, car elles entraînent des complications graves, qui sont une cause importante de morbidité et de mortalité chez les nouveau-nés (Raja *et al.*, 2008 ; Juraneck and Salman, 2010).

Le taux de mortalité en Pologne était de 0.89 par 1000 nouveau-nés, plus élevé que dans d'autres pays Européens, comme la Grande Bretagne avec 0.08/1000 ou la Hongrie avec 0.25/1000 naissances (Gos and Szpecht-Potocka, 2002).

Les ATN sont responsables le plus souvent de séquelles psychomotrices et sphinctériennes importantes (Sanoussi *et al.*, 2001 ; Detrait *et al.*, 2005), nécessitant une prise en charge multidisciplinaire (Thompson, 2010), car sans cela, les personnes atteintes de sb ne survivent pas assez longtemps et seulement 46% survivent jusqu'à l'âge de 35 ans (Hunt and Oakeshott, 2003).

Plus de 90 % des personnes atteintes d'ATN présentent en plus un syndrome d'Arnold Chiari et une hydrocéphalie nécessitant une dérivation qui doit fréquemment être

révisée. Les incapacités secondaires dans la population adulte porteuse de myéломéningocèle sont notamment l'hydronéphrose, l'insuffisance rénale, les plaies, la perte de mobilité, l'ostéoporose, l'isolement social et la dépression (Rauen and Aubert, 1992 ; Date *et al.* , 1993 ; Zurmohle *et al.* , 1998).

8. Traitement

L'objectif du traitement des ATN est la fermeture du défaut de la dure-mère, et la reconstruction de la déformation osseuse externe (Smit *et al.* , 1993). En cas d'encéphalocèle, il devrait être recommandé à un âge plus précoce pour éviter la distorsion de l'anatomie du visage durant la croissance. Dans le cas du type occipital, la chirurgie est généralement accomplie peu après la naissance pour repositionner le cerveau protubérant et le reculer dans le crâne, supprimer tout tissu dysplasique du cerveau et corriger la déformation du crâne (Raja *et al.* , 2008).

9. Prévention des anomalies du tube neural

En raison de la forte incidence des ATN dans différentes populations et à la faible efficacité du traitement chirurgical de ces pathologies, la prévention est d'une importance capitale (Gos and Szpecht-Potocka, 2002). Comme beaucoup d'autres anomalies congénitales et des troubles génétiques, les ATN peuvent être identifiées dans la période prénatale et par conséquent, peuvent se prêter à une prévention secondaire via l'arrêt électif des grossesses affectées. Cependant, ces anomalies se présentent comme un des quelques défauts de naissance pour les lesquelles des stratégies de prévention primaires sont également disponibles (Finnell *et al.* , 2013).

Les essais cliniques de différents pays qui ont mis en place des programmes alimentaires d'enrichissement obligatoire par l'acide folique indiquent que la prévalence des ATN est réduite d'environ la moitié chez la progéniture après cette fortification (Blencowe *et al.* , 2010) .Ceci a été confirmé par l'étude de Fujimori *et al.* (2013) dans l'état de São Paulo au Brésil, où l'enrichissement de la farine par l'acide folique a réduit la prévalence des ATN de 35% passant de 0,57/1 000 à 0,37/1 000 naissances.

9.1. L'acide folique

9.1.1. Données biochimiques

L'acide folique, connu aussi sous le nom de vitamine B₉ ou acide ptéroylmonoglutamique, est une molécule simple, de poids moléculaire égal à 441. La

vitamine naturelle est surtout présente dans les aliments sous la forme plus complexe de polyglutamates, appelés communément folates. Ces derniers doivent être déconjugés par une enzyme intestinale spécifique, avant d'être absorbés (Potier de Courcy, 2005). Cette opération limite la biodisponibilité qui se situe en réalité entre 60 et 100% pour une alimentation à base de fruits, légumes et jus d'agrumes, lorsqu'elle est calculée avec des méthodes physiologiques, basées sur la mesure des réserves accumulées après la digestion (Brouwer *et al.*, 1999).

Il existe un cycle entéro-hépatique important; le stockage est hépatique et les réserves sont faibles (Zeisel, 2009). Les globules rouges renferment la plus grande partie du stock, qui n'est pas échangeable mais peut être récupéré lors de leur destruction. C'est ainsi que les réserves ne s'épuisent à moins de 4 mois environ de restriction sévère chez un homme jeune bien nourri (Herbert, 1962).

Les folates circulent essentiellement sous forme de méthyltétrahydrofolate et sont faiblement liés à des protéines non spécifiques: ainsi la FABP "folic acid binding protein" a une grande affinité pour les folates oxydés et les oriente vers le foie (Zeisel, 2009). L'entrée des folates dans la cellule dépend d'un système de transport spécifique. A ce niveau, ils sont transformés en polyglutamates grâce à une déméthylation (dépendante de la vitamine B₁₂), ensuite survient la réduction par une déhydrofolate réductase aboutissant à la synthèse de dihydrofolates et surtout de tétrahydrofolate (Poujade and Luton, 2008).

9.1.2. Fonctions des folates

L'acide folique agit toujours sous une forme non oxydée, il agit comme transporteur -et donc donneur- de fractions actives comportant un atome de carbone et appelées pour cette raison unité monocarboné. Ainsi, il peut prendre, puis céder un radical méthyle (CH₃-) à l'homocystéine en la transformant en méthionine. Cette réaction est possible grâce à la méthionine synthétase (Potier de Courcy, 2005).

Outre la réaction de méthylation, l'homocystéine peut être éliminée par une enzyme active grâce à la vitamine B₆, mais les études quantitatives indiquent que cette voie (trans-sulfuration) paraît relativement moins utilisée par l'organisme que la voie de la transméthylation (Potier de Courcy, 2005) (Figure 13).

L'acide folique joue un rôle fondamental dans le métabolisme cérébral et nerveux, dans la synthèse des neuromédiateurs en particulier (Potier de Courcy, 2005). La voie métabolique des folates contribue à tellement de processus physiologiques, allant de la

biosynthèse des nucléotides, nécessaires à la prolifération cellulaire, à la génération de cofacteurs ayant une incidence sur les réactions biochimiques et à la génération du donateur principal de méthyle, S-adénosyl méthionine (Ado-Met), qui participe à la méthylation des histones de l'ADN, à la modulation de l'expression des gènes ainsi qu'à la méthylation des protéines et des lipides (Blom *et al.*, 2006 ; Miller, 2008).

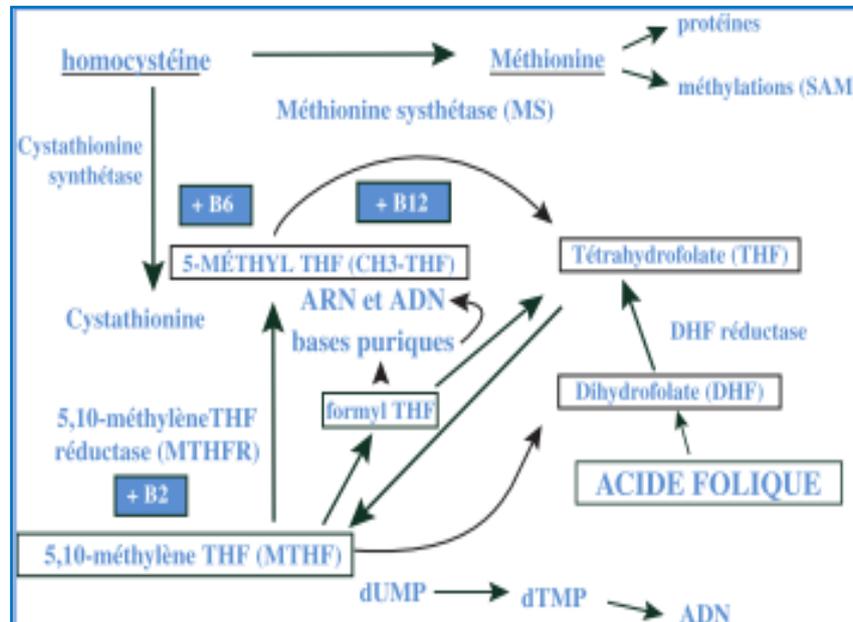


Figure 13 : Principaux rôles métaboliques de l'acide folique et synergie d'action avec les vitamines B₂, B₆ et B₁₂ (Potier de Courcy, 2005).

9.1.3. Sources alimentaires

Très sensible à l'oxydation, l'acide folique l'est également à la chaleur, à la lumière et à l'ébullition, d'autant plus néfaste si les aliments sont épluchés ou fractionnés. La plus grande partie des folates alimentaires est apportée par les légumes verts (salades, épinards, petits pois, endives, haricots, choux, avocat ...) et les fruits (orange, fruits rouges, melon, banane ...), mais tous les fromages (surtout affinés, de type bleu ou camembert) en sont une bonne source, ainsi que les œufs, le foie et le pâté de foie, et les graines en général (maïs, châtaigne, pois chiche, noix, amandes ...), ou leurs dérivés (farines, semoules, pâtes, pains et riz complets) (Potier de Courcy, 2005).

Des aliments peu riches en folates, mais consommés régulièrement (tels que pain, pommes de terre, laitages frais ou pommes) représentent un apport intéressant à la fois du fait de la fréquence et de la régularité de leur consommation, et de la taille moyenne des portions consommées (Potier de Courcy, 2005).

9.1.4. Prévention

Il n'existe aucun doute qu'une bonne alimentation riche en fruits et légumes frais et un apport équilibré des autres groupes alimentaires contribue de manière importante à la prévention des ATN (Van Allen *et al.* , 2002) .

Il fut observé dans toutes les régions géographiques que lorsqu'il se produit une sécheresse, une famine ou une guerre, les taux d'incidence des ATN augmentent d'une manière frappante et chutent durant les périodes de prospérité (Wasserman *et al.* , 1998), d'où la nécessité d'une supplémentation aussi large que possible dans les zones à haut risque de pénurie nutritionnelle, mais aussi dans les régions moins touchées (Kalter, 2000).

Les bénéfices de l'acide folique sur la prévention des ATN sont connus depuis plusieurs années, et ont conduit de nombreuses organisations de santé à recommander une alimentation saine associée à une supplémentation en acide folique lors de la période périconceptionnelle (Czeizel and Dudas , 1992 ; Lumley *et al.* , 2001).

De ce fait, les femmes sans antécédents d'une ATN devraient prendre 0,4 mg d'acide folique chaque jour tout au long de leurs années de reproduction, soit comme un supplément dans une multivitaminé, ou en aliments enrichis de l'acide folique (Workshop on folate B₁₂ and Coline, 1999 ; Toriello, 2005).

La supplémentation folique ne peut être efficace que si elle est débutée au cours des 4 semaines précédant la conception et poursuivie jusqu'à 12 semaines de gestation (Poujade and Luton, 2008) (tableau III).

Tableau III: Supplémentation folique (Poujade and Luton, 2008)

- Dosage de 0,4 mg/j en l'absence d'antécédent.
- Dosage de 5 mg/j pour les femmes à risque élevé:
 - antécédent de défaut de fermeture du tube neural,
 - femmes épileptiques traitées,
 - femmes enceintes fumeuses et/ou alcooliques et/ou ayant des carences alimentaires,
 - grossesses multiples.

Plusieurs études ont démontré que la supplémentation maternelle en période périconceptionnelle avec l'acide folique réduit le risque de récurrence des ATN (Detrait *et al.* , 2005) .La prévalence de spina bifida a diminué de 31 % et celle de l'anencéphalie de 16 % (Mills *et al.* , 2003).Par ailleurs, De Wals *et al.* (2007) ont étudié les

répercussions d'un enrichissement alimentaire en acide folique au Canada, et ont observé que la prévalence des ATN a été réduite de 46 %. L'impact de cette diminution était plus important pour le spina bifida (53 %) par rapport à l'anencéphalie (38 %) et à l'Encéphalocèle (31 %). Toutefois une autre recherche a démontré que, malgré la prise recommandée en folate de 400 µg/ j par des femmes enceintes saines, 16 % de leurs nouveau-nés présentaient un certain types d'anomalies du tube neural (fossettes sacrales) et la dose prophylactique recommandée pour les patients ayant un polymorphisme de la Méthylène Tétrahydrofolate Réductase C677T devait être au moins 2000 µg/j (Özer *et al.* , 2011) .

9.2. Autres facteurs

✓ La supplémentation en zinc pourrait être considérée pour une diminution supplémentaire de la survenue et la récurrence des ATN (Cengiz *et al.* , 2004 ; Zeyrek *et al.* , 2009), surtout chez les femmes enceintes avec une déficience chronique en zinc (Akar, 1997).

✓ Il est important que les femmes traitées par les antiépileptiques reçoivent une supplémentation de 200µg/jour de sélénium (Pippenger, 2003), car l'acide valproïque et peut-être d'autres thérapies d'antiépileptiques appauvrissent le sélénium total du corps (Graf *et al.* , 1998). C'est un élément essentiel pour la synthèse des séléno-protéines, y compris le glutathion peroxydase (Halliwell and Gutteridge , 1999).

✓ Une supplémentation associant l'acide folique et la vitamine B₆ pourrait s'avérer bénéfique. Tout d'abord, parce qu'une insuffisance en folates est à l'origine d'un taux d'homocystéine excessif, lui-même à l'origine d'effets tératogènes. Or la vitamine B₆ intervient dans la transformation de l'homocystéine en cystathionine, et réduit ainsi le risque d'accumulation d'homocystéine. De plus, l'assimilation correcte de la vitamine B₉ nécessite l'apport d'autres vitamines du groupe B, dont les vitamines B₆ et B₁₂ en particulier (Poujade and Luton, 2008).

1. Population d'étude

La présente étude a porté sur 147 individus consentant apparemment sains dont 82 hommes et 65 femmes (groupe témoin) , et un groupe consentant de 48 pères et 92 mères d'enfants atteints d'anomalie du tube neural (groupe d'ATN), âgés entre 24 et 48 ans de la région de Sétif, Algérie.

Une étude rétrospective des enfants nés avec une anomalie du tube neural identifiés à partir des fiches de 215 cas d'ATN parmi un total de 28500 naissances et mort fœtales au niveau de l'Hôpital de Sétif a été réalisée durant la période de 3 ans (2004-2006) au cours de laquelle plusieurs informations ont été recueillies pour chaque cas, notamment l'âge de la mère , la date de naissance de l'enfant , le sexe ratio et la consanguinité .

2. Collecte de sang

Les échantillons du sang périphérique (10 mL) ont été obtenu par ponction veineuse collectés dans des tubes à EDTA (l'héparine inhibant l'action de la Taq polymérase) et stockés à -20°C, puis transféré au laboratoire de génétique pédiatrique à l'Hôpital d'Ankara pour l'extraction de l'ADN et le génotypage.

3. Extraction de l'ADN

Après hémolyse du sang par une solution hypotonique dans des tubes coniques (Falcon) ; l'ADN génomique a été isolé par la méthode conventionnelle phénol- chloroforme comme suit :

- ✓ Les tubes conique contenant 10 mL du sans total complété à 50 mL avec le Tris-EDTA (TE) sont rapidement homogénéisés puis mis dans la glace pendant 20 min, centrifugés à 4000 rpm pendant 20 min à 4°C (Universal 30 RF).
- ✓ Après centrifugation, le surnageant est déversé, ensuite le TE est ajouté jusqu'à 35 mL au culot et l'étape précédente est répétée jusqu'à l'obtention d'un culot blanc.
- ✓ 600 µL du TE sont ajoutés au culot, puis homogénéisés vigoureusement au vortex (suspension de leucocytes).
- ✓ Dans des tubes eppendorf, ajouter à 300 µL de l'échantillon (suspension des leucocytes) , un volume de 450 µL du tampon Sodium Tris EDTA (STE) et 33 µL du détergent SDS (10 %) en plus de 23 µL de protéinase K; mélanger au vortex et

plonger les tubes eppendorf couverts avec du parafilm, dans un bain Marie (Memmert) à 56°C pendant 16 h.

- ✓ Placer un mélange de Phénol/ CHCl₃/ Alcool isoamylique (25 :24 :1) dans un tube Falcon et délaisser pour se stabiliser.
- ✓ Mettre du phénol à un volume 1 :1 , couvrir les tubes avec du papier parafilm puis agiter énergiquement à la main pendant 10 min.
- ✓ Mettre les tubes dans la glace et au réfrigérateur pendant 20 min.
- ✓ Centrifuger les tubes eppendorf à froid à 4000 rpm pendant 20 min (Allegra X 15 R, Beckman Coulter) .
- ✓ Transférer le surnageant dans un nouveau tube eppendorf et rajouter directement 750 µL de chloroforme, puis agiter énergiquement à la main pendant 10 min, et enfin mettre les tubes dans la glace et au réfrigérateur pendant 20 min.
- ✓ Centrifuger à 4°C avec une vitesse de 4000 rpm pendant 20 min.
- ✓ A l'aide d'une pipette automatique, transférer le surnageant dans un nouveau tube eppendorf contenant 10 % d'acétate de sodium (75 µL), en plus de 750 µL d'éthanol 95% préalablement refroidi. .
- ✓ Après un bref mélange à la main par retournement ; l'ADN apparait clairement sous forme de précipité (méduse d ADN) ; garder les tubes à -20°C.
- ✓ Centrifuger à + 4°C pendant 20 min à une vitesse de 6000 rpm.
- ✓ Ajouter à 100 µL du liquide (pelote d'ADN récupérée), un volume de 500 µL d'éthanol 70%; centrifuger à 4000 rpm pendant 20 min.
- ✓ Repêcher le précipité, l'égoutté sur les bords du tube eppendorf et le transférer dans un tube contenant le TE, (avec le même volume marqué sur les tubes selon la grosseur de la pelote, entre 50 et 300 µL).
- ✓ Mettre les tubes dans un bain marie (Memmert) à 37°C pendant 16 h.
- ✓ Conserver l'ADN à -20°C jusqu'à son utilisation.

4. Détermination de la pureté de l'ADN

La pureté de l'ADN est essentielle pour une analyse réussie par la PCR .dans le cas où l'ADN est contaminé, le résultat est à écarter dans les étapes suivantes, il est donc indispensable de procéder à la réextraction de l'ADN afin d'obtenir la pureté souhaitée.

Par mesure spectrophotométrique de la densité optique (DO) de l'ADN et par le moyen de DO 260 nm/DO 280 nm, la pureté de l'ADN est déterminée en indiquant la

contamination de l'ADN par les protéines ou par les ARN. L'ADN absorbe à 260 nm, alors que les protéines absorbent à 280 nm.

L'échantillon d'ADN est dilué au 1/100 dans l'eau distillée et les DO sont lues par spectrophotométrie dans la même cuve ayant servi à faire le zéro (eau stérile) à 260 nm et à 280 nm.

On considère que:

-L'ADN est pur quand le rapport $R = DO_{260}/DO_{280}$ est compris entre 1.8 et 2.

-L'ADN est contaminé par des protéines quand $R < 1.8$

-L'ADN est contaminé par les ARN quand $R > 2$.

5. Détermination de la concentration de l'ADN

La concentration de l'ADN est déterminée directement par le Nanodrop ND-1000. La densité optique à 260 nm permet de calculer la concentration de l'ADN sachant que :

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

La concentration de l'ADN en $\mu\text{g}/\text{mL}$ = facteur de dilution $\times DO_{260} \times 50 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Une dilution à 50 ng/mL est réalisée pour l'utilisation au moment de la PCR.

6. Recherche de mutations

6.1. Amplification de l'ADN par la méthode de PCR

La PCR est une abréviation de l'expression anglaise Polymerase Chain Reaction ou réaction en chaîne par polymérase. C'est une technique de réplique ciblée *in vitro*, mise au point par Kary Mullis en 1985 (Sakai *et al.*, 1985).

6.1.1. Principe

La PCR permet l'amplification d'un segment d'ADN compris entre deux régions de séquences connues par un procédé d'extension d'amorce (primers). Elle consiste à utiliser 2 amorces oligonucléotidiques de synthèse de 20 à 25 nucléotides complémentaires des extrémités 3' des deux brins d'ADN encadrant la séquence à amplifier. Une des amorces est une copie du brin codant et l'autre une copie du brin non codant. Sous l'action d'une

enzyme (Taq polymérase), chaque amorce est allongée dans le sens 5'-3' d'une séquence exactement complémentaire du brin recopié. A chaque étape de PCR, le nombre de segments d'ADN cible double N cycles permettant ainsi d'obtenir 2^N copies d'ADN (Saiki *et al.*, 1985).

La réaction de PCR se décompose en 3 étapes :

- ✓ Dénaturation en deux brins monocaténares
- ✓ Hybridation des amorces sur la cible
- ✓ Synthèse d'un nouveau brin à partir des amorces par la Taq polymérase. Il en résulte deux brins d'ADN bicaténares.

Russell Higuchi . (1992) fut l'un des premiers à faire l'analyse des cinétiques de la PCR en élaborant un système qui détectait le produit de la PCR au fur et à mesure qu'il s'accumulait .La technologie de la PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un «reporter» fluorescent .L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité des produits d'amplification générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle où la première augmentation significative dans la quantité des produits d'amplification est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice originale cible.

6.2. Recherche de la mutation 1691 G-A sur le gène du facteur V Leiden

6.2.1. Principe

Le test du facteur V Leiden (FVL) qui permet de détecter et de définir le génotype d'une mutation ponctuelle (G à A en position 1691) du gène du facteur V humain, est réalisé sur l'instrument Light Cycler[®] 1.5 en recourant à un procédé de PCR de l'ADN issu de l'échantillon, puis à une hybridation fluorigène spécifiquement ciblée, afin de détecter et de définir le génotype de l'ADN amplifié du facteur V.

Un fragment de 222 paires de bases du facteur FVL est amplifiée à partir d'ADN génomique humain, à l'aide d'amorces spécifiques et détecté par fluorescence à l'aide de deux sondes HybProbe spécifiques en utilisant le Light Cycler[®] FastStart DNA Master hybridation probes (Roche Diagnosis), Light Mix[®] (TIB MOL BIOL, Berlin, Germany).

Lors de l'analyse de la courbe de fusion, l'augmentation de la température entraîne une diminution de la fluorescence en raison de la dissociation de la sonde la plus courte (sonde de mutation, marquée à la fluorescéine) entraînant l'éloignement des deux colorants fluorescents. En présence d'une mutation Leiden du facteur V, la discordance entre la sonde de mutation et la cible déstabilise l'hybride entraînant la diminution de la fluorescence à une température moins élevée. Aucune discordance n'est observée avec le génotype sauvage et par conséquent, la température de fusion de l'ADN double brin hétérologue est plus élevée.

6.2.2. Recherche du polymorphisme du facteur V Leiden G 1691A

L'analyse génétique des polymorphismes du facteur V Leiden a été réalisée pour la population saine d'après une courbe d'analyse de fusion performée dans des tubes capillaires Light Cycler[®] préalablement refroidi, dont chacun contient les réactifs suivants:

- ✓ 5.5 µL d'eau bi distillée (PCR – grade)
- ✓ 1µL du mélange de réaction du facteur V Leiden
- ✓ 1 µL du mélange de détection de la mutation
- ✓ 2.5 µL ADN (concentration de 50 à 100 ng / µL)

Après une fermeture hermétique de chaque tube capillaire à l'aide d'un bouchon en utilisant le dispositif de pose de bouchon LC Capping Tool, les tubes sont centrifugés rapidement pendant 30 secondes, puis transférés dans leur portoir (à 32 tubes) avec un contrôle positif en première position sur l'instrument Light Cycler[®].

Réactifs-solutions de travail

Les composants suivants sont ajoutés dans un tube eppendorf placé sur glace selon l'ordre qui suit :

- **FVL DIL** (Diluant FVL)
 - H₂O, PCR – grade
- **FVL R Mix** (mélange de réaction)
 - Tampon Tris- HCl
 - Taq polymerase
 - dNTP
 - MgCl₂
- **FVL MD Mix** (mélange de détection de la mutation)

- Amorce sens FVL (5'-TGCCAGTGCTTAACAAGACCA-3')
et antisens (5'-CTTGAAGGAAATGCCCCATTA-3')
- Sonde HybProbe Red 640 FVL (5'-LC-640-TGTCCTTGAAGTAACCTTTCAGAAATTCTG-3'-PHO)
- Sonde HybProbe Fluorescéine FVL (5'-GGCGAGGAATACAGGTAT-3'-Flu)

6.3. Evaluation de la mutation 20210 G-A sur le gène de la prothrombine

6.3.1. Principe

Un fragment de 165 paires de bases du facteur II(prothrombine) est amplifiée à partir d'ADN génomique humain, à l'aide d'amorces spécifiques et détecté par fluorescence à l'aide de deux sondes Hybprobe spécifiques constituées de deux oligonucleotides distincts qui s'hybrident à une séquence interne du fragment amplifié lors de la phase d'annelage du cycle de PCR. La fluorescence émise est mesurée par l'instrument Light Cycler[®] 1.5.

6.3.2. Recherche génétique

L'analyse génétique des polymorphismes de la prothrombine G20210A (PT) a été réalisée dans des tubes capillaires préalablement refroidis contenant les solutions suivantes :

- ✓ 5,5 µL d'eau bi distillée (PCR – grade)
- ✓ 1µL du mélange de réaction de la prothrombine (Tris – HCl, Taq polymérase, dNTP, MgCl₂).
- ✓ 1 µL du mélange de détection de la mutation
- ✓ 2,5 µL ADN

Après une centrifugation rapide, les tubes capillaires couverts sont transférés dans leur portoir avec un contrôle positif en première position.

