

IMPACT DE L'HYPERHOMOCYSTÉINÉMIE SUR LE RISQUE THROMBOEMBOLIQUE VEINEUX

SEMRA K.^(1,2), BENEMBAREK K.^(1,2), ABADI N.^(1,2), BENLATRECHE C.^(1,2).

1) Laboratoire de Biochimie, CHU Benbadis de Constantine.

2) Laboratoire de Recherche en Biologie et Génétique Moléculaire, Faculté de Médecine, Université Constantine 3.

RÉSUMÉ :

Le rôle de l'hyperhomocystéinémie (HHC) mineure ou modérée comme facteur de risque indépendant dans la survenue des thromboses veineuses reste controversé. L'objectif de cette étude est d'évaluer la relation entre l'HHC et la maladie thromboembolique veineuse chez une population de l'Est Algérien. Patients et méthodes: Cette étude est rétrospective de type cas-témoins. Nous avons mesuré l'homocystéine (Hcy) plasmatique chez 77 patients hospitalisés pour thrombose veineuse, tout type confondu et chez 117 sujets cliniquement sains. La technique d'analyse employée pour la détermination de l'Hcy plasmatique est immunochimique par polarisation de fluorescence (FPIA). L'analyse par régression logistique a été utilisée pour évaluer le risque thromboembolique veineux lié à l'HHC. Résultats: La valeur médiane d'Hcy est respectivement de $12,80 \pm 9,56 \mu\text{mol/l}$ chez les patients et de $11,38 \pm 6,16 \mu\text{mol/l}$ chez les témoins ($p=0,04$). Les HHC $> 15 \mu\text{mol/l}$ sont retrouvées chez 29,87% de thrombotiques veineux contre 17,09% chez les sujets sains ($p=0,036$). Après ajustement pour l'âge et le sexe; l'HHC définie au-delà du 95e percentile est significativement associée à la maladie thromboembolique veineuse (OR (IC 95%): 4,00 [1,19-13,40]; $p=0,023$) et suit une relation de type dose-effet. La force de cette association est retrouvée plus élevée chez les cas présentant une récurrence pour la maladie (OR (IC 95%): 11,69 [1,47-92,91]; $p=0,018$). Conclusion: L'hyperhomocystéinémie est indépendamment associée à la thrombose veineuse, multipliant par quatre fois le risque de sa survenue. Les patients hyperhomocystéinémiques présentent un haut risque de récurrence de la maladie.

Mots-Clés: Hyperhomocystéinémie, Thromboses veineuses, Récurrence.

ABSTRACT: IMPACT OF HYPERHOMOCYSTEINEMIA ON THE RISK OF VENOUS THROMBOEMBOLISM.

The role of minor or moderate hyperhomocysteinemia (HHC) as an independent risk factor in the occurrence of venous thrombosis remains controversial. The objective of this study is to evaluate the relationship between HHC and venous thrombotic disease in a population of Eastern Algeria. Patients and methods: This is a retrospective case-control study. We have measured plasma total homocysteine (tHcy) in 77 patients hospitalized for all types of venous thrombosis and in 117 clinically healthy subjects. The fluorescence polarization immunoassay (FPIA) was applied for the determination of tHcy. Logistic regression analysis was used to evaluate the venous thrombotic risk associated with HHC. Results: The median level of homocysteinemia was $12.80 \pm 9.56 \mu\text{mol/l}$ in the patients and $11.38 \pm 6.16 \mu\text{mol/l}$ in the controls ($p=0.04$). HHC $> 15 \mu\text{mol/l}$ were found in 29.87% of venous thrombotic patients and in 17.09% of healthy subjects ($p=0.036$). After adjustment for age and sex; the HHC define as tHcy above the 95th percentile is significantly associated with venous thromboembolic disease (OR (95% CI): 4.00 [1.19 - 13.40], $p=0.023$) and follows a dose-type relationship-effect. The strength of this association is even higher with the recurrence of the disease (OR (95% CI): 11.69 [1.47 - 92.91], $p=0.018$). Conclusion: Hyperhomocysteinemia is independently associated with venous thrombosis, multiplying by four the risk of its occurrence. Hyperhomocysteinemic patients are exposed to a high risk of recurrence of the disease.

