

**Enrichissement de la farine
en vitamines B en France**

proposition d'un programme-pilote

Ce rapport a été élaboré de mai à décembre 2002, sous l'égide d'un Comité de pilotage, mis en place par l'Afssa, en liaison avec l'Institut de veille sanitaire.

Il a été rédigé par :

- ◆ Sébastien Czernichow, médecin de santé publique
- ◆ Jacques Blacher, praticien hospitalier de médecine interne
- ◆ Pierre Ducimetière, directeur de recherche INSERM

Depuis maintenant 20 ans, la question d'instaurer une prévention efficace des anomalies congénitales de fermeture du tube neural par l'augmentation de l'apport en acide folique des femmes en âge de procréer est à l'ordre du jour de tous les pays, dont la France.

Les limites de la politique de supplémentation des femmes durant la période péri-conceptionnelle sont maintenant bien connues et l'enrichissement d'un vecteur alimentaire pour l'ensemble de la population apparaît nettement plus efficace et plusieurs pays dont les USA et le Canada ont introduit un enrichissement des farines alimentaires depuis quelques années.

L'enrichissement alimentaire prend une dimension supplémentaire en termes de prévention cardiovasculaire dans la mesure où son efficacité dans ce domaine serait clairement démontrée. C'est dans le cadre du "Programme national de réduction des risques cardiovasculaires 2002-2005" du Ministère délégué à la santé qu'une mission a été confiée à l'Afssa en liaison avec l'InVS de créer un groupe de travail chargé de rédiger un rapport scientifique présentant le point des connaissances et faisant des propositions d'action prenant en compte les finalités de santé publique de l'enrichissement.

Ce rapport, qui fait l'objet de la présente publication a été remis au Ministre de la santé, de la famille et des personnes handicapées à la fin de l'année 2002. Il proposait alors la réalisation, dans un premier temps, d'un programme pilote d'enrichissement de la farine panifiable en vitamines B9 et B12 dans une région française (l'Alsace) de manière à permettre son évaluation en termes de santé publique.

Aujourd'hui, l'objectif de diminuer l'incidence des anomalies du tube neural en France est retenu dans le rapport annexé au projet de loi relatif à la politique de santé publique. Sans aucun doute, le présent rapport est une base de travail essentielle pour la définition des actions à entreprendre même s'il convient déjà de tenir compte de l'évolution des connaissances et des expériences étrangères depuis sa rédaction...

Martin Hirsch
Directeur général de l'Afssa

Pierre Ducimetière
Directeur de recherche Inserm

■ Président du Comité

- ◆ P. Ducimetière

■ Experts

- ◆ D. Arveiler
- ◆ J. Blacher
- ◆ B. Chadeaux-Vekemans
- ◆ J. Goujard
- ◆ J. Ménard
- ◆ G. Potier de Courcy
- ◆ J-L. Schlienger
- ◆ J. Zittoun

■ Chargé de mission

- ◆ S. Czernichow

■ Membres de l'Afssa

- ◆ A.Martin
- ◆ J-L.Berta
- ◆ I.Vanrullen

■ Membres de l'InVs :

- ◆ H. Isnard
- ◆ S. Hercberg
- ◆ S. Paterniti

■ Représentant du Ministère de la santé, de la famille et des personnes handicapées (DGS)

- ◆ M. Vacarie

■ Représentant du Ministère de l'économie, des finances et de l'industrie (DGCCRF)

- ◆ D. Baelde

* Ainsi que pour l'aide apportée dans l'analyse des données de consommation alimentaire :

- ◆ J-L.Volatie
- ◆ A. Dufour
- ◆ M. Touvier

Liste des personnes auditionnées

- ◆ P-A. Masteau, secrétaire général et F. Souply, responsable du service technique et économique. Association nationale de la meunerie française, Paris.
- ◆ J-P. Brochoire. Directeur de l'institut national de la boulangerie pâtisserie, Rouen.
- ◆ R. Kuntz. Président du syndicat de la meunerie, région Alsace-Moselle, Strasbourg.
- ◆ L. Olland. Président de la fédération des Patrons Boulangers du Bas-Rhin, Strasbourg.
- ◆ J-C. Westerman. Directeur de la DRASS Alsace, Strasbourg.
- ◆ Y. Alembik, B. Dott, C. Stoll. Registre des malformations congénitales du Bas-Rhin. service de génétique médicale, Hôpital de HautePierre, Strasbourg.
- ◆ M-J. Meyer-Wipf, direction de la solidarité, service de PMI (Colmar) et O. Peter, service de pédiatrie Hôpital Hasenrain (Mulhouse) : registre des malformations congénitales du Haut-Rhin.
- ◆ A. Buemi. Registre des tumeurs du Haut-Rhin, Mulhouse.
- ◆ M. Velten. Registre des cancers du Bas-Rhin, laboratoire d'épidémiologie et de santé publique, faculté de Médecine, Strasbourg.
- ◆ B. Haas. Registre des cardiopathies ischémiques du Bas-Rhin, laboratoire d'épidémiologie et de santé publique, faculté de Médecine, Strasbourg.
- ◆ M-C. Mouquet. Direction de la recherche, des études, de l'évaluation et des statistiques (DRESS). Bureau des Etablissements de Santé, Paris.

Introduction	11
A. Contexte	11
B. Objectifs.....	11

1^{ere} partie : Etat des connaissances

I. Anomalies de fermeture du tube neural (AFTN)	15
A. Définition et mécanismes de formation.....	15
B. Survie et handicap des enfants vivants atteints d'une AFTN	15
C. Recueil des données : les registres de malformations congénitales	16
1. Définition	16
2. Caractéristiques	16
3. Spécificité d'enregistrement	17
D. Extrapolation des données	17
E. Dépistage prénatal : influence de l'offre de soins sur la politique de prévention	17
1. Introduction.....	17
2. Échographie obstétricale.....	17
3. Dosage de l'alpha-foetoprotéine sérique.....	17
F. Impact psychologique pour les parents lors du dépistage d'une AFTN.....	18
G. Épidémiologie : situation actuelle et évolution	18
1. En France.....	18
1. <i>AFTN</i>	18
2. <i>Fentes labiales et labio-palatines</i>	19
2. Autres pays	19
II. Vitamines B6, B9 et B12	20
A. Vitamine B6	20
B. Vitamine B9	20
1. Métabolisme	20
1. <i>Cycle biochimique</i>	20
2. <i>Fonctions physiologiques</i>	20
3. <i>Absorption et biodisponibilité</i>	20
2. Statut biologique et nutritionnel de la population.....	21
3. Apports Nutritionnels Conseillés	21
4. Sources alimentaires.....	22
5. Innocuité.....	22
1. <i>Toxicité de l'acide folique</i>	22
2. <i>Risques potentiels de masquage du déficit en vitamine B12</i>	22
3. <i>Interaction avec les anticonvulsivants et l'épilepsie</i>	23
4. <i>Interaction avec les traitements antagonistes des folates</i>	23
5. <i>Conclusion sur les effets secondaires possibles d'une augmentation de consommation d'acide folique</i>	23
6. Limites de sécurité des apports en France et en Europe.....	24
C. Vitamine B12 (cobalamines).....	24
1. Métabolisme	24
1. <i>Cycle biochimique et fonctions physiologiques</i>	24
2. <i>Sources alimentaires, absorption et biodisponibilité</i>	24
3. <i>Carence en vitamine B12</i>	24
2. Apports Nutritionnels Conseillés	25
3. Innocuité.....	25

III. Prévention des AFTN par l'acide folique	26
A. AFTN	26
B. Influence du terrain génétique	28
C. Autres malformations congénitales.....	28
1. Études d'observation	28
2. Études expérimentales.....	29
D. Fertilité, parité et survie foetale	29
1. Études d'observation	29
2. Études expérimentales.....	29
E. Hypertension gravidique.....	29
IV. Autres effets bénéfiques potentiels de l'acide folique	30
A. Introduction.....	30
B. Pathologies cardiovasculaires	30
1. Apports alimentaires et taux plasmatique d'homocystéine	30
1. <i>Études d'observation</i>	30
2. <i>Études expérimentales</i>	30
2. Apports alimentaires et risques cardiovasculaires	31
3. Taux plasmatique d'homocystéine et risques cardiovasculaires.....	31
1. <i>Études d'observation</i>	31
2. <i>Étude expérimentale disponible</i>	31
C. Autres effets attendus.....	32
1. Thrombose veineuse.....	32
2. Fonctions cognitives et maladies d'Alzheimer.....	32
3. Cancers	33
1. <i>Cancer colorectal</i>	33
2. <i>Cancer du sein</i>	33
V. Stratégies communautaires pour augmenter les apports en acide folique	34
A. Campagnes d'information, éducation nutritionnelle et supplémentation périsconceptionnelle.....	34
1. En Europe	34
1. <i>France</i>	34
2. <i>Royaume Uni</i>	34
3. <i>Irlande</i>	34
4. <i>Hollande</i>	34
2. USA	34
3. Canada.....	35
4. Australie et Nouvelle-Zelande	35
5. Mexique.....	35
6. Colombie	35
B. Enrichissement : expériences internationales	36
1. USA	36
1. <i>Vérification de la concentration en acide folique des produits enrichis</i>	36
2. <i>Impact sur les apports alimentaires</i>	36
3. <i>Impact sur les niveaux de folates plasmatiques et érythrocytaires</i>	36
4. <i>Modification de la prévalence des AFTN</i>	36
2. Canada.....	37
3. Amérique Centrale et Amérique du Sud.....	37
1. <i>Chili</i>	37
2. <i>Autres pays</i>	37
4. En Europe	38
C. Avis de l'Organisation Mondiale de la Santé pour l'Europe.....	38

2^{ème} partie : analyse de la situation française en 2002 et recommandations

I. Les bases de la décision de santé publique	41
A. Introduction	41
B. Stratégies envisageables pour la réduction des AFTN.....	41
C. Choix d'un vecteur alimentaire adapté	42
D. Une exigence de sécurité sanitaire : un enrichissement mixte en acide folique et vitamine B12.....	42
 II. L'établissement d'un programme d'enrichissement adapté à la situation française	 43
A. La farine panifiable et le pain.....	43
1. Marché intérieur français de la farine	43
2. Structures de représentation de la profession boulangère.....	43
3. Consommation de farine panifiable	43
4. Consommation de pain	44
B. Estimation des bénéfices attendus par l'enrichissement en vitamines B	44
1. Anomalies de fermeture du tube neural	44
1. <i>Méthode</i>	44
2. <i>Résultats de l'estimation</i>	45
2. Pathologies cardiovasculaires	47
1. <i>Méthode</i>	47
2. <i>Résultats de l'estimation</i>	47
C. Les effets de l'incorporation de vitamine B12	48
1. Introduction.....	48
2. Simulations dans l'étude INCA.....	48
3. Distribution de la carence en vitamine B12 chez des sujets âgés non-institutionnalisés	49
D. Les aspects technologiques et le choix des doses d'enrichissement.....	49
1. Les ajouts d'additifs dans le pain	49
2. Fixation de la vitamine B12 aux protéines du pain.....	50
1. <i>Methodologie</i>	50
2. <i>Résultats</i>	50
3. Stabilité à la cuisson des vitamines.....	51
1. <i>Bibliographie</i>	51
2. <i>Methodologie</i>	51
3. <i>Résultats concernant l'acide folique</i>	51
4. <i>Résultats concernant la vitamine B12</i>	52
4. Aspect du pain après enrichissement en vitamine B12.....	53
5. Homogénéité et traçabilité des vitamines incorporées dans la farine	53
6. Choix de la forme de vitamine B9	53
7. Choix des doses de vitamines.....	53
 III. Discussion	 54
A. Aspects éthiques	54
B. Acceptabilité des consommateurs et des professionnels	54
C. Aspects réglementaires	56
1. En France.....	56
2. En Europe	56
 IV. Conclusion : Nécessité d'un programme-Pilote d'enrichissement	 57

V. Proposition du programme-pilote en Alsace	58
A. Faisabilité de l'enrichissement en Alsace	58
1. Introduction.....	58
2. Marché de la farine et du pain en Alsace	58
1. <i>Farine</i>	58
2. <i>Consommation de pain</i>	59
B. Évaluation de l'intervention.....	59
1. Introduction.....	59
2. Épidémiologie des malformations congénitales concernées.....	60
1. <i>AFTN</i>	60
2. <i>Fentes labiales et labio-palatines</i>	60
3. Indicateurs de morbidité	61
1. <i>AFTN et cardiopathies ischémiques</i>	61
2. <i>Cancers</i>	61
4. Autres pathologies vasculaires.....	61
5. Surveillance des effets adverses.....	62
6. Enquêtes de population.....	62
1. <i>Objectifs</i>	62
2. <i>Principes méthodologiques</i>	62
3. <i>Variables mesurées</i>	63
7. Surveillance pratique de l'enrichissement	63
C. Perspectives d'évolution du programme-pilote durant les 5 années	63
D. Coût du programme-pilote	63
1. Coût de l'enrichissement	63
2. Coût de l'Évaluation	64
1. <i>Enquêtes de population</i>	64
2. <i>Registres, PMSI et coordination</i>	64
3. Communication	64
E. Études complémentaires nécessaires	64
VI. Synthèse et recommandations	65
VII. Références	67

A. Contexte

La prévalence des anomalies de fermeture du tube neural (AFTN) est estimée en France à 10/10 000 naissances vivantes et interruptions médicales de grossesse. Depuis les années 1980, il est démontré qu'une supplémentation en vitamine B9, ou acide folique, pendant la période périconceptionnelle, réduit de 40 à 75 % le risque de récurrence, mais aussi de premier épisode, des AFTN chez le fœtus. Cette supplémentation ne peut être efficace que si elle est appliquée durant les 4 semaines précédant la conception et poursuivie pendant 8 semaines.

En 1995 et 1997, la Société Française de Pédiatrie et le Collège National des Obstétriciens et Gynécologues de France ont émis des recommandations sur la prévention des AFTN, incitant à la supplémentation médicamenteuse en période périconceptionnelle par 4 à 5 mg/j chez les femmes avec un antécédent obstétrical d'AFTN et de 200 µg/j chez les femmes sans antécédent. En août 2000, des recommandations officielles ont été émises par la Direction Générale de la Santé pour donner une information claire aux professionnels de santé. Ces recommandations reprenaient la dose de 5 mg/j pour les femmes avec un antécédent obstétrical d'AFTN et celles qui sont traitées par certains médicaments anti-épileptiques, mais augmentaient la dose à 400 µg/j pour les femmes sans antécédent.

Cependant, compte tenu de la précocité de la période pendant laquelle la supplémentation est efficace (<4 semaines précédant la conception) et du fait que plus de 50 % des grossesses ne sont pas programmées, une action de santé publique uniquement axée sur la seule supplémentation semble insuffisante. Les différentes expériences internationales ont confirmé le faible impact de la promotion de la supplémentation individuelle.

Ainsi, quelques pays se sont déjà orientés, depuis plusieurs années, vers une mesure alternative de santé publique qui est l'enrichissement par la vitamine B9 d'un vecteur alimentaire, le plus souvent les farines, parfois seulement le pain ou les produits céréaliers.

Les Etats-Unis et le Canada ont rendu obligatoire, depuis le 1^{er} janvier 1998, l'introduction de 140 µg d'acide folique pour 100g de farine (à la rare exception des farines " biologiques " ne contenant aucun additif). La même année, la Hongrie a autorisé l'enrichissement du pain, sur une base volontaire. Depuis cette date, la plupart des pays d'Amérique du Sud et Centrale ont entrepris un enrichissement des farines à des concentrations variables.

La mesure d'enrichissement, s'étendant à l'ensemble de la population, permet effectivement d'augmenter l'apport en vitamine B9 des femmes au cours de la période cible de leur gestation, mais peut recevoir une justification d'une autre nature. En effet, de nombreux arguments semblent indiquer que l'augmentation des apports en vitamine B9 pourrait diminuer l'incidence des pathologies cardiovasculaires. De nombreux essais d'intervention en prévention sont en cours de réalisation afin d'établir une certitude scientifique sur ce point.

B. Objectifs

La problématique de l'enrichissement en vitamines B d'un vecteur alimentaire est à l'étude dans de nombreux pays (en particulier européens), mais n'a pas fait l'objet d'une analyse récente en France. Au-delà des aspects d'efficacité et de sécurité, l'acceptabilité, la faisabilité et l'évaluation d'une telle mesure de santé publique sont des éléments importants à considérer.

Dans le cadre du Programme National de Réduction des Risques Cardiovasculaires (2002-2005) du Ministère de la Santé, l'Afssa a été missionnée pour coordonner, en liaison avec l'InVS, un comité de pilotage qui a la charge d'élaborer un rapport définissant les modalités d'un enrichissement des farines en vitamines B dans une population déterminée, et de préciser les moyens de son évaluation en santé publique.

1^{ère} partie : état des connaissances

I. Anomalies de fermeture du tube neural (AFTN)

A. Définition et mécanismes de formation

Les anomalies congénitales les plus fréquentes sont les cardiopathies congénitales, les anomalies du tractus urinaire, la fente labiale et la fissure palatine, les anomalies des membres dont le pied-bot, et les anomalies de fermeture du tube neural (AFTN).

Lors du développement normal de l'embryon humain, le système nerveux se forme à partir de l'ébauche primitive de la peau. Au 17^e jour de gestation, 2 types de tissus embryonnaires se forment :

- Neuroblaste, ébauche du futur système nerveux,
- Epiblaste, ébauche de la future peau (derme et épiderme).

Le neuroblaste continue à s'épaissir pour donner une **plaque neurale** dont les bords vont se soulever, se rapprocher et finalement fusionner. Cette **fermeture du tube neural** est un phénomène essentiel qui se produit entre le 21^e et le 28^e jour de la gestation humaine.

Les AFTN correspondent à un défaut de fermeture, avant le 28^e jour de grossesse, du corps et des lames postérieures d'un ou de plusieurs arcs postérieurs de la vertèbre entourant le système nerveux central. Les AFTN les plus fréquentes sont le spina-bifida, l'encéphalocèle et l'anencéphalie.

Le spina-bifida se situe le plus souvent dans la partie lombaire ou sacrée du rachis, sur 2 à 3 vertèbres et parfois plus. La forme dite "aperta" est la plus sévère car elle désigne une ouverture dorsale (postérieure) des vertèbres associée à une atteinte plus ou moins prononcée de la moelle épinière. Il peut se former une poche au niveau cutané, contenant les méninges seules (méningocèle) ou associées à la moelle (myéломéningocèle).

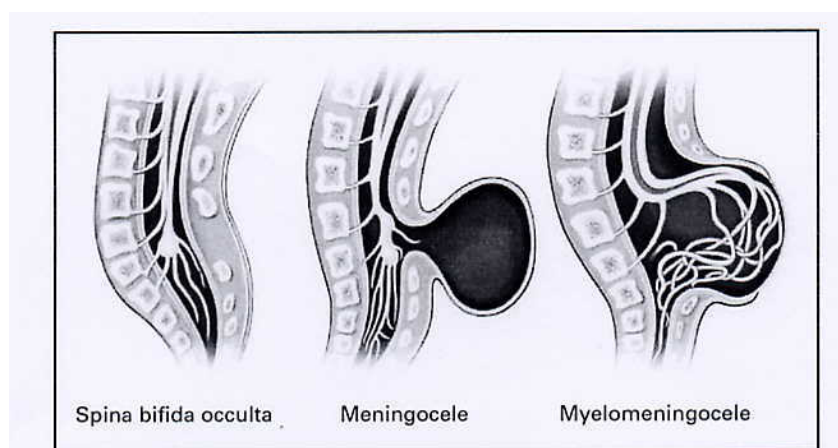


Figure 1. Vue latérale de 3 types de spina-bifida (Botto et al., NEJM 1999).

B. Survie et handicap des enfants vivants atteints d'une AFTN

Les plus graves des AFTN (anencéphalie) sont constamment mortelles et entraînent souvent un avortement spontané et une mortinatalité. Les affections les moins graves, comme l'encéphalocèle et le spina-bifida, ne sont pas habituellement mortelles. Le taux de survie à 1 an des enfants nés en Amérique du Nord est de plus de 90 %¹.

La pathologie séquellaire du myéломéningocèle est lourde avec un handicap multiple associant une paraplégie, une hydrocéphalie et une incontinence sphinctérienne urinaire et anorectale. Ces troubles sont d'intensité très variable selon le niveau de la lésion et son étendue. La majorité de ces enfants subissent des interventions chirurgicales parfois curatives.

Une étude a été menée pour définir le devenir des nouveau-nés porteurs de spina-bifida à partir des données du registre des malformations congénitales de Paris entre 1981 et 1988². Durant cette période, la fréquence de survenue du Spina-Bifida est restée constante. En revanche, le pourcentage des enfants nés vivants, la mortalité globale et la fréquence des handicaps moteurs sévères ont diminué, du fait d'un progrès du dépistage anténatal combiné avec celui de la chirurgie

néonatale. Cependant, cette diminution est également due à l'augmentation des interruptions médicales de grossesse pour les malformations dépistées durant cette même période.

Il existe 2 associations d'aide aux parents dont les enfants sont atteints de spina-bifida. Leur rôle est d'apporter de l'information aux familles et de sensibiliser les pouvoirs publics :

- ASBH : Association Spina Bifida et handicaps associés,
- FFASB : Fédération Française des Associations Spina Bifida.

C. Recueil des données : les registres de malformations congénitales

1. Définition

Un registre est un recueil continu et exhaustif de données individuelles, intéressant un ou plusieurs événements de santé dans une population géographiquement définie, à des fins de recherche et de santé publique, par une équipe ayant les compétences appropriées.

Dans le cas des registres de malformations congénitales, le risque d'erreur de diagnostic des AFTN est très faible, assurant une bonne qualité à l'enregistrement, à partir du moment où celui-ci recherche activement les cas dans une perspective d'exhaustivité.

2. Caractéristiques

Il existe en France 4 registres de malformations congénitales en activité (Tableau 1) :

- ◆ Paris,
- ◆ Centre Est (départements Rhône-alpes, Jura, côte d'Or, Nièvre, et Saône et Loire), avec individualisation de la région Auvergne,
- ◆ Bas-Rhin,
- ◆ Haut-Rhin.

Ils couvrent les naissances (enfants nés vivants et mort-nés) et les interruptions médicales de grossesse (IMG)³, soit environ :

- ◆ **170 000 naissances /an** (environ 1/4 des 774 800 naissances en 2001)⁴,
- ◆ **650 à 700 IMG/an pour anomalies congénitales.**

Au total, ils répertorient environ **4500 naissances ou fœtus mal formés/an**³.

Le Comité National des Registres (CNR), créé par arrêté le 10 février 1986, est placé sous la double tutelle des ministères chargés de la Santé (DGS) et de la Recherche (INSERM)⁵. Il est chargé de proposer une politique des registres, de donner un avis sur l'opportunité de créer de nouveaux registres, de maintenir ceux qui existent et de les financer. En janvier 2001, les registres du Centre Est et de Paris ont reçu le renouvellement pour 4 ans de leur qualification par le CNR.