Réactifs-solutions de travail

➤ PT MD Mix (mélange de détection de la mutation)

- Amorce sens PT (5'-CCGCTGGTATCAAATGGGG-3') et
antisens (5'-CCAGTAGTATTACTGGCTCTTCCTG-3')
- Sonde HybProbe Red 640 PT
(5'-LC-640-TCCCAGTGCTATTCATGGGC-3'-PHO).

- Sonde	HybProbe	Fluorescéine	PT
(5'- CTCAGCGAGCCTCAATG -3'-Flu)			

6.4. Etude de la mutation 677C-T sur le gène de la MTHFR

6.4.1. Principe

Un fragment de 233 paires de bases du gène de la MTHFR est amplifiée à partir d'ADN génomique humain, à l'aide d'amorces spécifiques et détecté par fluorescence à l'aide de deux sondes Hybprobe spécifiques en utilisant le Light cycler FastStart Dna Master hybridation probes (Roche), lightMix (TIB MOL BIOL , Berlin , Germany) , en utilisant le Light Cycler® 1.5.

6.4.2. Recherche génétique

L'analyse génétique du polymorphisme C677T de la MTHFR a été effectuée pour le groupe témoin et celui des cas d'ATN, d'après la courbe d'analyse de fusion performée du light cycler (Light Cycler® 1.5, Mannheim, Germany). Dans des tubes capillaires (borosilicate) avec un Kit de détection de ce polymorphisme. Chaque tube capillaire préalablement refroidi contient les solutions suivantes :

- ✓ 3.5µL d'eau bi distillée
- ✓ 2 µL du mélange de réaction
- ✓ 2 µL du mélange de détection de la mutation
- ✓ 3 µL ADN (échantillon ou contrôle)

Réactifs-solutions de travail

Les composants suivants sont ajoutés dans un tube eppendorf à 1.5 mL, placé sur la glace, selon l'ordre indiqué ci-dessous:

- **MTHFR DIL** (Diluant MTHFR)
 - H₂O, PCR - grade
- **MTHFR Reaction Mix** (mélange de réaction)
 - Tampon Tris - HCl
 - Taq polymerase (5 U/ µL)
 - dNTP (10 mM)
 - MgCl₂ (25 mM)
- **MTHFR MD Mix** (mélange de détection de la mutation)
 - Amorce sens MTHFR (5'- TGGCAGGTTACCCCAAAGG-3') : 10 pM et antisens (5'- TGATGCCCATGTTCGGTGC -3') : 10 pM

- Sonde HybProbe Red 640 MTHFR (5'-LC-640-CGGGAGCCGATTCATCAT-3'-PHO)
- Sonde HybProbe Fluorescéine MTHFR (5'-TGAGGCTGACCTGAAGCACTTGAAGGAGAA GGTGTCT-3'-Flu)

Couvrir les tubes capillaires et après une rapide centrifugation (2000- 3000 rpm); les placer dans le portoir du Light Cycler[®] avec un contrôle positif (hétérozygote) en première position.

6.5. Etude de la mutation sur gène de la CBS

La mise en évidence de l'existence d'une insertion de 68 paires de bases dans le gène de la CBS a été déterminée par la méthode PCR (Tsai *et al.*, 1996) dans le thermocycleur (Biometra) pour les deux populations d'étude.

Chaque tube eppendorf stérile contient les réactifs suivants :

- ✓ 5µL de tampon Tris-Hcl (Fermentas)
- ✓ 2µL dNTP (10 mM, Fermentas)
- ✓ 3µL MgCl₂ (25mM, Fermentas)
- ✓ 1 µL amorce sens (10 pM, 5'- GCA GTT GTT AAC GGC GGT AT- 3')
- ✓ 1 µL amorce antisens (10 pM, 5'- GTT GTC TGC TCC GTC TGG TT- 3').
- ✓ 2 µL du Taq polymérase (5 U, Fermentas)
- ✓ 3 µL de l'ADN échantillon et ajuster le volume à 50 µL avec l'eau bidistillée (ddH₂O).

La quantité de chaque composant est multipliée par le nombre de tubes voulu plus un autre. En cas du tube témoin négatif, le mélange des réactifs précédents doit être effectué sans ADN.

Mettre les tubes après une rapide centrifugation dans le thermocycleur (Biometra) avec les conditions suivantes:

Dénaturation à 94°C pendant 1 minute

Hybridation à 63°C pendant 1 minute

Elongation à 72°C pendant 1 minute par 35 cycles

Suivi par une élongation finale à 72°C pendant 12 minutes.

Dans chaque puits du gel, une aliquote de 10µL des produits de la PCR est mise en électrophorèse sur un gel d'agarose à 2% (additionné de 30 µL de bromure d'éthidium, Sigma) avec une goutte de bleu de bromophénol (BBP) (Merck, Allemagne), pour être visualiser (Après 15min environ) sous Ultra-violet (UV) dans un trans-illuminateur. Quand au premier puits, 3µL du marqueur sont déposés (ΦX174 DNA Hae III, Fermentas).

6.6. Etude des mutations sur les gènes des transporteurs du Zinc

6.6.1. Le gène ZIP14

6.6.1.1.Principe

Le séquençage de l'ADN a été inventé dans la deuxième moitié des années 1970, il s'agit de la détermination de la succession des nucléotides le composant. Les réactions de séquençage, la purification et la suspension dans un tampon approprié doivent être réalisées séparément. La très grande majorité des séquences réalisées sont effectuées sur des séquenceurs automatiques qui ne réalisent que la séparation des brins et la lecture des pics.

Pour cela, les fragments d'ADN sont marqués grâce à des marqueurs fluorescents. Une fois la réaction de séquence terminée, la taille des fragments obtenus est déterminée par une chromatographie. Les systèmes les plus modernes permettent même de lire les quatre nucléotides à partir d'une seule colonne de chromatographie. Le résultat est présenté par la machine sous forme de courbes qui montrent la fluorescence détectée, et l'interprétation qui en est faite en termes de nucléotides (El Fahime and Ennaji, 2007).

6.6.1.2.PCR du gène ZIP 14

La recherche des mutations au niveau du gène ZIP 14 a été réalisée chez les mères d'enfants atteints d'ATN. La purification des produits de PCR et le séquençage de la région du promoteur 1 : 333 paires de bases a permis de comparer leur ADN avec la séquence initiale du gène (Torun *et al.*, 2011).

La solution mélange préparée pour chaque échantillon contient les réactifs suivants :

- ✓ 5µL du Tampon (Fermentas)
- ✓ 1 µL MgCl₂ (25 mM, Fermentas)
- ✓ 2 µL dNTP (10 mM, Fermentas)
- ✓ 2 µL amorce Sens (10 pM, F: 5'-TCACCCCCAAATTAACATTTCT-3')

- ✓ 2 µL amorce Antisens (10 pM, R:5'-GCTAGGCGGTGAGAGCTTC-3')
- ✓ 0.2 µL Taq polymérase
- ✓ 5 µL Diméthyle sulfoxyde (DMSO) (Fermentas)
- ✓ 29.8 µL eau bi distillée (ddH₂O)

Après mélange au vortex et une brève centrifugation (Hettich Zentrifugen), 3 µL d'ADN d'échantillons sont ajoutés dans chaque tube eppendorf.

La séquence cible de l'ADN est amplifié par 34 cycles en utilisant le thermocycleur (Biorad DNA Engine) avec les conditions suivantes :

Dénaturation à 95°C pendant 5 min

Hybridation à 52°C pendant 1 min

Elongation à 72°C pendant 1min

Dans chaque puits du gel sur le gel agarose à 2%, sont déposés 10 µL du produit de PCR de l'échantillon et en première position 1.5 µL du marqueur (ΦX174 DNA Hae III, Fermentas) pour être visualiser résultat sous UV.

6.6.1. 3. Purification de l'ADN

Après visualisation des produits de PCR, deux solutions de purification (METIS purification system KIT) : 5 µL de la solution A et 45 µL de solution B sont ajoutées aux tubes des échantillons, puis laisser environ 2 h dans une température de + 4° C

- ✓ Centrifuger les tubes 10 min à une vitesse de 10000 rpm à + 4° C
- ✓ Ajouter au culot 200 µL d'éthanol (70%) et centrifuger une deuxième fois avec une vitesse de 13000 rpm à + 4° C pendant 5 min.
- ✓ Verser le surnageant puis mettre les tubes dans le lyophilisateur jusqu'au l'évaporation de l'alcool
- ✓ Ajouter à chaque tube 30-35 µL d'eau bi distillée, mélanger au vortex puis centrifuger quelque secondes.
- ✓ Déposer dans chaque puits du gel , une aliquote de 5 µL de chaque échantillon avec une goutte de BBP, et garder la première position pour 1.5 µL du marqueur (Fermentas) et visualiser les résultats de la purification sous UV.

6.6.1. 4. Séquençage de l'ADN

Dans chaque puits de la plaque de séquençage sont ajoutées les solutions suivantes:

- ✓ 8 µL de la solution pré-mix (Beckman Coulter, USA) ; 2 µL de l'amorce (sens ou F : 10 pM), en plus de 1-7 µL ADN puis compléter le volume à 20 µL par l'eau bi distillée et ajouter une goutte d'huile minérale (Beckman Coulter, USA, 5 mL gardée à +30°C).
- ✓ Mettre la plaque de séquençage dans le thermocycleur (Biometra thermocycler) avec une température de 50°C pendant approximativement 3 heures.
- ✓ Ajouter aux produits de la PCR un mélange de 3 solutions comme suit :
- ✓ 2 µL d'acétate de sodium (3M, pH5.2, Sigma), 2 µL EDTA (100 mM, pH8, Sigma) et 1 µL glycogène (20mg/mL, Genome Lab ; Beckman Coulter) ensuite rajouter 60 µL d'éthanol (95 %)
- ✓ Centrifuger à + 4° C pendant 30 min à une vitesse de 4000 rpm
- ✓ Verser le contenu de la plaque et l'inverser sur du papier absorbant
- ✓ Ajouter 200 µL d'éthanol (70%) dans chaque puits.
- ✓ Centrifuger à + 4°C pendant 5 min à une vitesse de 4000 rpm, puis inverser sur du papier absorbant.
- ✓ Ajouter 25 µL de formamide (Beckman Coulter Kit) et une goutte d'huile minérale.
- ✓ Utiliser une autre plaque pour le tampon (Genome Lab Kit separation buffer, Beckman Coulter, USA ; gardé à 4°C)
- ✓ Mettre les 2 plaques dans l'appareil de séquençage (Beckman Coulter CEQ 8000 Genetic Analysis System), puis récupérer les courbes de nucléotides pour analyse.
- ✓ Répéter les étapes précédentes du séquençage du gène ZIP 14 en utilisant 2 µL l'amorce antisens.

6.6.2. Le gène ZnT4

6.6.2. 1.Principe

L'ADN cible amplifié est analysé par RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction). Le RFLP reflète un polymorphisme au niveau d'un site particulier de reconnaissance d'une enzyme de restriction donnée. Après digestion enzymatique, les fragments de restriction sont soumis à une électrophorèse sur gel qui permet leur séparation en fonction de leur taille. La variabilité d'un site de restriction se manifeste par la présence ou l'absence de celui-ci, ce qui se traduit par un polymorphisme des longueurs des fragments de restriction (Narayanan, 1991).

6.6.2. 2. Analyse génétique

La recherche de mutation génétique dans l'un des transporteurs du zinc a été réalisée après amplification de l'exon 5 du gène ZNT4 (Akar *et al.*, 2006) et analysée par la méthode de PCR en utilisant les deux amorces :

Sens ou F : 5'-AGCAAGAAGGGACATATTCC-3'

Antisens ou R : 5'-GGTAAAAGATGGGAGAGTTC-3'

Pour un volume total de 50 μ L dans chaque tube eppendorf, les réactifs suivants ont été ajoutés :

- ✓ 5 μ L de la solution tampon (Fermentas)
- ✓ 2.5 μ L de chaque amorce (10 pM)
- ✓ 0.5 μ L Taq polymérase (5 U/ μ L, Fermentas)
- ✓ 2 μ L dNTP
- ✓ 3.5 μ L MgCl₂ (25mM, Fermentas)
- ✓ 3 μ L ADN (contrôle ou échantillon)

Après une rapide centrifugation, les tubes sont mis dans le thermocycleur (Biometra) avec les conditions suivantes:

Dénaturation à 94°C pendant 50 secondes.

Hybridation à 55°C pendant 50 secondes

Elongation à 72°C pendant 1min ; 34 cycles

Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 3% additionné de 30 μ L de bromure d'éthidium (Sigma).

Les mutations génétiques sont analysées après l'utilisation de 0.5 μ L de l'enzyme de restriction endonucléase *Moraxella bovis* (Mbo I) (Fermentas) avec 15 μ L des produits de la PCR et 2 μ L de la solution tampon. Les eppendorf sont mis dans un bain marie à 37°C pendant 16 h.

Dans chaque puits du gel d'agarose à 3 % additionné de bromure d'éthidium sont déposés 5 μ L des produits de PCR et les résultats sont visualisés sous UV. La présence de 4 bandes détermine le génotype hétérozygote CT, alors que les génotypes mutant et sauvage sont définis par 3 bandes seulement.

7. Analyse statistique

La prévalence des anomalies du tube neural (Taux des naissances ATN/1000 naissances) a été déterminée pour chaque année d'étude, et d'autres proportions ont été calculées par type d'anomalie selon le sexe de l'enfant, l'âge de la mère, la consanguinité et la saison de naissance.

Le test chi-deux a été utilisée pour évaluer la différence significative dans la distribution des données (génotypes entre sexe, ATN entre sexe et / ou âge des mères). Une valeur $p < 0.05$ a été considérée comme significative.

La fréquence allélique a été calculée à partir de la distribution génotypique. La comparaison des fréquences génotypiques et alléliques entre les parents d'enfants atteints d'ATN et les témoins a été effectuée par le test χ^2 . La signification statistique a été acceptée si $p < 0.05$.

Les Odds-ratio (OR) et leurs intervalles de confiance à 95% ont été calculés pour déterminer l'éventuelle association entre les différents génotypes.

1. Prévalence des anomalies du tube neural

La prévalence annuelle de tous les types d'ATN durant les trois années d'étude (2004 à 2006) dans la région de Sétif a été calculée d'après les fichiers Hospitaliers des naissances et les résultats de notre investigation ont montré des taux variant entre 7.3, 8.2 et 7.1 /1000 naissances et mort fœtales pour chaque année, dont le taux moyen est de 7.5/1000 naissances.

Parmi les cas d'ATN 122 (56.7%) avaient spina bifida, 69 (32.1%) l'anencéphalie, et un nouveau né (0.5%) était atteint d'encéphalocèle, en revanche 23 (10.7%) avaient spina bifida associé à l'anencéphalie.

Les prévalences correspondantes par 1000 naissances étaient de 4.35 pour spina bifida, 2.42 pour l'anencéphalie, 0.70 Spina bifida et anencéphalie et enfin 0.03 avaient l'encéphalocèle.

La distribution des cas d'ATN selon le sexe était significativement ($p < 0.05$) élevée chez les filles au nombre de 126 (58.6%) comparée aux 88 garçons (40.9%). Une différence significativement élevée selon le sex-ratio (fille/garçon) a été noté surtout en cas d'anencéphalies (1.76) et de spina associé à l'anencéphalie (4) comparé au cas de spina bifida (1.10) (Tableau IV).

Le rapport entre les cas de spina/ anencéphalie (1.77) n'a pas changé durant les trois années d'étude et on a observé 64 cas atteints d'anomalies du tube neural associés à l'hydrocéphalie (29.8%).

Des différences de prévalence ont été observé en relation avec les variations saisonnières durant les trois années d'étude; d'ailleurs la prévalence des ATN était plus élevée durant la période de janvier à juin avec des taux élevés en mai (13.5%) et en juin (15.8%).

Cette étude montre aussi que 13% des enfants atteints d'anomalies du tube neural sont issus de mariage consanguin et en tenant compte de l'âge des mères ayant eu un enfant atteint, le taux le plus élevé (21.9%) a été observé dans la tranche d'âge 31- 35 ans. (Tableau IV).

Tableau IV : Caractéristiques des différents types d'ATN et prévalences respectives enregistrés à Setif (2004-2006)

Variable	Types d'ATN				Total	χ^2	P-value
	Spina bifida	Anencéphalie	Spina bifida + Anencéphalie	Encéphalocèle			
	n. (%)	n. (%)	n. (%)	n. (%)			
<i>Sexe</i>							
Garçon	59(67.0)	25 (28.4)	4 (4.5)	0 (0.0)	88 (100)	5.02	0.05
Fille	65(51.6)	44 (34.9)	16(12.7)	1 (0.8)	126 (100)		
<i>Age de la mère (ans)</i>							
< 20	4(57.1)	1 (14.3)	2(28.6)	0 (0.0)	7 (100)	14.28	0.01
21 - 25	24 (60.0)	11 (27.5)	5 (12.5)	0 (0.0)	40 (100)		
26- 30	23 (67.6)	9 (22.5)	2 (5.9)	0 (0.0)	34(100)		
31- 35	20(42.5)	22 (46.8)	5 (10.6)	0 (0.0)	47 (100)		
>36	21 (56.7)	13 (35.1)	2(5.4)	1 (2.7)	37 (100)		
<i>Consanguinité</i>	16 (57.1)	9 (32.1)	3 (10.7)	0 (0.0)	28 (100)		
Mort	30 (25.6)	64 (54.7)	23 (19.6)	0 (0.0)	117 (100)		

2. Recherche des mutations

2.1. Evaluation des mutations sur les gènes du facteur V Leiden 1691G-A et de la prothrombine 20210G-A

La détermination des génotypes sauvages (GG), hétérozygote (GA) et mutant (AA) pour les mutations sur les gènes du facteur V Leiden et de la prothrombine a été réalisée après analyse du profil des courbes de fusion obtenus par la PCR en temps réel (Figure 14).

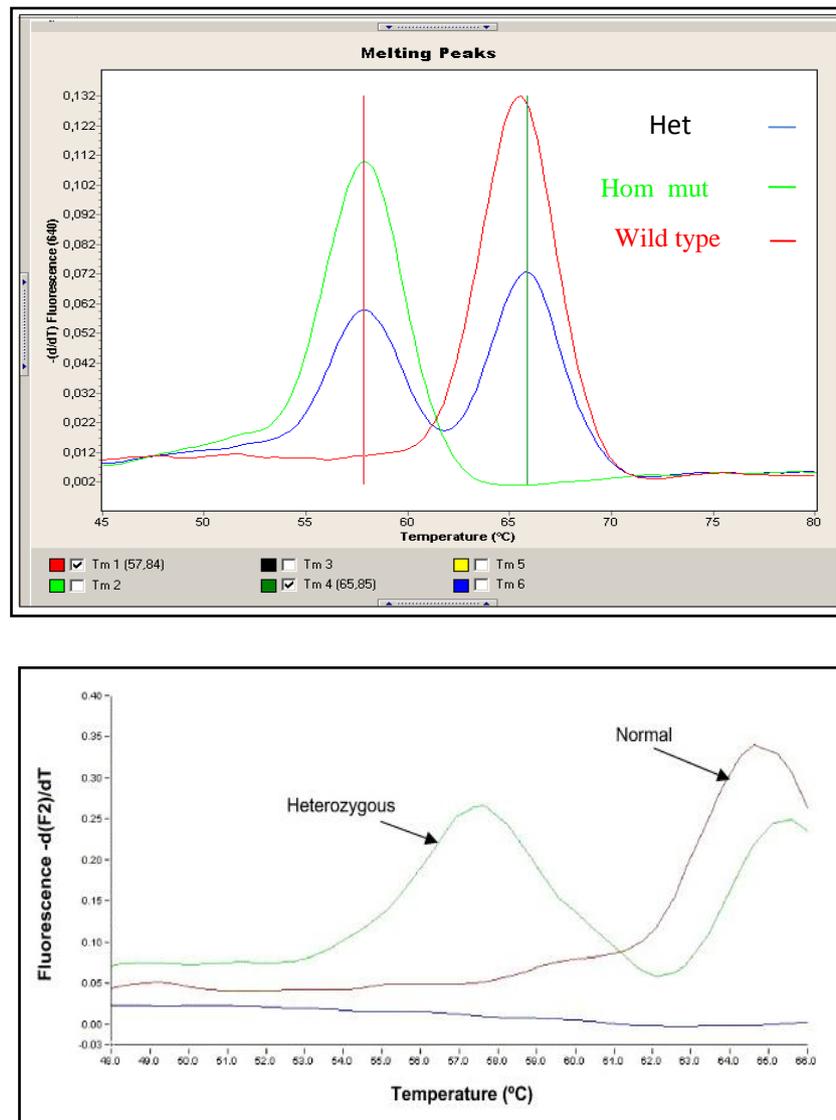


Figure 14 : Courbe d'analyse des polymorphismes G 1691A du facteur V Leiden (A) et G 20210A de la Prothrombine (B) par la PCR en temps réel.

Het : hétérozygote, **wild type :** génotype sauvage, **Hom mut:** mutant

Parmi les 147 individus sains de la présente étude, 3 (2.04%) avaient la mutation G 1691A du facteur V Leiden et 5 (3.4%) portaient la mutation G 20210A de la prothrombine. La fréquence des génotypes G/A et A/A du facteur V Leiden (2.1 et 0 %) ou celle des génotypes G/A et A/A de la prothrombine G20210A (2.8 et 0%) étaient très basses dans notre population d'étude. Par ailleurs, aucune coexistence des deux mutations n'a été trouvée.

2.2. Mutation 677C-T sur le gène de la Méthylène tétrahydrofolate Réductase

La mutation de la MTHFR a été déterminée pour les deux groupes d'étude par la méthode de la PCR en temps réel et 3 génotypes ont été identifiés: la présence d'un seul pic de fusion à 63° C indiquant un génotype sauvage (CC); les deux pics à 54.5 et 63.0 °C montrent un génotype hétérozygote mutant (CT), par contre le pic à 54.5°C définit un homozygote mutant (TT) (Figure 15).

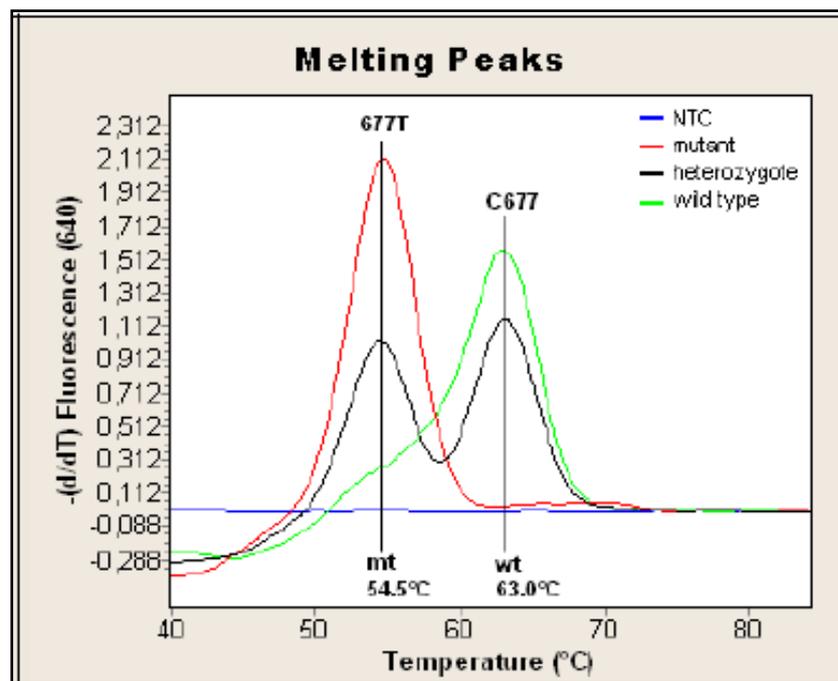


Figure 15 : Courbe d'analyse du polymorphisme MTHFR C677T par la méthode de PCR en temps réel

NTC : contrôle négatif ; **wild type** : type sauvage

D'après les résultats de la présente étude, la fréquence allélique de l'allèle T dans la population d'étude saine de la région de Sétif est de 34.3%. La distribution du polymorphisme C677T du gène de la MTHFR a démontré que le génotype (CC) a été trouvé chez 67 individus (45.6%), d'autre part, le génotype hétérozygote a été identifié chez 59 individus (40.1%) mais seulement 21 personnes (14.3%) portaient le génotype mutant.

Par ailleurs, nos résultats n'ont montré aucune différence significative dans la fréquence de la mutation C677T sur le gène de la MTHFR selon le sexe (0.47 versus 0.59) pour les hommes versus les femmes, respectivement ($p=0.2$). Le génotype homozygote représentait 22.6% chez les hommes et 28.6% chez les femmes. D'autre part, aucune différence significative n'a été trouvée concernant les différents génotypes entre les groupes d'hommes et femmes ($p=0.1$).

La concomitance des mutations sur les gènes de la MTHFR, du V Leiden et de la PT a été trouvée dans 6 cas parmi les 86 individus portant la mutation MTHFR 677T repartis dans le tableau (V).