Key words: Hyperhomocysteinemia, Venous thrombosis, Recurrence.

INTRODUCTION

L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé soufré, dérivé du métabolisme complexe et vitamine B-dépendant de la méthionine [1,2]. En dehors de l'insuffisance rénale et de la prise de certaines thérapeutiques, des élévations des hyperhomocystéinémies (HHC) au-delà de 15 $\mu\text{mol/l}$ sont fréquentes au sein de la population générale et seraient la résultante de l'intrication de facteurs nutritionnels et/ou génétiques étroitement liés, impliqués dans le métabolisme de l'Hcy [3].

De part un nombre élevé d'études prospectives et rétrospectives, l'Hcy a été reconnue comme facteur de risque indépendant et quantitatif dans la survenue des thromboses veineuses (TV) [3-6]. Sa causalité directe reste cependant controversée [1-3]. Les mécanismes physiopathologiques explicatifs de la toxicité veineuse de l'Hcy ne sont pas totalement connus. Des travaux de recherche sur des modèles animaux ont démontré que l'hyperhomocystéinémie induisait des anomalies vasculaires structurelles et fonctionnelles [7]; une modification du caractère anticoagulant de l'endothélium vasculaire en caractère procoagulant ainsi qu'un effet toxique par des radicaux libres générés par oxydation des groupements sulfhydryl (-SH). D'autre part, l'homocystéinylation des protéines par l'Hcy ou par son métabolite toxique Hcy-thiolactone (HTL) peut être à l'origine de l'inhibition du système fibrinolytique ou de l'activation de la coagulation sanguine [8,9]. Toutefois, les essais cliniques visant à réduire le risque thromboembolique veineux lié à l'HHC ne sont pas encore concluants [1,7,10].

Le présent travail a pour but d'évaluer l'impact de l'hyperhomocystéinémie sur le risque thromboembolique veineux chez des patients résidant dans la région Est de l'Algérie.

PATIENTS ET MÉTHODES

1. Patients

Les patients diagnostiqués pour des thromboses veineuses inaugurales ou récurrentes, qu'elles soient profondes (TVP), cérébrales (TVC) ou encore embolies pulmonaires (EP) ont été recrutés pour la présente étude. Le recueil des informations cliniques a été réalisé à partir des dossiers médicaux. L'âge, le sexe, les antécédents personnels et familiaux de thrombose veineuse, la présence de récurrences et leur nombre, la localisation des TV, la présence de pathologies associées, de grossesse, de post-partum, de contraception, de tabagisme, la prise de thérapeutiques. Les patients ayant des atteintes rénales et/ou hépatiques et ceux sous-thérapeutiques interférant avec l'homocystéinémie et le métabolisme des vitamines du groupe B (folates, VB12 et VB6) ont été exclus de cette étude. Le groupe témoin est constitué de volontaires sains, recrutés parmi le personnel hospitalier.

2. Analyses biologiques

Les prélèvements sanguins ont été effectués à jeun, sur tube à EDTA. Les échantillons ont été immédiatement placés dans de la glace, puis centrifugés à 4000 tr/mn pendant 15 mn. Des kits réactifs Hcy pour analyseur automatisé AxSym Abbott (AxSYM Homocysteine Reagent Pack, FPIA, ABBOTT, USA) ont été utilisés pour la détermination des concentrations plasmatiques de l'homocystéine. Il s'agit d'un dosage immunoenzymologique par polarisation de fluorescence (FPIA) dont le principe est basé sur la transformation enzymatique de l'Hcy, réduite au préalable par le dithiothréitol (DTT), en S-adenosyl-L-homocystéine (SAH), laquelle, est dosée par compétition vis-à-vis d'un anticorps monoclonal marqué à la fluorescéine. Le seuil normal est défini entre 5 et 15 $\mu\text{mol/l}$.

3. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été effectuée sur le logiciel STATISTICA version 8.0 pour Windows. La comparaison des données entre le groupe des patients et celui des témoins a été réalisée par les tests non paramétriques de Mann-Whitney U pour la comparaison des taux moyens d'Hcy et de Chi-square table 2x2 et Fisher exact table 2x2 pour la comparaison des fréquences. Le seuil d'hyperhomocystéinémie a été défini au 95ème percentile des valeurs obtenues chez le groupe témoin. L'analyse par régression logistique univariée et multivariée a été utilisée pour l'estimation du risque thrombotique veineux lié à l'HHC, exprimé en odds ratio (OR) avec intervalle de confiance à 95% (IC95%). La significativité statistique des résultats est définie pour une valeur de $p < 0,05$.

RÉSULTATS

Le groupe d'étude inclue 77 cas atteints de thromboses veineuses (10 hommes, 67 femmes), d'âge moyen $42 \pm 15,77$ ans. Le groupe témoin est composé de 117 sujets sains (35 hommes, 82 femmes), d'âge moyen $36,5 \pm 15,26$ ans. La localisation des thromboses veineuses, le nombre d'épisodes observés ainsi que la présence de facteurs de risque connus sont résumés dans le tableau I. Les facteurs de risques observés sont respectivement: 15 cas de post-partum (19,48%); 10 cas de chirurgie (12,98%); 7 cas de contraception orale (9,09%); 2 cas de cancer (2,59%), 1 cas d'infection (1,29%) et 1 cas de grossesse (1,29%).

Tableau I. Caractéristiques des thromboses veineuses.

Thromboses veineuses	Patients (n= 77)	
	Nombre	%
Localisation		
TVP	51	66,23%
EP	18	23,37%
TVP + EP	04	5,19%
TVC	04	5,19%
Episodes		
Premier	71	92,2%
Multiplés	06	7,79%
Etiologies		
Idiopathiques	41	53,24%
Facteurs de risque	36	46,75%

TVP: Thromboses veineuses profondes; EP: Embolies pulmonaires; TVC: Thromboses veineuses cérébrales.

La valeur médiane d'Hcy est significativement plus élevée chez les patients comparativement aux témoins ($12,80 \pm 9,56 \mu\text{mol/l}$ vs $11,38 \pm 6,16 \mu\text{mol/l}$; $p = 0,04$).

La valeur du plus haut quartile (75%) est de $17,18 \mu\text{mol/L}$ chez les patients et de $14,78 \mu\text{mol/l}$ chez les témoins (figure 1).

La fréquence des HHC > 15 $\mu\text{mol/l}$ est plus élevée chez les patients comparativement aux témoins (29,87 % vs 17,09 %; $p < 0,05$). Une différence significative entre les deux groupes se situe essentiellement dans la classe des HHC intermédiaires (30 à 100 $\mu\text{mol/l}$) (tableau II).

Le seuil du risque thrombotique veineux apparaît au 80ème percentile, soit à un taux d'Hcy plasmatique de 15 $\mu\text{mol/l}$ (OR brut

Tableau II. Classification des hyperhomocystéinémies chez les cas et témoins.

HHC	Témoins (n= 117)		Patients (n= 77)		P
	Nombre	%	Nombre	%	
> 15 µmol/l	20	17,09%	23	29,87%	0,036*
Min. (15 - 30) µmol/l	19	16,24%	14	18,18%	> 0.05
Int. (30 -100) µmol/l	01	0,85%	09	11,69%	0,0012*
Sévères > 100 µmol/l	00	00%	00	00%	-