Tous les registres, sauf celui du Haut-Rhin, appartiennent au réseau européen EUROCAT (European Registration of Congenital Anomalies and Twins) et au réseau international ICBDM (International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems). Le délai de recensement est d'environ 6 mois pour la majorité des cas recueillis dans une année. Par ailleurs, la définition des cas des registres en France est identique à celle qui a été adoptée à l'échelle européenne et internationale, ce qui permet une comparaison des données.

Tableau 1. Registres de malformations congénitales en activité en 2002

	Couverture : Naissances et IMG / an **	Nombre moyen de cas / an *	Qualification CNR	Participation à un réseau
Haut-Rhin (Dr. Meyer-Wipf)	9000	240	Non	Non
Bas-Rhin (Pr Stoll)	13 500	450	Non	EUROCAT ICBDMS
Paris (Dr. De Vigan)	38 000	1300	Oui	EUROCAT ICBDMS
Centre Est (Dr. Robert)	100 000	2000 à 2100	Oui	EUROCAT ICBDMS

Source : données fournies par chaque registre.

* Concerne l'ensemble des malformations congénitales,

** Interruption médicale de grossesse

3. Spécificité d'enregistrement

Les sources d'information sont multiples pour chaque registre : maternités, services de gynécologie obstétrique, néonatalogie, pédiatrie et chirurgie pédiatrique, laboratoires de cytogénétique ou foetopathologie. La multiplicité des sources et leur confrontation permet d'assurer une meilleure exhaustivité ainsi que d'améliorer la qualité des informations recueillies.

L'enregistrement concerne :

- ◆ Les fœtus ayant fait l'objet d'une **IMG** après diagnostic prénatal de malformation, quel que soit le terme (selon la législation française),
- ◆ Les fœtus **mort-nés** de 28 semaines d'aménorrhée (180 jours) ou plus (cette limite les différencie d'un avortement tardif),
- ◆ Les enfants **nés vivants**, pour qui la malformation a été dépistée en période prénatale, à la naissance ou en période néonatale.

D. Extrapolation des données

Les 4 registres couvrent actuellement environ 1/4 des naissances en France métropolitaine, permettant de fournir des informations spécifiques aux régions concernées. Les zones géographiques sont essentiellement localisées à l'est d'un axe nord-Sud.

Il n'existe pas de données issues de registre dans toute la partie Ouest de la France. Il se pourrait que l'incidence des AFTN soit relativement variable selon les régions françaises. Toutefois, cette absence de données ne peut modifier de façon majeure l'estimation de la prévalence faite à partir des registres existants, actuellement estimée à 10/10 000 naissances vivantes et interruptions médicales de grossesse.

E. Dépistage prénatal : influence de l'offre de soins sur la politique de prévention

1. Introduction

Le terme maximal de grossesse pour lequel une IMG est autorisée, et l'offre de dépistage prénatal sont variables suivant les pays. Ceci induit une variabilité dans les différentes stratégies de prévention primaire des AFTN.

2. Échographie obstétricale

En France, les femmes ont accès à 3 échographies obstétricales remboursées par la Sécurité Sociale durant leur grossesse aux 10^e, 20^e et 30^e semaines de gestation. L'intérêt de la dernière échographie est de permettre la détection d'anomalies congénitales qui n'étaient pas présentes ou pas diagnostiquées avant ce terme, comme l'hydrocéphalie, la microcéphalie ou des anomalies cardiaques. Elle permet aussi d'affiner le diagnostic d'une anomalie déjà détectée auparavant, mais pour laquelle il subsistait un doute. En cas de diagnostic tardif d'une anomalie congénitale grave, même non mortelle, il est possible d'avoir recours à une interruption médicale de grossesse (IMG) jusqu'au dernier trimestre de la grossesse.

Une étude multicentrique, soutenue par l'Union Européenne (projet Biomed II) a analysé l'évolution des prévalences des AFTN en liaison avec l'existence ou non de recommandations officielles dans 11 centres participants, européens et non européens⁶. Parmi les autres pays participant, la Hongrie, l'Italie et Israël sont les seuls à proposer ce même nombre d'échographies dans leur politique dépistage.

3. Dosage de l'alpha-foetoprotéine sérique

Une politique nationale de dépistage biochimique systématique chez la femme enceinte a été mise en œuvre en France en 1997, plus spécialement orientée vers le dépistage de la Trisomie 21, mais qui inclut aussi le dosage de l'alpha-foetoprotéine sérique⁶. Ce dosage doit être proposé pour des raisons légales à la femme enceinte lors de la 15^e semaine de gestation et doit être réalisé entre la 15^e et 18^e semaine. Concernant les pays appartenant au projet européen, pour la Finlande, la Norvège, le Portugal et l'Italie, le dépistage systématique national n'existe pas, mais

dépend des politiques régionales en la matière. En Hollande, l'obstétricien n'a pas le droit de proposer le dosage, qui doit être demandé par la femme enceinte elle-même. Enfin, aux USA, la pratique de l'échographie ou du dosage de l'alpha-foetoprotéine dépend exclusivement d'un accès, ou non, à un système de protection sociale pour la femme enceinte, c'est-à-dire en fait de son niveau de revenu économique⁶.

F. Impact psychologique pour les parents lors du dépistage d'une AFTN

Les pays les plus avancés dans leur pratique de dépistage des anomalies congénitales sont ceux pour qui la prévention secondaire, par la pratique d'une IMG des fœtus atteints, prévaut sur celle d'une pratique de prévention primaire.

À ce titre, la France fait partie des derniers pays à avoir mis en place une politique officielle de prévention primaire par la supplémentation individuelle orale en acide folique⁶. À l'opposé, dans les pays nordiques, une seule échographie est proposée aux femmes durant leur grossesse, l'offre de dosage de l'alpha-foetoprotéine est très limitée et le taux d'IMG est très bas, alors que des campagnes de promotion de la supplémentation individuelle ont été menées précocement. Ceci est en cohérence avec l'important développement d'une culture de prévention dans ces pays.

L'amélioration du dépistage in utero, combiné avec la possibilité offerte en France d'un recours possible à une IMG jusqu'au dernier trimestre de la grossesse, conduit à des situations difficiles pour les parents qui découvrent tardivement un fœtus mal formé.

G. Épidémiologie : situation actuelle et évolution

1. En France

1. AFTN

Il n'existe pas de données sur l'incidence des AFTN à l'échelle nationale. L'utilisation des registres de malformations congénitales pour l'estimation des données à la France entière est la seule source disponible.

Les données d'incidence sur la période considérée (1980 à 1998-1999), ainsi que les tendances d'évolution des incidences pour les registres appartenant au réseau EUROCAT, sont résumées dans le Tableau 2. Il est possible de faire l'hypothèse que la plus faible incidence pour le registre Centre Est s'explique par la taille de la région couverte qui limite les possibilités de recueil « actif » des cas. Ceci engendre vraisemblablement un sous-enregistrement des cas, et en particulier des IMG précoces pour anencéphalie. En revanche les taux de spina-bifida sont d'un ordre de grandeur comparable.

Tableau 2. Incidence (pour 10 000 naissances) des AFTN en France

Registres	Période	Nombre de cas sur l'ensemble de la période	Incidence cumulée **	Tendance
Centre Est*	1980-1999	961	5,1 (4,8-5,4)	Augmentation
Paris	1981-1999	827	11,8 (11,0-12,7)	Augmentation
Bas-Rhin	1982-1998	235	10,4 (9,1-11,8)	Stable

* Le statut dans le réseau EUROCAT est celui de « registre associé », ** Intervalle de confiance à 95 %

Source : rapport EUROCAT⁷

Le nombre de cas et l'incidence des AFTN dans chaque registre, pour l'année 1999, figurent dans le tableau 3.

Tableau 3. Nombre de cas et incidence des AFTN en 1999 dans les registres français.

	Nombre de cas *			Total	Incidence**
	Spina-bifida	Anencéphalie	Encéphalocèle		
Centre Est	31	15	16	62	6,2
Paris	21	27	10	58	15,0
Bas-Rhin	11	7	3	21	15,2
Haut-Rhin	7	2	2	11	11,2

* Nés vivants et morts nés, et IMG, ** pour 10 000 naissances.

Source : données fournies par chacun des registres.

2. Fentes labiales et labio-palatines

Ces anomalies viables sont aussi surveillées dans le cadre des registres. Elles peuvent constituer une source de données intéressantes à surveiller dans la mesure où, et bien que l'on ne dispose pour l'instant que de données d'observation, la fréquence de ces malformations pourrait être diminuée par la supplémentation en acide folique.

2. Autres pays

La surveillance des anomalies congénitales en Europe, pour la période 1980-1999, montre que l'incidence cumulée des AFTN dans les 28 registres européens qui y participent est de **10,9 /10 000 naissances** (intervalle de confiance à 95 % = 10,5-11,0)⁷. Les incidences du spina-bifida, anencéphalie et encéphalocèle sont, respectivement de : 5,4 ; 4,1 et 1,3 /10 000 naissances. En Europe, pour la période de 1980 à 1999⁷, les plus fortes incidences sont retrouvées en :

- ◆ Écosse (Glasgow) : 25,7 /10 000 naissances,
- ◆ Irlande (Dublin) : 21,9 /10 000 naissances,
- ◆ Angleterre (Wales) : 18,1 /10 000 naissances.

L'incidence des AFTN rapportée à partir de différentes sources aux USA indique un taux variant de 4 à 10 /10 000 naissances vivantes⁸. Il est estimé que 4 000 AFTN surviennent chaque année aux USA⁹⁻¹¹.

II. Vitamines B6, B9 et B12

A. Vitamine B6

Le terme “ vitamine B6 ” recouvre un ensemble de 6 composés, dont le PLP (pyridoxal 5'-phosphate)¹². Le PLP est le coenzyme d'une centaine d'enzymes participant au métabolisme des acides aminés. Par ailleurs, il est aussi le cofacteur de 2 enzymes qui régulent la voie de la transsulfuration de l'homocystéine en cystéine : la cystathionine β -synthase et la cystathionase (Figure 2). Cependant, son implication dans la prévention des AFTN n'a pas été mise en évidence.

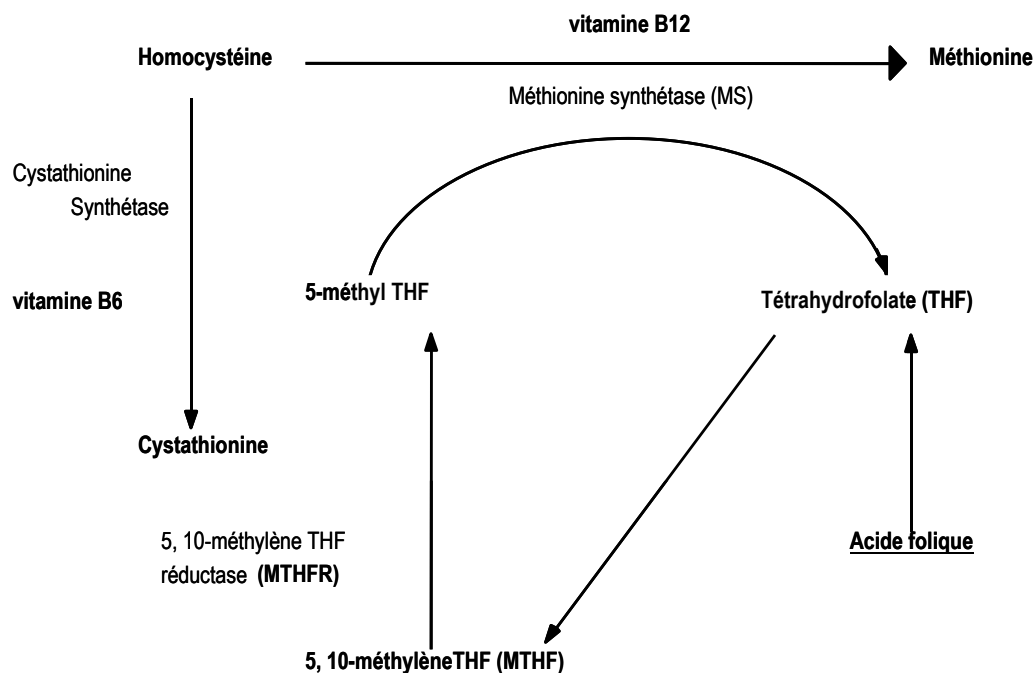


Figure 2. Vitamines et enzymes intervenant dans le métabolisme de l'homocystéine (ANC, Martin et al., 2001).

B. Vitamine B9

1. Métabolisme

1. Cycle biochimique

La molécule d'acide folique est l'acide ptéroyl monoglutamique (PGA)¹². Dans les aliments, il est représenté sous forme de polyglutamates, dénommés folates. Pour être métaboliquement active, la molécule doit être réduite par une enzyme, la dihydrofolate réductase (DHFR), en tétrahydrofolate (THF), qui est un transporteur d'unités monocarbonés.

Le 5,10-méthylène THF est réduit par la 5,10-méthylène THF réductase en 5-méthyl THF de manière irréversible. Le 5-méthyl THF est capable de céder son méthyle à l'homocystéine (Hcy) pour former de la méthionine grâce à la méthionine synthase, enzyme B12 dépendante. L'homocystéine située à un carrefour métabolique peut également être transsulfurée en cystéine via la cystathionine, ceci sous la dépendance d'enzymes B6 dépendantes (Figure 2).

2. Fonctions physiologiques

L'acide folique participe au métabolisme des acides aminés (dont la synthèse de la méthionine à partir de l'homocystéine), et des acides nucléiques¹². Du fait de son rôle dans la synthèse de l'ADN et de l'ARN, sa carence provoque un ralentissement des mitoses, avec notamment des troubles de la lignée rouge qui se manifestent par une anémie macrocytaire. Un apport suffisant est donc très important dans les situations d'activité métabolique intense, comme la grossesse et le

développement de l'enfant. Enfin, l'acide folique est impliqué dans le métabolisme cérébral et nerveux, dans la synthèse des neuromédiateurs...

3. Absorption et biodisponibilité

Pour être absorbés, les polyglutamates doivent être déconjugués par une enzyme des cellules de la partie proximale de l'intestin, au niveau du jéjunum¹². C'est sous la forme méthylée que le transport se fait dans le sérum. S'ensuit un cycle entéro-hépatique, qui permet une redistribution de la vitamine vers les tissus périphériques. La déméthylation est nécessaire pour permettre le cycle cellulaire des folates, ce qui ne peut se faire qu'en présence de vitamine B12. Le stock d'environ 4 mois est essentiellement hépatique, le reste des réserves est dans les globules rouges.

La **biodisponibilité des folates naturels** est incomplète lors de l'ingestion d'un repas varié, avec une absorption qui est **estimée entre 50 et 60 %**^{13 14}. Cependant, cette valeur est imprécise en raison du faible nombre de sujets généralement étudiés et de la variabilité des indices utilisés (taux de folates plasmatiques ou érythrocytaires, homocystéinémie)¹⁴. Lorsque la source alimentaire d'apport en folates est principalement constituée d'agrumes, en particulier de citrons, la biodisponibilité peut s'élever jusqu'à 60 à 90 %¹⁵ en comparaison à l'acide folique.

2. Statut biologique et nutritionnel de la population

Les données transversales de l'étude menée en 1988 auprès de 1039 sujets de 6 à 97 ans dans le Val-de-Marne indiquent des niveaux médians de folates plasmatiques entre 5,0 et 6,3 mg/l et de folates érythrocytaires entre 158 et 206 µg/l, selon l'âge¹⁶.

La consommation de la population, et particulièrement des femmes en âge de procréer en France, peut être estimée à partir des données de l'enquête INCA (Enquête Individuelle et Nationale sur les Consommations Alimentaires), réalisée en 1998-1999¹⁷. Dans le tableau 4, sont indiqués les apports moyens quotidiens en folates selon le sexe et l'âge. Des apports moyens similaires ont été retrouvés dans l'étude SUVIMAX sur un sous-échantillon d'hommes âgés de 45 à 60 ans (n=306) et de femmes (n=310) âgées de 35 à 60 ans : 360 ± 88 µg/j et 268 ± 91 µg/j¹⁸.

Tableau 4. Apports quotidiens en folates par l'alimentation en France (étude INCA)

	n	Moyenne µg/j	Ecart-type
Ensemble	1474	270,8	99,9
Hommes	672	296,6	102,6
15-24 ans	114	277,3	108,1
25-44 ans	263	282,1	86,4
45-64 ans	183	323,2	104,6
≥ 65 ans	112	306,9	117,3
Femmes	802	249,3	92,1
15-24 ans	140	218,7	77,6
25-44 ans	323	245,5	90,1
45-64 ans	206	268,8	96,4
≥ 65 ans	133	260,3	94,8
<i>Femmes utilisatrices de suppléments avec acide folique à dose nutritionnelle uniquement (< 4 mg)</i>	42	267,7	100,4

Les hommes ont des apports quotidiens moyens en folates supérieurs aux femmes. Dans l'échantillon (n = 1474), parmi le groupe des femmes en âge de procréer, aucune femme de la tranche d'âge 15-24 ans n'a des apports supérieurs à 400 µg/j, et 5 % seulement des femmes de 25 à 44 ans, alors que le seuil de 400 µg/j est généralement considéré comme la limite inférieure pour une protection efficace.

Les femmes qui consomment des suppléments multi-vitaminiques, contenant de la vitamine B9 à des doses nutritionnelles (n = 42) ont un apport total moyen peu différent des femmes non-consommatrices.

3. Apports Nutritionnels Conseillés

Les valeurs suivantes indiquent les ANC¹² pour différents groupes de population :

- Enfants de 1-3 ans, 4-6 ans, 7-9 ans et 10-12 ans : 100, 150, 200 et 250 µg/j,

- Adolescents de 13-15 ans, 16-19 ans et adolescentes de 16-19 ans : 300, 330 et 300 µg/j,
- Hommes adultes : 330 µg/j,
- Femmes adultes : 300 µg/j et femmes enceintes ou allaitantes : 400 µg/j.

Ces valeurs permettent de mettre en évidence le décalage qui existe en France entre les apports en vitamine B9 et les ANC, en particulier au regard de la population des femmes en âge de procréer.

4. Sources alimentaires

Les légumes verts et les fruits représentent les plus importantes sources de folates alimentaires. Les fromages, les œufs, mais aussi le foie et les graines sont des sources d'apport intéressantes. Le pain est un vecteur alimentaire intéressant car, bien que peu riche en folates ($\approx 20 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ de poids sec), il constitue un aliment de consommation courante. Les simulations issues de l'enquête INCA¹⁷ confirment que la consommation de pain et viennoiserie fabriqués avec de la farine de blé représente une source naturelle faible de folates. Pour une consommation moyenne de 87,3 g/j de « pain et viennoiseries », les apports en folates provenant de cette source sont, en moyenne, de 20,6 µg/j pour les femmes de 15 à 24 ans. Chez les 25 à 44 ans, 111,9 g/j de pain et viennoiseries apportent 25,6 µg/j de folates.

5. Innocuité

1. Toxicité de l'acide folique

L'acide folique est métabolisé dans la muqueuse intestinale en 5-méthyl tétrahydrofolate qui est la principale forme circulante dans le plasma, pouvant être captée par les cellules de l'organisme. Cette étape limitante d'activation de l'acide folique pourrait, en fait, limiter les effets secondaires des doses élevées d'acide folique qui sont éliminées par voie urinaire sans avoir été activées en 5-méthyl tétrahydrofolate. De fait, la toxicité de l'acide folique est faible. Aucun effet secondaire n'a été associé à la consommation de doses importantes de folates alimentaires^{19 20}. Des effets secondaires ne sont (rarement) notés que lors de l'ingestion de doses élevées, supra-nutritionnelles, de l'ordre de plusieurs milligrammes, d'acide folique sous forme de PGA (Pteroyl Glutamique Acide).

L'analyse des données issues d'un registre de toxicologie en Hongrie a montré l'absence de toxicité lors d'une intoxication aiguë par ingestion de doses massives (120 à 150 mg) d'acide folique chez 4 femmes enceintes²¹. Le suivi des enfants pendant les premières années de vie n'a pas non plus montré de toxicité. Bien que ces cas isolés n'apportent pas un haut niveau de preuve scientifique, ils constituent cependant une source d'information importante sur l'exposition à des doses massives durant la gestation.

2. Risques potentiels de masquage du déficit en vitamine B12

En dehors des rares carences d'apport, quasi-exclusivement rencontrées chez les végétariens stricts, les déficits en vitamine B₁₂ sont majoritairement secondaires à des défauts d'absorption. La forme classique est représentée par la maladie de Biermer : gastrite atrophique d'origine auto-immune entraînant la quasi absence de sécrétion d'acide chlorhydrique et de facteur intrinsèque. Dans cette pathologie, en raison de la quasi absence de facteur intrinsèque ; l'absorption active au niveau de l'iléon terminal est impossible, car elle nécessite impérativement la formation d'un complexe vitamine B₁₂/facteur intrinsèque. Seule une absorption passive le long de l'intestin grêle est possible mais celle ci ne concerne qu'environ 1% de la vitamine B₁₂ ingérée. Chez les sujets âgés, la forme la plus habituelle de déficit en B₁₂ n'est pas due à une absence totale de facteur intrinsèque mais à une moindre aptitude à libérer les molécules de vitamine B₁₂ des protéines alimentaires. Cette B₁₂ liée ne peut alors que partiellement être absorbée, activement ou passivement. Cette situation est directement en rapport avec l'hypo-achlorhydrie gastrique fréquemment observée chez les sujets âgés²². Il semble que cette pathologie, bien que décrite de longue date, a été longtemps sous estimée ; elle pourrait concerner jusqu'à 20 % des populations vieillissantes^{23 24}.

Les carences avérées en vitamine B₁₂ peuvent entraîner de nombreuses répercussions à la fois cliniques et biologiques : macrocytose, anémie, sclérose combinée de la moelle avec neuropathie potentiellement irréversible, démence²⁵⁻²⁷.

Un programme d'enrichissement en acide folique des farines peut créer potentiellement un effet adverse chez les sujets préalablement porteurs d'une hypovitaminose B₁₂. En effet, en cas de déficit en vitamine B₁₂, l'apport d'acide folique peut masquer les signes hématologiques de déficit en B₁₂ (la macrocytose et l'anémie), les signes hématologiques du déficit en vitamines B9 et B12 étant similaires, alors que les signes neurologiques continueraient de progresser jusqu'à un stade irréversible des lésions. De rares observations de cas de patients traités avec des doses supra-physiologiques d'acide folique, de l'ordre de 5 à 15 mg/j, corroborent ce type de résultats²⁰. Par ailleurs, il n'existe pas, à notre connaissance, de données signalant des cas de masquage de signes hématologiques pour des doses < 5 mg/j d'acide folique. Bien que cet effet adverse soit plus hypothétique que réellement démontré, il semble qu'il pourrait exister dès que la consommation en acide folique dépasserait le milligramme par jour pour certains²⁸ ou que l'apport additionnel d'acide folique, en plus de l'alimentation, dépasserait 1 milligramme pour d'autres²⁹.