Tableau V : Concomitance des mutations dans la population saine

Concomitance	Génotype	Nombre
MTHFR C677T & FV Leiden 1691G-A	C/T et G/A	0
	C/T et A/A	0
	T/T et G/A	2
	T/T et A/A	0
	C/T et G/A	4
MTHFR C677T & Prothrombine G20210A	C/T et G/A et G/A	0
MTHFR C677T & Prothrombine G20210A & FV Leiden 1691G-A	T/T et G/A et G/A	0
MTHFR C677T	C/T	59
	T/T	21
Total		86

Les résultats issus de l'analyse génétique des polymorphismes chez les mères d'enfants atteints d'ATN de la présente étude, montrent qu'il y a 46% de mères qui portent l'allèle T et 16% qui sont homozygotes mutantes (TT). En revanche, 43% des mères du groupe témoin étaient hétérozygotes (CT) et 14% étaient homozygotes (TT) pour le gène de la MTHFR.

Aucune différence significative entre les fréquences génotypiques et alléliques pour le polymorphisme C677T n'a été trouvée entre les mères témoins et celles ayant un enfant atteint d'ATN, les fréquences alléliques étaient similaires pour les deux allèles C et T respectivement (Tableau VI).

Tableau VI : Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme (677C→T) de la MTHFR entre les mères témoins et celles ayant un enfant atteint d'ATN

	Mères témoins (n= 82)	Mères d'enfants atteints (n=92)	Odds-ratio (IC : 95%)
Génotype CC	33 (0.40)	35(0.38)	1
Génotype CT	35 (0.43)	42 (0.46)	1.13 (0.59 -2.17)
Génotype TT	14 (0.17)	15 (0.16)	1.01 (0.42- 2.41)
Allèle C	101 (0.62)	112 (0.61)	1
Allèle T	63 (0.38)	72 (0.39)	1.03 (0.67- 1.59)

Les valeurs entre parenthèses concernent les fréquences génotypiques et alléliques (colonne 2 et 3) ou l'intervalle de confiance 95% (colonne 4)

Nos résultats montrent aussi que parmi les pères des enfants atteints d'ATN, 10% avaient le génotype homozygote mutant (TT) et 46% étaient hétérozygotes. En revanche, malgré que la fréquence des homozygotes parmi les couples fût plus élevée chez les mères avec un enfant atteint d'ATN comparées aux témoins (19 % contre 14%), la différence est non significative. Par ailleurs, la fréquence allélique de l'allèle T était plus élevée chez les mères d'enfant ATN comparées aux témoins avec un Odds ratio de 1.55 et un intervalle de confiance (0.97-2.48) mais la différence des fréquences alléliques était non significative (Tableau VII)

Tableau VII : Distribution des fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme (677C→T) de la MTHFR entre les mères et les pères des enfants atteints d'ATN et les témoins

Variable	Témoins (n = 147)	Mères d'enfants atteints (n = 48)	Pères d'enfants atteints (n = 48)	OR mères d'ATN*	OR pères d'ATN*
Génotype					
CC	67 (0.46)	59 (0.40)	21(0.44)	1	1
CT	59 (0.4)	25 (0.52)	22 (0.46)	2.03 (0.97- 4.26)	1.19 (0.6 -2.38)
TT	21 (0.14)	9 (0.19)	5 (0.10)	2.05 (0.78 -5.41)	0.76 (0.26- 2.26)
Allèle C	193 (0.66)	53 (0.55)	64 (0.67)	1	1
Allèle T	101 (0.34)	43 (0.45)	32 (0.33)	1.55 (0.97 - 2. 48)	0.96 (0.59 -1.56)

*Odds- ratio (IC 95%) vs. Témoins

2.3. Etude de l'insertion de 68 paires de bases sur le gène de la CBS

La visualisation des produits de PCR de la mutation au niveau du gène de la CBS844ins68 sous U.V a démontré que les mères de les populations d'études portaient un des génotypes suivant : mutation CBS négative ou sauvage ; hétérozygote ou homozygote (Figure 16).

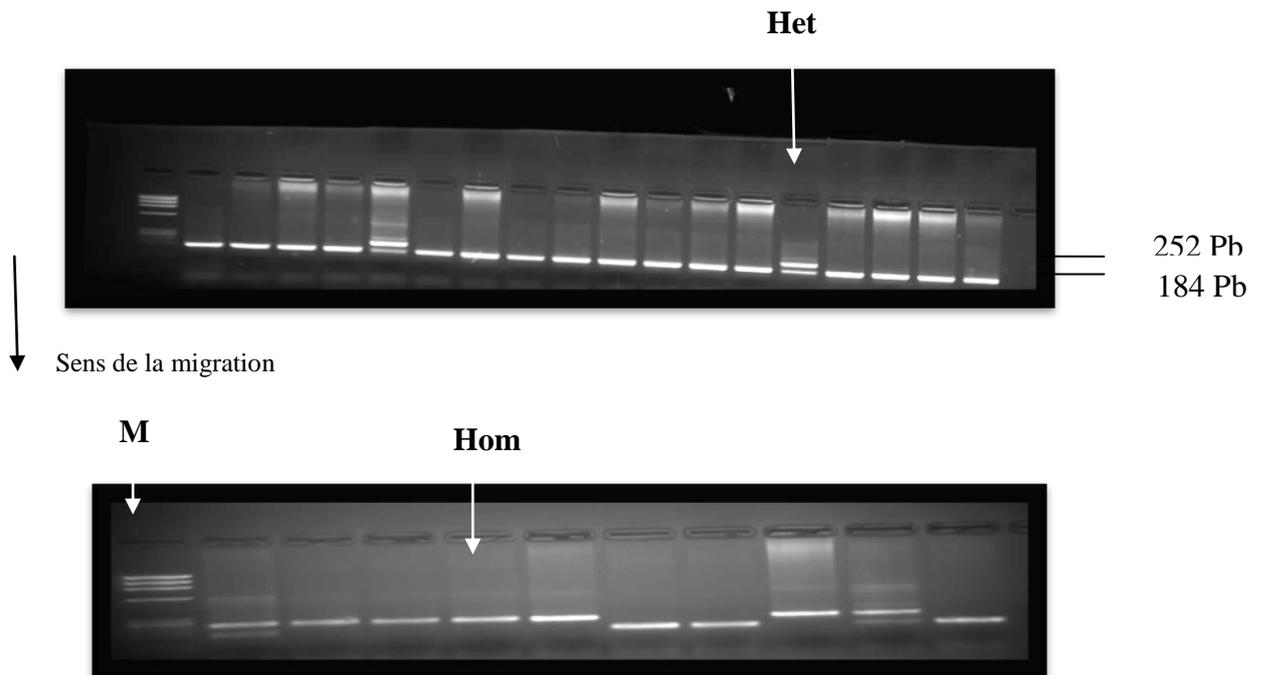


Figure 16 : Résultats de la PCR du gène de la CBS 844ins68

M : Marqueur (Φ X174 DNA Hae III), **Het** : génotype Hétérozygote, **Hom** : génotype homozygote, **pb** : paires de bases

La distribution des différents génotypes du polymorphisme de la CBS 844ins68 montre qu'il existe une différence significative entre les fréquences génotypiques des hétérozygotes entre les mères avec des enfants atteints d'ATN et les témoins (37 et 13%) pour cette population d'étude OR : 3.72 (1.59-8.73) .Tableau VIII

Tableau VIII : Distribution génotypique du polymorphisme de la CBS 844ins68 entre les mères témoins et celles ayant un enfant atteint

Variable	Mères témoins (n=85)*	Mères d'enfants atteints (n=51)	Odds- ratio (IC 95%)
CBS négative	69 (0.81)*	32 (0.63)	1
Hétérozygote	11 (0.13)	19 (0.37)	3.72 (1.59-8.73)
homozygote	5 (0.06)	0.5 (0.01)	0.060.0-1.21)

* Fréquences génotypiques entre parenthèse

D'après nos résultats, l'analyse comparative de la coexistence des mutations sur les gènes de la MTHFR et de la CBS entre les mères avec des enfants atteints d'ATN et les mères témoins n'a montré aucune association significative (Tableau IX).

Tableau IX : Fréquences des mères ayants un enfant atteint et les témoins hétérozygotes pour la CBS (844ins68) et homozygotes pour le gène de la MTHFR (TT)

Groupe	Génotype 844ins 68 /TT	Autres	Odds-ratio (CI 95%)
Témoins	3	85	1
Mères d'enfants atteints	2	51	1.11 (0.18-6.87)

2.4. Les gènes des transporteurs du zinc

2.4.1. Le gène ZIP 14

La visualisation des produits de PCR du gène ZIP 14 (promoteur 1 : 333 paires de bases) a montré une PCR satisfaisant suivie par une purification de l'ADN du gène ZIP 14 pour éliminer les artefacts et obtenir une séquence du gène ZIP 14 la plus nette possible. (Figure 17)

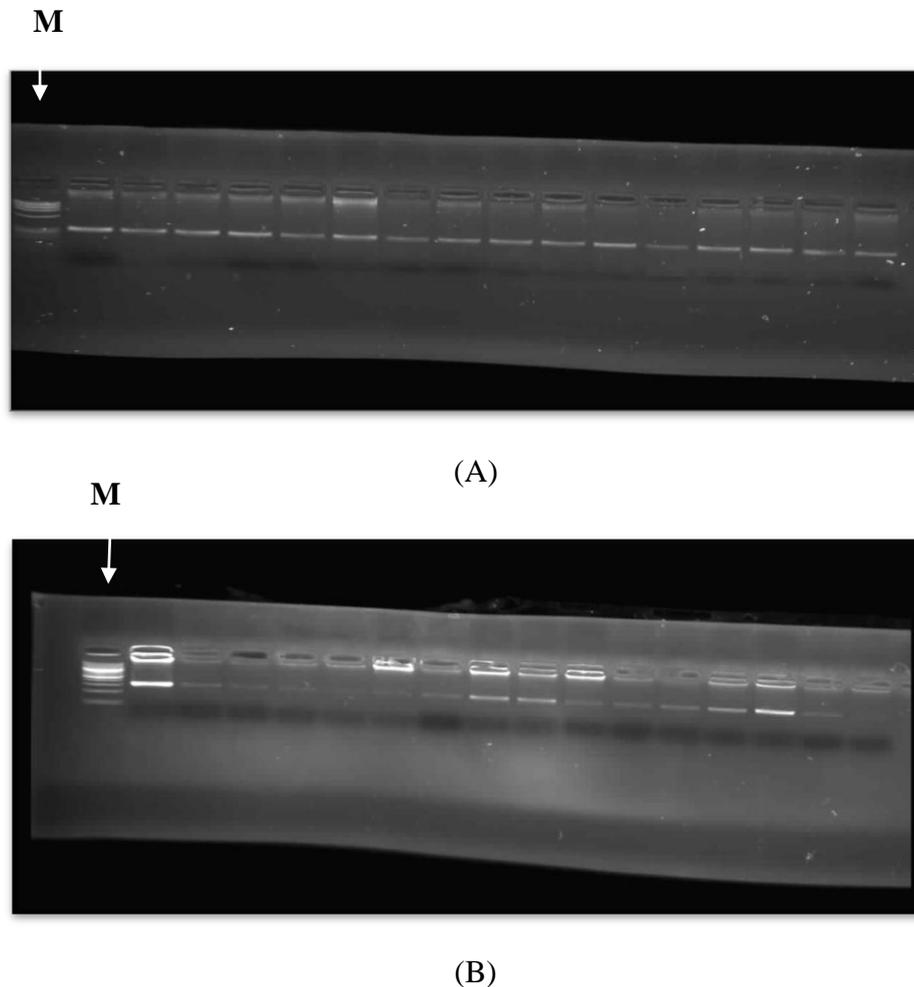


Figure 17: Résultats de la PCR (A) et la purification (B) du gène ZIP 14, promoteur 1

M : Marqueur (Φ X174 DNA Hae III).

Après obtention des séquences de l'ADN du gène ZIP14 des mères ayant un enfant atteint d'anomalies du tube neural en utilisant l'amorce sens (Figure 18) ; et en comparaison avec la séquence initiale du gène ZIP 14 promoteur 1 (333 paires de bases) , aucune mutation, ni insertion au niveau des séquences échantillons n'a pu être décelée .

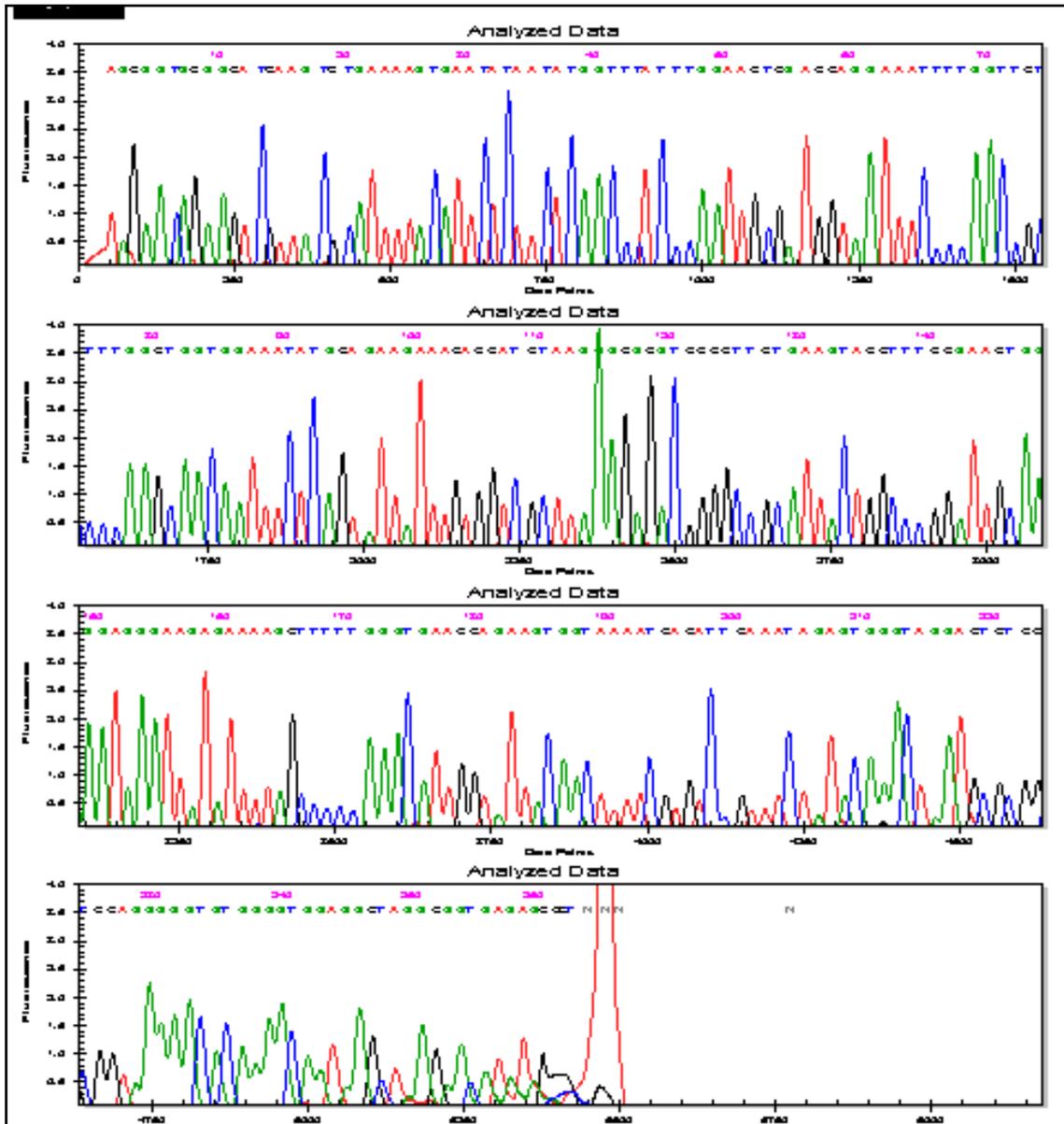


Figure 18 : Séquençage du gène ZIP 14 (promoteur1) en utilisant l'amorce sens

L'analyse des résultats du séquençage en utilisant l'amorce antisens (Figure 19) n'a pas prouvé l'existence d'une mutation ou d'insertion au niveau du gène ZIP 14 chez les mères ayant un enfant atteint d'anomalies du tube neural.

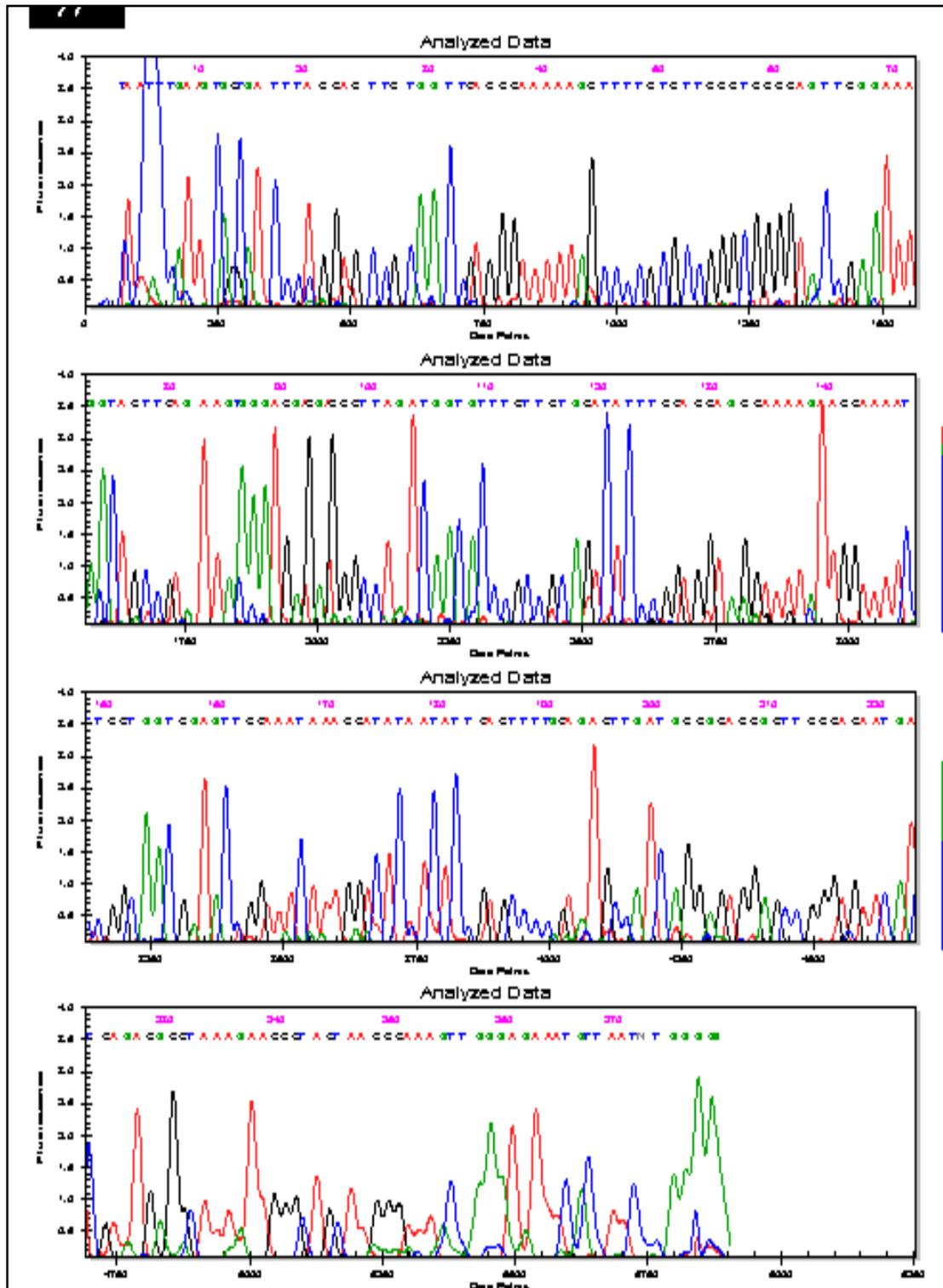


Figure 19 : Séquençage du gène ZIP 14 (promoteur1) en utilisant l'amorce non sens

2.4.2. Le gène ZnT4

L'analyse des produits de PCR du gène ZnT4 exon5 (914 T-C) après l'utilisation de l'enzyme de restriction (Mbo I) a démontré l'existence de 3 génotypes : sauvage (TT), hétérozygote (TC) et homozygote mutant (CC). (Figure 20)

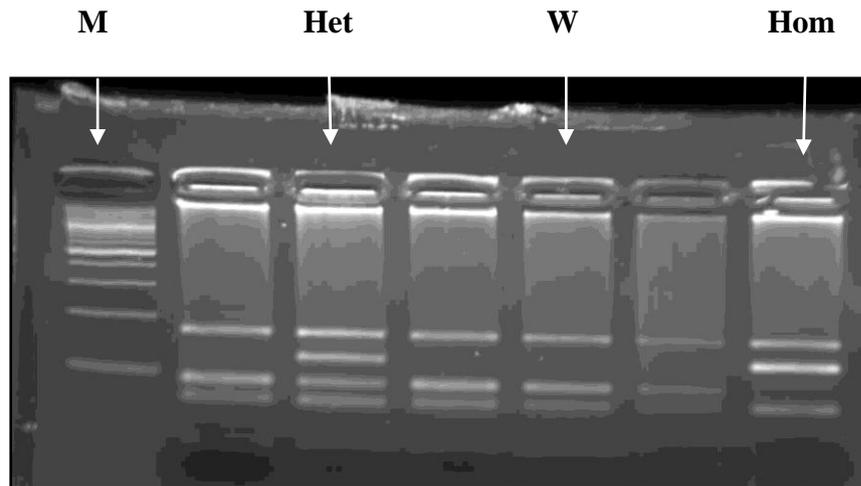


Figure 20 : PCR du gène ZnT4 exon 5 (915 T-C) après restriction enzymatique

M : Marqueur (Φ X174 DNA Hae III); **Het** : hétérozygote ; **W** : génotype sauvage ; **Hom** : génotype mutant

La distribution du polymorphisme 915 T-C du gène ZnT4 dans le groupe témoin et celui des mères d'enfants atteints d'ATN a montré que le génotype mutant (CC) a été trouvé dans 6 individus de chaque groupe. D'autre part, le génotype hétérozygote (CT) a été identifié chez 43 mères du groupe témoin (45.75%) et chez 36 (40.90 %) mères d'enfants atteints d'ATN respectivement.

La différence entre la fréquence allélique de l'allèle C chez les mères ayant un enfant atteint d'ATN comparée aux femmes témoins est non significative (Odds ratio 0.9, IC : 0.57- 1.43) (Tableau X).

Tableau X : Distribution des fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme (915 T-C) du gène ZnT4 entre les mères témoin et celle avec un enfant atteint d'ATN

	Mères témoins (n=94)	Mères d'enfants atteints (n= 88)	OR IC (95%)
Génotype TT	45 (0.48)	46 (0.53)	1
Génotype CT	43 (0.45)	36 (0.40)	0.81 (0.44-1.49)
Génotype CC	6 (0.06)	6 (0.06)	0.97 (0.29- 3.26)
Allèle T	133 (0.7)	128 (0.73)	1
Allèle C	55 (0.29)	48 (0.27)	0.90 (0.57 -1.43)

1. Prévalence des anomalies du tube neural

Malgré que l'incidence réelle des anomalies du tube neural soit inconnue, car seule une partie des fœtus touchés par ces malformations survit à un stade où leur anomalie est susceptible d'être reconnue (Finnell *et al.*, 2013). Dans l'ensemble, les ATN ouvertes sont un problème d'une ampleur mondiale car elles affectent environ 300.000 ou plus de fœtus /enfants chaque année (CDC, 1998). Elles sont parmi les malformations fœtales les plus communes aux Etats-Unis, et se produisent dans 2/10 000 naissances (CDC, 2009) .

D'après la présente étude, on a enregistré une prévalence de 7.5 cas d'ATN par 1000 naissances avec une tendance assez constante durant les trois années d'étude (2004-2006). C'est une prévalence assez élevée qui peut être attribuée à la faible prise des folates alimentaires par notre population féminine (Houcher *et al.* , 2003) .

La prévalence des ATN dans notre région d'étude est nettement plus supérieure que celle observée dans plusieurs pays, comme l'Italie 0.36/1000, la Hollande 0.58 /1000 (Eurocat Working Group, 1991), les Émirats Arabes 1.23/1000 (Samson ,2003), Oman 1.25/1000 naissances (Rajab, 1998), le Canada avec 1.4/1000 (De Wals *et al.*, 1992; Van Allen *et al.* ,1993b; Wilson and Van Allen ,1993), l'Allemagne 1.5-1.64/1000 (Koch and Fuhrmann, 1984 ; Rosch, 1998), la Jordanie avec 1.63/1000 (Daoud *et al.* ,1996), l'Afrique du Sud 1.74 /1000 (Buccimazza *et al.* , 1994), la Tunisie 2.2/1000 (Khrouf *et al.* ,1986); et la Turquie 3.01 (Tuncbilek *et al.* , 1999). En Iran, une différence de prévalences a été observée au Nord avec 2.87/1000 (Golalipour *et al.* , 2007) comparé à 4.2 /1000 naissances au sud-ouest (Behrooz and Gorjizadeh, 2007).