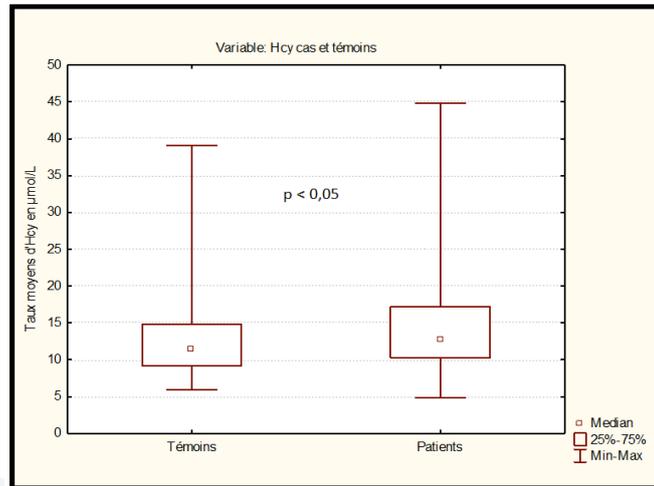


Figure 1. Taux moyens d'homocystéine (Hcy) chez les patients et témoins.

(IC95%): 2,06 [1,03-4,11]; p< 0,05). Ce risque reste significatif après ajustement pour l'âge et le sexe (OR ajusté (IC95%) 2,30: 1,06-5,01; p< 0,05).

L'association de l'HHC à la maladie thromboembolique veineuse (MTEV), définie à un seuil d'Hcy au delà du 95ème percentile du groupe témoin était significative aussi bien en analyse brute (OR brut (IC95%): 3,34 [1,088-10,27]; p< 0,05) qu'après ajustement pour l'âge et le sexe (OR ajusté (IC 95%) 4,00: [1,19-13,40]; p< 0,05) (tableau III).

Tableau III. Seuils d'homocystéinémie pour l'estimation du risque thrombotique veineux.

Seuils d'Hcy (µmol/l)	OR brut IC 95% P	OR ajusté IC 95% P
70 ^{ème} percentile (13,72 µmol/l)	1,66 0,90-3,05 0,096	1,68 0,86-3,25 0,11
75 ^{ème} percentile (14,78 µmol/l)	1,47 0,78-2,78 0,22	1,39 0,68-2,85 0,35
80 ^{ème} percentile (15 µmol/l)	2,06 1,03-4,11 0,038*	2,30 1,06-5,01 0,033*
95 ^{ème} percentile (27,36 µmol/l)	3,34 1,088 - 10,27 0,033*	4,00 1,19 - 13,40 0,023*

* p< 0,05

Une association positive a été observée entre l'HHC et la TV inaugurale (OR ajusté (IC 95%):3,50 [1,05-11,65]; p< 0,05) et entre l'HHC et la TV récurrente (OR ajusté (IC95%) :11,69 [1,47-92,91]; p< 0,05) (tableau IV).

HHC	TV inaugurales (n= 71)		TV récurrentes (n= 6)	
	OR brut IC 95% P	OR brut IC 95% P	OR brut IC 95% P	OR ajusté IC 95% P
95 ^{ème} percentile (27,36 µmol/l)	3,25 1,03-10,20 0,042*	3,50 1,05-11,65 0,039*	11,2 1,6 -77,88 0,013*	11,69 1,47-92,91 0,018*

* p< 0,05; TV: Thrombose veineuse; HHC: Hyperhomocystéinémie.

DISCUSSION

Dans la présente étude, le lien entre l'hyperhomocystéinémie et la MTEV est significatif. Le risque veineux estimé est multiplié par un facteur d'environ quatre. Nos résultats concordent avec ceux rapportés lors de plusieurs travaux [3, 5, 11-16].

Néanmoins, les profils de cette association restent très hétérogènes entre les différentes études.

Nos résultats montrent que le seuil de risque thrombotique vei-

neux lié à l'HHC apparaît au 80^{ème} percentile, soit à un taux de 15 $\mu\text{mol/l}$ d'Hcy plasmatique. Gemmati et al. [16] voient également le seuil de risque apparaître au 80^{ème} percentile mais pour un taux d'Hcy plasmatique de 10,57 $\mu\text{mol/l}$. Près de 30% de nos patients avaient des HHC > 15 $\mu\text{mol/l}$. Zamani et al. [17] en rapportent un taux de 79,06%. Oger et al. [18] ont de leur part retrouvé une prévalence de 64%. En effet, il ne semble pas exister de seuil de toxicité à l'homocystéine mais un continuum du risque [13,19].