3. Interaction avec les anticonvulsivants et l'épilepsie

Chez l'animal, des doses élevées d'acide folique sont épiléptogènes³⁰⁻³².

Au plan clinique, de fortes doses d'acide folique, de l'ordre de 7 mg, administrées par voie intraveineuse, augmentent la fréquence des crises d'épilepsie chez certains malades traités par les antiépileptiques, alors que, chez d'autres sujets, la perfusion intraveineuse de 75 mg d'acide folique était sans effet³³. Ces doses sont 30 à 300 fois supérieures aux doses de type nutritionnel.

4. Interaction avec les traitements antagonistes des folates

De nombreux médicaments sont impliqués dans le métabolisme des folates. On peut citer le méthotrexate, le triméthoprime, la colchicine ou la pyriméthamine, qui sont des molécules d'usage relativement courant. Les effets d'inhibition de leur efficacité ont été rapportés pour des doses d'acide folique > 27 mg/semaine, et sur des petites séries de patients²⁰. Ainsi, de la même façon, il existe peu d'information disponible décrivant des effets négatifs pour des doses d'acide folique < 5 mg/j. Notons tout de même un article récent faisant état de la nécessité de prescription de doses discrètement plus élevées de méthotrexate, en présence de supplémentation concomitante en acide folique à 1 mg/j, pour obtenir le même effet thérapeutique chez des sujets porteurs de rhumatisme inflammatoire³⁴. Dans le domaine de la cancérologie, certaines études fondamentales laissent supposer une moindre efficacité de certaines chimiothérapies antifoliques en présence d'administration concomitante d'acide folique³⁵.

5. Conclusion sur les effets secondaires possibles d'une augmentation de consommation d'acide folique

La complication potentielle la plus documentée d'une augmentation des apports totaux en folates par un enrichissement d'un vecteur alimentaire en population générale est celui du masquage du déficit pré-existant et non diagnostiqué en vitamine B12, en particulier chez le sujet âgé mal absorbant la vitamine B12 alimentaire. Cependant, alors que depuis janvier 1998, l'ensemble de la population aux USA et au Canada est exposé à un enrichissement généralisé en vitamine B9, depuis cette date aucune augmentation des cas de neuropathie périphérique n'a été rapportée, bien qu'aucun système de surveillance particulier n'ait été mis en place. Les autres effets adverses potentiels apparaissent comme moins probables, mais nécessitent tout de même une surveillance en cas de décision d'enrichissement d'un vecteur alimentaire. Concernant le problème du masquage du déficit en vitamine B12, une approche de type sécuritaire devrait être adoptée, selon l'avis unanime du Comité de Pilotage face à cette question par l'adjonction de faibles doses de vitamine B12 cristalline ajoutées à l'acide folique³⁶.

Un éditorial récent fait état de l'absence d'évaluation des effets adverses potentiels d'une augmentation des apports en acide folique en population générale, et de la nécessité d'une évaluation précise avant une éventuelle décision d'augmenter les taux d'enrichissement des farines aux Etats Unis³⁷.

6. Limites de sécurité des apports en France et en Europe

Compte tenu des données disponibles, le seuil de risque a été fixé pour une dose de 5 mg/j d'acide folique¹². Avec un coefficient de sécurité de 5, on aboutit à une **limite de sécurité** d'apport total de vitamine B9 de **1 mg/j**. Cette dose qui correspond à 2 à 3 fois les Apports Nutritionnels Conseillés (ANC) est considérée comme la limite supérieure de sécurité, que se soit en **France** (Afssa), en **Europe** (Scientific Committee on Food, Union Européenne) ou aux **USA** (Food and Nutrition Board, Institut of Medicine).

C. Vitamine B12 (cobalamines)

1. Métabolisme

1. Cycle biochimique et fonctions physiologiques

Il existe plusieurs formes chimiques particulières de vitamine B12¹². Deux sont des coenzymes impliquées dans le métabolisme chez l'homme : l'adénylcobalamine et la méthylcobalamine. Cette dernière forme est impliquée dans la réaction de synthèse de la méthionine à partir d'homocystéine (Figure 2).

2. Sources alimentaires, absorption et biodisponibilité

La vitamine B12, essentiellement synthétisée par des bactéries, est présente dans les aliments d'origine animale (viande, poisson, œufs et lait), sous forme liée à des protéines. Le pH acide de l'estomac va permettre la libération du support alimentaire. L'absorption digestive (iléon distal) nécessite la fixation à une autre protéine, le facteur intrinsèque (FI), qui est synthétisé par les cellules pariétales gastriques. Ce complexe se fixe à un récepteur spécifique à l'aide d'une protéine de liaison (la transcobalamine), pour permettre l'endocytose de l'ensemble (FI-B12). Il existe aussi un transfert passif (sans FI) d'environ 1 % de la dose ingérée.

3. Carence en vitamine B12

La prévalence de la carence en vitamine B12 est estimée dans des études d'observation transversales à 13 % en hôpital gériatrique³⁸, 4,8 % à 9,8 % en hôpital général³⁹ ou même 12 % en population générale²⁴. Une étude française a observé une prévalence de 3 % de taux plasmatique de B12 < 200 pg/ml, chez des personnes âgées volontaires (Dufouil C, données non publiées).

La carence en B12 s'accompagne classiquement d'une anémie macrocytaire, voire mégaloblastique, mais il existe des carences sans macrocytose, et même sans anémie. La véritable anémie de Biermer est rare. La principale étiologie est la gastrite atrophique par défaut de libération de la B12 alimentaire. Ce processus est physiologique avec le vieillissement et se manifeste sous la forme d'une hypochlorhydrie qui, en diminuant le pH de l'estomac, limite la libération du support protéique alimentaire, auquel est fixée la B12.

Tableau 5. Les principales étiologies des carences en B12.

Origine	Étiologie	Mécanisme impliqué
Gastrique	Anémie de Biermer	Absence de FI
	Anémie pernicieuse juvénile	
	Gastrectomie	
	Gastrite atrophique	Diminution de sécrétion du FI
Malnutrition	Végétaliens	Défaut de libération de la B12 alimentaire chez les sujets âgés
		Apports insuffisants

Chez le sujet sain

L'absorption de la vitamine B12 alimentaire est de l'ordre de 50 %^{40 41}. Cependant, cette estimation est partielle car il n'existe pas de données publiées sur l'absorption de la B12 en provenance de produits laitiers, ni de la plupart des poissons, ou viandes rouges.

La forme cristalline synthétique orale donnée à dose < 5 µg, aurait une absorption de 60 %⁴¹. À dose ≥ 500 µg, en présence d'aliments ou en solution, l'absorption serait de 0,5 à 1 %^{40 42 43}.

Chez les sujets avec une hypochlorhydrie gastrique

En cas d'atrophie gastrique, il existe une diminution de l'absorption de la vitamine B12, mais nous n'avons pas pu trouver de données sur une éventuelle liaison aux protéines végétales (du pain en particulier).

Chez les patients présentant une anémie de Biermer (déficit complet en facteur intrinsèque), l'absorption de B12 naturelle ou synthétique à faible ($< 5 \mu\text{g}$)⁴¹ ou forte ($\geq 500 \mu\text{g}$)⁴² dose, ne dépasse pas 1 % (diffusion passive)³⁶.

3. Apports Nutritionnels Conseillés

Les valeurs suivantes indiquent les ANC¹² pour différents groupes de population :

- ◆ De 1-3 ans, 4-6 ans, 7-9 ans, 10-12 ans et 13 à 15 ans : 0,8 ; 1,1 ; 1,4 ; 1,9 et 2,3 $\mu\text{g}/\text{j}$,
- ◆ À partir de 16 ans, y compris personnes âgées : 2,4 $\mu\text{g}/\text{j}$,
- ◆ Femmes enceintes : 2,6 $\mu\text{g}/\text{j}$,
- ◆ Femmes allaitantes : 2,8 $\mu\text{g}/\text{j}$.

Les données chez l'enfant sont issues d'estimation, car il n'existe pas de données épidémiologiques dans cette tranche d'âge.

3. Innocuité

Aucune toxicité n'a été imputée à la vitamine B12. Il n'existe donc pas de limite supérieure de sécurité, que se soit en France (Afssa), en Europe ou aux USA.

III. Prévention des AFTN par l'acide folique

A. AFTN

Définition : La prévention primaire correspond à la prévention d'un premier épisode et/ou de la récurrence d'une AFTN. La prévention secondaire se réfère à la pratique d'une IMG pour une AFTN chez une femme enceinte.

Depuis 1981, on dispose d'études sur la relation entre la prise d'acide folique et le risque de survenue de premier épisode ou de récurrence d'AFTN⁴⁴. Depuis le premier essai randomisé contrôlé en double-aveugle⁴⁴, de nombreuses études d'observation ont été réalisées sur de larges échantillons⁴⁵⁻⁵⁰. Toutes, sauf une⁴⁸, ont mis en évidence une diminution du risque d'AFTN jusqu'à 71 % dans les études de cohorte (RR = 0,29 ; IC_{95%} : 0,15-0,55)⁴⁵, jusqu'à 75 % (OR = 0,25, IC_{95%} : 0,14-0,62) dans les études cas-témoins⁴⁷. Toutes ces études, résumées dans le tableau 6⁴⁵⁻⁵⁰, ont porté sur une supplémentation débutée au moins 1 mois avant la conception, avec des doses d'acide folique de 0,4 à 1 mg/jour.

Tableau 6. Résultats de la prévention des AFTN dans les études d'observation.

	Plan d'étude	Effectifs des cas (C) ou exposés (E) et des Témoins (T)	AFTN / grossesses (‰) Risque Relatif (IC 95%) *
Boston (USA) ⁴⁵ 1989	- Cohorte prospective - 22,776 grossesses recrutées à 16 semaines (dosage α -foeto-protéine ou échographie)	E : 0,1 à 1 mg AF + MV T : MV sans AF Prise < 6 ^e semaine de grossesse	E : 10 / 10,713 (9 ‰) T : 39 / 11,944 (33 ‰) RR = 0,29 (0,15-0,55)
Atlanta (USA) ⁴⁶ 1988	- Cas et témoins issus d'un registre - Grossesse sans antécédent d'AFTN	C : 347 AFTN T : 2829 témoins sains - \geq 1mois avant conception et fin du 1 ^e trimestre Dose non disponible	0,40 (0,25-0,63)
Ouest Australien ⁴⁷ 1989	- Cas et témoins issus d'un registre - Grossesse sans antécédent d'AFTN	C : 77 AFTN T : 154 témoins sains \geq 1mois avant conception et fin du 1 ^e trimestre de folates alimentaires et suppléments (dose inconnue).	0,25 (0,14-0,62) (Comparaison du quartile le plus élevé / le plus bas)
Californie et Illinois ⁴⁸ 1989	- Cas et témoins issus de registres - Grossesse sans antécédent d'AFTN	C : 571 AFTN T1 : 546 autres malformations et mort-nés T2 : 573 normaux - Dose non disponible \geq 1mois avant conception et 45 jours après.	0,95 (0,78-1,14)
Boston, Philadelphie, Toronto ⁴⁹ 1993	Recrutement dans les maternités	C : 436 AFTN T : 2615 autres malformations - \geq 1mois avant conception et fin du 1 ^e mois Dose : 0,4 à 1 mg	0,40 (0,20-0,60)
Californie ⁵⁰ 1995	- Cas issus d'un registre de malformations congénitales - Témoins normaux hospitaliers	C : 549 AFTN T : 540 normaux - 3 mois avant conception Dose : 0,4 à 0,8 mg (mal définie)	0,65 (0,45-0,94)

* Odds-Ratio dans les études cas-témoins. AF : acide folique, MV : multivitamines, OE : oligo-éléments.

Pour la prévention de premier épisode d'AFTN (tableau 7)^{51 52}, un seul essai randomisé contrôlé en double aveugle est disponible depuis 1992⁵². Réalisé chez des femmes planifiant une grossesse, avec une dose quotidienne de 0,8 mg d'acide folique, les auteurs ont retrouvé un effet protecteur dans la prévention du premier épisode d'AFTN.

Depuis, une étude d'intervention nutritionnelle en population générale dans 2 régions de Chine⁵², a porté sur plus de 247,000 femmes recrutées au moment de leur examen prénuptial, et supplémentées par 0,4 mg/j d'acide folique⁵¹. Dans la région Nord, de plus forte prévalence des AFTN (50/10 000 naissances), une réduction du risque de 79 % était retrouvée, alors que dans la région Sud, de prévalence plus faible (10/10 000), il a été observé une réduction du risque de 41 %, en comparant dans les 2 cas les femmes ayant effectivement pris la supplémentation, par rapport aux autres femmes non supplémentées.

Tableau 7. Résumé chronologique des essais de prévention du premier épisode d'AFTN par l'acide folique

	Plan d'étude	Exposés (E) Témoins (T)	Résultats : AFTN /grossesses (%)	Risque Relatif (IC 95%)
Hongrie⁵² 1992	- R/C/DA 4753 femmes planifiant une grossesse	E : 0,8 mg AF + MV +OE T : OE > 1 mois avant conception	E : 0/ 2104 (0) T : 6 /2052 (2,9)	OR = 0 (0,0-0,91)
2 régions de Chine⁵¹ 1999	- 2 régions de Chine - Femmes au moment de l'examen prénuptial	E : 0,4 mg AF T : Rien ≥ Dernières menstruations et fin du 1 ^{er} trimestre	E : 102 /130,142 (0,78) T : 173 /117,689 (1,47)	0,53 (0,42 - 0,68)
<i>Région Nord</i>	Prévalence élevée (5 ‰)	-----	E :13 /13,012 (1,0) T : 16 / 3,318 (4,8)	0,21 (0,1-0,43)
<i>Région Sud</i>	Prévalence faible (1 ‰)	-----	E : 34 /58,638 (0,6) T : 28 /28,265 (1,0)	0,59 (0,36-0,97)

R :Randomisé, C : contrôlé, DA : double aveugle.

AF : acide folique, MV : multivitamines, OE : oligo-éléments.

Enfin, en prévention des récurrences d'AFTN (tableau 8)^{44 53-56}, tous les essais randomisés, contrôlés en double aveugle, ont aussi retrouvé de manière unanime un effet protecteur de la supplémentation.

Sur les 2 essais multicentriques^{53 54} qui ont mis en évidence un effet protecteur significatif sur la récurrence de survenue d'AFTN, un seul⁵⁴ a testé l'effet de l'acide folique à la dose de 4 mg/j, combiné ou non avec un complexe de multivitamines. Comme initialement prévu dans le protocole, l'essai de supplémentation a été arrêté du fait d'une réduction significative du risque de 72 % (RR = 0,28 ; IC_{95%} : 0,12-0,71). Il a fallu attendre plus de 10 ans pour que l'importance de la supplémentation en acide folique dans la prévention des récurrences des AFTN soit effectivement reconnue.

En France, depuis août 2000, des recommandations ont été émises par la Direction Générale de la Santé, incitant à la prescription de 5 mg/j d'acide folique pour les femmes avec un antécédent obstétrical d'AFTN ou celles qui sont traitées par certains médicaments antiépileptiques. Pour les femmes sans antécédents d'AFTN, il est recommandé une supplémentation individuelle à la dose à 0,4 mg/j.

Cas particulier du taux plasmatique en vitamine B9 ou B12 et risque d'AFTN

Une étude cas-témoins a analysé la relation entre le taux plasmatique de vitamine B12 et le taux plasmatique et érythrocytaire de folates et plasmatique de B12, chez des mères ayant accouché d'enfants porteurs d'AFTN (n=81), en comparaison à des mères ayant accouché d'enfants normaux (n=247)⁵⁷. En comparaison au niveau le plus élevé, le niveau plasmatique bas de vitamines B9 et B12 étaient des facteurs de risque indépendants de survenue d'AFTN : OR = 5,4 (IC_{95%} :1,2-25,2).

Une récente hypothèse a été émise concernant la possible implication de la déplétion en folates plasmatiques et érythrocytaires dans la survenue d'AFTN lors de grossesses rapprochées dans le temps (< 6 mois)⁵⁸. Les folates plasmatiques et érythrocytaires diminuent à partir du 5^e mois de grossesse jusqu'après l'accouchement. Ainsi, en l'absence d'apports suffisants, le statut biologique de la mère lors de la 2^e grossesse est plus bas qu'avant la première grossesse. Par conséquent, l'exposition du fœtus à une carence en folates lors de la grossesse suivante est augmentée, et ainsi le risque d'AFTN est lui aussi augmenté.

Tableau 8. Résumé chronologique des essais de prévention de la récurrence d'AFTN par l'acide folique (femmes ayant un antécédent de grossesse avec AFTN)

	Plan d'étude	Exposés (E) Témoins (T)	Résultats : AFTN / grossesses (%)	Risque Relatif (IC 95%)
Pays de Galle⁴⁴ 1981	- R/C/DA	E : 4 mg AF T : Placebo ≥ 1 mois avant conception et 1 ^{er} trimestre	E : 2 / 60 (33) T : 4 / 51 (78)	0,42 (0,10-2,67) Non significatif
Royaume-Uni⁵³ 1983	- Multicentrique	E : 0,36 mg AF + MV T : Rien ≥ 1 mois avant conception et fin du 1 ^{er} trimestre	E : 2 / 254 (7,9) T : 11 / 219 (50,2)	0,16
Cuba⁵⁶ 1990		E : 5 mg AF T : Rien ≥ 1 mois avant conception et fin du 1 ^{er} trimestre	E : 0 / 81(0) T : 4 / 114 (35)	OR = 0 (0,0-2,22) Effet protecteur non significatif
MRC⁵⁴1991	- R/C/DA- Multicentrique	E _A : 4 mg AF E _B : 4 mg AF + MV E _C : Placebo E _D : Rien ≥ 1 mois avant conception et fin du 1 ^{er} trimestre	E _A : 2 / 298 } E _B : 4 / 295 } E _C : 13 / 300 } E _D : 8 / 302 } 35	10,1 0,28 (0,12-0,71)
Irlande⁵⁵ 1992	- R/C/D (partiel) * - Multicentrique	E _A : 0,36 mg AF E _B : 0,36 mg AF + MV E _C : MV E _D : Rien ≥ 2 mois avant conception et fin 3 ^e menstruations	E _A : 0 / 85 (0) E _B : 0 / 87 (0) E _C : 1 / 89 (11,2) E _D : 3 / 103 (29)	OR = 0 (0,0-1,36) Essai interrompu avant la fin (Recrutement insuffisant)

R : Randomisé, C : contrôlé, DA : double aveugle.

AF : acide folique, MV : multivitamines, OE : oligo-éléments.

* Groupe contrôle recruté après la randomisation. ** Données combinées.

B. Influence du terrain génétique

Les résultats des études d'observation ou des essais randomisés montrent que la supplémentation peut prévenir une part des AFTN, au maximum 70 %. Le terrain génétique, en particulier, pourrait prédisposer les femmes enceintes à une susceptibilité différente vis-à-vis de la supplémentation⁵⁹. La mutation " C-T 677 " du gène de l'enzyme MTHF réductase a notamment été étudiée⁶⁰⁻⁶⁴. Cette hétérogénéité dans la réponse des AFTN à l'acide folique, en fonction du terrain génétique, plaide en faveur d'une évaluation d'une politique d'enrichissement spécifique à chaque pays⁵⁰.

C. Autres malformations congénitales

1. Études d'observation

Différentes estimations du risque de la survenue de fentes labiales ou labio-palatines selon l'exposition à différentes doses d'acide folique contenues dans les suppléments multivitaminiques ont montré un effet protecteur systématique sauf pour une étude⁶⁵ :

- ◆ 19 % (OR = 0,81 ; IC_{95%} : 0,67-0,98) avec 3 mg/j⁶⁶,
- ◆ 30 % (OR = 0,70 ; IC_{95%} : 0,4-1,1) avec 0,4 mg/j⁶⁷,
- ◆ 48 % (OR = 0,52 ; IC_{95%} : 0,34-0,48), pour des doses allant de 0,4 à 0,8 mg/j⁶⁸,
- ◆ 50 % (OR = 0,50 ; IC_{95%} : 0,36-0,68) pour des doses allant de 0,4 à 0,8 mg/j⁶⁹,
- ◆ 65 % (OR = 0,35 ; p = 0,03) avec 10 mg/j⁷⁰,
- ◆ OR = 1,2 ; (IC_{95%} : 0,7-2,0)⁶⁵, dose non disponible.

Une étude cas-témoins⁷¹ a analysé le risque d'AFTN chez les femmes exposées à des traitements anti-convulsivants (trimétoprime, carbamazépine, phénobarbital, phénytoïne...) au moment de leur grossesse, en fonction de l'exposition à l'acide folique contenu dans des comprimés multivitaminiques. Les risques relatifs d'anomalies cardiovasculaires, de fentes palatines, et d'anomalies du tractus urinaire étaient respectivement de : RR = 2,2 (IC_{95%} : 1,4-3,5), 2,5 (IC_{95%} : 1,5-4,2) et 2,5 (IC_{95%} : 1,2-5,0) ; lors d'une exposition à ces traitements. Ce risque était fortement

diminué si les analyses étaient restreintes aux femmes qui prenaient simultanément de l'acide folique sous forme de comprimés multivitaminiques (0,4 mg/j).

2. Études expérimentales

Une méta-analyse des essais randomisés contrôlés⁷², utilisant des doses d'acide folique de 0,36 mg/j à 4 mg/j^{54 55 73}, n'a pas mis en évidence de relation significative entre la prise d'acide folique et la survenue des malformations suivantes :

- ◆ Anomalie d'un membre : RR = 0,59 ; (IC_{95%} : 0,04-8,34),
- ◆ Anomalies des cavités et des orifices cardiaques (ex : transposition de l'aorte ou transposition des gros vaisseaux) : RR = 0,74 ; (IC_{95%} : 0,16-3,32),
- ◆ Fentes labiales ou labio-palatines : RR = 0,76 ; (IC_{95%} : 0,24-2,37),
- ◆ Toutes malformations combinées : RR = 0,76 ; (IC_{95%} : 0,38-1,51).

Bien que tous ces résultats montrent un effet protecteur, la puissance de ces études n'était pas suffisamment élevée pour conclure définitivement.

D. Fertilité, parité et survie foétale

1. Études d'observation

Une méta-analyse des études cas-témoins publiées entre 1966 et 1999⁷⁴ a montré qu'un taux plasmatique bas en folates était un facteur de risque de fausse-couche et de récurrence de fausse-couche (OR = 3,4 ; IC_{95%} : 1,2-9,9). Pour le risque de fausse-couche, une récente étude cas-témoins a confirmé le sens de ces résultats : OR = 1,47 (IC_{95%} : 1,01-2,14), pour un taux de folates plasmatiques bas ($\leq 4,9$ nmol/l), en comparaison aux femmes avec un taux plus élevé (entre 5,0 et 8,9 nmol/l)⁷⁵.