Cependant, une prévalence plus élevée que celle de la présente étude, a été observée en Egypte avec 13. 8 /1000 naissances (Samaha *et al.* , 1995), en Chine 10. 23 -13 .87 /1000 (Xiao *et al.* , 1990; Dai *et al.* , 2002; Li *et al.* , 2006) et en Inde 8.21 à 10.66/1000 naissances (Cheriaan *et al.* , 2005 ; Menasinkai, 2010).

1.1. Distribution des ATN selon le type d'anomalies

Le spina bifida fut l'anomalie la plus fréquente aussi bien dans la présente étude que dans d'autres (Harris and James, 1997; Rankin *et al.* , 2000; Soumaya *et al.* , 2001; Golalipour *et al.* , 2007; Dey *et al.* , 2010; Finnell *et al.* , 2013) suivi par l'anencéphalie et enfin l'encéphalocèle; comme l'ont démontré plusieurs recherches où les ATN les plus répandues comme le spina bifida et l'anencéphalie se produisent avec des fréquences allant de 0,9 au Canada jusqu'à 7,7 dans les Emirats Arabes Unies et de 0,7 en France centrale à 11,7 en Amérique du sud par 10000 naissances (Tolmie, 1996).

D'après nos résultats, le rapport spina bifida /anencéphalie est similaire à celui rapporté par d'autres travaux (Mc Donnell *et al.* , 1999), d'autant plus que la moitié des décès était due à l'anencéphalie (Eurocat Working Group, 1991) .

Contrairement à nos résultats, une étude menée en Iran a montré un taux largement élevé des cas d'anencéphalie (53.6%) suivi de (26.8%) de spina bifida (Behrooz and Gorjizadeh, 2007). D'après d'autres recherches notamment en chine, les cas d'anencéphalie représentent plus de la moitié des autres anomalies du tube neural (Xiao *et al.* , 1990; Li *et al.* , 2006). Ceci peut être partiellement dû à la différence d'application des définitions des types d'ATN comme par exemple pour le craniorachischisis et l'inencéphalie qui ont été inclus avec l'anencéphalie dans l'étude de Li *et al.* (2006).

Dans la présente étude, parmi les cas de spina bifida 29.8% étaient associés à l'hydrocéphalie dont l'étiologie est très complexe et hétérogène et peut être secondaire à une ouverture du tube nerveux (Williamson *et al.* , 1984). Notre taux est similaire à celui rapporté par une étude au Niger où l'hydrocéphalie était associée au spina bifida ou à l'encéphalocèle dans 30.74 % des cas (Sanoussi *et al.* , 2001).

En général, les patients atteints de spina bifida ont 80-85% de risque pour développer une hydrocéphalie (Rintoul *et al.* , 2002 ; Dey *et al.* , 2010), surtout dans les familles avec une prédisposition aux ATN (Cohen *et al.* , 1979).

1.2. Prévalence des ATN selon le sexe ratio

Nos résultats montrent une prédominance significative des cas d'ATN de sexe féminin avec un sexe ratio M/F de 0.69. Ceci vient en accord avec d'autres recherches (Gilman ,1991; Lary and Paulozzi , 2001; Rittler *et al .* , 2004; Li *et al .* , 2006; Behrooz and Gorjizadeh, 2007; Menasinkai, 2010) , cependant selon certaines études, le ratio M/F variait entre 0.73 et 0.85 dans différents pays (Seller, 1987;Daoud *et al .* , 1996; Stevenson *et al .* , 2000; Samson, 2003; Deak *et al .* , 2008).

En revanche, il y avait une prédominance masculine non significative des cas d'ATN en Inde et en Thaïlande avec un ratio de 1.07-1.5 (Cherian *et al .* , 2005; Wasant and Sathienkijkanchai, 2005), par contre dans la province de Shanxi en Chine, il n'y avait aucune différence significative dans la distribution des cas d'ATN selon le sexe de l'enfant (Gu *et al .* , 2007).

La majorité féminine des naissances atteintes d'anencéphalie ou de Sb observée dans la présente étude était similaire à celle montrée dans d'autres pays (Mc Donnell *et al .* , 1999), ceci pourrait partiellement refléter une plus grande proportion des avortements spontanés qui se produisent plus tôt chez les fœtus mâles (Deak *et al .* , 2008).

1.3. Prévalence des ATN selon l'âge maternel

D'après la présente étude, on a noté un taux élevé de nouveau-nés atteints d'ATN issus de mères âgées entre 31 et 35 ans. Ceci vient en désaccord avec certaines recherches qui ont montré une relation linéaire entre les taux d'ATN et l'âge maternel (Golalipour *et al .* , 2007), mais aussi avec celle qui n'ont souligné aucun rapport avec l'âge (Dey *et al .* , 2010).

En revanche, des études ont montré un risque élevé de naissances atteintes d' ATN par des mères adolescentes (moins de 20 ans) sans explications précises (Mc Donnell *et al .* , 1999; Owen *et al .* , 2000 ; Gu *et al .* , 2007), et chez les femmes de 35 ans et plus (Hendricks *et al .* , 1999 ; Sanoussi *et al .* , 2001 ; Sipek *et al .* , 2002 ; Vieira and Taucher, 2005 ; Li *et al .* , 2006), ceci pourrait être due à plusieurs facteurs comme l'âge des mariages au delà de 35 ans ou au fait que les taux plasmatiques d'acide folique sont altérés par les traitements antiépileptiques et les contraceptifs oraux (Poujade and Luton, 2008) .

Il semblerait que l'effet de la parité sur les anomalies du tube neural est plus fort que celui de l'âge maternel comme l'ont montré certaines études où le risque des ATN a été plus élevé chez les primipares (Elwood *et al .* , 1992), toutefois d'autres études n'ont trouvé aucune

différence entre le taux d'occurrence des ATN chez les mères primipares et multipares (Behrooz and Gorjizadeh, 2007) .

1.4. Prévalence selon le degré de parenté

Il a été démontré que le taux des naissances affectées d'anomalies du tube neural est plus élevé dans les mariages consanguins (Murshid, 2000). Le taux de ces mariages consanguins dans les différents pays du Moyen-Orient varie entre 23.3% à 57.9% (Khoury and Massad, 1992; Teebi, 1994), alors qu' en Algérie, l'incidence des mariages consanguins a été estimé à 23-34% (Benallegue and Kedji, 1984; Zaoui and Biemont , 2002) avec des fréquences de 40.5 et 30.6% dans les régions rurales et urbaines respectivement.

Le mariage entre cousins germains de premier degré constitue presque 1/3 des mariages dans la plupart des pays Arabes (Hamamy *et al.* , 2005), mais il ne représente en Algérie que 10-16% seulement (Zaoui and Biemont, 2002).

D'après nos résultats, 13% des parents ayant un nouveau né atteint d'une anomalie du tube neural avaient un mariage consanguin (premier degré). D'ailleurs dans les familles qui avaient un enfant atteint d'ATN, le taux de consanguinité était plus élevé que celui observé dans la population générale (Khrouf *et al.* , 1986; Jaber *et al.*, 2004). Ceci peut suggérer que certains cas d'ATN sont dûs à un désordre mono- génique (Zlotogora, 1997).

Cependant, nos résultats sont largement inférieurs au taux rapporté par d'autres études concernant l'impact de la consanguinité sur la prévalence des anomalies du tube neural comme c'est le cas, par exemple, au Niger où un taux de 41.08 % d'enfants atteints d'ATN issus de mariage consanguin a été rapporté (Sanoussi *et al.* , 2001).

1.5. Prévalence des ATN selon les variations saisonnières

Les variations saisonnières ont reçu une attention particulière dans l'apparition des anomalies du tube neural avec des résultats contradictoires menés dans diverses régions du monde.

Au Royaume-Uni (Maclean and Mac Leod ,1984), et en Afrique du Sud (Buccimazza *et al.* ,1994) une variation saisonnière significative a été rapportée avec les ATN, à l'inverse des recherche effectuées au Canada (Hunter ,1984), au Japon

(Ehara *et al.* , 1998), en chine (Gu *et al.* , 2007) ,au nord de l'Allemagne (Beyer *et al.*, 2011) ,et en Norvège (Hwang *et al.*, 2013) qui n'ont montré aucun rapport.

D'après la présente étude, des variations saisonnières ont été observées dans la prévalence des ATN car les naissances étaient plus élevées durant la période de janvier à juin en comparaison à la période de juillet à décembre, ceci est en accord avec les travaux de Mc Donnell *et al.* (1999).

Au contraire, d'autres recherches ont montré une prédominance des naissances avec une ATN pendant les mois d'hiver et spécialement entre octobre-décembre et janvier-mars (Office for Population Censuses and Surveys ,1988; Golalipour *et al.*, 2007). Cependant, pour d'autres pays comme le sud-ouest d'Iran, des taux élevés des cas d'ATN ont été observé surtout au printemps (Behrooz and Gorjizadeh, 2007).

Notre recherche a montré que le taux des ATN était plus élevé en Juin. Par contre, en Irlande le pic des prévalences était en Avril (Mc Donnell *et al.* , 1999) alors qu'au nord d'Iran il a été observé en Décembre (Golalipour *et al.*, 2007).

L'influence des variations saisonnières sur la prévalence des naissances avec des anomalies du tube neural observée dans notre étude reste difficile à comparer avec d'autres études menées dans des pays aux changements saisonniers différents du notre, ceci dépend de la température et de la consommation des folates alimentaires selon les saisons, comme c'est le cas ,par exemple ,de l'augmentation des concentrations sériques des folates observée durant l'été dans les populations du Royaume-Uni (Clarke *et al.* , 1998).

2. Recherches des mutations génétiques

2.1. Evaluation des mutations du facteur V Leiden 1691G-A et de la prothrombine 20210G-A

Les grossesses normales sont caractérisées par un état d'hypercoagulabilité qui prédispose à la thrombose (Sanson *et al.*., 1999) , en revanche, les mutations des gènes du facteur V Leiden (G1691A) et de la prothrombine (G20210A) sont considérées comme les deux facteurs de risque héréditaires de la thrombophilie agissant tôt ou tard au cours de la grossesse, c'est-à-dire avant ou après la 20^{ème} semaine de gestation menant à une perte fœtale possible (Rosendorff and Dorfman, 2007) , à une restriction de croissance intra-utérine , à la prééclampsie et la mortinatalité (Pabinger and Vormittag, 2005).

Les pertes récurrentes de grossesse (PRG) qui sont définies comme deux ou plusieurs avortements spontanés, affectent environ 5 % des femmes en âge de procréer (Settin *et al.*., 2011). Bien que plusieurs causes de PRG ont été mises en place, plus de 50 % des cas demeurent inexpliqués , la thrombophilie a été suggéré comme un facteur de risque pour les pertes fœtales ,les malformations fœtales, dont la pathogénie est potentiellement liée à un événement vasculaire thrombotique ou ischémique (Belinda *et al.*., 2005; Spina *et al.*., 2007).

Mili *et al.* (1991) ainsi que Rasmussen *et al.* (2001) ont constaté une augmentation de la prématurité et l'hypotrophie dans certains défauts affectant la tête ou le système nerveux central (anencéphalie, hydrocéphalie, microcéphalie, encéphalocèle, spina bifida et fentes labiale ou palatine), ainsi que dans des syndromes qui agissent sur le cerveau (trisomie 21,18). Par ailleurs, une récente étude a montré que les avortements spontanés sont fréquents dans les familles ayant un enfant atteint d'une ATN (Teckie *et al.*., 2013).

La mutation du facteur V Leiden semble jouer un rôle dans la pathogénèse de la porencéphalie et la microcéphalie congénitales (Debus *et al.*., 1998; Voudris *et al.*., 2002). Par ailleurs, d'autres recherches ont montré une fréquence significativement élevée du polymorphisme du gène de la prothrombine A20210G en cas de PRG comparé avec aux sujets témoins (D'Uva *et al.*., 2008).

D'après la présente étude, les fréquences génotypiques (G/A) et (A/A) du facteur V Leiden (2.1 et 0 %) sont similaires à celles observées en Arabie Saoudite (2 et 0%) (Al Mawi *et al.* , 2005), probablement dues au mélange qui s'est produit entre les anciens Algériens (berbères) et Arabes durant la période de l'extension islamique; mais il n'y pas d'informations précises sur l'impact démographique et génétique des arrivants de la péninsule Arabe (Lefevre –Witier *et al.* , 2006) .

Nos résultats ont montré des fréquences génotypiques du facteur V Leiden plus élevées que celles observées en Amérique Latine comme en Chili 1.25 % (Palomo *et al.* , 2009), mais assez basses comparées à celles d'autres populations Arabes comme la Syrie (13.6%) et la Jordanie (12.3%) (Awidi *et al.* , 1999), le Liban (13.8 et 1%), la Tunisie (5.8 et 0.6%) , le Bahreïn (3.1 et 0%)(Ameen *et al.* , 2005) , en plus du Koweït (8.25 et 0.75%) (Dashti *et al.* , 2010).

En revanche, la fréquence la plus élevée fut retrouvée en Egypte 16.5% (Ulu *et al.* , 2006). Ces données confirment l'hétérogénéité dans la distribution des mutations du facteur V Leiden entre les Arabes, et recommande une institution des mesures prophylactiques pour les porteurs de ces mutations (Al Mawi *et al.* , 2005).

En outre, la prévalence du facteur V Leiden (G1691A) de la présente étude est très basse par rapport à celle retrouvée dans la population saine , aussi bien chez les turques où elle varie entre 7.3 et 15.2 % (Ozbek and Tangun ,1996; Akar *et al.* ,1997; Gürgey and Mesci, 1997; Kurt *et al.*, 1999; Kabukcu *et al.*, 2007; Şahin *et al.* , 2012) , et chez les caucasiens où ce polymorphisme est considéré comme la cause héritée la plus commune de la thrombose.

Il y a 21000 – 34000 ans il a été retrouvé au Moyens orient où il s'est diffusé à travers l'Europe ce qui pourrait expliquer sa majeure prévalence chez les Caucasiens (Zivelin *et al.* , 1997) avec un intervalle variant entre 2 et 15% avec une moyenne de prévalence de 4% dans la population saine (Rosendaal *et al.* ,1995) comme ,par exemple, l'Espagne (3.33%) (Grandone *et al.*, 1997); la France et l'Italie (2.7-7.5%) (Lucotte and Mercier, 2001). En Albanie la prévalence des hétérozygotes portant ce facteur était de 1.8 % (Atay *et al.* , 2011) plus basse que celles reportées en Grèce 2.5% (Antoniadi *et al.* , 1999) et en Croatie 2.9% (Alfirevic *et al.* , 2010) .

Il est fort possible que la dispersion du facteur V Leiden est associé aux migrations néolithiques introduisant l'agriculture en Europe (Rees *et al.* , 1995). D'ailleurs, dans leur étude sur 26 populations d'Europe et pays voisins, Lucotte and Mercier. (2001) ont conclut que son expansion s'est produite de la région Anatolienne près des zones où ont commencé les processus d'agriculture.

Il est évident que le facteur V Leiden est absent dans les populations sub-saharienne Africaine, les populations de l'Est d'Asie et les populations d'indigènes d'Amérique et d'Australie (Rees ,1996). Par ailleurs, cette mutation est presque absente chez les Basques qui représentent le groupe Européen de l'individualisation pré-néolithique le moins confronté au mélange de migration vers l'ouest d'Europe à travers les temps (Cavalli-Sforza *et al.* , 1994).

En ce qui concerne la mutation sur le gène de la prothrombine, notre étude a montré des fréquences élevées des génotypes PT 20210 G/A et A/A (2.8 et 0 %) comparées à celles observées dans certaines populations comme l'Arabie Saoudite (0 et 0 %), le Bahreïn (1et 0%) (Ameen *et al.* , 2005), la population Kurde d'Iran 1,6% (Rahimi *et al.* ,2008) , et le Chili avec 1.33% (Palomo *et al.* , 2009) .

Toutefois les fréquences de cette présente étude étaient similaires à celles d'autres populations comme Ankara en Turquie (2.7%) (Akar *et al.* ,1998), la Tunisie et le Liban avec (2.6 et 0%) et (3.6 et 0%) respectivement (Al Mawi *et al.* , 2005) , l'Espagne 2.2% (Aznar *et al.* , 2000) , l'Italie 3.2% (Italian Sud Group, 2003) , l'Albanie 3.1% (Atay *et al.* , 2011), et Tokat en Turquie 2.1 % (Şahin *et al.* , 2012).

La prévalence des hétérozygotes PT 20210G/A dans la région de Sétif similaire à celle rapporté en Algérie par de précédents travaux de Helley *et al.* (1999), est toutefois comprise dans l'intervalle des populations Européennes qui varie entre 0.7 et 4 % (Rosendaal *et al.* , 1998). D'un côté, ces données suggèrent que l'afflux de la mutation du gène de la prothrombine PT 20210 G-A dans notre population s'est produit durant la période de migration des phéniciens , ou à partir d'autres régions méditerranéennes comme l'Italie, la Grèce ou la Turquie durant la période Ottomane en Algérie.

Par ailleurs, l'absence d'une double homozygotie des polymorphismes du facteur et PT dans notre étude a été également rapporté par les recherches menées au Centre du Chili (Palomo *et al.* , 2009).

Certaines études portant sur la relation entre le facteur FVL et les PRG, ont établi un lien, avec des Odds ratio variant de 0.5 à 18 (Kovalevsky *et al.* , 2004); par ailleurs, la mutation du gène de la prothrombine a été retrouvée dans 4 à 9 % des femmes avec une perte

récurrente de grossesse, en comparaison à 1 ou 2 % des femmes avec des grossesses sans complication (OR: 2 à 9) (Kujovich, 2004).

Il y a une tendance croissante pour la procréation qui se produit plus tard dans la vie des femmes, en particulier en Europe occidentale, Australie, Nouvelle-Zélande, Canada et les Etats-Unis d'Amérique. Toutefois, si la période biologiquement optimale pour la procréation est située entre 20 et 35 ans, le risque de fausses couches augmentent avec l'âge, c'est pourquoi le dépistage génétique pour les mutations du FVL et PT G20210A est indiqué pour les femmes ayant des PRG ou un avortement tardif (Bogdanova and Markoff, 2010).

2.2. Mutation 677C-T sur le gène de la Méthylènetétrahydrofolate Réductase

La mutation C677T du gène de la MTHFR à l'état homozygote (variant thermolabile) montre une prévalence allant de 10 à 20% dans certaines populations. (Özer *et al.* , 2011). En revanche, plusieurs recherches ont bien défini la prévalence de l'allèle 677T dans leurs populations, les plus basses étant retrouvées chez les noirs Africains(0.052) (Franco *et al.*, 1998) , les Afro-Américains avec 0.11 (Stevenson *et al.* , 1997),et les Indiens du Brésil avec 0.14 (Arruda *et al.* , 1998), en plus des Tunisiens avec 0.18 (Jerbi *et al.* , 2005). Par contre, les fréquences les plus élevées ont été observé chez les Français 0.36 (Wilcken *et al.* , 2003) , les Italiens 0.40 (De Franchis *et al.* , 1996) et les Colombiens avec 0.49 (Pepe *et al.* , 1998) .

Cette présente étude a montré une prévalence élevée du gène de la MTHFR C677T dans la population saine avec une fréquence génotypique (TT) égale à 14.3% ; supérieure à celle retrouvée dans la population Algérienne saine de la région de Batna dont la prévalence était 8.5% (Abdessemed *et al.* ,2009), ceci pourrait être du à la différence d'âge des individus des deux études .Toutefois, la différence dans les allèles du gène de la MTHFR chez les sujets habitants l'Afrique et la Méditerranée n'est pas facile à expliquer, mais il est raisonnable de croire que les facteurs socio- environnementaux pourraient avantager ou désavantager la sélection du génotypes de la MTHFR(Chillemi *et al.* , 2005).

La prévalence du gène de la MTHFR de la présente étude se trouve nettement au dessus de celle observée dans d'autres populations saines comme au Maroc avec 8.4% selon Bennouar *et al.* (2007) ou 6% rapporté par Paluku They-They *et al.* (2009); au Liban où elle a été estimée à 11%, en Tunisie (9,1%), au Bahreïn 2.1%, en Arabie Saoudite avec 4%

(Ameen *et al.* ,2005), en Croatie 9.21% (Lovričević *et al.* , 2004) ou 7% (Alfirevic *et al.* , 2010),chez les Noirs Américains (2.7%) ,et dans les populations sub-sahariennes (0%) (Wilcken *et al.* , 2003; Chillemi *et al.* , 2005).

Cependant, la fréquence du génotype (TT) retrouvée dans notre étude se situe au dessous d'autres fréquences particulièrement élevées rapportées dans le Nord de la chine (20%) et au Mexique (32%) (Wilcken *et al.* , 2003; Molloy *et al.* , 2013), confirmant ainsi que la prévalence de l'allèle T varie aussi selon la race et le groupe ethnique à travers le monde (Alfirevic *et al.* , 2010).

D'après la présente étude, aucune différence significative n'a été trouvée entre les deux sexes porteurs de l'allèle mutant, avec 29.2 et 38.4% chez les hommes et les femmes, respectivement .Ces résultats sont en concordance avec d'autres recherches où cette fréquence n'est pas associée au sexe (Guillen *et al.* , 2001 ; Jerbi *et al.* , 2005). En revanche, d'après une récente étude dans la région de Tokat en Turquie, la fréquence de la mutation C677T sur le gène de la MTHFR était plus élevée chez les femmes (62.6%) par rapport à celle des hommes (56.8%) (Şahin *et al.* , 2012).

Certaines études épidémiologiques ont investigué la corrélation de la mutation C677T du gène de la MTHFR avec plusieurs processus pathologiques (Ueland *et al.*, 2001), dépendants du métabolisme des folates; comme les maladies cardiovasculaires (Lewis *et al.* , 2005; Bennouar *et al.* , 2007), les cancers (Srivastava *et al.* , 2008) et les ATN (Botto and Yang, 2000; Greene *et al.* ,2009).Ainsi, un métabolisme de l'acide folique défectueux pourrait entraîner une synthèse d'ADN ou méthylation altérées impliquées dans le processus de neurulation (Yan *et al.* , 2012).

La recherche d'une association entre les ATN et le polymorphisme C677T MTHFR ont montré des résultats ambigus, car le risque était accru pour les populations Néerlandaise et Irlandaise (Van der Put *et al.* , 1995; De franchis *et al.* ,1997 ;Shields *et al.* , 1999; Relton *et al.* , 2004; Boyles *et al.* , 2006) contrairement pour d'autres populations où aucune association n'a pu être établie (Morrison *et al.* , 1998 ; Speer *et al.* , 1999,Stegmann *et al.* , 1999; Boyles *et al.* , 2006) mais ceci a été partiellement attribué à la taille des échantillons, aux différences des populations en fonction des localisations géographiques et des ethnies (Wilcken *et al.* , 2003) .

La présente étude s'est basée sur l'hypothèse faite par Shields *et al.* (1999) sur l'implication de l'allèle 677T comme facteur de risque des ATN seulement pour les populations ayant une nutrition faible en folate, comme c'est le cas pour la notre dont la prise quotidienne en folate est en dessous de la Reference Nutrient Intake (Houcher *et al.*, 2003).

A notre connaissance, cette recherche est la première étude réalisée en Algérie pour déterminer l'association possible des anomalies du tube neural avec l'allèle T du polymorphisme C677T du gène de la MTHFR dans la région de Sétif où ces anomalies sont à haute prévalence (7/1000 naissances) (Houcher *et al.*, 2008).

D'après la présente étude, la même prévalence de l'allèle T chez les mères ayant un enfant atteint d'ATN est similaire à celle des femmes témoins, ce qui suggère que la variante C677T thermolabile du gène MTHFR n'est pas un facteur de risque pour les anomalies du tube neural dans notre population d'étude. Nos résultats sont similaires à d'autres où aucune association n'a pu être trouvée chez les mères ayant des enfants atteints d'ATN à Constantine (Abbas *et al.*, 2012), au Brésil (Perez *et al.*, 2003), en Italie et en Irlande où des fréquences alléliques 677T élevées ont été observées. (De Marco *et al.*, 2002; Kirke *et al.*, 2004).

Nos données viennent en désaccord avec d'autres recherches qui ont rapporté une prévalence élevée de l'homozygotie (TT) chez les mères ayant un enfant atteint d'ATN comparées aux témoins (Grandone *et al.*, 2006; Carter *et al.*, 2011), par ailleurs, d'après une méta-analyse, les mères portant le génotype homozygote (TT) ont montré un risque d'ATN significativement élevé par rapport aux témoins (Yan *et al.*, 2012), ceci confirme que l'homozygotie pour le polymorphisme du gène de la MTHFR 677T pourrait être un facteur de risque des anomalies du tube neural seulement pour certains groupes ethniques (Papapetrou *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 2012).

La variante C677T thermolabile du gène MTHFR, ainsi que des différences dans la consommation des folates et de riboflavine dans différents pays, peut expliquer les observations d'association avec les ATN dans certaines populations et pas d'autres (Molloy *et al.*, 2013). Cette divergence entre les populations accentue l'interrogation sur le rôle significatif que pourraient jouer les facteurs nutritionnels dans la mutation C677T, d'ailleurs, il est évident que le risque des anomalies du tube neural associé aux génotypes du gène de la MTHFR est dépendant du statut nutritionnel (Gonzalez-Herrera *et al.*, 2002) spécialement avec des taux bas en folate érythrocytaire (Martinez de Villarreal *et al.*, 2001).