D'autres travaux n'ont pas prouvé l'existence d'un lien entre l'hyperhomocystéinémie et le risque d'accidents thromboemboliques veineux [20-23]. Peu d'explications concernant cette controverse sont apportées. Toutefois, l'absence d'un lien significatif n'exclue pas totalement l'existence d'un haut risque potentiel de MTEV lié à l'HHC. Dans leurs travaux, Lijfering et al. [9] n'avaient pas trouvé un lien significatif direct entre l'HHC et les thromboses veineuses (RR (IC95%): 0,9 [0,4-2,0]; $p > 0,05$). Par contre, ils ont trouvé qu'un taux élevé en facteur VIII était associé au risque thrombotique veineux et que cette association restait significative chez les sujets hyperhomocystéinémiques comparativement à ceux normohomocystéinémiques (RR (IC95%): 1,0 [0,4-2,3]; $p < 0,05$). Ils ont suggéré de ce fait que l'hyperhomocystéinémie mineure ou modérée n'aurait d'effets prothrombogènes qu'en association avec d'autres facteurs de risque.

L'hypothèse d'un lien direct entre la maladie thromboembolique veineuse et les déterminants nutritionnels de l'Hcy (folates, VB12 et VB6) [14,15,18,24-28] et/ou génétiques, particulièrement le polymorphisme C677T du gène de l'enzyme méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) a été investigué [13,18,29-31]. Toutefois, les résultats ne sont pas concluants.

Peu d'études ont testé l'influence d'interactions de type gènes-gènes et gènes-nutriments, cette piste de recherche semble être prometteuse [13,15,32-34]. Par ailleurs, les résultats d'essais cliniques, visant à réduire le risque thrombotique veineux par réduction des taux plasmatiques d'Hcy par des thérapies vitaminiques B, ont été voués à l'échec [35].

Le lien indépendant de l'HHC à la MTEV est caractérisé par son aspect quantitatif, le risque thromboembolique veineux augmente avec l'augmentation des taux plasmatiques d'Hcy [36]. Nos résultats montrent que le risque thromboembolique veineux avait augmenté d'un facteur de 1,73 entre le 80^{ème} et le 95^{ème} percentile. Des résultats semblables ont été rapportés par Cacoub et al. [37] qui ont trouvé que le risque relatif des thromboses veineuses avait une valeur de 2,7 pour un taux d'Hcy plasmatique de 16 $\mu\text{mol/l}$ et augmentait à 3,1 pour un taux de 22 $\mu\text{mol/l}$. den Heijer et al. [38] ont trouvé lors de leur méta-analyse une élévation du risque de TV de 60 % dans les études rétrospectives et de 27 % dans celles prospectives pour une augmentation du taux plasmatique d'homocystéine de 5 $\mu\text{mol/l}$.

Dans notre étude, le risque thromboembolique veineux lié à l'HHC était multiplié par environ 11 fois en cas de récurrence et 3,5 fois en cas de thromboses veineuses inaugurales. L'impact de l'HHC sur la récurrence apparaît donc 3 fois plus élevé par rapport aux premiers épisodes.

L'influence de l'HHC sur la récurrence des MTEV a été abordée dans au moins trois enquêtes. Fermo et al. [39] retrouvent un taux de récurrence de TV plus important chez les sujets hyperhomocystéinémiques. Après un an de suivi, 6 sur 10, soit 60%, des malades hyperhomocystéinémiques ont présenté une récurrence thrombotique.