2. Études expérimentales

La même méta-analyse de la base Cochrane citée précédemment⁷² a quantifié le risque des différents événements de la grossesse suivant la prise d'une supplémentation ou non. Aucune association n'a été retrouvée concernant les événements suivants :

- ◆ Modification de la fécondité : RR = 1,02 ; (IC_{95%} : 0,97-1,07),
- ◆ Fausse-couche : RR = 1,12 ; (IC_{95%} : 0,98-1,29),
- ◆ Grossesse ectopique : RR = 1,09 ; (IC_{95%} : 0,47-2,55),
- ◆ Morts-nés : RR = 0,78 ; (IC_{95%} : 0,34-1,78),
- ◆ Grossesse multiple : RR = 1,40 ; (IC_{95%} : 0,93-2,11).

L'augmentation non significative de 40 % du risque de grossesse multiple, avait fait l'objet de critiques méthodologiques en particulier dans le cas de l'essai Hongrois⁷³. En effet, un taux plus important de femmes du groupe " multivitaminées " avaient reçu des injections de clomifène pour stimuler l'ovulation dans le cadre d'un traitement de la stérilité, en comparaison au groupe contrôle. De plus, dans les 2 groupes, le taux de grossesses multiples était largement supérieur à celui de la population générale dans ce pays. Des analyses basées sur la combinaison des données de l'essai MRC⁵⁴, et d'une étude d'observation prospective dans laquelle les femmes sous traitement pour infertilité ont été exclues⁷⁶, n'a pas retrouvé de différence dans le taux de grossesses multiples chez les femmes prenant de l'acide folique ou non ($p=0,59$)⁷⁷.

E. Hypertension gravidique

Une étude cas-témoin sur 2100 femmes aux USA et Canada entre 1993 et 2000 a analysé les relations entre la prise d'acide folique contenu dans les suppléments multivitaminiques et la survenue d'une hypertension durant la grossesse⁷⁸. Le risque d'hypertension lors de la grossesse était de 0,55 (IC_{95%} : 0,39-0,79) chez les femmes qui avaient pris de l'acide folique dans le mois précédent l'événement en comparaison aux femmes non supplémentées. Bien que préliminaires, ces résultats protecteurs sont difficiles à interpréter car, d'une part, la concentration en acide folique dans ces suppléments n'était pas connue et, d'autre part, les fausses couches et les grossesses avec enfants malformés ont été exclues des analyses.

IV. Autres effets bénéfiques potentiels de l'acide folique

A. Introduction

En marge des effets démontrés de l'acide folique sur la prévention des AFTN et un effet supposé sur d'autres malformations congénitales, plusieurs autres effets préventifs sont attendus. En particulier, de nombreuses études mettent en évidence un effet protecteur de l'acide folique sur les pathologies cardiovasculaires coronariennes et les accidents vasculaires cérébraux, mais aussi sur la préservation des fonctions cognitives et la maladie d'Alzheimer, ainsi que sur certains cancers.

B. Pathologies cardiovasculaires

1. Apports alimentaires et taux plasmatique d'homocystéine

1. Études d'observation

Plusieurs études d'observation ont mis en évidence l'existence d'une relation significative entre la prise alimentaire de folates et la baisse des taux plasmatiques d'homocystéine chez des sujets âgés de 20 à 65 ans^{79 80}, et de 66 à 94 ans⁸¹.

Une analyse du statut biologique des sujets de la cohorte de Framingham⁸², avant et après la mise en place de l'enrichissement obligatoire aux USA à 140 µg/100 g de farine, a montré une diminution moyenne de l'homocystéine plasmatique de 0,7 µmol/l (10,1 à 9,4 µmol/l), conduisant à une baisse de 50 % des sujets avec un taux > 13 µmol/l, considérés classiquement comme « à risque ».

2. Études expérimentales

Pour des apports totaux en folates compris entre 0,5 et 5 mg/j : une méta-analyse⁸³ a montré que le pourcentage de réduction de l'homocystéine (Hcy) plasmatique était indépendant du niveau d'apports supplémentaires et plafonnait à 25 %.

Pour des apports en folates < 0,5 mg/j : il n'existe pas de résultats à partir de méta-analyse. Cependant, pour les estimations de réduction du risque cardio-vasculaire (cf. infra), il a été fait l'hypothèse dans ce rapport qu'il existe une relation linéaire entre le pourcentage de réduction de l'Hcy et les apports supplémentaires.

Les différents essais randomisés qui ont testé l'impact d'un apport en acide folique sous forme de suppléments vitaminiques⁸³⁻⁹⁵, de céréales enrichies^{96 97} ou sous la forme d'une intervention nutritionnelle par des conseils diététiques⁹⁸, montrent une diminution systématique de l'homocystéine (Hcy) plasmatique, mise en évidence sur la figure 3.

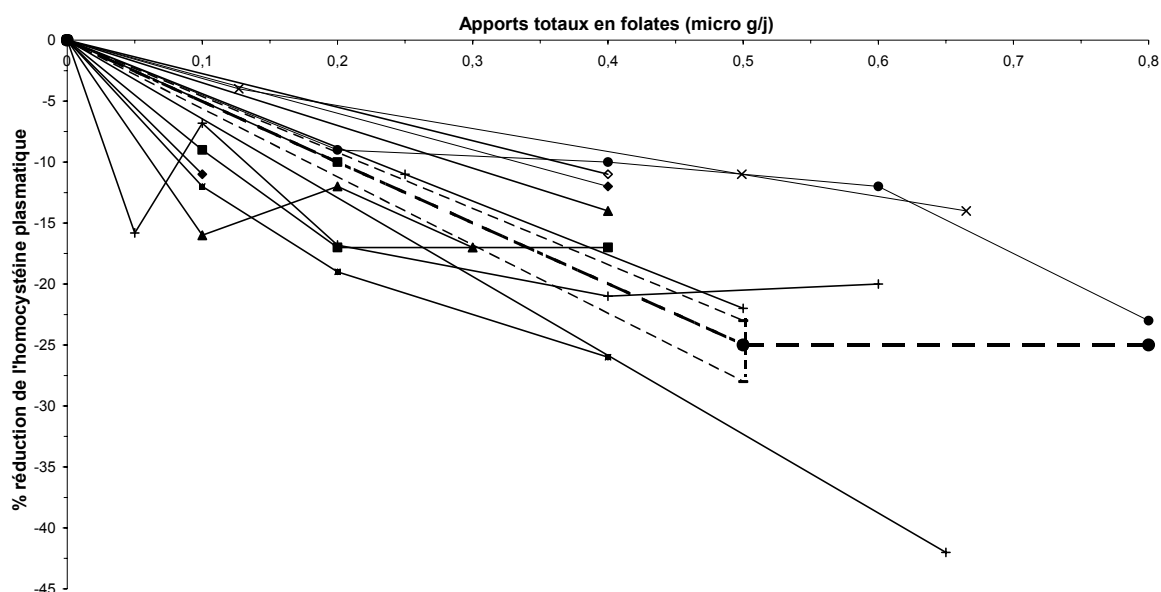


Figure 3. Relation entre l'apport total supplémentaire en folates et la réduction de l'homocystéine plasmatique

L'hypothèse de linéarité n'apparaît pas déraisonnable, et la droite : % réduction Hcy = 0,5 x Δ apports en folates (mg/j), conduisant à une réduction de 25 % pour un apport supplémentaire de 0,5 mg/j, semble fournir l'ordre de grandeur de l'effet recherché à des doses inférieures à 0,5 mg/j.

2. Apports alimentaires et risques cardiovasculaires

On dénombre 5 études d'observation qui ont mis en relation directement les apports alimentaires en folates avec le risque cardiovasculaire : 2 cas-témoins^{99 100} et 3 études de cohorte¹⁰¹⁻¹⁰³. Pour des apports supplémentaires identiques (120 à 150 μ g/j), on observe une réduction très variable du risque selon les études, entre 12 à 56 % pour l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral.

L'estimation « directe » de la réduction du risque cardiovasculaire par des apports alimentaires supplémentaires en folates, supposé ayant un effet causal, est de ce fait très imprécise pour des quantités inférieures à 1 mg/j. L'estimation « indirecte » à partir de l'effet, supposé causal, d'un abaissement de l'Hcy plasmatique a été jugée préférable.

3. Taux plasmatique d'homocystéine et risques cardiovasculaires

1. Études d'observation

Il existe un grand nombre d'études d'observation qui mettent en relation le niveau plasmatique d'homocystéine (Hcy) et différents indicateurs du risque cardiovasculaire. Les 6 méta-analyses disponibles¹⁰⁴⁻¹⁰⁹, présentent une hétérogénéité quant à leurs résultats. En effet, la réduction du risque des pathologies cardiovasculaires en fonction du taux plasmatique d'Hcy semble plus forte lorsqu'elle est estimée à partir d'études cas-témoins, du fait du biais de dilution de régression¹¹⁰.

La méta-analyse la plus récente¹⁰⁶ a utilisé un coefficient de correction pour tenir compte de ce biais dans l'analyse des études rétrospectives (cas-témoins) et prospectives (études cas-témoins nichées dans une cohorte et cohortes). Ainsi, pour une diminution de 25 % du taux d'Hcy plasmatique, la méta-analyse indique une réduction du risque estimée à partir des études prospectives de :

- ◆ 19 % pour les accidents vasculaires cérébraux (OR = 0,81 ; IC_{95%} : 0,69-0,95).
- ◆ 11 % pour les cardiopathies ischémiques (OR = 0,89 ; IC_{95%} : 0,83-0,96).

Plusieurs études d'observation ont montré dans différentes populations que l'augmentation de l'Hcy plasmatique était un facteur de risque d'artériopathie des membres inférieurs^{111 112}. Une étude cas-témoins multicentrique a montré que le quintile supérieur d'Hcy plasmatique était un facteur de risque de pathologie vasculaire périphérique (RR = 2,2 ; IC_{95%} : 1,6-2,9), en comparaison aux 4 quintiles les plus bas¹¹³.

2. Étude expérimentale disponible

Un seul essai randomisé contrôlé en double aveugle a testé l'effet d'un complexe multivitaminique avec 1 mg d'acide folique, 400 μ g de vitamine B12 et 10 mg de vitamine B6 sur la resténose coronarienne à 6 mois¹¹⁴ et 1 an¹¹⁵ en prévention secondaire, post-angioplastie. Une diminution significative du taux plasmatique d'homocystéine et du taux de resténose coronarienne était observée à 6 mois¹¹⁴. À 1 an¹¹⁵, le taux de revascularisation des lésions en cause dans le groupe traité était significativement diminué de 38 % (IC_{95%} : 0,40-0,97).

Ces résultats concernent des patients en prévention secondaire, avec des doses élevées d'acide folique, associées à des vitamines B6 et B12. Ils constituent les premières preuves directes dans le cadre d'un essai thérapeutique randomisé, de l'efficacité de l'acide folique en pathologie coronaire. À ce jour, on ne dispose d'aucun essai randomisé contrôlé testant l'effet d'une diminution de l'homocystéine sur le risque cardiovasculaire. De nombreux essais de prévention sont en cours, sur plus de 50 000 patients¹¹⁶. Les caractéristiques de ces études sont résumées dans le tableau 9. Dans toutes les autres études d'intervention basées sur des critères intermédiaires de jugement, aucun effet adverse imputable à la supplémentation vitaminique B n'a été rapporté, quelle qu'en soit la posologie.

Tableau 9. Essais randomisés en cours sur l'effet d'une diminution de l'homocystéine sur le risque cardiovasculaire.

Études	Population	Date de début	Effectif
Bergen Vitamin Study	AVC (Norvège)	1997	2 000
Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS-2)	IM*, angor instable (USA)	1998	4 000
Heart Outcomes Prevention Evaluation study (HOPE-2)	Pathologie vasculaire artérielle (Canada)	1999	5 000
Norwegian Study of Homocysteine Lowering with B-Vitamins in Myocardial Infarction (NORVIT)	IM* (Norvège)	1998	3 000
Prevention with a Combined Inhibitor and Folate in Coronary Heart Disease study (PACIFIC)	Pathologie vasculaire artérielle (Australie)	1998	10 000
Study of the Effectiveness of Additional Reductions in Cholesterol and Homocysteine (SEARCH)	IM* (Royaume-Uni)	1998	12 000
Vitamins in Stroke Prevention trial (VISP)	AVC (USA)	1998	3 600
VITamins TO Prevent Stroke study (VITATOPS)	AVC (Australie)	1999	5 000
Women's Antioxidant and Cardiovascular disease Study (WACS)	Pathologie vasculaire artérielle (USA)	1998	8 000

* Infarctus du myocarde

C. Autres effets attendus

1. Thrombose veineuse

L'augmentation de l'homocystéine plasmatique est associée à une augmentation du risque de thrombose veineuse^{117 118}. Une méta-analyse des 26 études rétrospectives de type cas-témoins disponibles sur la relation entre l'Hcy plasmatique et le risque de thrombose veineuse, a montré qu'une diminution de 3 µmol/l de l'Hcy avait pour effet une diminution du risque de thrombose veineuse de 25 % (IC_{95%} : 8-38 %) ¹⁰⁹.

2. Fonctions cognitives et maladies d'Alzheimer

Plusieurs études d'observation transversales ont mis en évidence une relation entre l'augmentation de l'homocystéine plasmatique et le déclin des fonctions cognitives mesurées de façon simultanée¹¹⁹⁻¹²². Chez des sujets de 54 à 81 ans, une concentration élevée en Hcy plasmatique était un facteur prédictif d'une mauvaise capacité de représentation dans l'espace¹²⁰. Deux études chez des sujets âgés non déments, aux USA¹²² et en Hollande¹²³, ont montré qu'une homocystéinémie élevée et un taux de folates bas, étaient significativement associés à une mauvaise capacité de mémorisation. Une étude cas-témoins a estimé le risque relatif de maladie d'Alzheimer à 2,9 (IC_{95%} : 1,0-8,1), pour un taux plasmatique d'Hcy ≥ 13,3 µmol/l (versus < 13,3 µmol/l) qui restait identique après ajustement sur les facteurs de risque cardiovasculaires classiques, la créatininémie, ainsi que sur les apports alimentaires¹²⁴.

Plusieurs études prospectives ou cas-témoins nichées dans une cohorte, ont montré une association entre l'élévation du taux plasmatique d'Hcy et le risque de démence d'Alzheimer¹²⁵⁻¹²⁸. Dans la première, les patients avec un taux plasmatique d'Hcy > 11 µmol/l avaient, sur 3 ans, une progression vers la maladie d'Alzheimer plus rapide que les sujets dont le taux était inférieur à ce seuil¹²⁷. Le niveau plasmatique élevé d'Hcy à l'inclusion de 32 sujets âgés sains était associé à un déclin des fonctions cognitives à 5 ans¹²⁶. Des niveaux bas de vitamines B9 (≤ 10 nmol/l) et B12 (≤ 150 pmol/l) étaient en relation avec un doublement du risque de maladie d'Alzheimer chez 370 sujets âgées de 75 ans ou plus¹²⁸. Dans cette étude, l'Hcy n'était pas mesurée. Enfin, l'évolution du taux plasmatique d'Hcy à 8 ans d'intervalle en relation avec la survenue d'une démence d'Alzheimer chez des sujets initialement indemnes a montré que, pour une augmentation de 5 µmol/l d'Hcy plasmatique, le risque d'Alzheimer était augmenté de 40 % (RR = 1,4 ; IC_{95%} : 1,1-1,9) ¹²⁵.

L'ensemble de ces études sont en faveur de l'existence d'une association entre une diminution des vitamines B9 ou B12 plasmatiques et/ou une élévation de l'Hcy plasmatique et entre le risque de démence d'Alzheimer. Toutefois, on ne dispose pas encore d'essai randomisé permettant de tester l'hypothèse de relation causale.

3. Cancers

1. Cancer colorectal

Plusieurs études ont mis en évidence une relation inverse entre les apports alimentaires de folates et l'adénome colorectal ou le cancer colorectal^{129 130}. Le suivi pendant 14 ans des 88 756 femmes de l'étude des « nurses américaines » a montré qu'en comparaison avec les apports alimentaires $\leq 200 \mu\text{g/j}$, le risque de cancer colorectal associé aux apports $> 400 \mu\text{g/j}$ était diminué de 31 % (RR = 0,69 ; IC_{95%} : 0,52-0,93)¹³⁰. Une réduction du risque était aussi retrouvée pour une augmentation des apports par prise de suppléments multivitaminiques contenant de l'acide folique. Dans plusieurs études cas-témoins, le niveau plasmatique en folates était associé à une augmentation du risque de cancer colorectal. Chez des femmes, en comparaison avec le quartile de folates plasmatiques les plus bas, le quartile le plus élevé était associé à une réduction du risque de cancer colorectal de 48 % (OR = 0,52; IC_{95%} : 0,27-0,97)¹³¹. Chez les hommes, des données issues d'autres cohortes ont retrouvé des résultats du même ordre avec les apports alimentaires ou les niveaux plasmatiques¹³²⁻¹³⁴.

De nombreuses études d'observation, fréquemment de type cas-témoins, ont recherché l'implication du polymorphisme du gène de l'enzyme MTHF réductase (de type 677C--->T) dans la relation entre les apports alimentaires ou les niveaux sanguins en folates, et les lésions adénomateuses précancéreuses.

Pour des niveaux de folates plasmatiques et érythrocytaires le plus bas, et en comparaison avec le génotype hétérozygote, les sujets avec un génotype homozygote (TT) avaient un risque d'adénome colorectal plus élevé¹³⁵. Ces résultats ont été confirmés dans une autre étude, où les sujets avec un génotype (TT) et les apports les plus bas avaient un risque 2 à 3 fois plus élevé que ceux qui avaient le même génotype, mais avec les apports les plus élevés^{136 137}. Une autre étude plus récente n'a pas retrouvé de liaison entre ce phénotype et la survenue de polypes hyperplasiques, identifiés comme étant à l'origine du développement de cancers colorectaux¹³⁸.

2. Cancer du sein

Un effet protecteur des apports alimentaires en folates sur le risque de cancer du sein est de plus en plus souvent suggéré dans la littérature.

Une étude cas-témoins menée en Chine, a montré que, plus les niveaux plasmatiques en folates étaient élevés, plus le risque était réduit (OR = 0,71; IC_{95%} : 0,56-0,92)¹³⁹.

Une étude prospective sur le suivi pendant 16 ans de 88 818 femmes de l'étude des « nurses américaines » n'a pas retrouvé d'association entre les apports totaux en folates et le risque de cancer du sein¹⁴⁰. Une interaction entre les apports alimentaires en folates et la consommation d'alcool était retrouvée : seules les femmes qui consommaient plus de 15 g/j d'alcool et avec les apports alimentaires en folates les plus élevés ($\geq 600 \mu\text{g/j}$) avaient une réduction de ce risque (RR = 0,55 ; IC_{95%} : 0,39-0,76). Une réduction du risque était aussi retrouvée pour une augmentation des apports par la prise de suppléments multivitaminiques contenant de l'acide folique. Pour la même quantité d'alcool, l'utilisation régulière de suppléments multivitaminiques (principale source de folates dans cette population), permettait une réduction du risque de 26 % (RR = 0,74; IC_{95%} : 0,59-0,93).

V. Stratégies communautaires pour augmenter les apports en acide folique

A. Campagnes d'information, éducation nutritionnelle et supplémentation périconceptionnelle

1. En Europe

1. France

Concernant la supplémentation individuelle en acide folique, une étude d'observation transversale menée dans 16 maternités parisiennes (7 privées et 9 publiques) a montré que seules 2% des femmes interrogées bénéficiaient d'une supplémentation débutée avant la conception¹⁴¹. Une campagne d'information a été instaurée par la DGS en août 2000 auprès des femmes en âge de procréer et des professionnels de santé. À notre connaissance, aucune évaluation de cette intervention n'est disponible actuellement pour mesurer son impact.

2. Royaume Uni

Deux femmes sur trois ignoraient en 1994 les recommandations officielles publiées en 1992 pour promouvoir la supplémentation individuelle¹⁴². Une étude menée en 1998 a montré que 31 % des femmes avaient une supplémentation adaptée dans le sud de l'Angleterre⁷⁶. Une autre étude dans le nord de ce pays a montré que 21 % des femmes avaient une supplémentation adaptée¹⁴⁵. Les facteurs associés à la prise adaptée étaient l'âge (OR = 1,09 par année, IC_{95%} : 1,05 ; 1,14), le nombre de grossesse (OR = 0,68, IC_{95%} : 0,55 ; 0,83) et le caractère programmé de la grossesse (OR = 78, IC_{95%} : 51 ; 117) montrant à nouveau un profil à risque parmi les femmes jeunes, primipares et dont la grossesse n'est pas programmée.

3. Irlande

Dans ce pays, 16 % des femmes avaient une supplémentation adéquate après une campagne d'incitation active, alors qu'initialement le taux était de 6 %¹⁴⁶.

4. Hollande

Plusieurs études^{143 144} ont montré que l'âge, le niveau socio-économique et notamment le niveau d'éducation, étaient positivement liés à la prise d'une supplémentation individuelle en acide folique. L'étude d'évaluation de la supplémentation menée en novembre 2000^{147 148} a montré que 53 % des femmes de haut niveau socio-économique et 33 % des femmes de bas niveau socio-économique, suivaient une supplémentation péri-conceptionnelle adaptée, confirmant le lien entre ce facteur et l'accès à la prévention.

2. USA

La consommation habituelle et quotidienne de suppléments vitaminiques est plus importante aux USA qu'en France. Une étude a montré que chez les femmes en âge de procréer, elle serait de 28 % en 1995 et de 32 % en 1998¹⁴⁹.

Concernant l'évolution des connaissances des femmes en âge de procréer et malgré les recommandations émises officiellement par le CDC et le National Public Health Service en 1992, seulement 2 % des femmes en 1995 et 13 % en 1998 savaient que l'acide folique sous forme d'une supplémentation individuelle devait être pris avant le début de la grossesse¹⁴⁹. Le CDC a donc mis en œuvre une campagne d'éducation massive, tandis que la décision d'enrichissement de plusieurs vecteurs alimentaires (pâtes, farines de blé, maïs et riz...) était adoptée par la FDA en 1996¹⁵⁰. Des actions éducatives ont été entreprises, avec l'objectif de diminuer les anomalies de fermeture du tube neural de 30 % en 2001. Le budget consacré à cette campagne était de 10 millions de dollars¹⁴⁹.