D'ailleurs, une autre étude a rapporté une baisse du folate érythrocytaire chez les individus homozygotes pour la mutation C677T du gène MTHFR (Molloy *et al.*, 1997).

Les recherches menées par Davalos *et al.* (2000) incluant des pères et mères d'enfants atteints d'ATN au Mexique ont aboutit à des résultats similaires aux nôtres car aucune différence entre les témoins et les cas d'ATN n'a été trouvée concernant les fréquences génotypiques ou alléliques; alors que d'autres études ont montré que le génotype 677TT est associé à un risque significativement élevé d'avoir un enfant atteint d'ATN, augmentant de 4 fois si sa mère porte le même génotype mutant donc le génotype du père pourrait contribuer au risque de ces anomalies (Van der Put *et al.*, 1996).

Certaines personnes développent des niveaux d'homocystéine élevés, en partie en raison, d'une prédisposition génétique reliée à des mutations au niveau du gène de la MTHFR dont la mutation thermolabile C677T de la MTHFR affectant la régulation de l'homocystéine (Varga *et al.*, 2005). Plusieurs études épidémiologiques ont révélée que des concentrations élevées d'homocystéine jouaient un rôle sévère dans les pertes fœtales récurrentes et les ATN (Ray and Laskin, 1999; D'Uva *et al.*, 2008; Saxena *et al.*, 2011). Par ailleurs, le Polymorphisme C677T du gène de la MTHFR a été associée aux pertes fœtales récurrentes aux premiers stades de la grossesse (Robertson *et al.*, 2006; Saxena *et al.*, 2012; Yaliwal and Desai, 2012).

En revanche; à cause de la fréquence élevée de la mutation du gène de la MTHFR 677 C-T retrouvée dans notre étude, on a exploré la possibilité d'une coexistence entre ce polymorphisme et les deux autres causes des PRG (mutation du facteur V Leiden et prothrombine). Nos résultats ont montré que dans notre population d'étude, le taux de concomitance entre MTHFR et le facteur V Leiden est de 2.3%, , quand à celui avec la prothrombine, il est de 4.6%, , mais aucune combinaison des trois mutations n'a été signalée. Ces résultats doivent être considérés dans l'évaluation de la signification clinique de la prédisposition aux pertes fœtales; malgré que certaines études n'ont pas pu établir une relation évidente entre ces polymorphismes et le retard du développement intra-utérin (Infante-Rivard *et al.*, 2002).

2.3. Mutation sur le gène de la CBS

La CBS est l'enzyme clé dans la voie de trans-sulfuration qui métabolise irréversiblement l'homocystéine en Cystathionine en présence de la sérine et la vitamine B₆ (Summers *et al.*, 2008). De nombreuses études ont montré des taux plus élevés d'homocystéine dans le plasma et le liquide amniotique des mères ayant des fœtus atteints d'ATN suggérant ainsi que l'incapacité à maintenir des niveaux d'homocystéine normaux peut être un facteur contribuant à ces anomalies (Felkner *et al.*, 2009).

La mutation courante la plus étudiée dans différentes populations ethniques du gène de la CBS en cas d'ATN est celle de l'insertion de l'allèle 844ins68 (Morrison *et al.*, 1998 ; De Franchis *et al.*, 2002; Boyles *et al.*, 2006 ; Fredriksen *et al.*, 2007).

Les résultats de la présente étude montre une différence significative entre les fréquences génotypiques des hétérozygotes chez les mères ayant un enfant atteint d'ATN et les mères témoins. Ceci vient en accord avec l'étude de Martinez *et al.* (2009) qui a rapporté que la mutation sur le gène de la CBS qui se traduit par un changement de l'acide aminé isoleucine en thréonine située dans la région de la CBS 844ins68 était significativement associée au risque du myéloméningocèle.

En revanche, d'après les travaux de Grandone *et al.* (2006) , le risque accru d'avoir un enfant atteint d'ATN était significativement associé au génotype paternel portant la mutation 844ins68 sur le gène de la CBS, mais d'après d'autres études, aucune association significative n'a été trouvée entre les anomalies du tube neural et le gène de la CBS (Ramsbottom *et al.*, 1997; Morrison *et al.*, 1998; Van der Put *et al.*, 1998; Speer *et al.*, 1999; Gonzalez-Herrera *et al.*, 2002 ; Pei, 2011; Tilley *et al.*, 2012; Ouyang *et al.*, 2014).

D'après nos résultats, aucune association évidente entre les génotypes de la MTHFR 677T et l'insertion de 68 paires de bases sur le gène de la CBS combinés n'a été observée; ceci est en désaccord avec les travaux de De Franchis *et al.* (1997) en Irlande et en Italie, suggérant que la variante du gène de la CBS pourrait se produire plus fréquemment qu'elle n'est supposée l'être en combinaison avec la variante thermolabile de la MTHFR chez les mères avec un enfant atteint d'ATN, car la combinaison de ces deux mutations a quintuplé le risque de spina bifida comparé à chacune des variantes seules, indiquant la présence d'interactions gène-gène dans l'étiologie des ATN (Botto and Mastroiacovo, 1998).

En revanche, l'exploration de l'association gène-gène étudiée par Summers *et al.* (2008) a montré que le risque associé à l'état homozygote de la mutation du gène de MTHFR C677T pouvait être annulé, au moins en partie, par le statut CBS 844ins68, ceci pourrait avoir d'importantes implications dans plusieurs situations comme les maladies cardiovasculaires et le spina bifida dans lesquelles un taux d'homocysteine élevé et faible d'acide folique semble contribuer.

Un autre polymorphisme du gène de la (CBS 833T > C) qui code potentiellement pour une forme tronquée de l'enzyme a été étudié sur différents groupes de patients atteints d'ATN avec un modeste risque pour ces anomalies (Shaw *et al.*, 2009).

2.4. Les gènes des transporteurs du zinc

Le zinc est un métal indispensable pour l'activité catalytique de plusieurs enzymes, la synthèse des protéines et de l'ADN, au développement neural, à l'apprentissage et à la mémoire (Prasad, 1996; Frederickson *et al.*, 2005). Par conséquent, la carence en zinc au cours du développement est hautement tératogène et embryo-toxique et les résultats sont très variables selon l'étendue et le moment où elle se produit (Kambe *et al.*, 2008).

La grossesse ainsi que l'utilisation des contraceptifs oraux peut provoquer une diminution de la concentration du zinc, probablement en raison de l'effet des œstrogènes (Pérez-Maldonado & Kurban, 2006). Toutefois, en cas d'excès, cet élément est toxique, par conséquent, le maintien de l'homéostasie du zinc est critique et plusieurs gènes sont impliqués pour moduler le stockage, l'efflux et l'absorption de ce métal en réponse à la disponibilité du zinc (Kambe *et al.*, 2008).

Du fait que les mécanismes biologiques conduisant aux ATN sont si mal comprises, il est fort probable qu'une altération dans la fonction d'un gène sans lien apparent aux voies de l'acide folique pourrait jouer un rôle dans ces anomalies (Molloy *et al.*, 2013).

Diverses expériences ont montré que le transporteur du zinc ZIP 14 joue un rôle majeur dans le mécanisme de l'hypo-zincémie qui accompagne la réponse de la phase aiguë de l'inflammation et de l'infection (Liuzzi *et al.*, 2005). Ce transporteur est un nouveau régulateur endogène pour la croissance systémique et l'homéostasie énergétique par un mécanisme de régulation du système endocrinien et la signalisation des récepteurs couplés à la protéine G, d'ailleurs les souris ayant une invalidation génique du gène ZIP14 montrent un retard de croissance avec une gluconéogenèse défectueuse (Fukada *et al.*, 2011; Hojyo *et al.*, 2011).

Des études précédentes ont montré le rôle possible du métabolisme du zinc au moins chez certaines mères ayant porté des enfants atteints d'ATN. Les facteurs nutritionnels et /ou les défauts génétiques liés au zinc peuvent causer les carences en zinc chez ces femmes. En outre, les études sur les niveaux plasmatiques maternels du zinc dans les grossesses associés aux ATN ont révélé que certaines femmes affectées ont une absorption défectueuse en zinc due à la déficience chronique en zinc qui retourne à la normale après supplémentation par ce métal (Akar, 1988; Prasad, 1996 ; Vats *et al.* , 2011) .

Dans la présente étude , l'implication possible du gène ZIP 14 dans les anomalies du tube neural a été investigué .Les résultats n'ont montré aucune altération de ce gène (région du promoteur 1: 333 paires de bases) chez les mères d'enfants atteints d'ATN .Ceci est en concordance avec une recherche réalisée en Turquie sur des mères et leurs enfants atteints d'ATN, démontrant ainsi qu'il n'y a pas de relation entre les anomalies du tube neural et le gène ZIP 14 (Torun *et al.* , 2011).

L'étude de l'implication du polymorphisme ZnT4 (915 T-C) dans la survenue des anomalies du tube neural n'a pas pu être confirmée dans la présente étude. malgré que ce polymorphisme semblait être un bon marqueur pour le spina bifida et en particulier dans les cas où des concentrations faibles en zinc ont été observées d'après l'étude qui a porté sur 105 mères d'enfants atteints d' ATN en Turquie , et où l'homozygotie (915CC) sur le gène ZnT4 était doublement supérieure chez les mères d'ATN par rapport au groupe témoin (Akar *et al.* , 2006) .

Par ailleurs, certaines recherches ont montré que les femmes enceintes qui souffrent de l'acrodermatitis enteropathica, qui se présente comme une atrophie sévère de la muqueuse intestinale, sont des femmes à risque pour les ATN (Mambidge *et al.* , 1975). Ce désordre est un défaut autosomal récessif causé par une mutation dans le gène SLC39A4 qui code pour la protéine du transporteur du zinc ZIP4, essentielle pour l'homéostasie normale de zinc (Wang *et al.* , 2004) ,qui cause une carence en zinc due à l'absorption altérée de cet élément dans le tractus gastro-intestinal (Chen , 2007). À l'inverse, la progéniture d'une femme souffrant de cette même pathologie était normale lorsqu'une supplémentation en zinc lui a été attribuée tout au long de sa grossesse (Akar *et al.* , 1991 ; Çavdar *et al.*, 1991) .

Conclusion et perspectives

La naissance d'un enfant porteur d'une anomalie congénitale du tube neural est une tragédie personnelle pour l'enfant et sa famille. En outre, les problèmes de santé résiduels peuvent réduire la qualité de vie, être à l'origine d'incapacités chroniques et imposer un poids social, financier et psychologique.

Bien que les ATN peuvent se produire dans le cadre des troubles chromosomiques d'un seul gène ou par suite de l'exposition aux tératogènes, un agent étiologique spécifique ne peut être identifié pour la majorité des personnes touchées.

Par ailleurs, l'identification des facteurs de risque génétiques humains est compliquée par la multiplicité des gènes participant à la neurulation et l'importance des interactions gènes-environnement.

Plusieurs études ont mis en évidence la relation entre la survenue de ce type d'anomalies et un déficit en acide folique surtout en début de grossesse. Parallèlement, l'effet protecteur d'une supplémentation en cette vitamine pour les femmes en période péri-conceptionnelle a été démontré même si cette prévention n'est pas totale.

Les principales conclusions de la présente étude sont :

- ✓ Ce travail montre pour la première fois que la prévalence des anomalies du tube neural est élevée dans la région de Sétif, et que certains facteurs génétiques pourraient jouer un rôle dans le taux des ATN dans cette région de l'Algérie, malgré que le mécanisme par lequel le génotype ou le statut du folate augmente ce risque, ne soit pas encore élucidé.
- ✓ La majorité des naissances avec une ATN était de sexe féminin, et la consanguinité entre les parents représentait 13%.
- ✓ Cette étude montre que la prévalence du polymorphisme 677C-T sur le gène de la MTHFR est élevée dans notre population d'étude mais avec une fréquence intermédiaire entre l'Europe et les fréquences basses sub-sahariennes confirmant ainsi l'hétérogénéité de la distribution de ce génotype à travers le monde.

- ✓ Nous avons pu montrer que la coexistence d'un défaut de l'enzyme MTHFR avec d'autres causes héréditaires des pertes récurrentes de grossesses (comme les mutations du facteur V Leiden et la prothrombine) est rare dans notre population saine d'étude.
- ✓ Nous avons montré que le risque accru d'avoir un enfant atteint d'ATN était significativement associé au génotype hétérozygote maternel pour la mutation 844ins68 sur le gène de la CBS, toutefois, des études plus élargies sont nécessaires pour déterminer si le polymorphisme 844ins68 CBS est un bon indicateur pour le risque d'ATN dans notre pays.
- ✓ Cette étude n'a pas pu établir une relation entre les ATN et les gènes ZIP 14 et Zn T4, malgré la coexistence de la relation entre ces anomalies et le statut du zinc d'après d'autres études.
- ✓ Par conséquent, malgré près d'une décennie de recherches dans le monde, aucun gène n'est devenu clairement un prédisposant dans les mécanismes biologiques conduisant aux ATN. Cette présente étude peut ouvrir la voie à tant d'autres désirant mener des recherches sur d'autres facteurs à risque des ATN dans notre pays.
- ✓ D'après nos investigations, la majorité de grossesses portants des anomalies du tube neural se produisent chez des mères sans cas précédant d'ATN, donc la prévention de cette première apparition doit être prise en considération comme un véritable problème de santé publique, d'autant plus que la prise quotidienne en folates de notre population algérienne se trouve être en dessous de la référence mondiale.
- ✓ Il est recommandé que toutes les femmes susceptibles de devenir enceintes consomment 0,4 mg d'acide folique par jour sur une base continue afin d'empêcher les ATN (prévention primaire). Pour les femmes à risque élevé (précédent ATN), l'apport recommandé est de 4 mg par jour depuis au moins un mois avant la conception et se poursuivant jusqu'au cours du premier trimestre (prévention secondaire).
- ✓ Il est évident qu'un grand nombre de cas est nécessaire pour élucider pleinement le mécanisme d'autres polymorphismes sur le gène de la MTHFR qui contribue à une diminution de la viabilité fœtale surtout pendant la période d'exigence élevés de folate.

✓ Compte tenu de la grande prévalence et les coûts sociaux élevés de ces défauts, il y a un besoin urgent d'un registre centralisé pour recenser l'évolution de la prévalence des cas d'ATN dans notre pays.

✓ D'un autre côté, des efforts doivent être fournis par des spécialistes pour éduquer les femmes en âge de procréation pour le besoin essentiel de la prise de suppléments d'acide folique surtout en période péri-conceptionnelle, notamment pour les femmes sous traitement avec des antiépileptiques.

✓ Dans la continuité des travaux de recherche décrits dans cette thèse, et dans une perspective plus fondamentale, la présence des affections chez l'enfant atteint d'ATN et chez sa mère pourrait être investiguer, pour essayer d'établir la relation entre les données cliniques de la déficience des enzymes du métabolisme du folate, ou de l'homocystéine avec l'histoire familiale.

✓ Par ailleurs, malgré l'absence d'une relation entre les gènes du zinc et les ATN dans la présente étude, la recherche de la déficience en zinc chez les mères d'enfants atteints peut être un excellent marqueur.

Références

Abbas A, Abadi N, Naimi D, Sifi K, and Benlatreche C. Recherche de la mutation C677 T du gène codant pour la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) dans les anomalies de fermeture du tube neural (AFTN) à Constantine . *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 2012 ; 27(Issue 3) : 122-127.

Abdessemed S, Hambaba L, Rodriguez- Gueant RM, Payet C, Philippe G, Laroui S, Yahia M, Ferd K, and Rouabeh F. Contribution des facteurs génétiques et nutritionnels dans les Hyperhomocystéinémies dans la population algérienne saine. *Nutrition clinique et métabolisme* 2009 ; 23 : 50-54

Afman LA, Lievers K JA, Van der Put NMJ, Trijbels FJM, and Blom HJ. Single nucleotide polymorphisms in the transcobalamin gene: relationship with transcobalamin concentrations and risk for neural tube defects. *European Journal of Human Genetics* 2002; 10: 433–438

Akar N , Bahçeci M, Uçkan D, Dinçer N, Yavuz H , and Çavdar AO. Maternal plasma zinc levels after oral zinc tolerance test in pregnancies associated with neural tube defects in Turkey. *J Trace Elem Exp Med* 1991; 4: 225–227.

Akar N, Akar E, Araç B, Ulu A, and Ekim M. Does SLC30A4 (ZnT4) gene exon 5, 915 T-C alteration play a role in neural tube defects? *Trace Elem Electrol* 2006; 23(4): 266–269

Akar N, Akar E, Dalgin G, Sözüöz A, Omürlü K, and Cin S . Frequency of factor V 1691 G-A mutation in Turkish population. *Thromb Haemost* 1997; 78: 1527.

Akar N, Akar E, Deda G, and Arsan S. Spina bifida and common mutations at the homocysteine metabolism pathway. *Clin Genet* 2000; 57: 230-231.

Akar N, Akar E, Deda G, Sipahi D, and Orsal A. Factor V 1691G-A, prothrombin 20210G-A , and methylenetetrahydrofolate reductase 677 C-T variants in Turkish children with cerebral infarct. *J Child Neurol* 1999; 14: 749- 51

Akar N, Akar E, Eğin Y, Deda G, Arsan S , and Ekim M. Neural tube defects and 19 bp deletion within intron-1 of dihydrofolate reductase gene. *Turk J Med Sci* 2008; 38 (5): 383-386.

Akar N, Akar E, Ozel D, Deda G, and Sipahi T. Common mutations at the homocysteine metabolism pathway and pediatric stroke. *Thromb Res* 2001 ; 102: 115-20

Akar N, Misirlioglu M, Akar E, Avcu F, Yalcin A, and Sozuoz A. Prothrombin gene 20210 G-A mutation in the Turkish population. *Am J Hematol* 1998; 58: 248-52.

Akar N. Neural tube defects and zinc. *Arch Dis Child* 1988: 278–288.

Akar N. Pregnancy outcome of mothers with defective oral zinc tolerance test. *J Trace Elem Exp Med* 1997; 10:153–4.

Al Mawi WY, Keleshian SH , Borgi L, Fawaz NA , Abboud N, Mtiraoui N, and Mahjoub T . Varied prevalence of factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A single nucleotide polymorphisms among Arabs. *J Thromb Thrombolysis* 2005; 20(3): 163-168

Alebic-Juretic A , and Frkovic A. Plasma copper concentrations in pathological pregnancies. *J Trace Elem Med Biol* 2005; 19: 191-194

Alfirevic Z, Simundic A-M, Nikolac N, Sobocan N, Alfirevic I, Stefanovic M, Vucicevic Z, and Topic E. Frequency of factor II G20210A, factor V Leiden, MTHFR C677T and PAI-1 5G/4G polymorphism in patients with venous thromboembolism: Croatian case control study. *Biochimica Medica* 2010;20(2):229-35.

Ameen G, Irani-Hakime N, Fawaz NA, Mahjoub T, and Almawi WY. An arab selective gradient in the distribution of factor V G1691A (Leiden), prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2126-7.

Anderson CL, and Brown CEL. Fetal chromosomal abnormalities: antenatal screening and diagnosis. *Am Fam Physician* 2009;79:117-123.

Antoniadi T, Hatzis T , Kroupis C , Economou-Petersen E, and Petersen MB. Prevalence of factor V Leiden , prothrombin G20210A, and MTHFR C677T mutations in Greek population of blood donors . *Am J Hematol* 1999; 61: 265-7

Aqrabawi HE. Incidence of neural tube defects among neonates at King Hussein Medical Centre, Jordan . *East Mediterr Health J* 2005; 11: 819-823.

Arruda VR, Siqueira LH, Gonçalves MS, Von Zuben PM, Soares MC, Menezes R, Annichino-Bizzacchi JM, and Costa FF. Prevalence of the mutation C677 > T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet* 1998;78:332–335.

Atay AA, Tekin M, Allajalebeu K, Egin Y, and Akar N. The frequency of FV G1691A and PT G20210A mutations in an Albanian population . *Turk J Hematol* 2011 ; 28: 241-2

Au KS, Ashley-Koch A, and Northrup H. Epidemiologic and genetic aspects of spina bifida and other neural tube defects. *Dev Disabil Res Rev* 2010; 16(1): 6-15

Au KS, Tran PX, Tsai CC , O'Byrne MR, Lin JI, Morrison AC, Hampson AW, Cirino P, Fletcher JM, Ostermaier KK, Tyerman GH, Doebel S, and Northrup H. Characteristics of a spina bifida population including north American Caucasian and Hispanic individuals. *Birth Defects Research (Part A)* 2008; 82: 692-700.

Awidi A, Shannak M, Bseiso A, Kailani MA, Omar N, Anshasi B, and Sakarneh N. High prevalence of factor V Leiden in healthy Jordanian Arabs. *Thromb Hemost* 1999; 81: 582-4.

Aznar J, Vaya A, Estelles A , Mira Y, Seguí R, Villa P, Ferrando F, Falcó C, Corella D, and España F. Risk of venous thrombosis in carriers of the prothrombin G20210A variant and factor V Leiden and their interaction with oral contraceptives. *Haematologica* 2000; 85: 1271-76.

Back SA , and Plawner LL. Congenital Malformations of the Central Nervous System in: Avery's diseases of the newborn. Elsevier Saunders 2012; 848-868

Baird PA ,and Sadovnick AD. Survival in infants with anencephaly. *Clin Pediatr (Phila)* 1984; 23:268-271

Bassuk AG , and Kibar Z. Genetic basis of neural tube defects. *Semin Pediatr Neurol* 2009; 16(3):101-10.

Beaudin AE, and Stover PJ. Insights into metabolic mechanisms underlying folate-responsive neural tube defects: a mini review. *Birth Defects Res. A Clin Mol Teratol* 2009; 85: 274–284.

Behrooz A and Gorjizadeh M H. Prevalence and correlates of neural tube defect in South West Iran: Retrospective analysis . *Sultan Qaboos Univ Med J* 2007; 7(1):31-34

Belinda C, Gavin S, and Lesley R. Recurrent miscarriage: pathophysiology and outcome. *Obstet Gynecol* 2005;17:591–7.

Benallegue A , and Kedji F. Consanguinité et santé publique: Une étude algérienne .*Arch Fr Pédiatr* 1984 ; 41 : 435-40.

Bennouar N, Allami A, Azeddoug H, Bendris A, Laraqui A, El Jaffall A, El Kadiri N, Benzidia R, Benomar A, Fellat S, and Benomar M. Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism and Homocysteine Are Risk Factors for Coronary Artery Disease in Moroccan Population. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2007; Article ID 80687, 9.

Beyer DA, Diedrich K, Weichert J, Kavallaris A, and Amari F. Seasonality of spina bifida in Northern Germany. *Arch Gynecol Obstet* 2011; 284:849e54.

Bezold G, Lange M, and Peter R. Homozygous methylenetetrahydrofolate reductase mutation C677T and male infertility .*N Engl J Med* 2001; 344: 15

Blanco Muñoz J, Lacasaña M, Borja Aburto VH, Torres Sánchez LE, García García AM, and López Carrillo L. Socioeconomic factors and the risk of anencephaly in a Mexican population: a case-control study. *Public Health Rep* 2005; 120: 39–45.

Blatter BM, Roeleveld N, Bermejo E, Martínez-Frías ML, Siffel C, and Czeizel AE. Spina bifida and parental occupation: results from three malformation monitoring programs in Europe. *Eur J Epidemiol* 2000;16: 343–51

Blencowe H, Cousens S, Modell, B, and Lawn J. Folic Acid to Reduce Neonatal Mortality from Neural Tube Disorders. *International Journal of Epidemiology* 2010; 39: 110–121.

- Blom HJ, Shaw GM, Den Heijer M, and Finnell RH.** Neural tube defects and folate: cases far from closed. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7:724-731
- Blom HJ.** Folic acid, methylation and neural tube closure in humans. *Birth Defects Research* 2009; 85:295–302.
- Bogdanova N, and Markoff A .**Hereditary thrombophilic risk factors for recurrent pregnancy loss *J Community Genet* 2010; 1:47–53
- Botto L D, Moore C A, Khoury M J, and Erickson JD.** Neural-tube defects. *N Engl J Med* 1999; 341:1509–1519
- Botto LD, and Mastroiacovo P.** Exploring gene-gene interactions in the etiology of neural tube defects. *Clin Genet* 1998; 53: 456-469.
- Botto LD , and Yang Q.** 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a huge review. *Am J Epidemiol* 2000; 151:862-877?
- Boulet SL, Gambrell D, Shin M, Honein MA, and Mathews T.** Racial/ ethnic differences in the birth prevalence of spina bifida- United States , 1995-2005. *MMWR* 2009;57:1409-1413
- Bound JP, Harvey PW, Francis BJ, Awwad F, and Gatrell AC.** Involvement of deprivation and environmental lead in neural tube defects: a matched case-control study. *Arch Dis Child* 1997; 76:107–12.
- Boyles AL, Billups AV, Deak KL, Siegel DG, Mehlretter L, Slifer SH, Bassuk AG, Kessler JA, Reed MC, Nijhout HF, George TM, Enterline DS, Gilbert JR, and Speer MC.** Neural tube defects and folate pathway genes: family-based association tests of gene–gene and gene–environment interactions. *Environ Health Perspect* 2006; 114: 1547–1552.
- Brender JD, Felkner M, Suarez L, Canfield MA, and Henry JP.** Maternal pesticide exposure and neural tube defects in Mexican Americans. *Ann Epidemiol* 2010; 20:16–22.
- Brock DJ.** Mechanisms by which amniotic-fluid alpha-feto-protein may be increased in fetal abnormalities. *Lancet* 1976; 2:345-346.
- Brough L, Rees GA, Crawford MA, and Dorman EK.** Social and ethnic differences in folic acid use preconception and during early pregnancy in the UK: effect on maternal folate status. *J Hum Nutr Diet* 2009; 22: 100-107
- Brouwer IA, Van Dusseldorp M, West CE, Meyboom S, Thomas CM, Duran M, Van het Hof KH, Eskes TK, Hautvast JG, and Steegers-Theunissen RP.** Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled trial. *J Nutr* 1999; 129: 1135-1139
- Brown KS, Cook M, Hoess K, Whitehead AS, and Mitchell LE.** Evidence that the risk of spina bifida is influenced by genetic variation at the NOS3 locus. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2004; 70:101–6.