Dans une enquête cas-témoin, den Heijer et al. [40] montrent qu'un taux d'homocystéine > 90^{ème} percentile de la population témoin, ajusté à l'âge, au sexe et au statut hormonal chez la

femme est associé à un risque relatif de thrombose récidivante de 2,0 (IC95 % ; 1,5-2,7). Ce risque augmente avec les taux d'homocystéine plasmatique. Dans une autre étude réalisée sur 602 patients atteints de TV, Eichinger [28] a rapporté qu'environ 17% des patients avaient récidivé et que le risque relatif de récurrence des TV chez les patients ayant des taux élevés d'Hcy plasmatique était de 1,6 fois supérieur à celui retrouvé chez les patients sans HHC.

Les mécanismes physiopathologiques par lesquels l'Hcy augmente le risque de récurrence des TV sont mal connus. Des travaux de recherches proposent la possibilité d'une altération par homocystéinylation des protéines impliquées dans la détoxification de l'Hcy et/ou dans la coagulation conduisant à un défaut de leurs fonctions [8, 41-44]. Szlauer et al. [45] rapportent que la protéine N-liée à l'Hcy était le prédicteur de la récurrence de la maladie (OR 1,765 (95%) [1,236 - 2,520]; $p = 0,002$) et que cette protéine était corrélée positivement à l'Hcy et à la protéine C réactive (CRP).

Leurs résultats montrent également que le métabolisme de l'Hcy et de l'inflammation sont étroitement liés en cas de récurrence alors que chez les patients avec un seul épisode, la protéine N-liée à l'Hcy n'était corrélée positivement qu'avec la CRP.

Conclusion

Nos résultats montrent un impact marqué de l'hyperhomocystéinémie sur la maladie thromboembolique veineuse multipliant par environ quatre fois le risque de sa survenue et exposant les patients à un plus haut risque de récurrence. Dans le cadre d'optimisation des stratégies de prévention et de traitement de cette pathologie, des études de recherche sur les dérivés du métabolisme de l'Hcy et de la N-homocystéinylation sont en cours. Ces dérivés seraient un meilleur marqueur du risque thrombotique comparés aux seuls taux d'Hcy plasmatique.

RÉFÉRENCES

1. Hirmerová J. Homocysteine and venous thromboembolism—Is there any link? *Cor et Vasa* 2013; 55 (2013) E248-E258.
2. Vesin C, Horellou M H, Mairesse S, Conard J, Safar M, Blacher J. Homocystéine et risque cardiovasculaire. *Sang Thrombose Vaisseaux* 2007; 19(3): 143-149.
3. Omar S, Ben Ghorbel I, Feki H, Souissi M, Feki M. Hyperhomocysteinemia is associated with deep venous thrombosis of the lower extremities in Tunisian patients. *Clinical Biochemistry* 2007; 40: 41–45.
4. Ray JG. Meta-analysis of Hyperhomocysteinemia as a Risk Factor for Venous Thromboembolic Disease. *Arch Intern Med* 1998; 158: 2101-2106.
5. Perry DJ. Hyperhomocysteinemia. *Clinical Haematology* 1999 ; 12(3) : 451-477.
6. Langman LJ, Ray JG, Evrovski J, Yeo E, Cole D. Hyperhomocyst(e) inemia and the Increased Risk of Venous Thromboembolism. *Arch Intern Med* 2000; 160: 961-964.
7. Rodionov RN, Lentz SR. The Homocysteine Paradox. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2008; 28: 1031.
8. Karolczak K, Olas B. Mechanism of Action of Homocystéine and Its Thiolactone in Hemostasis System. *Physiol.Res* 2009; 58: 623-633.
9. Lijfering WM, Coppens M, Veeger N, Middeldorp S, Hamulyák K, Prins MH, et al. Hyperhomocysteinemia is not a risk factor for venous and arterial thrombosis, and is associated with elevated factor VIII levels. *Thrombosis Research* (2008) 123, 244–250.