Devant la faible efficacité de ces mesures pour obtenir des changements de comportement de la population, la politique de prévention des AFTN s'est ré-orientée vers une stratégie d'enrichissement alimentaire. Depuis 1994, la FDA autorise aux USA l'utilisation par l'industrie alimentaire d'allégations de santé par la mention sur les produits de l'effet protecteur de l'acide folique sur les anomalies du tube neural.

3. Canada

Des données non publiées transmises par le Pr. P. De Wals (Directeur du Département de médecine sociale et préventive de l'Université Laval, Québec) indiquent que dans les enquêtes transversales réalisées au Québec, la proportion de femmes qui rapportent avoir consommé ces suppléments est restée relativement stable durant la dernière décennie (19 % en 1987 ; 22 % en 1992-1993 et 23 % en 1998). Une enquête menée entre 1999 et 2000 auprès de 1240 femmes dans 10 hôpitaux a montré que seules 25 % d'entre elles avaient reçu une supplémentation adaptée en période périconceptionnelle¹⁵¹.

4. Australie et Nouvelle-Zélande

Une étude transversale menée auprès de 140 femmes d'un seul centre en Australie a montré que 30,7 % avaient une supplémentation adaptée¹⁵². Un essai contrôlé randomisé sur 34 sujets en Nouvelle-Zélande a montré qu'il était possible d'augmenter les apports alimentaires en folates par une intervention nutritionnelle¹⁵³. Dans le groupe qui recevait des conseils alimentaires prodigués par une diététicienne, les apports alimentaires totaux après 4 semaines augmentaient de 263 à 618 µg/j. Cependant, dans les 17 semaines qui ont suivi l'intervention, les apports totaux ont progressivement diminué jusqu'à atteindre 400 µg/j. Ces résultats illustrent la difficulté d'obtenir une augmentation sur le long terme des apports en folates d'origine alimentaire, en dehors du cadre expérimental de sujets encadrés par des diététiciennes. Par ailleurs, il faut signaler que les sujets participants à cette étude ont reçu une compensation financière pour leur participation au protocole, ce qui a pour effet, en général, d'augmenter la compliance.

5. Mexique

En 1999, un programme de prévention primaire a été débuté dans un état au Nord-Est du Mexique (Nuevo León), à la frontière avec le Texas¹⁵⁴. Des comprimés d'acide folique (5 mg/semaine) ont été distribués à 250 000 femmes en âge de procréer, avec un bas niveau socio-économique. Par ailleurs, les femmes ayant déjà eu un enfant atteint d'une AFTN ont été contactées pour les inciter à consommer ce même dosage, mais quotidiennement, en prévention de la récurrence d'AFTN. Enfin, une vaste campagne d'information a été menée afin d'améliorer les connaissances des femmes en âge de procréer et des professionnels de santé. Entre 1999 et 2001, l'incidence des AFTN est passée de 1,04 à 0,58 /10 000 naissances de plus de 20 semaines de gestation, soit une réduction de 50 % observée sur une période de 2 ans, portant aussi bien sur les cas de Spina Bifida que sur les anencéphalies. En revanche, il était noté une augmentation des cas d'encéphalocèles (passage de 2 à 7 cas). Il est possible que cette divergence dans l'évolution de l'incidence entre les différents types d'AFTN résulte d'une fluctuation de l'enregistrement des cas. Par ailleurs, il faut mentionner que les IMG (non autorisées dans ce pays) et morts-nés ne sont pas enregistrés dans le cadre des programmes de surveillance de cette étude. Enfin, il est difficile d'interpréter ces résultats, en l'absence de comparaison avec une région où l'intervention n'a pas eu lieu, car depuis 1999, le Mexique a mis en place un enrichissement avec 200 µg d'acide folique /100 g de farine de maïs ou de blé, le maïs étant un aliment majeur au Mexique.

6. Colombie

Une étude a mesuré le taux de supplémentation individuelle en période périconceptionnelle chez les femmes qui appelaient un centre d'information téléphonique destiné à la prévention des risques tératologiques durant la grossesse¹⁵⁵. L'intérêt de cette étude est justement d'introduire un biais de sélection de la population recrutée, ce qui permet l'analyse d'un sous-groupe de femmes parmi les plus concernées. Même dans cette population, seulement 42 % des femmes avaient un usage périconceptionnel adapté de l'acide folique.

B. Enrichissement : expériences internationales

1. USA

Rappelons que les Etats-Unis ont rendu obligatoire, depuis le 1^{er} janvier 1998, l'introduction de 140 µg d'acide folique pour 100g de farine (à la rare exception des farines " biologiques " ne contenant aucun additif).

1. Vérification de la concentration en acide folique des produits enrichis

Afin de déterminer l'efficacité de l'enrichissement en acide folique, notamment chez les femmes en âge de procréer, une analyse biologique de plus de 150 produits alimentaires enrichis les plus vendus aux USA a été menée entre février 1998 et avril 1999, c'est-à-dire dans les 16 mois suivant la mise en application légale de l'enrichissement¹⁵⁶. La plupart de ces aliments avaient des teneurs mesurées en folates supérieures à celles qui étaient indiquées sur les emballages, avec un dépassement d'environ 150 % de la valeur recommandée.

2. Impact sur les apports alimentaires

La vérification de cet excès d'enrichissement par rapport aux estimations prévues a été confirmée dans une analyse des apports alimentaires des sujets de la cohorte « Framingham Offspring »¹⁵⁷. Cette étude a montré que, parmi les sujets non-consommateurs de suppléments, les apports en acide folique ont augmenté de 190 µg/j (IC_{95%} : 176 ; 204) et que la prévalence des sujets avec des apports > 1 mg/j est passée de 1,3 à 11,3 % (p < 0,01). Ces résultats confirment que l'enrichissement a résulté en une augmentation des apports moyens en acide folique, qui est 2 fois supérieure à ce qui était prévu dans les simulations de la FDA¹⁵⁰. À ce jour et dans ce contexte, aucune augmentation du nombre de déclarations de cas de neuropathies par masquage d'une carence en vitamine B12, ou de tout autre effet adverse potentiellement imputable à la surconsommation d'acide folique, n'a été signalée par les autorités de santé américaines.

3. Impact sur les niveaux de folates plasmatiques et érythrocytaires

Les folates érythrocytaires sont un meilleur reflet du stock corporel à long terme que les folates plasmatiques qui sont plus spécifiques des apports alimentaires à court terme. Plusieurs études ont analysé l'évolution de ces marqueurs biologiques à différentes étapes de l'enrichissement^{82 158-160}.

Le taux des folates sanguins a été évalué aux USA chez plus de 5600 femmes de 15 à 44 ans, sur la période précédente (1998-1994) et suivant (1999) la mise en place de l'enrichissement, dans les enquêtes de population NHANES¹⁶⁰. Les folates plasmatiques ont augmenté de 2,5 fois en passant de 6,3 à 16,2 ng/ml. Cette augmentation était identique chez les femmes enceintes, habituellement moins grandes consommatrices de suppléments. Les folates érythrocytaires ont augmenté de 1,7 fois, en passant de 181 à 315 ng/ml.

L'analyse de 98 351 dosages de folates sériques entre 1994 et 1998 a montré que les folates sériques ont augmenté de 1,5 fois dans les 2 sexes, passant de 12,6 à 18,7 ng/ml¹⁵⁸.

Une autre analyse sur la cohorte de Framingham⁸², avant (janvier 1995 à septembre 1996) et après (septembre 1997 à mars 1998) l'enrichissement, a montré une augmentation des folates plasmatiques de 2,2 fois en passant de 4,6 à 10,0 ng/ml chez les sujets non utilisateurs de suppléments (p < 0,01). La prévalence des sujets avec un taux de folates plasmatique < 3 ng/ml est passée de 22,0 % à 1,7 % entre ces 2 périodes.

Une étude d'observation transversale a analysé le niveau de ces marqueurs en Californie du Sud, chez 2 groupes de femmes de 18 à 45 ans : favorisées (n=85) et défavorisées (n=50)¹⁵⁹. Les auteurs confirment l'augmentation des niveaux plasmatiques et érythrocytaires de folates, dans les 2 groupes de population, démontrant l'intérêt de l'enrichissement comme action de santé publique en population générale pour atteindre les femmes en situation de précarité.

4. Modification de la prévalence des AFTN

La prévalence combinée des AFTN (spina-bifida et anencéphalie), calculée uniquement à partir des certificats de naissances d'enfants vivants, dans 45 Etats américains et Washington DC, montre une diminution significative de 19 % entre les périodes 1995-1996 et 1998-1999¹⁶¹.

L'analyse séparée des 2 anomalies montre une différence : la prévalence du spina-bifida a diminué significativement de 23 %, alors que l'anencéphalie a diminué de manière non significative de 11 %.

L'interprétation de cette décroissance de 19 % est ambiguë, dans la mesure où elle s'effectue certes dans la période de mise en place de l'enrichissement des farines, mais parallèlement à des campagnes de promotion en faveur de la supplémentation individuelle et de consommation des fruits et légumes. Par ailleurs, seules les naissances vivantes sont prises en compte, alors que les IMG et avortements spontanés ne le sont pas, ce qui modifie l'importance de la réduction de risque retrouvée.

Une deuxième évaluation a été menée auprès de 24 programmes de surveillance des anomalies congénitales, en prenant en considération les naissances vivantes, les morts-nés et les avortements spontanés. Les IMG n'étaient pas enregistrées.

Il était retrouvé une diminution significative de 31 % de la prévalence du spina-bifida, entre la période précédant l'enrichissement (janvier 1995 à décembre 1996) et la période postérieure à la mise en application légale (octobre 1998 à décembre 1999)¹⁶². En revanche, comme le souligne les auteurs, la mise en évidence d'une relation temporelle entre le début de l'enrichissement et la diminution de 16 % des anencéphalies semble moins claire.

2. Canada

L'enrichissement des farines en acide folique a été autorisé au Canada le 5 mars 1996 et cette mesure est devenue obligatoire depuis le 11 novembre 1998. Des données préliminaires non-publiées, transmises par le Pr. P. De Wals, indiquent que le niveau d'enrichissement est, en moyenne, de 30 % supérieur aux normes prévues (140 µg/100 g de farine).

L'analyse d'examen sanguins d'environ 1/3 de la population de la province de l'Ontario (Canada), entre le 1^{er} janvier 1996 et fin décembre 1997, montre une augmentation de 214 nmol/l des folates érythrocytaires, sans modification du taux plasmatique pour la B12¹⁶³. La prévalence du déficit en folates plasmatique (< 3,4 nmol/l) est passée de 0,52 % à 0,22 %, dans cette même population, entre avril 1997 et fin mars 2000¹⁶⁴. Sur cette période plus large, le taux de carence en vitamine B12 n'a pas non plus évolué.

L'implication éventuelle d'une augmentation de la consommation de suppléments vitaminiques dans l'amélioration de ces taux semble écartée, car la consommation de suppléments est décrite comme stable dans le temps. En Nouvelle-Écosse, les taux d'AFTN sont passés de 25/10 000 en 1991-1997 à 12/10 000 en 1998-2000, soit une réduction de 54 %¹⁶⁵. La difficulté d'interprétation des données en dehors d'un cadre expérimental a été soulevée dans l'analyse de l'évolution des données d'incidence des AFTN dans la région de l'Ontario¹⁶⁶. En effet, la part relative liée à l'effet propre de l'enrichissement est difficile à distinguer des conséquences, d'une part, de l'amélioration du dépistage anténatal et, d'autre part, de l'amélioration de la supplémentation individuelle par l'acide folique.

3. Amérique Centrale et Amérique du Sud

1. Chili

Peu de données sont disponibles sur l'enrichissement de la farine (220 µg d'acide folique /100 g de farine), qui a débuté dans ce pays en janvier 2000¹⁶⁷. Depuis 30 ans, la prévalence des AFTN est estimée à 16/10 000 cas /an. Aucun résultat n'est actuellement disponible sur l'impact de cette mesure sur l'évolution de la prévalence.

2. Autres pays

Par ailleurs, bien qu'aucun résultat ne soit disponible, il semblerait que la plupart des pays d'Amérique Centrale ou du Sud aient entrepris un enrichissement en acide folique des farines de blé¹⁶⁸ :

- ◆ Bolivie : 150 µg/100 g de farine (depuis novembre 1996),
- ◆ Colombie : 154 µg/100 g de farine (depuis 1996),
- ◆ Costa Rica et République Dominicaine : 150 µg/100 g de farine (depuis novembre 1997),
- ◆ Équateur : 60 µg/100 g de farine (depuis novembre 1996),
- ◆ Salvador : 130 µg/100 g de farine (depuis novembre 1996),
- ◆ Guatemala : 35 à 45 µg/100 g de farine (depuis novembre 1993),
- ◆ Honduras : 150 µg/100 g de farine (depuis novembre 1997),
- ◆ Nicaragua : 130 µg/100 g de farine (depuis novembre 1997),
- ◆ Panama : 150 µg/100 g de farine (depuis novembre 1997),
- ◆ Paraguay : 300 µg/100 g de farine (depuis novembre 1998).

4. En Europe

En Europe, seule la Hongrie a mis en place un enrichissement, sur une base volontaire, des farines depuis août 1998 avec, pour 200 g de pain : 400 µg d'acide folique, 25 µg de vitamine B12 et 3600 µg de vitamine B6¹⁶⁹. Il n'y a aucun article disponible à ce jour pour décrire les résultats de cet enrichissement en Hongrie.

En 2002, une mission d'expertise a remis au Ministre de la santé Suisse un rapport recommandant l'enrichissement avec 300 µg de B9 et 1 µg de B12 pour 100 g de farine¹⁷⁰.

Le gouvernement anglais a, cette même année, décidé de retarder la mise en application des recommandations émises dans un rapport d'expertise pour la mise en place d'un enrichissement avec 240 µg d'acide folique/100 g de produits à base de farine¹⁷¹.

C. Avis de l'Organisation Mondiale de la Santé pour l'Europe

En novembre 2002, le Centre Européen pour la Santé et l'Environnement de l'OMS a organisé une réunion sur les politiques régionales de prévention des malformations congénitales, en particulier sur l'enrichissement et/ou la supplémentation individuelle en acide folique en Europe¹⁷². Trois options possibles de la prévention primaire des AFTN ont été rappelées : augmentation des apports alimentaires, supplémentation individuelle et enrichissement de la farine avec 240 µg efficace d'acide folique /100 g de farine. Aucune option définitive n'a été fixée (informations fournies par le P. C. Stoll).

Une réunion se tiendra en 2003 à Washington (USA), en partenariat avec le CDC (Center for Disease Control) et l'Organisation Panaméricaine de Santé, afin de discuter des niveaux d'enrichissement en acide folique et vitamine B12 sur le continent américain. Il sera notamment question d'un apport additionnel en vitamine B12 dans les farines.

2^{eme} partie : analyse de la situation française en 2002 et recommandations

I. Les bases de la décision de santé publique

A. Introduction

La preuve de l'efficacité de la supplémentation en vitamine B9 dans la prévention des anomalies de fermeture du tube neural (AFTN) a été faite. Les études épidémiologiques et les essais randomisés ont mis en évidence une réduction pouvant aller jusqu'à 70 % de l'incidence des AFTN. Cette supplémentation n'est efficace que si le supplément est pris dans les 4 semaines qui précèdent la conception et dans les 8 semaines qui suivent, dans un contexte où plus de 50 % des grossesses sont non programmées. La précocité et la brièveté de la période de traitement obligent à envisager d'autres stratégies préventives. De nombreux autres bénéfices sont attendus dans la prévention des pathologies cardiovasculaires, et peut-être des cancers colorectaux, des cancers du sein et des malformations congénitales. Plusieurs essais randomisés de prévention des pathologies cardiovasculaires ischémiques sont en cours dans le monde.

Une politique visant à augmenter la consommation de vitamine B9 des Français (particulièrement des femmes en âge de procréer) doit être discutée du point de vue de l'**efficacité** et de la **sécurité**, et doit tenir compte des aspects **éthiques**, **d'acceptabilité**, et **réglementaires** du problème. Il est par ailleurs indispensable qu'une **évaluation** de la politique une fois instituée puisse être entreprise et ses possibilités d'évolution, en fonction notamment du progrès des connaissances scientifiques soient envisagées.

B. Stratégies envisageables pour la réduction des AFTN

Plusieurs stratégies ont été envisagées pour réduire l'incidence des AFTN en population générale :

- ◆ Campagne de promotion de la consommation des aliments riches en folates, et particulièrement de fruits et légumes,
- ◆ Campagne de promotion de la supplémentation par des comprimés d'acide folique, ciblée sur les groupes à risque (femmes en âge de procréer),
- ◆ Enrichissement d'un vecteur alimentaire courant, le plus souvent la farine.

La littérature scientifique internationale montre que les 2 premières mesures ont été relativement inefficaces dans leur capacité à atteindre la population-cible. **Les expériences de promotion de la supplémentation individuelle montrent que, malgré des efforts d'information importants, le taux de couverture des femmes en âge de procréer plafonne à un maximum de 30 %**. Ceci explique que les résultats observés dans la population générale sont quantitativement inférieurs à ceux des études contrôlées¹⁷³. Enfin, tous les effets de ces mesures sont transitoires et régressent progressivement à l'arrêt de la campagne d'information. Ceci ne remet évidemment pas en question la nécessité d'une alimentation équilibrée pour chaque individu, qui passe par une consommation régulière de fruits et légumes ainsi qu'il est recommandé dans le Programme National Nutrition Santé (Ministère de la Santé).

Depuis 4 ans, la plupart des pays d'Amérique du Nord et du Sud ont décidé de mettre en place un enrichissement de plusieurs types de farines. Les expériences de terrain aux Etats-Unis et Canada montrent une réduction de l'incidence des AFTN de 19 à 50 %.

La difficulté majeure de la démarche qui a été entreprise dans ces pays est le caractère généralisé et simultané de l'enrichissement sur l'ensemble du territoire. En effet, bien qu'une diminution des AFTN soit constatée, il n'est pas possible d'attribuer cette réduction à l'enrichissement, dans un contexte où de nombreuses démarches de promotion de la supplémentation individuelle sont entreprises. D'autre part, en l'absence d'évaluation planifiée, on se rend compte seulement en 2002, que l'enrichissement réalisé à partir de 1998 a conduit à une augmentation moyenne des apports en vitamine B9, deux fois plus importante que celle prévue¹⁷⁴. De plus, les effets possibles sur le plan cardio et cérébrovasculaire ne peuvent pas être évalués, même grossièrement.

Dans le contexte français, on peut en 2002 distinguer schématiquement trois options différentes :

- L'abstention de tout enrichissement des farines,
- La généralisation de l'enrichissement à l'ensemble de la population,
- La réalisation d'un programme-pilote d'enrichissement des farines dans une région bien choisie qui permettrait une évaluation de santé publique.

La première option est celle qui est, de fait, suivie en France. Toutefois, elle priverait le pays d'une mesure de santé publique dont l'efficacité est démontrée et appliquée dans plusieurs pays développés et notamment en Amérique du Nord, depuis maintenant 5 ans.

Compte tenu de la gravité de la pathologie, d'après nos simulations (cf. chapitre I. de la 1^{ère} partie), le fait d'éviter à terme plus de 200 cas d'AFTN par an en France représente un objectif majeur de santé publique.

La deuxième option serait d'appliquer l'expérience nord-américaine en France, c'est-à-dire, un enrichissement des farines, généralisé et simultané sur l'ensemble du territoire. Il faut remarquer que la dose d'enrichissement choisie aux USA et au Canada ne pourrait pas, de toute façon, être applicable directement à la population française, car le vecteur alimentaire serait restreint à la farine panifiable, ce qui ne correspond pas à la situation nord-américaine où une grande diversité d'aliments est enrichie.

Compte tenu des incertitudes qui demeurent concernant la prévention cardiovasculaire d'une part et la réalité des hypothétiques effets secondaires d'autre part, une évaluation de santé publique effectuée dans les meilleures conditions méthodologiques serait souhaitable. Le choix de cette option l'interdirait en pratique.

Ces éléments plaident en faveur de la troisième option qui vise à mettre en place une évaluation par un programme-pilote d'enrichissement des farines. Les principes sur lesquels repose un tel choix sont décrits et discutés dans la suite du rapport avant que ne soit proposé un programme-pilote dans une région déterminée.

C. Choix d'un vecteur alimentaire adapté

En France, compte tenu des habitudes alimentaires, le seul vecteur alimentaire courant pour un enrichissement en acide folique permettant une politique de santé efficace est la farine panifiable. En effet, ce vecteur alimentaire répond aux différents critères suivants :

- Il doit être un produit fiable et ne pas être en opposition avec les recommandations nutritionnelles,
- L'enrichissement doit être techniquement faisable,
- Le vecteur doit contenir à l'état naturel, même sous forme de trace, le produit qui sera ajouté au vecteur,
- Le vecteur doit être peu cher pour ne pas pénaliser les catégories à faible revenu dans la population,
- Le vecteur doit être produit dans un petit nombre de structures pour permettre une bonne traçabilité de l'enrichissement.

La farine panifiable remplit parfaitement ce cahier des charges. En effet, le pain fait partie des aliments dont la consommation est recommandée dans le Programme National Nutrition Santé (PNNS) du Ministère de la Santé. Les expériences internationales ont montré la faisabilité technique de l'enrichissement de ce vecteur, **qui contient naturellement des vitamines B9 et B12 dont le taux sera renforcé par l'enrichissement**. Enfin, la farine est un vecteur bon marché, consommé par l'ensemble de la population, quel que soit l'âge, et produit dans un nombre limité de structures.

Le choix fait par d'autres pays, comme les USA, de réaliser un enrichissement généralisé à d'autres farines (maïs, riz,...), et donc à une grande variété de produits alimentaires transformés (pâtes alimentaires, pizza,...) ne peut pas être fait en France car leur fabrication est d'origine géographique diverse. Un enrichissement de ce type ne serait possible que s'il était décidé au niveau européen.

D. Une exigence de sécurité sanitaire : un enrichissement mixte en acide folique et vitamine B12

Compte tenu des incertitudes portant sur le risque de masquage du déficit en vitamine B12, en particulier chez le sujet âgé mal absorbant ; un consensus s'est établi au sein du Comité de Pilotage pour formuler la recommandation d'un enrichissement mixte en acide folique et vitamine B12.

II. L'établissement d'un programme d'enrichissement adapté à la situation française

A. La farine panifiable et le pain

1. Marché intérieur français de la farine

Le marché intérieur français représente 3,92 millions de tonnes de farine. La majeure partie (69,7 %) de la production est destinée à la panification. Cette production est assurée par 574 moulins sur l'ensemble du territoire.

Tableau 10. Marché français de la farine en 2001

Catégories d'utilisateurs	Tonnes	% de la panification
Panification	2 734 067	69,7
Industries utilisatrices alimentaires et utilisations diverses alimentaires *	876 773	22,4
Sachets individuels	157 250	4,0
Alimentation animale et autres (amidonnerie, glutennerie)	153 385	3,9
Total	3 921 475	100 %

* Biscotterie, biscuiterie, alimentation infantile, etc...