Brown MS , and Sheridan-Pereira M. Outlook for the child with a cephalocele. *Pediatrics* 1992; 90(6):914-9

Brzeziński ZJ. Frequent occurrence of NTD. In: Prevention of congenital neural tube defects . Instytut Matki i Dziecka, Program Pierwotnej Profilaktyki Wad Cewy Nerwowej, Warszawa 1998.

Buccimazza S, Molteno C, Dunne T , and Viljoen DL. Prevalence of neural tube defects in Cape Town, South Africa. *Teratology* 1994; 50:194-9

Burkitt MJ. A critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides, alphanatocopherol, thiols and ceruloplasmin. *Arch Biochem Biophys* 2001; 394: 117-135.

Campbell LR, Dayton DH, and Sohal GS. Neural tube defects: a review of human and animal studies on the etiology of neural tube defects. *Teratology* 1996; 34:171-87.

Campbell LR, and Sohal GS. The pattern of neural tube defects created by secondary reopening of the neural tube. *Journal of Child Neurology* 1990 ; (5):336-340.

Canfield MA , Annegers JF, Brender JD , Cooper SP, and Greenberg F. Hispanic origin and neural tube defects in Houston / Harris county II Texas risk factors . *Am J Epidemiol* 1996; 143:12-24

Canton MC, and Cremin FM. The effect of dietary zinc depletion and repletion on rats: Zn Concentration in various tissues and activity of pancreatic gamma glutamyl hydrolase (EC 3.4.22.12) as indices of Zn status. *Br J Nutr* 1990;64(1):201-9.

Carrillo-Ponce M de L, Martinez-Ordaz VA, Velasco-Rodriguez VM, Hernandez-Garcia A, Hernandez-Serrano MC, and Sanmiguel F. Serum lead, cadmium, and zinc levels in newborns with neural tube defects from a polluted zone in Mexico. *Reprod Toxicol* 2004; 19: 1

Carter TC , Pangilinan F, Troendle JF, Molloy AM, Vander Meer J, Peadar AM ,Kirke N, Conley MR, Shane B, Scott J M, Brody LC, and Mills JL . Evaluation of 64 Candidate Single Nucleotide Polymorphisms as Risk Factors for Neural Tube Defects in a Large Irish Study Population *Am J Med Genet A* 2011; 155A(1): 14-21.

Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, and Piazza A. The History and Geography of Human Genes . Princeton University Press, Princeton 1994.

Çavdar AO, Bahceci M, Akar N, Erten J, and Yavuz H. Effect of Zinc supplementation in a Turkish woman with two previous anencephalic infants. *Gynecol Obstet Invest* 1991; 32: 123-125.

CDC. Racial/ethnic differences in the birth prevalence of spina bifida – United States, 1995-2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 57(53):1409-13.

- Cengiz B, Soylemez F, Ozturk E, and Çavdar AO.** Serum zinc, selenium, copper, and lead levels in women with second-trimester induced abortion resulting from neural tube defects: a preliminary study. *Biol Trace Elem Res* 2004; 97:225-235.
- Chen CP.** Chromosomal abnormalities associated with neural tube defects (II): partial aneuploidy. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2007;46:336–351.
- Cherian A, Seena S, Bullock RK , and Antony AC .** incidence of neural tube defects in the least-developed area of india: a population –based study . *The lancet* 2005 ; 366(10) : 930-931.
- Chillemi R, Angius A, Persico I, Sassu A, Prodi DA, and Musumeci S.** Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) from Mediterranean to Sub-Saharan Areas. *J Biol Sci* 2005; 6 (1): 28-34.
- Christensen KE, Rohlicek CV, Andelfinger GU, Michaud J, Bigras J L, Richter A, Mackenzie R E, and Rozen R.** The MTHFD1p.Arg653Gln variant alters enzyme function and increases risk for congenital heart defects. *Hum Mutat* 2009 ; 30: 212–220.
- Clarke R, Woodhouse P, Ulvik A , Frost C, Sherliker P, Refsum H, Ueland PM, and Khaw KT.** Variability and determinants of total homocysteine concentrations in plasma in an elderly population. *Clin Chem* 1998; 44(1): 102-7.
- Cohen T, Stern E, and Rosenman A.** Sub risk of neural tube defect. Is prenatal diagnosis indicated in pregnancies following the birth of a hydrocephalic child? *J Med Genet* 1979; 16: 14-6.
- Connor M , and Ferguson - Smith M .** Basic medical genetics. PZWL, Warszawa 1998.
- Crane JP.** Sonographic detection of neural tube defects. In: Elias S ,Simpson JL ,ed. Maternal serum screening for fetal genetic disorders, New York: Churchill-Livingstone; 1992:59-74.
- Czeizel AE , and Dudas I.** Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992; 327: 1832-5.
- D’Uva1 M, Di Micco P, Strina I, Ranieri A, Alviggi C, Mollo A, Fabozzi F, Cacciapuoti L, M T S di Frega, Iannuzzo M , and De Placido G.** Etiology of hypercoagulable state in women with recurrent fetal loss without other causes of miscarriage from Southern Italy: new clinical target for antithrombotic therapy *Biologics: Targets & Therapy* 2008; 2(4): 897–902
- Dai L, Zhu G, Zhou G, Wang Y, Wu Y, Miao L, and Liang J.** Dynamic monitoring of neural tube defects in China during 1996 to 2000. *Chinese J Prevent Med* 2002 ; 36(6) : 402-5
- Danishpajoo IO, Gudi T, Chen Y, Kharitonov VG, Sharma VS, and Boss GR.** Nitric oxide inhibits methionine Synthase activity in vivo and disrupts carbon flow through the folate pathway. *J Biol Chem* 2001;276:27296–303.
- Dansky LV , and Finnell RH.** Parental epilepsy, anticonvulsant drugs, and reproductive outcome: epidemiologic and experimental findings spanning three decades; 2: human studies. *Reprod Toxicol* 1991; 5: 301–335.

Daoud AS , AL-Kaysi F, EL- Shanti H, Batiha A, Obeidat A, &Al-Sheyab M . Neural tube defects in Northern Jordan .*Saud Med J* 1996; 17:78-81

Dashti AA , Jadaon MM , and Lewis HL . Factor V Leiden mutation in Arabs in Kuwait by real-time PCR: different values for different Arabs . *Journal of Human Genetics* 2010; 55: 232-235

Date I, Yagyu Y, Asari S, and Ohmoto T. Long-term outcome in surgically treated spina bifida cystica. *Surg Neurol* 1993;40:471-5.

Davalos IP, Olivares N, Castillo MT , Cantú JM, Ibarra B, Sandoval L, Morán MC, Gallegos MP, Chakraborty R, and Rivas F. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexican mestizo neural tube defect parents, control mestizo and native populations. *Ann Genet* 2000; 43: 89-92.

Deak KL, Siegel DG, George TM, Gregory S, Ashley-Koch A, and Speer MC. Further evidence for a maternal genetic effect and a sex-influenced effect contributing to risk for human neural tube defects. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 2008; 82: 662–669 .

De Bruyn R. Echographie pédiatrique : indications, techniques et résultats. Elsevier Masson SAS, ISBN : 978-2-84299-840-0 2007 ; P : 269

De Franchis R, Mancini FP, D'Angelo A, Sebastio G, Fermo I, De Stefano V. Elevated total plasma homocysteine and 677C>T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene in thrombotic vascular disease. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 262-264.

De Franchis R, Sebastio R, and Mandato G. Risk factors for neural tube defects: analysis of common genetic variants of methylenetetrahydrofolate reductase and cystathionine β -synthase. *Am J Hum Genet* 1997; 61: suppl., A861.

De Marco P, Merello E, Calevo M G , Mascelli S, Raso A , Cama A, and Capra V. Evaluation of a methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase 1958G.A polymorphism for neural tube defect risk. *J Hum Genet* 2006; 51:98–103.

De Marco P, Calevo MG, Moroni A , Arata L, Merello E, Finnell RH, Zhu H, Andreussi L, Cama A, and Capra V. Study of MTHFR and MS polymorphisms as risk factors for NTD in the Italian population. *J Hum Genet* 2002;47:319-324.

De Marco P, Calevo MG, Moroni A, Merello E, Raso A, Finnell RH, Zhu H, Andreussi L, Cama A, and Capra V. Reduced folate carrier polymorphism (80A->G) and neural tube defects. *Eur J Hum Genet* 2003;11:245–252.

De Marco P, Moroni A, Merello E, De Franchis R, Andreussi L Finnell R H, Barber R C, Cama A, and Capra V. Folate pathway gene alteration in patients with neural tube defects. *American Journal of Medical Genetics* 2000;95: 216-223

De Stefano V, Dekou V, Nicaud V , Chasse JF, London J, Stansbie D, Humphries SE, and Gudnason V. Linkage disequilibrium at the cystathionine beta synthase (CBS) locus and the

association between genetic variation at the CBS locus and plasma levels of homocysteine. The Ears II Group. European Atherosclerosis Research Study. *Ann Hum Genet* 1998;62: 481–490.

De Wals P, Tairou F, Van Allen MI, Uh SH, Lowry RB, Sibbald B, Evans JA, Van Den Hof MC, Zimmer P, Crowley M, Fernandez B, Lee NS, and Niyonsenga T. Reduction in neural-tube defects after folic acid fortification in Canada. *N Engl J Med* 2007; 357: 135-42.

De Wals P, Trochet C, and Pinsonneaut L. Prevalence of neural tube defect in the province of Quebec. *Can J Pub Health* 1992; 90:237-9

Debus O, Koch H.G, Kurlemann G, Strater R, Vielhaber H, Weber P, and Nowak-Gottl U. Factor V Leiden and genetic defects of thrombophilia in childhood porencephaly. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1998;78:121-124.

Defoort EN, Kim PM, and Winn LM. Valproic acid increases conservative homologous recombination frequency and reactive oxygen species formation: a potential mechanism for valproic acid-induced neural tube defects. *Mol Pharmacol* 2006; 69: 1304–1310.

Dekou V, Gudnason V, Hawe E, Miller GJ, Stansbie D, and Humphries SE: Gene-environment and gene-gene interaction in the determination of plasma homocysteine levels in healthy middle-aged men. *Thromb Haemost* 2001;85: 67–74.

Del Bigio MR. Neuropathology and structural changes in hydrocephalus. *Dev Disabil Res Rev* 2010; 16:16-22.

Deltour S, Chopin V, and Leprince D. Modifications épigénétiques et cancer. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 405-11.

Denis I, Beaudonnet A, Pichot J, Roubille M , and Gelineau MC. Mise au point d'une méthode de dosage de l'alpha-fœtoprotéine fucosylée et évaluation dans le diagnostic biologique du carcinome hépatocellulaire sur cirrhose . *Ann Bio Clin* 2000 ; 58/1 : 85-90

Detrait ER, George TM, Etchevers HC, Gilbert JR, Vekemans M, and Speer MC. Human neural tube defects: developmental biology, epidemiology, and genetics. *Neurotoxicology and Teratology* 2005 ;27: 515-524

Dey AC, Shahidullah M, Abdul Mannan M, Noor MK, Saha L, and Rahman SA. Maternal and Neonatal Serum Zinc Level and Its Relationship with Neural Tube Defects. *Health Popul Nutr* 2010 ; 28(4):343-350

Dolk H, Dewals P, Gillerot Y, Lechat MF, Ayme S, Cornel M, Cuschieri A, Garne E, Goujard J, Laurence KM, Lillis D, and Lys F. Heterogeneity of neural tube defects in Europe: The significance of site of defect and presence of other major anomalies in relation to geographic differences in prevalence. *Teratology* 1991; 44:547–559,

Doudney K , Grinham J , Whittaker J, Lynch SA, Thompson D, Moore GE, Copp AJ, Greene N , and De Stanier P. Evaluation of folate metabolism gene polymorphisms as risk factors for open and closed neural tube defects. *Am J Med Genet* 2009; 149A: 1585–1589.

Duncan S, Mercho S, Lopes-Cendes I, Seni MH, Benjamin A, Dubeau F, Andermann F, and Andermann E . Repeated neural tube defects and valproate monotherapy suggest a pharmacogenetic abnormality. *Epilepsia* 2001; 42: 750–753.

Dunlevy LPE , Chitty LS , Doudney K, Burren KA , Stojilkovic-Mikic T , Stanier P , Scott R , Copp AJ , and Greene NDE. Abnormal folate metabolism in foetuses affected by neural tube defects. *Brain* 2007; 130: 1043–1049.

D'Uva M, Di Micco P, Strina I, Ranieri A, Alviggi C ,Mollo A ,Fabozzi F, Cacciapuoti L, Scotto di Frega MT, Iannuzzo M, and De Placido G . Etiology of hypercoagulable state in women with recurrent fetal loss without other causes of miscarriage from Southern Italy: new clinical target for antithrombotic therapy. *Biologics* 2008; 2: 897–902

Ebisch IM, Thomas CM, Peters WH, Braat DD, and Steegers-Theunissen RP. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Hum Reprod Update* 2006 (November 11).

Ehara H, Ohno K, Ohtani K, Koeda T, and Takeshita K. Epidemiology of spina bifida in Tottori Prefecture, Japan, 1976–1995. *Pediatr Neurol* 1998;19:199–203.

El Fahime EM, and Ennaji M. Évolution des techniques de séquençage .*les technologies de laboratoire* 2007 (N°5).

Elwood JM, Little J, and Elwood JH. Epidemiology and control of neural tube defects. New York: Oxford University Press 1992:1–926.

Eurocat Working Group .Prevalence of neural tube defects in 20 regions of Europe and the impact of prenatal diagnosis 1980–86. *J Epidemiol Community Health* 1991;45:52–8

Farley TF, Hambidge SJ, and Daley MF. Association of low maternal education with neural tube defects in Colorado, 1989–1998. *Public Health* 2002;116:89–94

Felkner M, Suarez L, Canfield MA, Brender JD, and Sun Q. Maternal serum homocysteine and risk for neural tube defects in a Texas-Mexico border population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2009;85:574–81

Feuchtbaum LB, Currier RJ, Riggle S, Roberson M, Lorey FW, and Cunningham GC. Neural tube defect prevalence in California (1990–1994): Eliciting patterns by type of defect and maternal race/ ethnicity. *Genet Testing* 1999; 3: 265–272

Finkelstein J D. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998; 157 (Suppl. 2): S40–S44

Finnell RH, George TM, and Mitchell LE. Neural Tube Defects in: Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics : Elsevier (Sixth Edition) 2013 ;chapter 114: 1–21

- Forrest JD.** Epidemiology of unintended pregnancy and contraceptive use. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170(5 Pt 2):1485–9.
- Franco RF, Araujo A G, Guerreiro J F, Elion J, and Zago M A.** Analysis of the 677 C/T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. *Thromb Haemost* 1998 ; 79:119-121.
- Frederickson CJ, Koh JY, and Bush AI .** The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 2005 6(6):449–462.
- Fredriksen A, Meyer K, Ueland PM, VollsetSE, Grotmol T, and Schneede J.** Large-scale population-based metabolic phenotyping of thirteen genetic polymorphisms related to one-carbon metabolism. *Hum Mutat* 2007;28:856-65.
- Friede RL.** *Developmental neuropathology.* ed 2. New York, Springer-Verlag, 1989
- Frost P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard C A, Matthews R G, Boers G J H , den Heijer M , Kluijtmans L A J, Van den Heuvel LP, and Rozen R.** A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995 ; 10 : 111-3.
- Fujimori E, Baldino CF, Sato AP, Borges AL, and Gomes MN.** Prevalence and spatial distribution of neural tube defects in São Paulo State, Brazil, before and after folic acid flour fortification. *Cad Saude Public.*2013;29 (1):145-54.
- Fukada T , Yamasaki S, Nishida K , Murakami M , and Hirano T.** Zinc homeostasis and signaling in health and diseases . *J Biol Inorg Chem* 2011; 16:1123–1134
- García AM, Fletcher T, Benavides FG, and Orts E .** Parental Agricultural Work and Selected Congenital malformations. *Am J Epidemiol* 1999; 149 (1): 64-74.
- Gelineau-van Waes J, Heller S, Bauer LK, Wilberding J, Maddox JR, Aleman F, Rosenquist TH, and Finnell RH .** Embryonic development in the reduced folate carrier knockout mouse is modulated by maternal folate supplementation. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2008; 82: 494–507
- Gilman S.** Genetic disorders with multifactorial inheritance .In: Thompson MH, Mc Innes R, Willard H, editors .Genetics in Medicine . Philadelphia: WB Saunders Co 1991:349-357
- Golalipour MJ, Mansourian AR, and Keshtkar A.** Serum Zinc levels in Newborns with Neural tube defects . *Indian Pediatrics* 2006; 43(17): 809-812
- Golalipour MJ, Mobasheri E, Vakili MA, and Keshtkar AA .** Epidemiology of neural tube defects in Northern Iran, 1998-2003. *Eastern Mediterr Health J* 2007 ; 3 :560-6
- Gonzalez-Herrera L, Garcia-Escalante G, and Castillo-Zapata I.** Frequency of the thermolabile variant C677T in the MTHFR gene and lack of association with neural tube defects in the State of the Yucatan, Mexico. *Clin Genet* 2002; 62: 394-398.

- Gos M, and Szpecht-Potocka A** . Genetic basis of neural tube defects. II. Genes correlated with folate and methionine metabolism . *J Appl Genet* 2002; 43(4): 511-524
- Goujard J**. Down syndrome and neural tube defects. In : Silman AJ, Allwright SPA. Elimination or reduction of diseases? Opportunities for health service action in Europe .Oxford: Oxford University Publications, 1988
- Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AM, Rosenblatt DS, Matthews RG, and Rozen R**. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1994 ; 7 : 195-200.
- Grandone E, Corrao AM, Colaizzo D , Vecchione G, Di Girgenti C, Paladini D, Sardella L, Pellegrino M, Zelante L, Martinelli P, and Margaglione M**. Homocysteine metabolism in families from southern Italy with neural tube defects: role of genetic and nutritional determinants. *Prenat Diagn* 2006;26:1-5
- Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, d'Addetta M, Cappucci G, Vecchione G, Sciannone N, Pavone G, and Di Minno G**. Factor V Leiden is associated with repeated and recurrent unexplained fetal losses. *Thromb Haemost* 1997; 77: 822-4.
- Greene NDE, Stanier P, and Copp AJ**. Genetics of human neural tube defects . *Human Molecular Genetics* 2009; 18 (2): R113–R129
- Grewal J, Carmichael S, Song J, and Shaw GM**. Neural tube defects: an analysis of neighborhood – and individual – level –socio-economic characteristics. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2008; 23:116-124
- Groenen PM, Peer PG, Wevers RA, Swinkels DW, Franke B, Mariman EC, and Steegers-Theunissen RP**. Maternal myoinositol, glucose, and zinc status is associated with the risk of offspring with spina bifida. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: 1713-1719.
- Gu X , Lin L, Zheng X, Zhang T, Song X , Wang J , Li X , Li P, Chen G, Wu J, Wu L, and Liu J**. High prevalence of NTDs in Shanxi Province: A combined epidemiological approach. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 2007; 79: 702–707.
- Guillen M, Corella D, Portoles O, Gonzalez JI, Mulet F, and Saiz C**. Prevalence of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T mutation in the Mediterranean Spanish population. Association with cardiovascular risk factors. *Eur J Epidemiol* 2001; 17: 255-61.
- Gürgey A , and Mesci L**. The prevalence of factor V Leiden (1691G-A) mutation in Turkey. *Turk J Pediatr* 1997; 39: 3131-15.
- Halliwell B , and Gutteridge JMC**. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. New York, NY: Oxford University Press, 1999.
- Hamamy H, Jamhawi L, Al-Darawsheh J , and Ajlouni K**. Consanguineous marriages in Jordan: Why is the rate changing with time? *Clin Genet* 2005; 67: 511-6.

- Hambidge M, Hackshaw A, and Wald N.** Neural tube defects and serum Zinc. *Br J Obstet Gynaecol* 1993; 100: 746-749.
- Harris JA , and James L.** State-by-state cost of birth defects-1992. *Teratology* 1997; 56: 11-6.
- Harris MJ.** Insights into prevention of human neural tube defects by folic acid arising from consideration of mouse mutants. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2009; 85: 331–339.
- Helley D, Chafa O, Yaker NL, Reghis A, and Fischer A-M.** Prevalence of the prothrombin gene 20210A mutation in thrombophilic and healthy Algerian subjects. *Throm Haemost* 1999; 82: 1554-5.
- Hendricks K.** Fumonisin and neural tube defects in South Texas. *Epidemiology* 1999;10:198–200.
- Hendricks KA, Simpson JS, and Larsen RD.** Neural tube defect along the texas-Mexico border, 1993-1995. *Am J Epidemiol* 1999; 149: 1119-27.
- Herbert V.** Experimental nutritional folate deficiency in man. *Trans Assoc Am Physicians* 1962 ;75 : 307-20.
- Herd-Losavio ML, Lin S, Chapman BR, Hooiveld M, Olshan A, Liu X, DePersis RD, Zhu J, and Druschel CM.** Maternal occupation and the risk of birth defects: an overview from the National Birth Defects Prevention Study. *Occup Environ Med* 2010;67:58–66.
- Hernandez-Diaz S, Werler MM, Louik C, and Mitchell AA.** Risk of gestational hypertension in relation to folic acid supplementation during pregnancy. *Am J Epidemiol* 2002 ;156 :806-812
- Herrmann FH, Salazar-Sanchez L, Schröder W, Grimm R, Schuster G, Jimenez-Arce G, Chavez M, & Singh JR.** Prevalence of molecular risk factors FV Leiden, FV HR2, FII 20210G>A and MTHFR 677C > T in different populations and ethnic groups of Germany, Costa Rica and India. *Indian J Hum Genet* 2001 ; 1 : 33-9.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh P S, and Griffith R.** Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 1992; 10: 413-417.
- Hojyo S, Fukada T, Shimoda S, Ohashi W, Bin B-H, Koseki H, and Hirano T.** The Zinc Transporter SLC39A14/ZIP14 Controls G-Protein Coupled Receptor-Mediated Signaling Required for Systemic Growth .*PLoS ONE* 2011; 6(3): e18059.
- Hol FA, Van Derputn M, Geurds MP, Heil SG, Trijbels FJ, Hamelb C, Marimane C, and Blom HJ.** Molecular genetic analysis of the gene encoding the trifunctional enzyme MTHFD in patients with neural tube defects. *Clin Genet* 1998;53:119-125
- Holmes LB, Harvey EA, Coull BA, Huntington KB, Khoshbin S, Hayes AM, and Ryan LM.** The teratogenicity of anticonvulsant drugs. *N Engl J Med* 2001;344: 1132-1138
- Homberger G, Linnebank M, Winter C, Willenbring H, Marquard T, Harms E, and Koch HG.** Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene . *Eur J Hum Genet* 2000 ; 8 :725-9 .

Houcher B, Bourouba R, Djabi F, and Houcher Z . The prevalence of neural tube defects in Sétif university maternity hospital, Algeria-3 years review (2004-2006). *Pteridines* 2008;19:12-18.

Houcher B, Potier de Courcy G, Candito M, Van Obberghen E, and Naimi D. Nutritional assessment of folate status in a population of Sétif, Algeria. *Pteridines* 2003; 14: 138-142.

Hunt GM, and Oakeshott P. Outcome in people with open spina bifida at age 35: prospective community based cohort study. *BMJ* 2003; 326: 1365-1366

Hunter A. Neural tube defects in Eastern Ontario and Western Quebec: demography and family data. *Am J Med Genet* 1984;19:45e63.

Hwang B-F, Magnus P, and Jaakkola JJK. Seasonal variation of birth defects in Norway. *BioMedicine* 2013 ; 3(Issue 2): 95-101

Infante- Rivard C, Rivard GE, Yotov WV , Génin E, Guiguet M, Weinberg C, Gauthier R, and Feoli-Fonseca JC. Absence of association of thrombophilia polymorphisms with intrauterine growth restriction. *N Engl J Med* 2002 ; 347: 19-25

Iqbal MM. Prevention of neural tube defects by periconceptional use of folic acid. *Pediatrics in Review* 2000; 21(2) Feb: 58-66.

Italian Study Group. Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. No evidence of association between prothrombotic gene polymorphisms and the development of acute myocardial infarction at a young age. *Circulation* 2003; 107: 1117-22.