10. Lussana F, Betti S, D'Angelo A, De Stefano V, Fedi S, Ferrazzi P, et al. Evaluation of the prevalence of severe hyperhomocysteinemia in adult patients with thrombosis who underwent screening for thrombophilia. *Thrombosis Research* 132 (2013) 681–684.
11. Den Heijer M, Rosendaal F R, Blom H J, Gerrits W B, Bos G M. Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. *Thrombosis and haemostasis* 1998; 80(6): 874–877.
12. Unlü Y, Keles S, Becit N, Koçoğullari CU, Koçak H, Bakan E. Hyperhomocysteinemia as a Risk Factor for Deep-vein Thrombosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005; 30: 315–318.
13. Quéré I, Chassé JF, Dupuy E, Bellet E, Molho-Sabatier P, Tobelem G, et al. Homocystéine, 5,10-méthyltétrahydrofolate réductase et thrombose veineuse profonde. Enquête auprès de 120 patients en médecine interne. *Rev Méd Interne* 1998; 19: 29–33.
14. Nagaraja D, Noone M, Bharatkumar V, Christopher R. Homocysteine, folate and vitamin B12 in puerperal cerebral venous thrombosis. *Journal of the Neurological Sciences* 2008; 272: 43–47.
15. Quéré I, Perneger T, Zittoun J, Bellet H, Gris JC, Daurès JP, et al. Red blood cell methylfolate and plasma homocysteine as risk factors for venous thromboembolism: a matched case-control study. *The Lancet* 2002; 359(9308): 747 – 752.
16. Gemmati D, Previati M, Serino M, Moratelli S, Guerra S, Capitani S, et al. Low Folate Levels and Thermolabile Methylene-tetrahydrofolate Reductase as Primary Determinant of Mild Hyperhomocysteinemia in Normal and Thromboembolic Subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1761–1767.
17. Zamani A, Omrani GR, Lankarani KB. Hyperhomocysteinemia, hyperlipidemia and risk of venous thromboembolism in Shiraz. *Eastern Mediterranean Health Journal* 2003; 9(5/6): 935–943.
18. Oger E, Lacut K, Legal G, Couturaud F, Guénet D, Abalain J, et al. Hyperhomocysteinemia and low B vitamin levels are independently associated with venous thromboembolism: results from the EDITH study: a hospital-based case-control study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2006; 4(4): 793–799.
19. Stanger O, Fowler B, Herrmann W, Pietrzik K, Geisel J, Dierkes J, et al. The D.A.CH.-LIGA homocysteine (German, Austrian and Swiss Homocysteine Society). Guidelines and recommendations on homocysteine measurement and use of folic acid and B- vitamins in cardiovascular and thrombotic disease. *Atherosclerosis* 2003; 4(2): 121.
20. Ravari H, Zafarghandi MR, Alvandfar D, Saadat S. Serum Homocysteine in Deep Venous Thrombosis, Peripheral Atherosclerosis and Healthy Iranians: A Case-Control Study. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 2009; 12(14): 1019–1024.
21. Cattaneo M, Martinelli I, Mannucci PM. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1997; 336 (19): 1399.
22. Falcon CR, Cattaneo M, Panzeri D, Martinelli I, Mannucci PM. High prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with juvenile venous thrombosis. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1080–1083.
23. Brattstrom L, Tengborn L, Lagerstedt C, Israelsson B, Hultberg B. Plasma homocysteine in venous thromboembolism. *Haemostasis* 1991; 21: 51–57.
24. Cattaneo M, Lombardi R, Lecchi A, Bucciarelli P, Mannucci PM. Low Plasma Levels of Vitamin B6 Are Independently Associated With a Heightened Risk of Deep-Vein Thrombosis. *Circulation* 2001; 104: 2442.
25. Cantu C, Alonso E, Jara A, Martínez L, Ríos C. Hyperhomocysteinemia, Low Folate and Vitamin B12 Concentrations, and Methylene Tetrahydrofolate Reductase Mutation in Cerebral Venous Thrombosis. *Stroke* 2004; 35: 1790–1794.