Source : ONIC

2. Structures de représentation de la profession boulangère

La boulangerie et pâtisserie française est représentée par deux structures :

- F.E.B.P.F. : Fédération des Entreprises de Boulangerie-Pâtisserie Française. Elle représente la vente de pain emballé ou destiné aux ventes de pain non-emballé dans les terminaux de cuisson (dépôts de pains, grandes surfaces,...).

- C.N.B.P.F. : Confédération Nationale de la Boulangerie-Pâtisserie Française. Elle représente les artisans, et donc la vente de pain frais ou "non-emballé".

L'I.N.B.P. : Institut National de la Boulangerie-Pâtisserie, est un organisme de formation pour adultes dans le domaine de la boulangerie-pâtisserie. En général, il est l'organisme missionné par la C.N.B.P.F. pour ses relations avec les services public.

3. Consommation de farine panifiable

Trois sources principales sont disponibles pour estimer la consommation de farine en France : à partir des enquêtes alimentaires de l'INSEE ou de l'étude INCA (Afssa) ou à partir de l'extrapolation des ventes de farines fournies par l'ONIC (Office National Interprofessionnel des Céréales). Ces dernières surestiment en général les données de consommation par rapport aux autres sources. En 2001, la consommation de farine à destination de la panification en France est estimée à 2,73 millions de tonnes pour le marché intérieur (Tableau 11).

Tableau 11. Parts de marché de la panification en 2001.

Catégories d'utilisateurs	Tonnes	% de la panification
Boulangerie et pâtisserie artisanale	1 488 231	54,4
Négociants en farines	130 094	4,8
Importation (sources Douanes)	156 874	5,7
Fabrication de mixes *	124 025	4,6
-----> Sous-total boulangerie artisanale	1 899 224	69,5
Boulangerie - pâtisserie industrielle (frais et surgelés)	610 074	22,3
Ateliers de boulangerie-pâtisserie de grandes surfaces	221 408	8,1
Secteur public (ex : armée, école, hôpitaux, prisons...)	3 361	0,1
Total panification	2 734 067	100

*Mixes : mélanges de farines déjà préparés, sources : ONIC/ANMF/Douanes

Par définition, les catégories artisanales ou industrielles dépendent de l'activité économique des entreprises concernées. Selon l'avis du ministère du travail (J.O. du 04/01/1978), est dite "industrielle" une boulangerie qui répond à au moins 3 des 4 critères suivants : quantité panifiée > 450 tonnes/an, > 20 salariés, < 30 % de ventes réalisées au détail, surface de cuisson > 30 m².

Les parts de marché décrites proviennent des déclarations mensuelles renseignées par les meuniers sur la production de farine qu'ils ont réalisée. Sur l'ensemble des parts de marché pour la panification, la majeure partie est représentée par le secteur de la boulangerie artisanale. La part de marché issue des importations (5,7 %) et des négociants en farines (4,8 %) ne doivent pas être comptabilisés. En

revanche, il faut ajouter la part de marché des ateliers de boulangerie-pâtisserie des grandes surfaces (8,1 %). En conclusion, **la part de marché de la panification** pour laquelle un enrichissement en vitamines B est envisageable **représente 67,1 % de la production totale de farine panifiable**.

4. Consommation de pain

Pour estimer la consommation de pain au niveau de la France entière les données utilisées sont celles de l'enquête INCA, réalisée en 1998-1999¹⁷⁵. Cette enquête recueille toutes les prises alimentaires des sujets pendant une semaine entière. Les données ont été obtenues à partir de carnets de consommation auto-remplis sur une période de 7 jours consécutifs, à des périodes différentes de l'année suivant les sujets pour tenir compte de la variabilité saisonnière. L'enquête initiale a été réalisée sur 3000 sujets, enfants et adultes représentatifs de la population française.

Les simulations de consommation de pain ont été limitées aux sujets de plus de 14 ans avec une élimination classique des sujets « sous-évaluants ». L'échantillon utilisé comprend au total 1474 sujets de 15 à plus de 65 ans : 672 hommes et 802 femmes.

Sur l'ensemble de la population (n=1474), la **consommation moyenne de pain est de 134,7 g/j ± 96,2 g/j**, ce qui correspond à une consommation de farine de 99,7 g/j ± 72,9 g/j. Les résultats par tranche d'âge de la consommation de pain et viennoiseries sur l'ensemble de la France sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 12. Consommation de pain uniquement (INCA) en g/j.

	Hommes		Femmes	
	n	m ± d.s.	n	m ± d.s.
Ensemble	672	147,9 ± 108,6	802	91,7 ± 73,5
15 - 24 ans	114	99,0 ± 99,9	140	64,6 ± 55,6
25 - 44 ans	263	141,1 ± 93,6	323	91,4 ± 69,8
45 - 64 ans	183	174,6 ± 121,6	206	95,3 ± 64,5
≥ 65 ans	112	170,2 ± 107,8	133	115,7 ± 98,6

B. Estimation des bénéfices attendus par l'enrichissement en vitamines B

1. Anomalies de fermeture du tube neural

1. Méthode

a) Directe

L'objectif est de proposer une méthode simple de simulation du risque de survenue d'AFTN en fonction des apports totaux supplémentaires en folates dans la population, à partir des relations de type " dose effet " disponibles dans la littérature (expérimentales ou observation). Elles s'expriment par un risque relatif d'AFTN selon des classes de la distribution des apports en comparaison à une classe de référence.

Une estimation de la pente de régression du logarithme du risque relatif sur la différence moyenne d'apport en folates a été calculée pour chaque étude. En faisant l'hypothèse d'absence d'hétérogénéité, une pente de régression commune (β) a été obtenue, en tenant compte du poids des pentes individuelles dans chaque étude (inverse de leur variance).

Ce coefficient de régression (β) permet d'estimer, à partir des données de consommation de l'étude INCA chez les femmes en âge de procréer, la réduction du risque attendue et donc du nombre de cas d'AFTN.

Les variables qui ont été prises en compte pour le calcul de (β) sont :

- ◆ x_0 : apport total en folates d'un sujet de la population de référence,
- ◆ x_1 : apport total en folates du même sujet après enrichissement,
- ◆ $\Delta x = x_1 - x_0$: différence d'apport en folates (après enrichissement - avant enrichissement), pour chaque sujet.

Au plan individuel, le risque relatif (RR) d'AFTN d'un sujet après/avant enrichissement s'écrit d'après l'hypothèse de linéarité : **RR = exp.** $\beta * \Delta X$

Au niveau de la population, le risque relatif est une pondération des risques individuels, eux-mêmes fonctions de l'apport initial en folates (x_0) et de son augmentation (Δx), pour chaque sujet. La somme (Σ) étant étendue aux sujets de la simulation, le risque relatif s'écrit :

$$RR = \frac{\sum \exp. (\beta * (x_0 + \Delta x))}{\sum \exp. (\beta * x_0)}$$

b) Indirecte

Nos simulations ont été comparées avec celles réalisées par Wald et al. en 2001¹⁷⁶, selon une autre méthode de calcul.

La consommation d'acide folique dans l'étude de Wald n'est pas mise en relation directement avec le risque d'AFTN, et l'estimation de l'effet utilise une phase intermédiaire de calcul. En effet, une première étape consiste à établir une relation entre les apports en acide folique et le taux de folates plasmatiques, sous forme d'une courbe dose-réponse. La seconde étape consiste à mettre en relation ce taux plasmatique de folates avec le risque d'AFTN. Cependant, les résultats d'une unique étude cas-témoins nichée dans une cohorte¹⁷⁷ ont été utilisés dans cette dernière étape. Dans cette étude, étudiant une plage très large d'apports, la modélisation de l'effet est linéaire entre le logarithme du risque d'AFTN et le logarithme du taux de folates, ce qui est différent de la modélisation « directe » ci-dessus.

2. Résultats de l'estimation

a) Directe

La revue de la littérature des articles qui décrivent une relation dose effet entre le risque d'AFTN et les apports totaux supplémentaires en folates correspond à un total de 811 cas cumulés d'AFTN^{47 49-51 53}. Deux études expérimentales non randomisées, en Chine⁵¹ et au Royaume-Uni⁵³, ont été sélectionnées pour des doses d'acide folique, respectivement de 0,4 et de 0,36 mg/j, et trois études d'observation de type cas-témoins pour des doses de 0,4 à 1 mg/j^{47 49 50}. Pour les études d'observation, les doses correspondent aux apports totaux supplémentaires en folates apportés par l'alimentation seule ou combinée aux suppléments.

Après calcul des pentes de régression propres à chaque étude, une pente de régression commune (β) a été calculée, dont la valeur est de : - 1,445 (IC_{95%} = -1,602 ; -1,288). En faisant l'hypothèse de linéarité de la relation, on peut ainsi déterminer une relation entre le logarithme de la réduction du risque et les apports totaux : $RR = \exp. (-1,445 * \Delta X)$ (Figure 4).

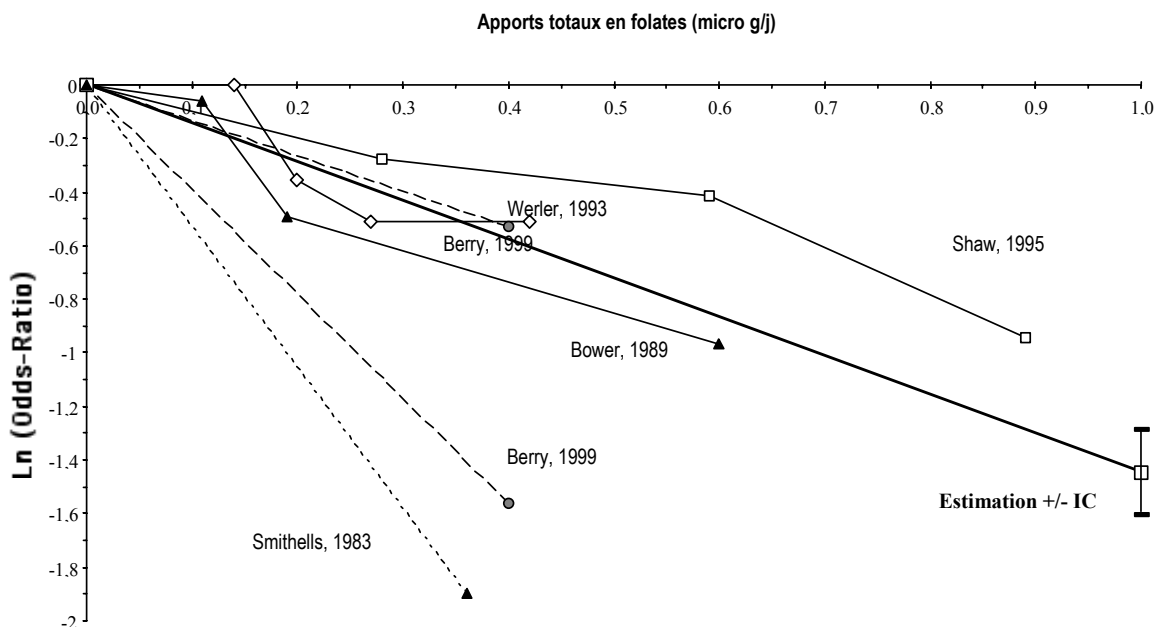


Figure 4. Relations entre l'apport total supplémentaire en folates et le logarithme de la réduction du risque d'AFTN dans la littérature (le trait le plus gras correspond à notre estimation +/- intervalle de confiance 95%).

Tableau 13. Simulation du pourcentage de réduction du risque d'AFTN en fonction de différents niveaux d'enrichissement des farines panifiables en acide folique dans l'étude INCA.

Dose d'enrichissement en acide folique (en µg/100g de farine)	Femmes de 15-24 ans % (Δ moyen apports/j)	Femmes de 25-44 ans % (Δ moyen apports/j)
0	219 µg/j	246 µg/j
140	11 % (85 µg/j)	14 % (111 µg/j)
190	15 % (115 µg/j)	19 % (151 µg/j)
240	18 % (146 µg/j)	23 % (190 µg/j)
290	21 % (176 µg/j)	27 % (230 µg/j)
340	24 % (206 µg/j)	30 % (269 µg/j)

Ce tableau indique, par exemple, qu'un enrichissement, correspondant à 240 µg efficace d'acide folique /100g de farine (après avoir tenu compte des pertes à la cuisson), permet d'obtenir une réduction des cas estimée entre 18 et 23 %.

Pour l'ensemble des femmes âgées de 15 à 44 ans (n=463), et avec cette même dose d'enrichissement, nos simulations montrent que l'apport moyen total en folates passe de 230 µg/j à 400 µg/j après enrichissement. La réduction du risque estimée chez ces femmes est de : **21,5 % (IC_{95%} : 8,3-33)**.

Le nombre de cas évités d'AFTN, si un tel enrichissement était réalisé, serait au plan national de : **170 à 210 cas/an** (800 à 1000 cas/an actuellement).

b) Indirecte

L'estimation de Wald¹⁷⁶ de la relation entre les apports totaux supplémentaires en folates et le logarithme de la réduction du risque d'AFTN, en fonction de trois niveaux de folates plasmatiques, est illustrée par les 3 courbes en trait continu fin sur la Figure 5. Pour des niveaux plasmatiques compris entre 2,5 et 5,0 ng/ml, l'ordre de grandeur des estimations est comparable. Par contre, nos estimations auraient plutôt tendance à surestimer, par rapport à Wald, la réduction du risque pour les femmes ayant des niveaux plasmatiques plus élevées (7,5 ng/ml).

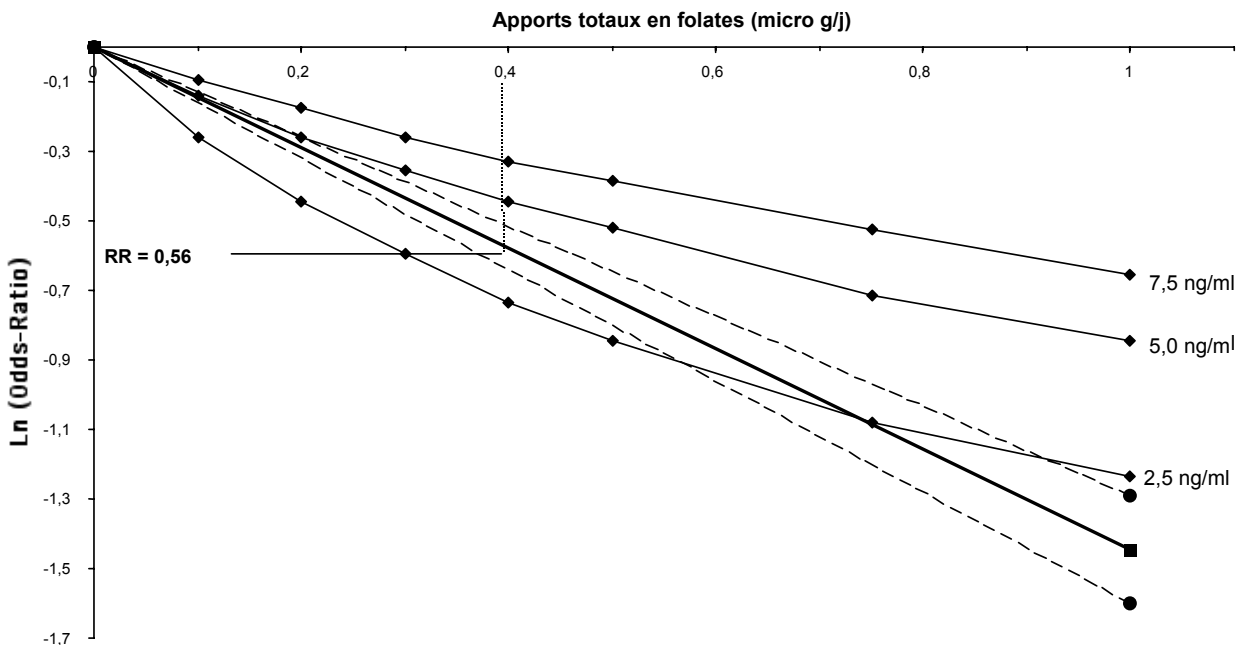


Figure 5. Comparaison de l'estimation de réduction de risque d'AFTN, en fonction d'un apport total supplémentaire en folates, avec les estimations de Wald¹⁷⁶ (le trait le plus gras, encadré par les 2 traits en pointillés, correspond à notre estimation +/- IC 95%).

2. Pathologies cardiovasculaires

1. Méthode

Il n'a pas été possible de suivre pour le cas des pathologies cardiovasculaires, la même démarche que celle du calcul du risque d'AFTN. En effet, grâce à plusieurs études expérimentales ou cas-témoins, il a été possible de mettre directement en relation les apports totaux supplémentaires en folates avec la réduction du risque d'AFTN. De cette façon, et après le calcul d'une pente de régression commune (β), la réduction du risque d'AFTN a pu être estimée directement en fonction des niveaux de consommation de folates dans l'étude INCA.

Pour les pathologies cardiovasculaires, cette démarche n'est pas applicable, pour deux raisons. En premier lieu, nous avons remarqué au chapitre V.2.2, que les études d'observation qui mettent en relation les apports alimentaires en folates et le risque cardiovasculaire fournissent des résultats très variables pour être utilisables. Deuxièmement, il n'existe pas d'étude expérimentale de morbidité-mortalité cardiovasculaire disponible actuellement. La simulation de réduction du risque cardiovasculaire en France a donc été réalisée, sous l'hypothèse d'une relation causale, selon les étapes suivantes :

- ◆ Pour chaque niveau d'enrichissement, il a été calculé une estimation des apports moyens en folates (Δx) dans un groupe donné de la population à partir des résultats de l'enquête INCA.
- ◆ La relation entre les apports en folates et la réduction du risque a été modélisée de façon simple par l'équation suivante : % réduction Hcy = $0,5 \times \Delta$ apports en folates (mg/j)⁸³. Cette équation permet de calculer le % moyen de réduction d'Hcy plasmatique, en fonction de l'apport supplémentaire moyen dû à l'enrichissement dans le groupe.
- ◆ Enfin, en appliquant les résultats de la méta-analyse de Clarke et al¹⁰⁶ (cf. ci-dessus) qui met en relation le % de réduction d'Hcy avec la réduction du risque d'AVC et de coronaropathie, le % de réduction du risque a été calculé dans plusieurs groupes de la population de l'enquête INCA.

2. Résultats de l'estimation

Le tableau 14 indique la réduction du risque d'AVC et coronaropathies chez les hommes et les femmes, en fonction de différents niveaux d'enrichissement, de 140 à 340 $\mu\text{g}/100$ g de farine.

Tableau 14. Simulation de la réduction du risque cardiovasculaire en fonction de différents niveaux d'enrichissement dans l'étude INCA

Dose ($\mu\text{g}/100$ g de farine)	Hommes ≥ 45 ans (n=295)		Femmes ≥ 45 ans (n=339)	
	AVC %	Coronaropathie %	AVC %	Coronaropathie %
140	7,3	4,2	4,5	2,6
190	10,0	5,7	6,0	3,5
240	12,5	7,5	8,0	4,5
290	15,2	8,8	9,2	5,3
340	17,8	10,3	10,8	6,2

Ces simulations montrent que pour un enrichissement en acide folique des farines de blé à un niveau efficace de 240 μg efficace /100 g de farine, il est possible d'envisager une réduction du risque de :

- **AVC : 8,0 à 12,5 %**,
- **Coronaropathies : 4,5 à 7,5 %**.

Pour un enrichissement de 240 $\mu\text{g}/100$ g de farine (cf. Tableau 15), il est possible de calculer le nombre de décès évités à partir des causes médicales de décès fournies par le CépiDC (Centre d'épidémiologie sur les causes de décès, 1999-INSERM).

Bien entendu, les réductions prévisibles concernent l'ensemble de la morbidité par cardiopathies ischémiques et maladies cérébrovasculaires. L'ordre de grandeur du nombre de cas évités annuellement pourrait être 10 fois supérieur au nombre de décès évités.

Tableau 15. Simulation de l'apport moyen en folates, avant et après enrichissement, avec 240 µg/100g de farine et nombre de décès évités chez les adultes de 45 à 74 ans.

Enrichissement avec 240 µg/100 g de farine	Hommes *	Femmes *
Simulation d'apport moyen (INCA)		
Avant enrichissement	315 µg/j	264 µg/j
Après enrichissement	646 µg/j	465 µg/j
Nombre de décès évités (CépiDC, INSERM)		
Cardiopathies ischémiques **	800 (10 669)	142 (3162)
Cérébrovasculaires ***	662 (5296)	255 (3193)

* Simulation du nombre de décès évités (total des décès en 1999 en France)

** Code Cim9 n°410-414,*** Code Cim9 n°430-438 des causes médicales de décès du CépiDC

On peut remarquer qu'une simulation du risque de coronaropathies effectuées dans la cohorte de Framingham aux USA¹⁷⁸, avec un enrichissement plus diversifié comprenant les farines de blé, mais et riz, ainsi que des pâtes alimentaires, montrait des résultats supérieurs à ceux qui sont estimés ici mais d'un ordre de grandeur tout à fait comparable (tableau 16).

Tableau 16. Comparaison des simulations de l'abaissement du risque de coronaropathies dans l'étude de Framingham et à partir des données de l'enquête INCA

Enrichissement (µg/100 g de farine)	Framingham	INCA
140	5 %	2,6 à 4,2 %
350	10 %	6,2 à 10,3 %

C. Les effets de l'incorporation de vitamine B12

1. Introduction

En France, en Europe et aux USA, le seuil de risque pour l'apport en acide folique a été fixé à une dose de 5 mg/j. Par conséquent, avec un coefficient de sécurité de 5, habituel en toxicologie, on aboutit à une limite supérieure d'apport total de vitamine B9 de 1 mg/j. Afin de ne pas risquer un masquage des signes hématologiques par un apport total en folates > 1 mg/j, un éventuel déficit en vitamine B12, faisant suite à une hypochlorhydrie qui accompagne le vieillissement, pourrait être corrigé par de faibles doses de vitamine B12 cristalline ajoutées à la vitamine B9.

2. Simulations dans l'étude INCA

Les données de simulation fournies par l'étude INCA montrent qu'avec un enrichissement à 240 µg d'acide folique /100 g de farine, 5 % de l'ensemble de la population est à risque de dépasser un apport total en folates de 1 mg /j. L'analyse en détail de ces consommateurs dans l'étude INCA montre que 41 sujets, âgés de 17 à 86 ans sont concernés dans l'échantillon et que vraisemblablement, seule une faible proportion de ces sujets peut être à risque de masquage d'une carence en vitamine B12. Leur consommation moyenne de farine enrichie sous forme de pain et viennoiseries est de 427,6 g/j, soit des apports moyens en folates de 1,22 mg/j, avec une variation allant de 1,00 à 2,46 mg/j.