Jaber L, Karim IA, Jawdat AM , Fausi M, and Merlob P . Awareness of folic acid for prevention of neural tube defects in a community with high prevalence of consanguineous marriages. *Ann Genet* 2004; 47: 69-75

Jerbi Z, Abdennebi M, Douik H, Ben Romdhane H, Harzallah L, Guemira F, and Ghanem A. Étude du polymorphisme C677T du gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase dans la population tunisienne. *Annales de Biologie Clinique*. 2005 ;63 :N° 5, 487-91.

Junien C, Gallou-Kabani C, Vigé A, and Gross MS. Épigénomique nutritionnelle du syndrome métabolique. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 396-404.

Juranek J, and Salman M S. Anomalous development of brain structure and function in spina bifida and myelomeningocele. *Dev Disabil Res Rev* 2010; 16:23-30.

Juriloff DM , and Harris MJ. Mouse models for neural tube closure defects. *Hum Mol Genet* 2000;9:993-1000.

Kabukcu S, Keskin N, Keskin A, and Atalay E. The frequency of factor V Leiden and concomitance of factor V Leiden with prothrombin G20210A mutation and methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene mutation in healthy population of Denizli, Aegean region of Turkey. *Clin Appl Thromb Hemost* 2007; 13: 166-71.

- Kalter H.** Folic acid and human malformations : a summary and evaluation. *Reproductive Toxicology* 2000 ; 14 : 463-76
- Kambe T, Weaver BP, and Andrews G K.** The Genetics of Essential Metal Homeostasis During Development . *Genesis* 2008; 46(4): 214–228.
- Kan DC, Tsai FJ, Peng CT, and Tsai CH.** Fetal alcohol syndrome with Arnold-Chiari malformation: report of one case. *Acta Paediatr Sin* 1998;39:116–8.
- Kaneko S, Battino D, Andermann E, Wada K, Kan R, Takeda A , Nakane Y, Ogawa Y, Avanzini G, Fumarola C, Granata T, Molteni F, Pardi G, Minotti L, Canger R, Dansky L, Oguni M, Lopes-Cendas I, Sherwin A, Andermann F, Seni M.H, Okada M, and Teranishi T.** Congenital malformations due to antiepileptic drugs . *Epilepsy Res* 1999 ;33: 145-158
- Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, and Strokosch G.** Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1988 ; 43 : 414-21.
- Khoury SA , and Massad D.** Consanguineous marriage in Jordan. *Am J Med Genet* 1992; 43: 769-75
- Khrouf N, Spang R, Podgorna T, Miled SB, Moussaoui M, and Chibani M.** Malformations in 10000 consecutive births in Tunis. *Acta Paediatr Scand* 1986;75:534-9
- Kibar Z, Torban E, Mc Dearmid JR, Reynolds A, Berghout J, Mathieu M, Kirillova I, De Marco P, Merello E, Hayes JM, Wallingford JB, Drapeau P, Capra V, and Gros P.** Mutations in VANGL1 associated with neural-tube defects. *N Engl J Med* 2007;356:1432–7.
- Kibar Z, Vogan KJ, Groulx N, Justice MJ, Underhill DA, and Gros P.** L tap, a mammalian homolog of *Drosophila* Strabismus/*Van Gogh*, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail. *Nat Genet* 2001;28:251–5.
- Kirke PN; Mills JL, Molloy A M, Brody LC, O’leary V B, Daly L, Murray S, Conley M, Mayne P D, Smith O, and Scott JM.** Impact of the MTHFR C 677T polymorphism on risk of neural tube defects : case – control study? *BMJ* 2004; 328: 1535-1536.
- Kirke PN, Molloy AM, Daly LE ,Burke H ,Weir D G , and Scott J M :**Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. *QJM* 1993;86: 703–708.
- Koch M , and Fuhrmann W.** Epidemiology of neural tube defects in Germany .*Hum Genet* 1984; 68:97-103
- Kohut R, and Rusen ID.** Les anomalies congénitales au Canada : Rapport sur la santé périnatale , 2002. *Système Canadien de surveillance périnatale* 2002 : 1-72
- Kovalevsky G, Gracia CR, Jesse A, Berlin JA, Sammel MD, and Barnhart KT.** Evaluation of the association between hereditary thrombophilias and recurrent pregnancy loss. A meta-analysis .*Arch Intern Med* 2004;164:558–63.

- Kraus JP.** Biochemistry and molecular genetics of cystathionine Synthase deficiency. *Eur J Pediatr.* 1998; 157 (Suppl. 2): S50-S53
- Kraus J P.** Cystathionine-synthase mutations in homocystinuria. *Hum Mut* 1999 ; 13: 362-375
- Kujovich J L.** Thrombophilia and pregnancy complications. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:412–24
- Kurt C, Tanriverdi K, Kocak R.** The frequency of factor V Leiden in southern Turkey. *Ann Med Sci* 1999; 8: 56
- Lacasaña M, Vázquez-Grameix H, Borja-Aburto VH, Blanco-Muñoz J, Romieu I, Aguilar-Garduño C, and García AM.** Maternal and paternal occupational exposure to agricultural work and the risk of anencephaly. *Occup Environ Med* 2006;63: 649–56.
- Lary JM ,and Paulozzi LJ.** Sex differences in the prevalence of human birth defects: a population-based study. *Teratology* 2001; 64: 237-51.
- Leclerc D , and Rozen R .**Génétique moléculaire de MTHFR Les polymorphismes ne sont pas tous bénins. *Medecine /sciences* 2007 ; 23 : 297-302
- Lefevre-Witier P, Aireche H, Benabadji M, Darlu P, Melvin K, Sevin A, and Crawford MH.** Genetic structure of Algerian populations. *Am J Hum Biol* 2006; 18: 492-501.
- Lewis SJ, Ebrahim S, and Davey Smith G.**Meta-analysis of MTHFR 677C->T polymorphism and coronary heart disease: does totality of evidence support causal role for homocystein and preventive potential of folate? *BMJ* 2005;331: 1053
- Li Z, Ren A, Zhang L , Ye R, Li S, Zheng J, Hong S, Wang T, and Li Z.** Extremely high prevalence of neural tube defects in a 4-county area in Shanxi province, China. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2006; 76: 237-40.
- Liuzzi JP, Lichten LA, Rivera S, Blanchard RK , and Aydemir TB.** Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102 (19) : 6843–6848.
- Livingstone A.** Primary prevention of neural tube defects : results of the MRC vitamin study. *Lancet* 1991; 1:131-7
- Lopaciuk S, Bykowska K, Kwiecinski H, Mickielewicz A, Czlonkowska A, Mendel T, Kuczynska-Zardzewialy A, Szelagowska D, Windyga J, Schröder W, Herrmann FH, and Jedrzejowska H.**Factor V Leiden , prothrombin gene G20210Avariant, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype in young adults with ischemic stroke . *Clin Appl Thromb Hemost* 2001; 7: 346-50
- Lovričević I, Franjić BD, Tomičić M, Vrkić N, de Syo D, Hudorović N, Sonicki Z, and Loncar R.** 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677 C→T genetic polymorphism in 228 Croatian volunteers. *Coll Antropol* 2004;28:647-54.

Lucotte G , and Mercier G. Population genetics of factor V Leiden in Europe. *Blood Cells Mol Dis* 2001; 27: 362.

Lumley J, Watson L, Watson M, and Bower C. Periconceptional supplementation with folate and/or multivitamins for preventing neural tube defects. *Cochrane Database Syst Rev* 2001: CD001056

Maclean M , and MacLeod A. Seasonal variation in the frequency of anencephalus and spina bifida births in the United Kingdom. *J Epidemiol Community Health* 1984;38:99e102.

Mahapatra AK, and Agrawal D. Anterior encephaloceles: a series of 103 cases over 32 years. *J Clin Neurosci* 2006; 13:536-539.

Mambidge KM, Neldner KW , and Walravens PA. Zinc, acrodermatitis enteropathica and congenital malformations. *Lancet* 1975: 577–578

Marasas WF, Riley RT, Hendricks KA, Stevens VL, Sadler TW, Gelineau-van Waes J, Missmer SA, Cabrera J, Torres O, Gelderblom WC, Allegood J, Martínez C, Maddox J, Miller JD, Starr L, Sullards MC, Roman AV, Voss KA, Wang E, and Merrill AH Jr. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *J Nutr* 2004;134: 711–6.

Marguerat P, Addor MC, Pescia G , Maillard-Brignon C, Laurini RN, Hohlfeld P, Vial Y, and Weihs D. Les défauts de fermetures du tube neural dans le canton de vaud 1980-1982 : impact du diagnostic prénatal. *Rev Med Suisse Romande* 1994 ; 114 : 851-9

Martinez CA, Northrup H, Lin JI, Morrison AC, Fletcher JM, Tyerman GH, and Au KS. Genetic association study of putative functional single nucleotide polymorphisms of genes in folate metabolism and spina bifida. *Am J Obstet Gynecol.* 2009; 201:394e1–e11

Martínez de Villarreal L, Delgado-Enciso I, Valdez-Leal R , Ortíz-López R, Rojas-Martínez A, Limón-Benavides C, Sánchez-Peña MA, Ancer-Rodríguez J, Barrera-Saldaña HA, and Villarreal-Pérez JZ. Folate levels and N5,N10-Methylenetetrahydrofolate reductase genotype (MTHFR) in mothers of offspring with neural tube defects: a case-control study. *Arch medical Res* 2001; 32: 277-282.

Martinez-Frias ML, Urioste M, Bermejo E, Sanchis A, and Rodriguez-Pinilla E. Epidemiological analysis of multi-site closure failure of the neural tube in humans. *Am J Med Genet* 1996;66:64-8.

Matok I, Gorodischer R, Koren G, Landau D, Wiznitzer A, and Levy A. Exposure to folic acid antagonists during the first trimester of pregnancy and the risk of major malformations. *Br J Clin Pharmacol* 2009 ; 68:956–962.

Mc Donnell RJ , Johnson Z, Delaney V, and Dack P. East Irland 1980-1994 : epidemiology of neural tube defects. *J Epidemiol Community Health* 1999 Dec ; 53(12) : 782-8.

- Menasinkai SB.** A Study of Neural Tube Defects .*Journal of Anatomical Society of India* 2010 ; 59(Issue 2) : 162–167.
- Mili F, Edmonds LD, Khoury MJ, and McClearn AB.** Prevalence of birth defects among low-birth-weight infants. A population study. *Am J Dis Child* 1991;145:1313–1318.
- Miller AL.** The methylation, neurotransmitter, and antioxidant connections between folate and depression. *Altern Med Rev* 2008; 13:216-226
- Mills JL, Mc Parklin JM, Kirke PN, Conley MR, Weir DG, and Scott JM.** Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural tube defects. *Lancet* 1995;345: 149-151
- Mills JL, Tuomilehto J, Yu KF, Colman N, Blaner WS, Koskela P, Rundle WE, Forman M, Toivanen L, and Rhoads GG.** Maternal vitamin levels during pregnancies producing infants with neural tube defects. *J Pediatr* 1992; 120: 863–871.
- Mills JL, Von Kohorn I, Conley MR, Zeller JA, Cox C, Williamson RE, and Dufour DR.** Low vitamin B-12 concentrations in patients without anemia: the effect of folic acid fortification of grain. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1474–1477.
- Milunsky A, Alpert E , Neff R K, and Frigoletto FD Jr .** Prenatal diagnosis of neural tube defects: IV. Maternal serum alpha-fetoprotein screening. *Obstet Gynecol* 1980; 55:60-66.
- Milutinovic S, D'Alessio AC, Detich N, and Szyf M.** Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinogenesis* 2007; 28: 560–571.
- Missmer SA, Suarez L, Felkner M, Wang E, Merrill AH Jr, Rothman KJ, and Hendricks KA.** Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas–Mexico border. *Environ Health Perspect* 2006;114:237–41.
- Mitchell LE .** Epidemiology of neural tube defects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2005; 135C : 88–94
- Molloy AM , Brody LC, Mills JL , Scott JM, and Kirke PN.** The search for genetic polymorphisms in the homocysteine/folate pathway that contribute to the etiology of human neural tube defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2009; 85: 285–294.
- Molloy A, Daly S, Mills J, Kirke PN, Whitehead AS, Ramsbottom D, Conley MR, Weir DG, and Scott JM.** Thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: implications for folate intake recommendations. *Lancet* 1997; 349: 1591-1593.
- Molloy AM, Kirke PN, and Mills JL .** Pregnancy: Prevention of Neural Tube Defects. *Encyclopedia of Human Nutrition* (Third Edition), 2013 : 81-89
- Molloy AM, Mills JL, Kirke PN, Weir DG, and Scott JM .** Folate status and neural tube defects. *Biofactors* 1999; 10 (2-3): 291-4.

- Moore CA, Li S, Li Z, Hong SX, Gu HQ , Berry RJ , Mulinare J, and Erickson JD** . Elevated rates of severe neural tube defects in high prevalence areas in northern China. *AM J Med Gen* 1997;73:113-18
- Moore KL , and Persaud TV.** The developing human: clinically oriented embryology. Philadelphia (PA): Saunders; 1 1993.
- Moretti ME, Bar-Oz B, Fried S, and Koren G.** Maternal hyperthermia and the risk for neural tube defects in offspring: systematic review and meta-analysis. *Epidemiology* 2005;16:216–219.
- Morin VI, Mondor M, and Willson RD.** Knowledge on periconceptional use of folic acid in women of British Columbia. *Fetal Diagn Ther* 2001; 16: 111-5.
- Morrison K, Papapetrou C, Hol FA, Mariman EC, Lynch SA, Burn J, and Edwards YH.** Susceptibility to spina bifida; an association study of five candidate genes. *Ann Hum Genet* 1998;62:379-396.
- Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE, Andria G, Boers GH, Bromberg IL, Cerone R, Fowler B, Gröbe H, Schmidt H, and Schweitzer L** . The natural history of homocystinuria due to cystathionine β -synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985; 37: 1-31.
- Mudd SH, Uhlenendorf BW, Freeman JM, Finkelstein JD, and Shih VE.** Homocystinuria associated with decreased methylenetetrahydrofolate reductase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1972 ; 46 : 905-12.
- Müller F , and O’Rahilly R.** Human embryology and teratology. 2nd ed. New York: Wiley-Less Publications; 1996.
- Müller F, and O’Rahilly R.** The development of the human brain, the closure of the caudal neuropore, and the beginning of the secondary neurulation at stage 12. *Anat Embryol* 1987;176:413–430
- Munkvold GP.** Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annu Rev Phytopathol* 2003;41: 99–116.
- Murshid WR.** Spina bifida in Saudi Arabia: is consanguinity among the parents a risk factor? *Pediatric neurosurgery* 2000; 32: 10-2.
- Nachmany A, Gold V, Tsur A, Arad D, and Weil M.** Neural tube closure depends on nitric oxide synthase activity. *J Neurochem* 2006;96:247–53.
- Naidich TP, Altman NR, Braffman BH, Mc Lone DG, and Zimmerman RA.** Cephalocele related malformations. *Am J Neuroradiol* 1993;13:655–90.
- Narayanan S.** Applications of restriction fragment length polymorphism. *Ann Clin Lab Sci* 1991; 21(4) : 291-296.
- Nieuwkoop PD.** The neural induction process: Its morphogenetic aspects. *Int J Dev Biol* 1999; 43SI:615–623,

- Nikolov V, Tsachev K, and Marinov B.** The zinc concentration of the maternal serum and the amniotic fluid in pregnancies with fetal neural defects in the second trimester. *Akush Ginekol (Sofia)* 1993; 32: 8-10.
- Njamnshi AK, Djientcheu Vde P, Lekoubou A, Guemse M, Obama MT, Mbu R, Takongmo S, and Kago I.** Neural tube defects are rare among black Americans but not in sub-Saharan black Africans: the case of Yaounde –Cameroon. *J Neurol Sci* 2008; 270: 13-17
- Office for Population Censuses and Surveys.** Congenital malformation statistics: notifications 1981-85. London: HMSO, 1988.
- Ornoy A.** Neuroteratogens in man: an overview with special emphasis on the teratogenicity of antiepileptic drugs in pregnancy. *Reprod Toxicol* 2006; 22: 214–226.
- Ouyang S, Zhuo Liu, Yuanyuan Li, Feifei Ma, and Jianxin Wu.** Cystathionine beta-synthase 844ins68 polymorphism is unrelated to susceptibility to neural tube defects. *Gene* 2014; 535:119–123.
- Owen TJ, Halliday JL, and Stone CA.** Neural tube defects in Victoria, Australia : potential contributing factors and public health implications. *Aust NZ J Public Health* 2000 Dec ;24 (6) : 584-9.13.
- Ozbek U , and Tangün Y.** Frequency of Factor V Leiden in Turkey. *Int J Haematol* 1996; 64:291.
- Özer I, Özçetin M, Karaer H, Kurt S, and Şahin Ş.** Retrospective Approach to Methylenetetrahydrofolate Reductase Mutations in Children . *Pediatric Neurology* 2011 ; 45 : 34-38
- Pabinger I , and Vormittag R.** Thrombophilia and pregnancy outcomes. *J Thromb Haemost* 2005;3:1603–10.
- Palomo I, Segovia F, Parra D, Alarcon M, and Rojas E.** Low prevalence of factor V Leiden and the prothrombin G20210 A mutation in a healthy population from the central –south region of Chile . *Rev Bras Hematol Hemoter* 2009; 31(3): 143-146
- Paluku They-They T, Hamzi K, Mazabraud A, and Nadifi S.** Fréquence du polymorphisme C677T du gène de la méthylène tetrahydrofolate réductase (MTHFR) dans les populations arabe et berbère du Maroc. *Antropo* 2009 ; 20 : 11-17
- Papapetrou C, Lynch SA, Burn J, and Edwards YH.,** Methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects. *Lancet* 1996; 348:58.
- Park C.H, Stewart W, Khoury MJ, and Mulinare J.** Is there etiologic heterogeneity between upper and lower neural tube defects?. *Am J Epidemiol* 1992 ; 136:1493-1501
- Peabody J L , Emery J R, and Ashwal S.** Experience with anencephalic infants as prospective organ donors. *N Engl J Med* 1989; 321:344-350.

- Pei L.** Relationship of plasma homocysteine and the gene polymorphism of metabolic enzymes with neural tube defects. *C N K I* 2011; 19–20.
- Pei L, Liu J, Zhang Y, Zhu H, and Ren A.** Association of reduced folate carrier gene polymorphism and maternal folic acid use with neural tube defects. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2009;150:874– 878.
- Pepe G, Camacho VO, Giusti B, Brunelli T, Marcucci R, Attanasio M, Rickards O, De Stefano GF, Prisco D, Gensini GF, and Abbate R.** (Heterogeneity in world distribution of the thermolabile C677T mutation in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 917–920.
- Pérez-Maldonado A , and Kurban AK.** Metabolic diseases and pregnancy. *Clin Dermatol* 2006;24:88–90.
- Perez AB, D'Almeida V, Vergani N, Oliveira AC, DeLima FT, and Brunoni D.** Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): incidence of mutations C677T and A1298C in Brazilian population and its correlation with plasma homocysteine levels in spina bifida. *Am. J. Med. Genet* 2003 ; (119) : 20–25.
- Pippenger CE.** Pharmacology of Neural Tube Defects. *Epilepsia* 2003; 44(s3) : 24–32
- Placzek M, Dodd J, and Jessell TM.** The case for floor plate induction by the notochord. *Curr Opin Neurobio* 2000; 110:15–22,
- Poloce F , and Boisson-Gaudin C.** Marqueurs sériques maternels d'anomalies fœtales (trisomie 21, anomalies chromosomiques, Spina bifida). *Revue Francophone des Laboratoires* 2010 ; 421 : 59-68
- Poort SR, Roosendaal FR, Reitsma PH, and Bertina RM.** A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996;88:3698-703.
- Potier de Courcy G.** Le point sur le rôle des folates. *Cholédoc* 2005; N 92.
- Poujade O , and Luton D.** Supplémentation périconceptionnelle en acide folique : pour qui et comment ?. *Réalités en Gynécologie-Obstétrique* 2008; 128 (Février): 1-7
- Prasad A S.** Zinc deficiency in women, infants and children. *J Am Coll Nutr* 1996;15(2): 113–120.
- Pulikkunnel ST and Thomas SV.** Neural tube defects: Pathogenesis and folate metabolism. *JAPI.* 2005; 53: 127-135
- Rahimi Z, Vaisi-Raygani A, Khjarrazi H, Mozafari H, Rezaei M, and Nagel RL.** Prevalence of factor V Leiden (G1691A) and prothrombin (G20210A) among Kurdish population from Western Iran. *J Thromb Thrombolysis* 2008; 25: 280-283
- Raja RA, Qureshi AA, Memon A R, and Ali HD.** Pattern of encephaloceles: A case series. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 2008 ;20(1):125-128

- Rajab A.** Neural tube defects and congenital hydrocephalus in the Sultanate of Oman .*J Trop Pediatr* 1998; 44/300-303
- Ramsbottom D, Scott JM, Molloy A ,Weir DG, Kirke PN, Mills JL, Gallagher PM, and Whitehead AS.** Are common mutations of cystathionine β -synthase involved in the aetiology of neural tube defects? *Clin Genet* 1997; 51: 30-42.
- Rankin J, Glinianaia S, Brown R, and Renwick M.** The changing prevalence of neural tube defects: a population –based study in the north of England, 1984-96.Northern Congenital Abnormality Survey Steering Group. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2000; 14:104-110
- Rasmussen SA, Moore CA, Paulozzi LJ, and Rhodenhiser EP.** Risk for birth defects among premature infants: A population-based study. *J Pediatr* 2001;138:668–673.
- Rauen KK, and Aubert EJ.** A brighter future for adults who have myelomeningocele – one form of spina bifida. *Orthop Nurs* 1992;11(3):16-26.
- Ray JG , and Laskin CA.** Folic acid and homocystein metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: A systematic review. *Placenta*, 1999 20:519-529.
- Rees DC .** The population genetics of factor V Leiden (Arg 506Gln) . *Br J Haematol* 1996; 95: 579-586
- Rees DC, Cox M, and Clegg JB.** World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995;346:1133-4.
- Relton CL, Wilding CS, Pearce MS, Laffling AJ, Jonas PA, Lynch SA, Tawn EJ, and Burn J.** Gene-gene interaction in folate-related genes and risk of neural tube defects in a UK population.*J Med Genet* 2004; 41:256–260.
- Rintoul NE, Sutton LN, Hubbard AM, Cohen B, Melchionni J, Pasquariello PS, and Adzick NS.** A new look at myelomeningoceles: functional level, vertebral level, shunting, and the implications for fetal intervention. *Pediatrics* 2002; 109: 409-13.
- Rittler M, Lopez CJ, and Castilla EE.** Sex ratio and associated risk factors for 50 congenital anomaly types: clues for causal heterogeneity. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2004; 70: 13-9.
- Robertson L, Wu O, and Langhorne P.** Thrombophilia in pregnancy: A systematic review. *Br J Haematol* 2006; 132: 171-196.
- Roessmann U.** Congenital malformations. In: Duckett S., ed. *Pediatric neuropathology*, Baltimore: Williams & Wilkins 1995:123-149.
- Rosch C.** Incidence of neural tube defects in The Magdeburg administrative district .*Gesundheitswesen* 1998;60: 563-566
- Rosen E, Renbaum P, Heyd J, and Levy-Lahad E.** High frequency of Factor V Leiden in a population of Israeli Arabs. *Tromb Haemost* 1999; 82: 1768.

- Rosendaal FR, Doggen C, Zivelin A, Arruda V, and Aiach M.** Geographic distribution of the 20210G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 1998;79:706-8
- Rosendaal TR, Koster T, Vanderbroucke JP, and Reitsma PH.** High risk of the thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995;85: 1504-8.
- Rosendorff A, and Dorfman DM.** Activated protein c resistance and factor V Leiden: a review. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:866-71.
- Ross M E.** Gene-environment interactions, folate metabolism and the embryonic nervous system. *WIREs Syst Biol Med* 2010, 2: 471-480.
- Rossi A , Biancheri R , Cama A, Piatelli G, Ravegnani M, and Tortori-Donati P.** Imaging in spine and spinal cord malformations . *Eur J Radiol* 2004 ; 50 : 177-200
- Rull RP, Ritz B, and Shaw GM.** Neural tube defects and maternal residential proximity to agricultural pesticide applications. *Am J Epidemiol* 2006;163:743-53.
- Sadler TW, Merrill AH, Stevens VL, Sullards MC, Wang E, and Wang P.** Prevention of fumonisin B1- induced neural tube defects by folic acid . *Teratology* 2002; 66: 169-176
- Şahin Ş, Benli, İ, and Aydoğan L .** Distribution of prothrombin G20210A, factor V Leiden, and MTHFR C677T mutations in the middle Black Sea area (Tokat) of Turkey *Turk J Med Sci* 2012; 42 (6): 1093-1097
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, and Arnheim N.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230:1350-4.
- Samaha I, Rady M, Nabhan A , and Gadallah M.** The prevalence of congenital malformations at birth in Ain Shams University Maternity Hospital Cairo, Egypt. *J Egypt Public Health Assoc* 1995; 70: 595-608.
- Samson GR.** The incidence and demography of neural tube defects in Abu Dhabi , United Arab Emirates (1992-1999) .*J Trop Pediatr* 2003; 49: 256-7
- Sanoussi S, Gamatie Y, Kelani A, Sbai C, Abrachi H, and Bazira L.** Malformations du tube neural au Niger : A propos de 387 cas en 10 ans, plaidoyer pour un traitement préventif par l'acide folique en période periconceptionnelle .*Médecine d'Afrique Noire* 2001 ; 48(12) : 509-515
- Sanson BJ, Simioni P, Tormene D, Moia M, Friederich PW, Huisman MV, Prandoni P, Bura A, Rejto L, Wells P, Mannucci PM, Girolami A, Büller HR, and Prins MH .** The incidence of venous thromboembolism in asymptomatic carriers of a deficiency of antithrombin, protein C, or protein S: a prospective cohort study. *Blood* 1999 94:3702-3706
- Saper RB, Kales SN, Paquin J, Burns MJ, Eisenberg DM, Davis RB, and Phillips RS.** Heavy metal content of ayurvedic herbal medicine products. *Jama* 2004;292(23):2868-73.