26. Díaz de Tuesta AM, Ribó DR, Belinchón O, Marchena PJ, Bruscas J, Val E, et al. Low levels of vitamin B12 and venous thromboembolic disease in elderly men. *J Intern Med* 2005; 258: 244–249.
27. Robinson K, Arheart K, Refsum H, Brattström L, Boers G, Ueland P, et al. Low Circulating Folate and Vitamin B6 Concentrations Risk Factors for Stroke, Peripheral Vascular Disease, and Coronary Artery Disease. *Circulation* 1998; 97: 437–443.
28. Eichinger S. Homocysteine, Vitamin B6 and the Risk of Recurrent Venous Thromboembolism. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003/2004; 33: 342–344.
29. Bezemer I, Doggen C, Vos H, Rosendaal F. No Association Between the Common MTHFR 677C→T Polymorphism and Venous Thrombosis. *Arch Intern Med* 2007; 167: 497–501.
30. Berrut G, Ghali A, Quere I, Ternisien C, Gallois I, Roy PM, et al. La mutation C677T du gène de la 5,10-méthyltétrahydrofolate réductase est associée aux thromboses veineuses idiopathiques. *La revue de médecine interne* 2003; 24: 569–576.
31. Gaustadnes M, Rudiger N, Moller J, Rasmussen K, Bjerregaard LT, Ingerslev J. Thrombophilic predisposition in stroke and venous thromboembolism in Danish patients. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999; 10: 251–259.
32. Abdessemed S, Hambab L, Rodriguez-Guéant RM, Corinne P, Philippe G, Salah L, et al. Contribution des facteurs génétiques et nutritionnels dans les hyperhomocystéinémies dans la population Algérienne saine. *Nutrition clinique et métabolisme* 2009; 23: 50–54.
33. Bagley PJ, Selhub J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13217–13220.
34. Christensen B, Arbour L, Tran P, Leclerc D, Sabbaghian N, Platt R, et al. Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. *Am J Med Genet* 1999; 84: 151–157.
35. Ray JG, Kearon C, Yi Q, Sheridan P, Lonn E. Homocysteine-Lowering Therapy and Risk for Venous Thromboembolism A Randomized Trial. *Annals of Internal Medicine* 2007; 146(11): 761–767.
36. David JL. L'hyperhomocystéinémie facteur du risque thromboembolique veineux. *Louvain Med* 2000; 119: S191–S196.
37. Cacoub P, Hausfater P, Tazi Z. Hyperhomocystéinémie : nouveau facteur de risque d'athérome, de thrombose artérielle et de thrombose veineuse. *Médecine thérapeutique* 1999; 5(9): 738–742.
38. Den Heijer M, Lewington S, Clarke R. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 292–299.
39. Fermo I, Vigano D'Angelo S, Paroni R, Mazzola G, Calori G, D'Angelo A. Prevalence of moderate hyperhomocysteinemia in patients with early-onset venous and arterial occlusive disease. *Ann Intern Med* 1995; 123: 747–753.
40. Den Heijer M, Gerrits WBJ, Haak HL, Wijermans PW, Bos GMJ, Blom HJ, et al. Is hyperhomocysteinemia a risk factor for recurrent venous thrombosis? *Lancet* 1995; 345: 882–885.

41. **Jakubowski H.** The Pathophysiological Hypothesis of Homocysteine Thiolactone- Mediated Vascular Disease. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2008; 59: 155-167.
42. **Undas A, Williams EB, Butenas S, Orfeo T, Mann KG.** Homocysteine inhibits inactivation of factor Va by activated protein C. *J Biol Chem* 2001; 276: 4389-4397.
43. **Jakubowski H.** Homocysteine is a protein amino acid in humans. Implications for homocysteine-linked disease. *J Biol Chem* 2002; 277: 30425-30428.
44. **Perla-Kajan J, Twardowski T, Jakubowski H.** Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids* 2007; 32: 561-572.
45. **Szlauer A, Mielimonka A, Glowacki R, Borowczyk K, Stachniuk J, Undas A.** Protein N-linked homocysteine is associated with recurrence of venous thromboembolism. *Thrombosis Research* 136 (2015) 911-916.