Pour ces sujets dont la consommation en folates dépasse 1 mg/j, une simulation a été réalisée pour estimer les doses optimales de vitamine B12 à ajouter à l'enrichissement pour permettre de traiter et éviter le risque de masquage d'une carence en vitamine B12.

L'analyse des résultats de 3 essais randomisés de supplémentation en vitamine B12 chez des sujets âgés hypochlorhydriques¹⁷⁹⁻¹⁸¹ a permis d'estimer une relation dose-effet dans l'intervalle de doses allant de 10 à 1000 µg/j. Dans cet intervalle, une relation linéaire en coordonnées doublement logarithmiques s'avère utilisable. Le doublement des apports en B12 multiplie par 11 % le taux plasmatique de la vitamine, nous avons fait l'hypothèse que cette relation valait également pour des taux inférieurs à 10 µg/j.

Bien qu'il n'existe pas de consensus formel pour définir un seuil de carence en vitamine B12, les taux plasmatiques inférieurs à 200 pg/ml sont considérés comme anormaux. Ainsi, en se plaçant dans le cas où les sujets à risque de masquage de l'anémie par excès d'apport en acide folique auraient un taux de 150 pg/ml de vitamine B12 plasmatique, en consommant par exemple 5 µg/j de vitamine B₁₂ supplémentaire, ce taux passerait à 185 pg/ml.

L'étude INCA a montré que les sujets qui consomment > 1 mg/j d'acide folique, ont une consommation moyenne de farine de 428 g/j. En se basant sur un enrichissement en B12 à la dose de 5 µg/100 g de farine, leur apport supplémentaire en vitamine B12 serait donc de : $(428 \times 5)/100 = 21,4$ µg/j. Dans ce cas, leur taux moyen de B12 plasmatique passerait de 150 pg/ml à 223 pg/ml en moyenne, et le taux de B12 plasmatique le plus bas atteint par les sujets de l'échantillon de l'étude INCA potentiellement concernés serait alors de 205 pg/ml.

3. Distribution de la carence en vitamine B12 chez des sujets âgés non-institutionnalisés

L'étude EVA (Epidemiology of Vascular Ageing) est une étude longitudinale française qui étudie les relations entre certains paramètres vasculaires liés au vieillissement et le déclin des fonctions cognitives auprès de plus de 1000 sujets âgés en moyenne de 67 ans¹⁸². Ces sujets volontaires non-institutionnalisés ont été recrutés dans la population générale de la ville de Nantes. Parmi les 32 sujets qui avaient des taux plasmatiques de vitamine B12 inférieurs à 200 pg/ml, seulement 3 étaient en dessous de 150 pg/ml, ce qui permet de justifier au moins partiellement les choix faits dans les simulations précédentes.

En conclusion, nos simulations ont montré qu'il était possible de faire passer le taux plasmatique de B12 de 150 à 200 pg/ml chez les sujets prenant plus de 1 mg/j d'acide folique, avec un enrichissement de 5 µg/100 g de farine de vitamine B12.

Cependant, compte tenu de l'extrapolation faite à partir des données de la littérature en ce qui concerne la courbe dose-réponse, il serait bon qu'une étude de supplémentation dans la gamme de doses concernée par l'enrichissement, puisse être réalisée chez des sujets âgés ayant des taux de B12 < 200 pg/ml.

D. Les aspects technologiques et le choix des doses d'enrichissement

1. Les ajouts d'additifs dans le pain

Le marché des additifs dans le monde augmente de 4 à 5 % par an. La réglementation française concernant les additifs a toujours été l'une des plus restrictives des pays occidentaux. Établie sur le principe d'une liste positive, elle détermine les additifs autorisés, tous les autres étant interdits. La réglementation européenne conserve le principe de la liste positive, mais la liste a été augmentée. De nombreux éléments sont actuellement déjà incorporés dans le pain en France. En effet, depuis septembre 1996, la directive européenne n°95/2/CE fixe une liste d'additifs autorisés pour incorporation dans les pains. Ces additifs ne sont cependant utilisés que si la preuve d'un intérêt technologique est faite.

Depuis cette date, on peut considérer quatre catégories de pain qui se distinguent par leur composition et leur contenu variable en additifs. Seule une catégorie ne contient aucun additif : le pain de " tradition française ", défini par l'arrêté 93-1074 du 13 septembre 1993.

En France, **95 % du pain consommé est fabriqué à partir de farine contenant de la vitamine C**, ce qui permet un travail plus facile de la pâte à pain. Actuellement, le consommateur n'a pas d'accès direct à l'information sur la teneur en additifs dans les produits panifiés lors d'un achat en boulangerie-pâtisserie.

Pain de " tradition française "

Ses caractéristiques sont les suivantes :

- ◆ N'avoir subi aucun traitement de surgélation au cours de l'élaboration,
- ◆ Ne contenant aucun additif,
- ◆ Résulte de la cuisson d'une pâte qui présente les caractéristiques suivantes : être composée d'un mélange de farines panifiables de blé, d'eau potable et de sel de cuisine, être fermentée à l'aide de levure de panification, éventuellement contenir de la farine de fèves, de soja ou de malt de blé.

Il représente environ 5 % de la consommation de pain en France.

Pain courant français

La réglementation précise qu'il s'agit du pain fabriqué à partir de farine de blé, de levure et d'adjuvants autorisés dans le pain de tradition française. Il peut comporter en outre **14 additifs** au maximum, qui sont :

- ◆ L'acide ascorbique ou vitamine C, sous ses 4 formes chimiques E 300-301-302-304 (en pratique seul le E 300 est utilisé),
- ◆ La lécithine E 322,
- ◆ Les mono et diglycérides d'acide gras E 471,
- ◆ Acide acétique (E 270-325-326-327) et acide lactique (E 260-361-262-263).

Pain fabriqué à partir de farine de froment, eau, levure ou levain et sel

Cette autre catégorie réglementaire peut contenir jusqu'à **18 additifs** différents, soit 4 de plus que le pain courant français. Il peut entre autres contenir des "data esters", qui sont des additifs qui améliorent la tolérance du pain au vieillissement, propriété qui se rapproche de celle de l'acide ascorbique. Ces additifs sont utilisés en France, bien qu'ils modifient le goût et l'aspect du pain.

Autres pains ou "pains spéciaux"

Cette catégorie comprend tous les pains qui ne rentrent pas dans les catégories citées précédemment. Dans cette dernière catégorie, **plus de 100 additifs** sont autorisés. Le pain dit "biologique" représente 1 % du pain consommé en France. Il relève d'un statut particulier fixé par l'arrêté du 21/12/92, qui précise les modes de culture et de conservation des produits dits biologiques. Cependant, même dans cette catégorie, différents additifs sont autorisés, dont la lécithine et l'acide ascorbique.

2. Fixation de la vitamine B12 aux protéines du pain

1. Méthodologie

Aucune donnée de la littérature ne semble avoir montré que la vitamine B12 cristalline ajoutée dans le pain est intégralement absorbable car non liée à des macromolécules. En effet, la vitamine B12 alimentaire arrive dans les voies digestives liée à des protéines, puis fait l'objet d'un processus physiologique pour libérer ses liens protéiques, sous l'effet de l'acidité gastrique, avant d'être absorbée.

Pour vérifier la disponibilité de la vitamine B12, deux expérimentations ont été réalisées :

- ◆ Mise en suspension de farine et de pain enrichis en vitamine B12 pour vérifier l'absence d'adsorption par le charbon végétal, ce qui implique l'absence de liaison protidique. En effet, le charbon actif, mis en suspension avec la farine ou le pain, ne peut se fixer qu'à la B12 libre non liée aux protéines du pain et former un complexe. Ainsi, après élimination des complexes formés avec le charbon, la solution finale contient la vitamine B12 fixée aux protéines du pain.
- ◆ Mise en suspension de farine et de pain supplémentés in vitro avec de la vitamine B12 radioactive (Co 57 cyanocobalamine) à forte activité spécifique à des concentrations identiques (100 µg /100g de farine), puis comptage de la radioactivité avec un compteur gamma. Enfin, mise en suspension avec une solution de charbon : le taux de B12 a été mesuré avant et après traitement comme précédemment décrit.

2. Résultats

À la suite du traitement par charbon de la farine contenant 140 µg /100g, le taux résiduel était inférieur à 10 µg. La même expérience à partir de pain contenant 40 µg /100g fournit un taux résiduel < 5 µg. Il est ainsi montré qu'après traitement au charbon actif, la solution finale ne contient pratiquement plus de vitamine B12.

La 2^e expérience retrouve, avant traitement par charbon, une moyenne de 140000 cpm (coups par minute). Après traitement par charbon, moins de 500 cpm sont comptés dans le surnageant, témoignant que la quasi intégralité (> 99,5 %) de la B12 rajoutée in vitro a été adsorbée par la solution de charbon. **Ces 2 expériences montrent que la fixation de vitamine B12 aux protéines du pain peut être négligée.**

3. Stabilité à la cuisson des vitamines

1. Bibliographie

Les études préalables sur la stabilité de l'acide folique lors de la cuisson du pain sont peu nombreuses, et s'appliquent mal à la situation française en termes de dose d'acide folique et de méthode de préparation et de cuisson¹⁸³⁻¹⁸⁵.

Elles fournissent des résultats parcellaires et peu comparables, qui nécessitent d'être confirmées. Dans un cas, il s'agit d'une comparaison avec la matière sèche de la pâte à pain (11 % de destruction), dans l'autre cas, il s'agit d'une comparaison avec la matière sèche du pain (environ 30 % de destruction).

2. Méthodologie

Une expérimentation de stabilité des vitamines à la cuisson de plusieurs échantillons de pain a été menée à l'INBP en octobre 2002, suivant le diagramme de fabrication le plus fréquemment utilisé en boulangerie.

- ◆ Pétrissage (hydratation : 61 %, 1 kg de farine de blé standard blanche (type 55), 22 g de sel, 22 g de levure sèche),
- ◆ Pointage : 30 minutes à T° ambiante (20°C),
- ◆ Division des patons + boulage,
- ◆ Détente : 15 minutes à T° ambiante (20°C),
- ◆ Façonnage,
- ◆ Apprêt : 1h30 dans une chambre de fermentation à 25°C à 85 % d'hydratation,
- ◆ Cuisson : 25 minutes à 240°C.

Plusieurs types d'échantillons ont été dosés :

- ◆ 3 échantillons de farine de blé enrichis avec une combinaison de : 30 µg à 3 mg d'acide folique et avec 1 µg à 100 µg de B12/100 g de farine,
- ◆ 3 échantillons de pain avec les mêmes concentrations,
- ◆ 1 échantillon de farine et un de pain non enrichis pour servir de témoin.

Les trois échantillons de farine et de pain ont chacun été dosés 4 à 5 fois pour tenir compte de la variabilité analytique. La méthode de dosage était de type microbiologique avec lecture pHmétrique finale.

Les valeurs données dans le tableau ci-dessous correspondent à la moyenne des 4 mesures ± écart-type (s.d.).

3. Résultats concernant l'acide folique

Il faut rappeler que, dans les aliments, les folates naturels se trouvent sous deux formes : polyglutamates (50 à 70 %) et libres (30 à 50 %). Seule cette dernière forme est mentionnée dans les résultats, étant donné que l'acide folique est lui-même ajouté sous forme libre dans la farine : c'est à partir de cette forme que le pourcentage de destruction est calculé.

Dans notre expérimentation, la valeur moyenne des folates totaux (polyglutamates + libres) est de 26,5 µg / 100 g de farine. Cette valeur est très proche de celle indiquée dans la table de composition du Répertoire Général des Aliments (24 µg /100 g de farine blanche), et permet de valider la méthode de mesure utilisée dans l'expérimentation¹⁸⁶.

Tableau 17. Stabilité de l'acide folique à la cuisson de différentes doses d'enrichissement de la farine

Enrichissement (µg / 100 g de farine)	B9 libre naturelle /100 g pain frais m ± s.d. (µg)	Matière sèche %	B9 libre naturelle /100 g pain sec m ± s.d. (µg)	Moyenne (B9) /100 g pain sec (µg)	% de destruction de l'acide folique
0 (étalon 1)	7,0 ± 0,3	72,25	9,7 ± 0,4	10 *	
0 (étalon 2)	7,7 ± 0,3	72,25	10,2 ± 0,4		
30 (échantillon 1)	19,3 ± 3,5	75,25	25,7 ± 4,7	26,4	45 %
30 (échantillon 2)	20 ± 0	73,80	27,1 ± 0		
150 (échantillon 3)	62 ± 3	80,8	77 ± 5	86	49 %
150 (échantillon 4)	70 ± 4,4	74,0	95 ± 6		
300 (échantillon 5)	113 ± 3	76,8	147 ± 4	155	52 %
300 (échantillon 6)	126 ± 0	74,8	163 ± 0		

* La moyenne des 2 valeurs (= 10 µg) en l'absence d'enrichissement est la teneur en vitamine B9 libre du pain. Cette valeur moyenne sera soustraite à chacun des dosages pour ne conserver que l'acide folique, dans le calcul du pourcentage de destruction.

Cette expérimentation sur des échantillons de farines enrichies indiquent une **perte après cuisson de l'acide folique qui varie de 45 à 52 %**, c'est-à-dire très supérieure aux valeurs indiquées dans les études citées plus haut (de 11 à 33 % de destruction). Il est possible que la mauvaise homogénéisation du mélange d'acide folique et de farine soit à l'origine de ces pourcentages élevés.

Une expérience complémentaire a été réalisée avec le même protocole de fabrication, mais avec pour référence, un dosage effectué sur la pâte enrichie avant cuisson et non sur le taux théorique d'incorporation. Partant d'une solution aqueuse d'acide folique dans la pâte à pain avant cuisson, cette expérience donne des résultats plus clairs en permettant une bonne homogénéisation de l'acide folique dans le pain. L'acide folique a été dosé dans différents échantillons de pâte à pain et de pain cuit. Rapportée à la matière sèche (MS) du pain, la valeur des folates libres « naturels », non ajoutés, varie entre 7 et 16 µg /100 g de matière sèche (moyenne : 12,6 ± 4 µg /100 g MS), indépendamment de la quantité d'humidité présente (cf. tableau 18).

Des prélèvements d'échantillons de pain après cuisson, à différents endroits de la miche de pain, indiquent un gradient de destruction de l'acide folique selon le degré d'humidité de l'échantillon. Le pourcentage de destruction de l'acide folique est en moyenne de 25 %. Il est plus élevé si le prélèvement est réalisé au niveau de la croûte (42 %), par rapport à la mie où la destruction est moins importante (6 %), du fait, semble-t-il, d'une humidité plus grande.

Tableau 18. Stabilité de l'acide folique à la cuisson, après enrichissement de la pâte à pain (équivalent de 360µg/100 g de farine).

Pâte	Pain		% de destruction de l'acide folique
	Acide folique (µg /100 g de poids frais)	Matière sèche %	
0 (étalon 1)	10 ± 0,9	62	-
0 (étalon 2)	5 ± 1,6	68	-
0 (étalon 3)	8,4 ± 7,4	73	-
0 (étalon 4)	11,7 ± 0,4	76	-
360 (échantillon 1)	239 ± 18	68	6 %
360 (échantillon 2)	228 ± 21	70	12 %
360 (échantillon 3)	230 ± 25	71	15 %
360 (échantillon 4)	207 ± 12	77	28,5 %
360 (échantillon 5)	205 ± 46	82	42 %

En conclusion, la conservation de l'acide folique ajouté à la farine à des quantités de l'ordre de 200 à 400 µg /100 g de farine, soumis à la cuisson du pain dans les conditions classiques de fabrication (240°C pendant 25 minutes) dépend de plusieurs facteurs, en particulier du degré d'humidité maintenu dans le pain après cuisson, c'est-à-dire de la taille et de la forme du pain, la plus grande proportion de croûte étant un facteur de perte. On peut estimer, de ce point de vue, que la perte d'acide folique est de 20 à 25 % dans les conditions standards de préparation et de consommation du pain. Les autres facteurs déterminants sont l'homogénéité du mélange d'acide folique ajoutée à la farine, et la durée de conservation de la farine enrichie. La présence de vitamine C comme additif dans la préparation de la majorité des pains français est un élément en faveur de la conservation de l'acide folique ajouté.

Au total, on peut estimer à 30 % le niveau de destruction de l'acide folique après cuisson, cependant il serait utile que des expérimentations complémentaires soient réalisées pour confirmer ces résultats.

4. Résultats concernant la vitamine B12

Un premier résultat non évident pour les spécialistes a été obtenu : il existe de la vitamine B12 à l'état naturel dans le pain non enrichi.

Pour ce qui concerne le niveau de destruction, le tableau ci-dessous montre que le **pourcentage de destruction de la vitamine B12 après cuisson est de 38 à 45 %**, lorsque ce résultat est exprimé par rapport à la concentration en B12 dans la farine, sous forme de matière sèche. Il n'y a pas eu d'expérience similaire avec la pâte à pain, comme cela a été réalisé pour l'acide folique.

Tableau 19. Stabilité de la vitamine B12 à la cuisson de différentes doses d'enrichissement avec 2 échantillons différents par dose d'enrichissement.

Enrichissement (μg / 100 g de farine)	Moyenne des 2 échantillons (B12) /100 g pain sec (μg)	% de destruction de la vitamine B12
0 (étalons 1 et 2)	0,045	
1 (échantillons 3 et 4)	0,62	38 %
5 (échantillons 5 et 6)	3,05	39%
10 (échantillons 7 et 8)	5,58	45 %

En pratique, on retiendra un pourcentage de destruction de 45 %.

4. Aspect du pain après enrichissement en vitamine B12

L'incorporation de vitamines B12 à la dose de 25, 100 ou 500 μg / 100 g de farine ne modifie pas l'apparence du pain, dans les conditions habituelles de cuisson aux USA³⁶. À partir d'une très forte dose de 1000 μg /100 g de farine, on pouvait observer une coloration blanc cassé du pain avec quelques traces rosées.

À la demande du Center for Disease Control and Prevention (CDCP), l'Institut Américain du Pain a évalué l'absence de modification de l'aspect du pain après enrichissement aux doses suivantes : 700, 800, 900 et 1000 μg / 100 g de farine¹⁸⁷. La B12 cristalline était incorporée après dilution dans de l'eau. Aucune modification du niveau de fermentation du pain n'était observée. À la dose maximale, il était observé une même coloration blanc cassé du pain. En revanche, la coloration rosée de la mie n'a pas été retrouvée dans cette expérimentation, même à la dose maximale.

5. Homogénéité et traçabilité des vitamines incorporées dans la farine

Pour permettre une bonne homogénéité des additifs introduits dans la farine, les professionnels ont généralement recours à une pré-dilution, en utilisant des mélanges pré-établis dans lesquels les additifs sont présents à concentration plus élevée. Il conviendrait d'avoir recours à cette technique dans le cas de l'enrichissement en vitamines du groupe B.

Le décret 66-564 du 29 juillet 1966, modifiant le décret du 05 avril 1935 relatif au régime des farines panifiables et à leur circulation, précise que le transport et la détention des farines panifiables ne peuvent avoir lieu qu'en sacs plombés et munis d'une étiquette de garantie. En cas de transport en vrac des farines, les trappes de chargement des véhicules et les vannes d'extraction, doivent être munies d'étiquette. Par ailleurs, l'article 7, du décret 84-1147 du 7 décembre 1984 précise que : « les indications mentionnées sur l'étiquette de garantie sont reproduites sur les factures. Elles sont extraites du registre des entrées et sorties du blé et de farine panifiables et autres produits de la mouture, tenu dans chaque moulin... ». Ces décrets permettent l'identification et le suivi des farines enrichies en vitamines B.

6. Choix de la forme de vitamine B9

La vitamine B9 sous forme d'acide folique est la forme de molécule la plus adaptée pour l'enrichissement. Le 5-méthyltétrahydrofolate (CH₃-THF) n'est pas adapté pour un enrichissement des farines pour des raisons économiques, d'efficacité et de stabilité de la molécule.

7. Choix des doses de vitamines

Rappelons qu'au chapitre VIII.2, un taux d'enrichissement de 240 μg d'acide folique efficace /100 g de farine permettait de faire passer l'apport moyen total en folates des femmes âgées de 15 à 44 ans de 230 $\mu\text{g}/\text{j}$ à 400 $\mu\text{g}/\text{j}$. Ce dernier taux est celui considéré comme permettant une prévention des AFTN. Les expériences de stabilité de la vitamine B9 montrent que le pourcentage de destruction de l'acide folique est de l'ordre de 30 %, lorsque ce résultat est rapporté à la concentration d'acide folique dans la pâte à pain, en matière sèche.

La dose d'acide folique proposée pour l'enrichissement est donc de 350 μg /100 g de farine. De la même façon, un taux d'enrichissement de 5 μg de vitamine B12 efficace /100 g de farine permettait d'améliorer le statut vitaminique des sujets carencés. Pour tenir compte de la destruction de la vitamine à la cuisson estimée à 45 %, **la dose de vitamine B12 proposée est de 10 μg /100 g de farine.**

A. Aspects éthiques

En termes éthiques, quatre questions principales peuvent être posées :

- Est-il envisageable d'enrichir la farine en vitamines B en France sans avoir l'assurance de l'absence totale d'effets adverses ?
- Est-il envisageable de ne pas enrichir la farine en France sachant que la supplémentation en acide folique des femmes en âge de procréer réduit de façon indiscutable l'incidence des AFTN et que l'impact de la promotion de la supplémentation individuelle des femmes est médiocre ?
- Est-il envisageable que la décision d'enrichissement des farines en vitamines B en population puisse être prise en fonction d'une analyse de bénéfices et de risques sachant que ce ne seront pas les mêmes groupes de population qui sont concernés par les différents effets (grossièrement, effets bénéfiques chez les femmes en âge de procréer, effets adverses potentiels chez les sujets âgés) ?
- est-il envisageable d'imposer à l'ensemble de la population la consommation d'un aliment enrichi sans laisser la liberté au consommateur de choisir cet aliment non enrichi ?

L'étude du processus ayant conduit à la décision en 2002 de surseoir à l'enrichissement au Royaume Uni est, en ce domaine, informative¹⁸⁸. En effet, la décision de l'agence de sécurité sanitaire des aliments (FSA) au Royaume-Uni, de ne pas suivre les recommandations du groupe de travail du ministère de la santé sur un enrichissement à 240 µg efficace de vitamine B9 /100 g de produit transformé oblige à s'interroger sur ses motivations. En termes chronologiques, à la suite du rapport remis par le ministère de la santé en janvier 2000¹⁷¹, un débat public avait été organisé en mars 2002 entre l'administration, les associations de consommateurs et les scientifiques impliqués. Deux mois plus tard, le FSA prenait la décision de surseoir pour les raisons suivantes qui reprennent en partie les questions précédentes :

- ◆ On ne dispose pas d'assez de preuves de l'innocuité de l'enrichissement vis-à-vis du masquage de la carence en vitamine B12,
- ◆ Les aspects techniques de l'enrichissement ne sont pas maîtrisés,
- ◆ Le choix du consommateur ne serait pas respecté en cas d'un enrichissement généralisé obligatoire.