- Saxena A K, Pandey S, and Pandey LK** . Evaluation of methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism associated risk factor in the patients of recurrent pregnancy loss; *Journal of Medical Genetics and Genomics* 2012 ; Vol. 4(2):25 – 28
- Saxena AK, Gupta J, Pandey S, Pandey LK, Gangopadhaya AN, and Tamarin RH** .Variation in chromosome structure: Principles of Genetics, 7th ed: McGraw Hill Publ 2011: 178-202.
- Schneider JA, Rees DC, Liu YT, and Clegg JB**. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1253-1260.
- Schorah CJ, Habibzadeh N, Wild J, and Smithells RW**. Possible abnormalities of folate and vitamin B12 metabolism associated with neural tube defects. Maternal Nutrition and pregnancy outcome. *Ann NY Acad Science* 1993 ; 678 : 81-91
- Sebastio G, Sperandeo MP, Panico M, De Franchis R, Kraus JP, and Andria G**. The molecular basis of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in Italian families, and report of four novel mutations. *Am J Hum Genet* 1995;56:1324–1333.
- Seller MJ**. Recent developments in the understanding of the etiology of neural tube defects. *Clin Dysmorph* 1995; 4:93-104
- Seller MJ**. Neural tube defects: are neurulation and canalization forms causally distinct? *Am J Med Genet* 1990;35:394-6.
- Seller MJ**. Neural tube defects and sex ratios. *Am J Med Genet* 1987;26: 699-707.
- Settin A, Abo Alkasem R, Ali E, El Baz R, and Mashaley A M**. Factor V Leiden and prothrombin gene mutations in Egyptian cases with unexplained recurrent pregnancy loss *Hematology* 2011; 16 (1) : 59-63
- Shaw GM, Lu W, Zhu H, Yang W, Briggs FB, Carmichael SL, Barcellos LF, Lammer EJ, and Finnell RH**. 118 SNPs of folate-related genes and risks of spina bifida and conotruncal heart defects. *BMC Med Genet* 2009 3;10:49.
- Shaw GM, Nelson V, and Olshan AF**. Paternal occupational group and risk of offspring with neural tube defects. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2002;16:328–333.
- Shaw GM, Todoroff K, Schaffer DM, and Selvin S**. Periconceptional nutrient intake and risk for neural tube defect-affected pregnancies. *Epidemiology* 1999; 10: 711-716.
- Shields D C, Kirke P N, Mills J L, Ramsbottom D, Molloy AM , Burke H, Weir DG, Scott JM, and Whitehead A S**. The ‘thermolabile’ variant of methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects: an evaluation of genetic risk and the relative importance of the genotypes of the embryo and the mother. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 1045–1055.
- Shurtleff DB, Luthy DA, Nyberg DA, Benedetti TJ, and Mack LA**. Meningomyelocele: management in utero and postnatum. *Ciba Found Symp* 1994;181:270-86

Siffel C, Wong LY, Olney RS, and Correa A. Survival of infants diagnosed with Encephalocele in Atlanta, 1979-98. *Paediatr and Perinat Epidemiol* 2003;17: 40–8 .

Singla M, Sahai V, and Grewal D S. Neural tube defects and herbal medicines containing lead: A possible relationship. *Medical Hypotheses* 2009; 72 : 285–287

Sipek A, Horacek J, Gregor V , Rychtaríková J, Dzurová D, and Masátová D. Neural tube defects in the Czech Republic during 1961-1999: Incidences, prenatal diagnosis and prevalences according to maternal age .*J Obstet Gynaecol* 2002; 22:501-507

Smit CS, Zeeman BJ, Smith RM, and de V Cluver PF. Frontoethmoidal meningoencephaloceles : a review of 14 consecutive patients. *J Craniofac Surg* 1993;4:210–4.

Smithells RW, Sheppard S, and Schorah CJ. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child* 1976; 51: 944–950.

Soumaya SG, Aida M, Sami M, Khaled N, Med Badis C, Sami J, Ezedine S, Zohra M, Issam L, Faouzia Z, Hedi R, Hela C, and Naima K. Encephalocele: 26 retrospective cases at the maternal and neonatal center of La Rabta, Tunis. *Tunis Med* 2001; 79: 51-3

Speer M, Nye J, Mc Lone D , Worley G, Melvin EC, Viles KD, Franklin A, Drake C, Mackey J, and George TM. Possible interaction of genotypes at cystathionine beta-synthase and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in neural tube defects. *Clin Genet* 1999; 348: 1591-1593

Spina V, Giorlandino C, Cervone P, Fabiani C, Bagolan P, Cignini P, Giovannini M, and Aleandri V Fetal malformations and fetal death in a case of parental thrombophilia *Journal of Prenatal Medicine* 2007; 1 (4): 61-63

Srinivas M, Gupta DK, Rathi SS, Grover JK, Vats V, Sharma JD, and Mitra DK. Association between lower hair zinc levels and neural tube defects. *Indian J Pediatr* 2001; 68: 519-522.

Srivastava A, Sachchida N, Pandey P, Pandey Gourdas C, and Balraj M. No Association of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T Polymorphism in Susceptibility to Gallbladder Cancer. *DNA and Cell Biology* 2008; 27 (3):127-132.

Stamm D S, Siegel D G ,Mehltretter L ,Connelly J J ,Trott A ,Ellis N , Zismann V , Stephan D A , George T M , Vekemans M, Ashley-Koch A, Gilbert JR, Gregory SG, and Speer MC. Refinement of 2q and 7p loci in a large multiplex NTD family. *Birth Defects Res. A Clin Mol Teratol* 2008; 82:441–452.

Stegers-Theunissen RP, Boers GH, Blom HJ , Nijhuis JG, Thomas CM, Borm GF, and Eskes TK. Neural tube defects and elevated homocysteine levels in amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 1436–1441.

Steen MT ,Boddie AM ,Fisher AJ, Macmahon W, Saxe D, Sullivan KM, Dembure PP, and Elsas LJ. Neural-tube defects are associated with low concentrations of cobalamin (vitamin B12) in amniotic fluid. *Prenat Diagn* 1998;18: 545–555.

- Stevens VL, and Tang J.** Fumonisin B1-induced sphingolipid depletion inhibits vitamin uptake via the glycosyl-phosphatidylinositol-anchored folate receptor. *J Biol Chem* 1997; 272:18020–5.
- Stevenson RE, Allen WP, Pai GS, Best R, Seaver LH, Dean J, and Thompson S .** Decline in prevalence of neural tube defects in a high-risk region of the United States. *Pediatrics* 2000; 106: 677-83
- Stevenson RE, Schwartz CE, Du YZ, and Adams M Jr.** Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies, between whites and blacks. (Letter) *Am J.Hum Genet* 1997 ; 60: 229-230.
- Stodgell CJ, Ingram JL, O'Bara M, Tisdale BK, Nau H, and Rodier PM.** Induction of the homeotic gene *Hoxa1* through valproic acid's teratogenic mechanism of action. *Neurotoxicol Teratol* 2006; 28: 617–624.
- Summers CM , Hammons AL ,Mitchell LE, Woodside JV, Yarnell JWG, Young IS, Evans A , and Whitehead AS .** Influence of the Cystathionine β -synthase 844ins68 and methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T polymorphisms on folate and homocysteine concentrations. *European Journal of Human Genetics* 2008; 16:1010-1013
- Teckie G, Krause A, and Kromberg JG.** Neural tube defects in Gauteng, South Africa: Recurrence risks and associated factors. *W bn S Afr Med J* 2013 ; 103(12):973-7.
- Teebi AS.** Autosomal recessive disorders among Arabs: an overview from Kuwait. *J Med Genet* 1994; 31: 224-33.
- Texier P , and Arthuis M.** Spina bifida encyclopédie médicale chirurgicale, neurologie. PARIS, France 1985 ; 17084 B¹⁰
- The Center for Disease Control and prevention (CDC).** Preventing Neural Tube Birth Defects: A prevention Model and Resource Guide. Atlanta: CDC. 1998
- Tilley MM, Northrup H, and Sing Au K.** Genetic studies of the cystathionine betasynthase gene and myelomeningocele. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology* 2012; 94: 52–56.
- Thompson DNP.** Spinal dysraphic anomalies ; classification, presentation and management. *Paediatrics and Child Health* 2010; 20 (9): 397-403
- Tolmie J.** Neural tube defects and other congenital malformations of the central nervous system, in: A.E. Emery, D.L .Rimoin (Eds), Principles and Practice of Medical Genetics, Churchill Livingston, New York 1996; p.2152
- Toriello HV.** Folic acid and neural tube defects. *ACMG practice guideline* 2005; 7 (4):283-284
- Torun D, Yilmaz E, Akar E, and Akar N.** Role of ZIP14 (SLC39A14) gene histidine rich regions in neural tube defects . *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 2011; Volume 12, Issue 2: 135-137
- Trabetti E.** Homocysteine , MTHFR gene polymorphisms , and cardio-cerebrovascular risk. *J Appl Genet* 2008; 49: 267-82

Tsai MY, Bignell M, Schwichtenberg K, and Hanson NQ: High prevalence of a mutation in the cystathionine beta-synthase gene. *Am J Hum Genet* 1996;59: 1262–1267.

Tuncbilek E, Boduroglo K, and Alikasifoglu M. Neural tube defects in Turkey: prevalence distribution and risk factors. *Turk J Pediatr* 1999 ; 41 :299-305

Ueland M, Steinar H, Schneede J, Refsum H, and Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Pharmacological Sciences* 2001; 22, No.4.

Urioste M , and Rosa A. Anencephaly and faciocranioschisis: evidence of complete failure of closure 3 of the neural tube in humans. *Am J Med Genet* 1998;75:4-6.

Van Allen M I ,Kalousek D K ,Chernoff G F, Juriloff D, Harris M, McGillivray B C, Yong S-L, Langlois S, Macleod PM, Chitayat D, Friedman J M, Wilson R D, McFadden D, Pantzar J, Ritchie S, and Hall J G. Evidence for multi-site closure of the neural tube in humans. *Am J Med Genetics* 1993_a;47:723-43

Van Allen M I, Mc Court C, and Lee NS. Santé avant la grossesse: L'acide folique pour la prévention primaire des anomalies du tube neural. Un document de référence à l'intention des professionnels de la santé. Ottawa, Ontario :Ministre des Travaux publics et Services gouvernementaux Canada,2002 :1-20

Van Allen MI, Fraser FC, Dallaire L, Allason J, McLeod DR, Andermann E, and Friedman JM. Recommendations on the use of folic acid supplementation to prevent the recurrence of neural tube defects. *Can Med Assoc J* 1993_b; 149:1239-43

Van Beynum IM, Den Heijer M, Blom HJ, and Kapusta L. The MTHFR 677C-T polymorphism and the risk of congenital heart defects: A literature review and meta- analysis. *Q J Med* 2007; 100: 743-53

Van der Linden I, Heil SG, Kouwenberg IC , Den HM, and Blom HJ. The methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (MTHFD1) 1958G.A variant is not associated with spina bifida risk in the Dutch population. *Clin Genet* 2007_a;72: 599–600.

Van der Linden IJM, Heil SG, den Heijer M, and Blom HJ. The 894G>T variant in the endothelial nitric oxide Synthase gene and spina bifida risk. *J Hum Genet* 2007_b;52: 516–20.

Van der Put NMJ, Eskes TKAB, and Blom HJ. Is the common C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A meta-analysis. *QJM* 1997; 90: 111-5.

Van der Put NMJ, Gabreëls F, Stevens EMB , Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, Van den Heuvel LP, and Blom HJ. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube defects? *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1044-1051.

Van der Put NMJ, Van Straaten HWM, Trijbels FJM , and Blom HJ. Folate, Homocysteine and Neural Tube Defects: An Overview .*Exp Biol Med* 2001; 226(4):243–270

Van der Put N M J , Steegers-Theunissen R P M , Frosst P, Trijbels F J M , Eskes T K A B, Van den Heuvel L P, Mariman E C M , Den Heyer M , Rozen R, and Blom H J. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995; 346:1070–1071.

Van der Put NM, Van den Heuvel LP, Steegers-Theunissen RP, Trijbels FJ, Eskes TK, Mariman EC, Den Heyer M, and Blom HJ. Decreased methylene tetrahydrofolate reductase activity due to the 677C→T mutation in families with spina bifida offspring. *J Molec Med* 1996;74:691–694.

Varga E A, Sturm AC, and Misita C P. Homocysteine and MTHFR Mutations Relation to Thrombosis and Coronary Artery Disease . *Circulation* 2005;111:e289-e293.

Vats R ,Sharma RK , and Sharma A. Role of Zinc, Copper and Manganese Concentration in Neural Tube Defects. *Our Nature* 2011 ; 9:173-175

Velie EM, Block G, Shaw GM, Samuels SJ, Schaffer DM, and Kulldorff M. Maternal supplemental and dietary zinc intake and the occurrence of neural tube defects in California. *Am J Epidemiol* 1999; 150: 605-616.

Vieira AR , and Taucher SC. Maternal age and neural tube defects: evidence for a greater effect in spina bifida than in anencephaly. *Rev Med Chill* 2005;133: 62-70

Vieira C, Pombero A, Garcia-Lopez R, Gimeno L, Echevarria D, and Martínez S. Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers. *Int J Dev Biol* 2010; 54:7-20

Voudris K A, Skardoutsou A, and Vagiakou E A . Congenital microcephaly in two infants with the factor V Leiden mutation. *J Child Neurol* 2002 ; 17(12):905-7.

Wald NJ , and Bower C. Folic acid , pernicious anaemia , and prevention of neural tube defects. *Lancet* 1994; 343:307

Wang F, Kim BE, Dufner-Beattie J, Petris MJ, Andrews G, and Eide DJ. Acrodermatitis enteropathica mutations affect transport activity, localization and zinc-responsive trafficking of the mouse ZIP4 zinc transporter. *Hum Mol Genet* 2004;13: 563–71

Wasant P, and Sathienkijkanchai A. Neural tube defects at Siriraj hospital, Bangkok, Thailand-10 years review (1990-1999). *J Med Assoc Thai* 2005, 88: S92-S98.

Wasserman CR, Shaw GM, Selvin S, Gould JB, and Syme SL. Socioeconomic status, neighborhood social conditions, and neural tube defects. *Am J Public Health* 1998;88:1674-80.

Weekes EW, Tamura T, Davis RO, Birch R, Vaughn WH, Franklin JC, Barganier C, Cosper P, Finley SC, and Finley WH. Nutrient levels in amniotic fluid from women with normal and neural tube defect pregnancies. *Biol Neonate* 1992; 61: 226-231.

Weindling AM, and Rennie JM. Neurological problems of the neonate: central nervous system malformation. In: Rennie JM, editor. *Robertson's Textbook of neonatology*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2005:1186-203.

Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Renlund M, Stoll C, Alembik Y, Dott B, Czeizel AE, Gelman-Kohan Z, Scarano G, Bianca S, Ettore G, Tenconi R, Bellato S, Scala I, Mutchinick OM, López MA, de Walle H, Hofstra R, Joutchenko L, Kavteladze L, Bermejo E, Martínez-Frías ML, Gallagher M, Erickson JD, Vollset SE, Mastroiacovo P, Andria G, and Botto LD. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas worldwide. *J Med Genet* 2003;40:619-625

Williamson RA, Schauberger CW, Varner MW , and Aschenbrener CA. Heterogeneity of prenatal onset hydrocephalus: Management and counseling implications. *Am J Med Genet* 1984; 17: 497-504.

Wilson A , Platt R W U Q, Lecler C D, Christensen B, Yang H, Gravel R A, and Rozen R . A common variant in methionine Synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida . *Mol Genet Metab* 1999; 67: 317-323.

Wilson RD, and Van Allen MI. Recommendations on the use of folic acid for the prevention of neural tube defects. *J Soc Obstet Gynecol* 1993; 15 Suppl: 41-4

Wilson RD, Davies G, Desilets V, Reid GJ, Summers A, Wyatt P, and Young D. The use of folic acid for the prevention of neural tube defects and other congenital anomalies. *J Obstet Gynaecol Can* 2003; 25: 959-73.

Workshop on folate, B12, and choline .Sponsored by the Panel on Folate and other B vitamins of the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board ,Institute of Medicine ,Washington, D.C., March3-4,1997.*Nutrition* 1999;15:92-96

Wynbrandt J , and Ludman MD. The encyclopedia of genetic disorders and birth defects. New York: Facts on File; 1991.

Xiao KZ, Zhang ZY, Su YM, Liu F Q, Yan Z Z, Jiang Z Q, Zhou S F, He W G , Wang B Y , Jiang H P , Yang H G , Li M M , Ju Z H, Hong S Q , Yao J S , Xing G K , Li H , Den H Y, Yu WZ , Chen H X , Liu L W , Bao G Z , Shang H Q, Zhou M M , Ciren Z M , Zhang Y J , Tan X L, Li Y Z , Zhou G Z , and JIA W G . Central nervous system congenital malformations, especially neural tube defects in 29 provinces, metropolitan cities and autonomous regions of China: Chinese Birth Defects Monitoring program. *Int J Epidemiol* 1990; 19:978-82

Yaliwal L V , and Desai R M .Methylenetetrahydrofolate reductase mutations, a genetic cause for familial recurrent neural tube defects. *Indian J Hum Genet* 2012; 18(1): 122-124.

Yan L, Zhao L, Long Y, Zou P, Ji G, Gu A, and Zaho P. Association of the Maternal *MTHFR* C677T Polymorphism with Susceptibility to Neural Tube Defects in Offsprings: Evidence from 25 Case-Control Studies. *PLoS ONE* 2012; 7(10): e41689.

Yang J, Carmichael SL, Canfield M, Song J, and Shaw GM. National Birth Defects Prevention Study. Socioeconomic status in relation to selected birth defects in a large multicentered US case-control study. *Am J Epidemiol* 2008;167: 145-54

Zaoui S, and Biemont C. Frequency of consanguineous unions in the Tlemcen area (West Algeria). *Santé* 2002; 12: 289-95.

Zeisel SH. Importance of methyl donors during reproduction. *Am J Clin Nutr* 2009; 89: 673-7

Zeyrek D, Oran M S, Akmak a C, Kocyigit A, and Iscan A. Serum Copper and Zinc Levels in Mothers and Cord Blood of their Newborn Infants with Neural Tube Defects: A Case-control Study. *Indian Pediatrics* 2009; 1:1-6

Zhu H, Kartiko S, and Finnell RH. Importance of gene–environment interactions in the etiology of selected birth defects. *Clin Genet* 2009; 75: 409–423.

Zimmerman AW. Hyperzincemia in anencephaly and spina bifida: a clue to the pathogenesis of neural tube defects? *Neurology* 1984;34:443-50.

Zivelin A, Griffin JH, Xu X, Pabinger I, Samama M, Conard J, Brenner B, Eldor A, and Seligsohn U. A single genetic origin for a common Caucasian risk factor for venous thrombosis. *Blood* 1997; 89(2): 397-402

Zlotogora J. Genetic disorders among Palestinian Arabs: 1. Effects of consanguinity. *Am J Med Genet* 1997; 68: 472-5.

Zurmohle UM, Homann T, Schroeter C, Rothgerber H, Hommel G, and Ermert JA. Psychosocial adjustment of children with spina bifida. *J Child Neurol* 1998; 13(2):64-70.

Résumé

Les anomalies du tube neural (ATN) sont un groupe de malformations qui résultent d'un échec de fusion de la région crânienne ou de la colonne vertébrale du tube neural. Cette étude a pour but de déterminer la prévalence de ces anomalies dans la région de Sétif, ainsi que la relation des gènes soupçonnés d'être des facteurs de risques génétiques des ATN. Une étude rétrospective des dossiers de patients avec une ATN a été réalisée dans la région de Sétif, au cours d'une période de 3 ans. 147 participants apparemment sains, ainsi que 92 mères et 48 pères d'enfants atteints d'ATN ont été impliqués dans l'étude des mutations spécifiques sur le gène de la 5, 10 Méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR), de la cystathionine β - synthase (CBS), du gène ZIP 14 et ZnT4 en relation avec les ATN. Nos résultats montrent que la prévalence des ATN était de 7.5 pour 1000 naissances. La répartition selon le sexe ratio était significativement élevée chez les filles ayant une ATN ($p < 0.05$). L'investigation des mutations sur les gènes du facteur V Leiden G 1691-A et de la prothrombine PT 20210 G-A, ont montré qu'elles sont rares dans la population témoins. La prévalence de la MTHFR 677TT (14.3) n'a montré aucune différence significative entre le groupe des mères d'enfants atteints d'ATN et les témoins, par contre, une différence statistiquement significative a été démontré chez les mères hétérozygotes ayant un enfant atteint d'ATN pour l'insertion sur le gène de la CBS par rapport aux témoins (Odds ratio 3.72 : 1.59–8.73). Toutefois, aucune interaction gène-gène entre le polymorphisme C677T de la MTHFR et le CBS 844ins68 n'a été identifiée pour les ATN. Aucune mutation dans les gènes ZIP 14 et ZnT4 n'a été détectée chez les mères d'enfants atteints d'ATN. En conclusion, cette étude montre que les ATN représentent un véritable problème de santé publique en Algérie. Malgré, l'absence de l'effet du polymorphisme de la MTHFR C677T et des gènes ZIP14 et ZnT4, qui n'ont montré aucune association pour le groupe d'ATN, nous suggérons une supplémentation en acide folique pour les femmes planifiant une grossesse pour prévenir ces anomalies, ainsi que l'investigation d'autres facteurs génétiques et environnementaux afin d'essayer de déterminer la pathogénie des ATN dans notre région et pays.

Mots clés : ATN, polymorphismes génétiques, MTHFR C677T, CBS844ins68, ZIP 14, ZnT4, Sétif, Algérie.

المخلص

تحدث تشوهات الجهاز العصبي (ATN) نتيجة عدم التلاحم صحيح في منطقة الجمجمة والعمود الفقري. صممت هذه الدراسة لتحديد مدى انتشار هذه الحالات في منطقة سطيف، فضلا عن العلاقة بين الجينات التي يشتبه في أن تكون عوامل الخطر الجينية لها. أجريت دراسة مرجعية لسجلات المرضى المصابين بهذه ATN في منطقة سطيف على فترة 3 سنوات. كما تم إشراك 147 شخصا سليما إضافة إلى 92 أم و 48 أب لأطفال مصابين من اجل دراسة علاقة الطفرات الجينية لكل من مورثة 5، 10 ميثيلين تيترا هيدروفولات ريدكتيز (MTHFR)، سيستاثيونين β - synthase (CBS)، ZIP 14، و ZnT4 بهذه التشوهات. أظهرت النتائج أن نسبة حدوث تشوهات الجهاز العصبي في منطقة سطيف كانت 7.5 لكل ألف مولود ؛ كما أن التوزيع حسب الجنس كان عاليا بصفة معنوية بين الفتيات المصابات ($p < 0.05$). بينت النتائج أيضا أن الطفرات في مورثات العامل الخامس V Leiden و البروترومبين نادرة في مجموعة الشواهد ، في حين أن انتشار تعدد أشكال المورثة MTHFR 677TT لم يظهر فرقا معنويا بين مجموعة أمهات المصابين ب ATN و الشواهد. على الرغم من وجود فرق معنوي بين الأنماط الجينية hétérozygotes لمورثة CBS عند أمهات المصابين (Odds ratio 3.72 : 1.59–8.73) إلا انه لم يثبت وجود تفاعل بين تعدد الأشكال MTHFR C677T و CBS. كما لم يتم تحديد أي طفرة في مورثة ZIP14 أو ZnT4 عند أمهات المرضى الذين يعانون من تشوهات الجهاز العصبي. توضح هذه الدراسة أن هذه التشوهات تمثل مشكلة رئيسية للصحة العامة في الجزائر وعلى الرغم من أن النتائج التي توصلنا إليها لم تظهر علاقة واضحة بين المورثات MTHFR C677T، ZIP14، و ZnT4 وهذه التشوهات، إلا أننا نقترح استعمال مكملات بحمض الفوليك للنساء عند التخطيط للحمل لتفادي هذه التشوهات، فضلا عن التحقيق في العوامل الوراثية والبيئية الأخرى من أجل محاولة تحديد الآلية المرضية لهذه الإصابات في منطقتنا و في الجزائر.

الكلمات المفتاحية: عيوب الجهاز العصبي، تعدد الأشكال الوراثية، MTHFR C677T، CBS844ins68، ZIP 14، ZnT4، سطيف، الجزائر.