Concernant le premier point, la gravité des affections qui se développeraient à la suite d'un éventuel masquage nécessite évidemment discussion. Il n'existe quasiment aucune preuve publiée d'effets de ce type, pour les doses nutritionnelles d'acide folique concernées par l'enrichissement envisagé dans ce rapport. Par ailleurs, cette problématique est en grande partie résolue, par la proposition reprise par le Comité de Pilotage d'une combinaison acide folique et vitamine B12.

Le deuxième argument peut aussi être discuté : les USA, le Canada, la Hongrie ou le Chili ont entrepris un enrichissement de leurs farines sans que cela pose de difficultés techniques particulières. Les discussions préliminaires menées avec les industriels du secteur sont de ce point de vue sans ambiguïté. Par ailleurs, même si les différentes méthodes de fabrication du pain ne sont pas directement reproductibles, les expérimentations de stabilité des vitamines à la cuisson, réalisées dans le cadre du présent rapport montrent qu'il est tout à fait possible d'adapter l'enrichissement au contexte français.

Enfin, poser la question d'un enrichissement généralisé des farines soulève la difficulté de respecter le libre choix du consommateur de consommer du pain non enrichi. La décision d'un enrichissement facultatif ne semble pas adapté car les bénéfices de santé deviendraient en grande partie aléatoires et sans doute insuffisants compte tenu d'une exposition vraisemblablement beaucoup plus faible de la population à l'effet des vitamines B. Toutefois, il semble difficilement concevable que le libre choix du consommateur vis-à-vis de la consommation de pain non enrichi ne soit pas respecté. La solution de proposer d'enrichir toutes les farines panifiables à l'exception de celles utilisées pour le pain dit de " tradition française " permet de le faire. Bien que ce type de pain ne représente que 5 % des parts de marché du pain consommé en France, il est le seul à ne contenir aucun additif, contrairement à l'ensemble des autres pains disponibles pour le consommateur. Ce pain représente en fait un atout majeur pour respecter le choix du

consommateur sans surcoût important tout en ne pénalisant pas la profession de la boulangerie pâtisserie artisanale qui a beaucoup fait pour la promotion de ce pain.

Il semble donc que les arguments employés par l'agence de sécurité sanitaire des aliments au Royaume-Uni contre une décision d'enrichissement ne sont pas tous directement transposables au contexte français qui permet de leur offrir une réponse adaptée.

Concernant la troisième question posée au début de ce chapitre, c'est-à-dire les possibles impacts de l'enrichissement selon les différents sous groupes de population, on peut difficilement ne pas évoquer la "solidarité trans-générationnelle" qui pourrait rendre la question elle-même non éthique. Par ailleurs la preuve qui serait donnée à l'avenir de l'efficacité préventive des apports en acide folique dans le domaine cardio et cérébrovasculaire pourrait évidemment modifier totalement la manière de poser la question.

Enfin, les réponses données aux deux premières questions semblent indiquer que si la mesure de santé a prouvé son efficacité, tout le monde doit en profiter, si elle n'a pas d'efficacité prouvée, voire si elle est potentiellement dangereuse, il ne faut pas la mettre en œuvre. Néanmoins, ainsi que la première partie de ce rapport le montre, la situation de l'enrichissement des farines en vitamines B est moins manichéenne qu'il n'y paraît ; en effet les effets adverses potentiels de cet enrichissement ne peuvent être « balayés d'un revers de manche ». Même s'ils sont peu probables et très certainement très rares, le retard au diagnostic des vrais Biermer, et l'augmentation des crises chez les sujets épileptiques traités... représentent des questions réelles et il n'est pas possible de garantir un risque zéro. D'un autre côté, on peut affirmer avec quasi-certitude, à partir des essais individuels et des expériences collectives d'autres pays, que l'enrichissement des farines réduit les AFTN.

Devant ce problème délicat, alors que le Royaume Uni a décidé de surseoir à la supplémentation, le choix d'autres pays, notamment les Etats Unis et le Canada, a été celui du compromis avec décision d'enrichissement par de faibles doses d'acide folique sans complément de vitamine B12, absence de programme pilote, et donc d'évaluation précise des effets à la fois bénéfiques mais aussi adverses potentiels...

Fort des expériences et réflexions des autres pays, le Comité de Pilotage a estimé que la meilleure réponse **éthique**, mais aussi **scientifique**, à la problématique d'enrichissement alimentaire en vitamines B, est la réalisation d'un programme pilote d'enrichissement des farines en France sur une région de taille suffisante, avec une évaluation précise des effets. En effet, en décembre 2002, on ne peut pas considérer qu'il y a perte de chance liée à la réalisation d'un programme-pilote car il n'est pas prouvé que les effets bénéfiques (certains sur les AFTN) surpassent, en termes médicaux, les effets adverses potentiels (hypothétiques).

En la matière, les avis des experts internationaux semblent très variables ; l'argumentaire éthique est parfois utilisé pour accréditer la thèse de l'enrichissement, parfois pour accréditer l'inverse¹⁸⁹⁻¹⁹¹. La proposition d'entreprendre un « field trial » qui se révèle proche du programme-pilote du présent rapport a été faite récemment pour le Royaume Uni¹⁸⁹.

B. Acceptabilité des consommateurs et des professionnels

Après avoir auditionné des représentants des principales professions concernées (meuniers et boulangers) au niveau national et régional, il est apparu que l'acceptabilité des professionnels était quasi-exclusivement conditionnée par le fait que la mesure d'enrichissement ne se traduise pas par des coûts supplémentaires, et surtout qu'elle n'entraîne pas de désaffection pour la consommation de pain et viennoiseries. Si le pain pouvait gagner en "allégation santé" pouvant conduire à une augmentation de consommation grâce à une mesure d'enrichissement des farines, les professionnels pourraient même contribuer à "porter le projet".

Du côté des consommateurs, aucune audition n'a été réalisée, mais le Comité de Pilotage a bénéficié de l'expérience de certains de ses membres, notamment dans le cadre du Plan National Nutrition Santé. Il est apparu qu'idéalement, les associations de consommateurs devraient être considérées comme partenaires à part entière, avec partage le plus complet possible des informations. Dans la région pilote retenue, une communication "grand public" axée vers les consommateurs devrait être envisagée, et portée par un grand nombre de représentants (professionnels de la meunerie et de boulangerie, associations de consommateurs, conseil

général, conseil régional, DDASS, DRASS, caisses d'assurance maladie, union régionale des médecins libéraux, élus...)

Le libre choix des consommateurs de pouvoir consommer sans difficulté du pain fabriqué à partir de farines non enrichies semble être un élément important. Des discussions devront être menées avec les associations de consommateurs dans le cadre du programme-pilote.

C. Aspects réglementaires

1. En France

Les vitamines B9 et B12 existent à l'état naturel dans la farine de blé. La mesure d'enrichissement proposée dans le rapport consiste à augmenter la concentration d'une vitamine déjà présente (situation de « restauration ») dans une denrée alimentaire courante telle que le pain. En France, toute demande d'autorisation d'enrichissement de denrées alimentaires courantes doit faire l'objet d'un avis de l'Afssa. Plusieurs cas de figure peuvent se présenter lors d'une demande d'autorisation d'emploi :

- ◆ Définitive : un arrêté d'autorisation d'emploi doit être pris afin d'introduire les nouvelles dispositions dans la réglementation et doit être notifié à la Commission Européenne (CE) selon les procédures en vigueur.
- ◆ Temporaire : une autorisation administrative peut être envisagée sans nécessairement prévoir une autorisation d'emploi par le biais d'un arrêté spécifique.

Il n'existe pas, à ce jour, d'autorisation d'enrichissement à caractère obligatoire, pour des denrées alimentaires courantes, qui ait été donnée sur des motifs de santé publique. Les seules de ce type qui existent sont optionnelles et concernent l'utilisation du fluor et de l'iode dans le sel culinaire, pour lesquels le consommateur conserve une possibilité totale de choix.

2. En Europe

Il existe actuellement un projet de directive de la Commission Européenne du 15 février 2001 (2001/15/CE), relative aux substances qui peuvent être ajoutées dans un but nutritionnel spécifique aux denrées alimentaires destinées à une alimentation spécifique. Cette directive, à terme transposable en France, fixe la liste de substances qui peuvent faire l'objet d'un enrichissement pour ce qui concerne les **aliments destinés à une alimentation particulière**, dont les vitamines B9 et B12. Il n'existe pas de contre-indication de la Commission Européenne (CE) à la mise en place d'un enrichissement des farines pour ces deux vitamines.

S'agissant de l'enrichissement en vitamines et minéraux des **aliments courants**, un autre projet de directive a été annoncé par les services de la CE, sans date de publication précise à ce jour. Il viserait à préciser les modalités d'enrichissement en vitamines et minéraux des aliments courants, sous la forme d'une **mesure non obligatoire** pour les professionnels concernés.

Dans l'hypothèse de la prise d'un arrêté en France visant à autoriser ou à imposer l'enrichissement des farines en vitamines du groupe B, la France serait autorisée par la CE à prendre cet arrêté dans la mesure où une **nécessité de santé publique** serait mise en avant pour la population.

Dans le cadre d'une autorisation temporaire ou définitive, la demande d'autorisation doit préciser la dose des vitamines, la forme chimique d'apport, le critère de pureté et du coefficient de stabilité, mais aussi, préciser pour le vecteur le type de farines auquel l'enrichissement est destiné (exemple : farines à destination de la panification).

IV. Conclusion : nécessité d'un programme-pilote d'enrichissement

Le Comité de Pilotage a pris position en faveur de la réalisation d'un programme-pilote d'enrichissement des farines en vitamine B9 à hauteur de 350 µg pour 100 g de farine (=240 µg efficace) et B12 à hauteur de 10 µg pour 100 g de farine (=5 µg efficace) dans une région française pendant 5 ans, comprenant une évaluation en termes de santé publique.

Les principaux éléments ayant conduit à cette proposition sont les suivants :

Concernant la prévention des AFTN, il n'y a pas de nouvelles données scientifiques publiées depuis les années 1990 en termes de niveau de preuve ; par contre, la supplémentation individuelle des femmes en âge de procréer a montré ses limites, laissant la place à l'évaluation de l'enrichissement des farines ;

On peut affirmer avec quasi-certitude, à partir des essais individuels et des expériences collectives d'autres pays, que l'enrichissement des farines réduit les AFTN ;

La possibilité d'effets adverses de l'enrichissement ne peut être en théorie éliminée. Même s'ils sont peu probables et très certainement très rares, un risque-zéro ne peut être garanti. Il doit donc exister une place à l'évaluation précise de cette mesure du point de vue de la santé publique ;

Dans la situation scientifique actuelle, il n'y a pas de perte de chance liée à la réalisation d'un programme pilote car il n'est pas prouvé que les effets bénéfiques (certains dans le cas des AFTN) surpassent les hypothétiques effets adverses ; les régions concernées ou non par le programme-pilote d'enrichissement des farines continueront à bénéficier de la promotion de la supplémentation individuelle des femmes en âge de procréer ;

Si les bénéfices cardio et cérébrovasculaires étaient prouvés, la non-supplémentation, et donc le programme pilote d'enrichissement des farines représenteraient une perte de chance pour les autres régions car les effets bénéfiques surpasseraient, et de loin, les effets adverses potentiels. Dans ce cas le Comité propose l'extension du programme-pilote au reste du pays. En l'absence de données scientifiques convaincantes sur ce sujet, la généralisation de l'enrichissement des farines en vitamines B en France dépendra dans une grande mesure des résultats de l'évaluation proposée,

Dans tous les cas, le programme-pilote aura permis d'acquérir une importante expérience dans les aspects opérationnels de l'enrichissement des farines en France.

V. Proposition du programme-pilote en Alsace

A. Faisabilité de l'enrichissement en Alsace

1. Introduction

L'objectif du programme-pilote est de proposer un enrichissement des farines de blé à destination de la panification. Le secteur concerné est celui de la boulangerie-pâtisserie artisanale qui permet une bonne traçabilité des produits fabriqués. La farine produite dans la région d'Alsace est en majeure partie consommée localement, ce qui ne serait pas le cas de la farine utilisée pour la fabrication de produits alimentaires industriels, qui peuvent être exportés vers d'autres régions (cf. infra).

Toutefois, cette condition étant remplie, la nécessité de recueillir, dans la région-pilote, le maximum d'indicateurs de santé dans de bonnes conditions méthodologiques apparaît essentielle dans le choix de la région.

L'Alsace représente la seule région de France qui regroupe à la fois des registres de malformations congénitales, de cancers et de pathologies cardiovasculaires ischémiques. À ce titre, elle constitue une exception qui permet une évaluation dans le temps de plusieurs pathologies dans une même zone géographique où les structures sont opérationnelles et en place depuis plusieurs années.

La sensibilisation actuelle de la population alsacienne et des autorités de santé régionale autour de la prévention des maladies chroniques, en particulier cardiovasculaires et cérébrovasculaires est importante. Dans cette région de France, peut être plus que dans toute autre, l'implication des comportements alimentaires et la morbi-mortalité élevée de la population est reconnue et rend sans doute plus aisée l'acceptation d'un programme de santé publique d'intervention nutritionnelle.

2. Marché de la farine et du pain en Alsace

1. Farine

La région meunière " Alsace-Moselle " est composée des 3 départements du Bas-Rhin, Haut-Rhin et Moselle, regroupés autour du syndicat de la meunerie. La concentration des structures de production est importante. Par exemple, dans le département du Bas-Rhin, sur les 17 moulins existants, 2 moulins concentrent 93,3 % de la production locale.

Dans l'ensemble de cette région meunière, au total 28 moulins produisent 206 248 tonnes, réparties suivant les départements :

- ◆ Bas-Rhin : 17 moulins, qui produisent 97 105 tonnes,
- ◆ Haut-Rhin : 7 moulins, qui produisent 46 854 tonnes,
- Moselle : 4 moulins, qui produisent 62 289 tonnes.

Cependant, d'après l'ANMF, et bien que la quantité exacte de farine importée ne soit pas disponible, le **principal devenir des importations de farine en Alsace serait vers une utilisation de type industrielle**. Ceci plaide en faveur d'un enrichissement des farines à destination artisanale uniquement, afin de maîtriser plus précisément la filière de l'enrichissement.

Tableau 20. Origine de la farine utilisée pour la panification en Alsace en 2001 (en tonnes) *

Catégories d'utilisateurs	Farine produite en Alsace (A)	Farine utilisée en Alsace (B)	Ratio (A/B) (en %)
Boulangerie et pâtisserie artisanale	44 624	48 012	93 %
Négociants en farines	578	1 081	53 %
Fabrication de mixes	24	24	100 %
-----> Sous-total boulangerie artisanale	45 226	49 118	92 %
Boulangerie - pâtisserie industrielle	4 780	6 752	70 %
Ateliers de boulangerie - pâtisserie grande surface	5 444	6 613	82 %
Secteur public	516	517	100 %
Cession à Moulin (ventes entre moulins)	2 755	3 642	75 %
Total panification	58 724	66 644	88 %

* Départements Bas-Rhin (67) et Haut-Rhin (68)

Sources : ONIC/ANMF/Douanes

Sur le total du tableau ci-dessus, on constate que 88 % des farines panifiables utilisées en Alsace sont issues de la région. Cela signifie qu'environ 10 % des farines utilisées viennent d'autres

départements (10, 21, 39, 54, 57, 71, 72 et 81). Toutefois, il est intéressant de noter que la majorité de ces départements ne sont pas limitrophes à la région d'intervention, ce qui limite l'arrivée dans la région d'intervention de farine panifiable non enrichie.

En 2001, l'Alsace a utilisé 66 644 tonnes de farine pour la panification, dont 58 724 tonnes ont été produites localement, soit un rapport de 88 %. Après élimination des négociants en farines (578 tonnes produites) qui représentent un secteur hétérogène, ainsi que le secteur de la boulangerie-pâtisserie industrielle (4 780 tonnes), qui a une filière de diffusion à part, on constate que **sur l'ensemble de la farine panifiable utilisée en Alsace : 91 % est produite localement**. Ceci signifie que 91 % du pain produit et consommé en Alsace pourrait être enrichi en vitamines B. Enfin, en Alsace, l'ensemble des artisans boulangers-pâtisseries est adhérent au syndicat professionnel de la boulangerie-pâtisserie qui représente près de 70 % de la part de marché du pain dans cette région. Ceci est un atout de pour la communication auprès de cette profession et des consommateurs (ex : mise à disposition de brochure dans les magasins).

Après rencontre avec les représentants professionnels de la boulangerie-pâtisserie et de la meunerie en Alsace, il semblerait que 14 moulins sur les 28 qui sont présents dans cette région pourraient réaliser les mélanges de pré-dilution et les distribuer aux autres moulins ; ces derniers se chargeant à leur tour de les incorporer dans la farine qu'ils produisent.

2. Consommation de pain

Bien qu'il ne soit pas possible de la comparer rigoureusement avec les données de l'étude INCA du fait de méthodologies différentes, l'enquête de population réalisée dans le cadre de l'étude MONICA¹⁹², sur 3 départements en 1995 - 1997, permet d'estimer la consommation de pain dans le Bas-Rhin pour les 35 à 64 ans (n=807). La fréquence de consommation, calculée à partir d'un carnet alimentaire de 3 jours (2 jours de semaine et 1 jour de week-end) est résumée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 21. Fréquence de consommation de pain en Alsace.

Nombre de consommations de pain /jour	Hommes (n=398)	Femmes (n=409)
> 3 fois	42 %	21 %
1 à 3 fois	41 %	49 %
< 1 fois	17 %	30 %

Au plan qualitatif, il est confirmé que les femmes sont des plus faibles consommatrices de pain, en comparaison aux hommes. Le détail par tranche d'âge dans la région est détaillé dans le tableau 22.

Tableau 22. Consommation de pain à l'exclusion de tout autre produit contenant de la farine (en g/j, données non publiées).

	Hommes		Femmes	
	n	m ± d.s.	n	m ± d.s.
35 - 44 ans	119	123,9 ± 66,6	127	79,5 ± 50,3
45 - 64 ans	268	125,4 ± 71,2	270	81,2 ± 50,8

B. Évaluation de l'intervention

1. Introduction

L'intérêt principal du programme-pilote est de permettre une réelle évaluation de santé publique de l'enrichissement, prévu pour se dérouler sur une durée totale de 5 ans. Cette évaluation repose sur les aspects médicaux (bénéfices attendus et surveillance des effets adverses potentiels), mais aussi sur la mise en place pratique de l'enrichissement, c'est-à-dire le monitoring des ventes de pains et viennoiseries et des contrôles vérifiant l'application de l'enrichissement par les meuniers.

L'évaluation des aspects médicaux s'appuie sur la mesure de l'évolution de l'incidence des principales pathologies, pour lesquelles une simulation de réduction du risque a été réalisée dans ce rapport : AFTN, cardiopathies ischémiques et pathologies cérébrovasculaires (AVC). En ce qui concerne les AVC, il n'existe pas de registre de morbidité assurant la surveillance en Alsace. Il est proposé dans ce rapport l'utilisation d'un autre outil de surveillance, le PMSI (Programme de

Médicalisation des Systèmes d'Information), pour évaluer la tendance de plusieurs indicateurs comme celui de la prise en charge des AVC, dans les régions d'intervention et témoins. Une surveillance de l'évolution de l'incidence de plusieurs pathologies cancéreuses sera réalisée à l'aide des registres situés dans les zones intervention et témoins, compte tenu des potentiels effets bénéfiques sur ce type de pathologies. Un des volets de l'évaluation consistera à mesurer l'évolution des folates alimentaires, des taux plasmatiques de B9, B12 et d'homocystéine, avant et après le début de l'enrichissement sur des échantillons de population.

Enfin, afin de pouvoir surveiller la survenue d'éventuels autres effets adverses, il sera réalisé une surveillance des cas de démences et neuropathies périphériques par carence en vitamine B12 à l'aide du PMSI.

2. Épidémiologie des malformations congénitales concernées

1. AFTN

On estime à environ **32 cas/an le nombre moyen d'AFTN** constaté actuellement en Alsace (registres du Bas-Rhin et Haut-Rhin) (cf. tableau 3). Les données qui concernent la période plus récente (1990 à 1999) dans les 2 registres d'Alsace sont résumées dans le tableau 23.

Tableau 23. Nombre total de cas et incidence des AFTN entre 1990 et 1999 en Alsace*

	Bas-Rhin	Haut-Rhin	Total
Spina-bifida			
Nombre de cas	69	58	127
Incidence**	5,2	6,4	
Anencéphalie			
Nombre de cas	64	30	94
Incidence**	4,8	3,3	
Encéphalocèle			
Nombre de cas	27	10	37
Incidence**	2,0	1,1	
Incidence et nombre total de cas d'AFTN	12,0	10,8	258

* Nés vivants et morts nés, et IMG, ** Pour 10 000 naissances.

Source : données fournies par chaque registre

L'effet de l'intervention estimé par nos simulations (baisse de 21,5 % de l'incidence) conduit à une estimation de 34 cas évités en Alsace sur une période de 5 ans. Un calcul simple montre que cette différence serait significative pour $\alpha = 0,05$, avec une puissance de 70 %.

2. Fentes labiales et labio-palatines

Le nombre total cumulé pour ces 2 anomalies entre 1990 et 1999 est de 182 cas dans le Bas-Rhin et 113 cas dans le Haut-Rhin. Le nombre de cas annuel d'AFTN, sur la période 1990-1999, varie de 1 à 12 cas pour le Bas-Rhin, et de 0 à 8 cas pour le Haut-Rhin.

Tableau 24. Nombre de cas et prévalence des fentes labiales et labio-palatines en 1999 en Alsace.

	Bas-Rhin	Haut-rhin
Fentes labiales		
Nombre de cas en 1999 *	7	7
Incidence en 1999 **	5,3	7,8
Fentes labio-palatines		
Nombre de cas en 1999 *	14	4
Incidence en 1999 **	10,5	4,4

* Nés vivants et morts nés, et IMG, ** pour 10 000 naissances

Source : données fournies par chaque registre

3. Indicateurs de morbidité

1. AFTN et cardiopathies ischémiques

L'objectif de cette évaluation est de mesurer l'évolution de l'incidence des AFTN et des cardiopathies ischémiques (infarctus du myocarde et décès coronaires) à l'aide des registres de morbidité. Elle consistera à mesurer, d'une part, l'évolution au cours du temps de l'incidence dans la région d'intervention, et d'autre part, de comparer l'évolution de l'incidence entre les régions « intervention » et « témoins ». En résumé, il s'agit de réaliser les études suivantes :

- ◆ **Avant-après** : mesure de l'incidence avant et après enrichissement dans la région d'intervention : l'Alsace,
- ◆ **Ici-ailleurs** : comparaison de l'évolution de l'incidence entre la région d'intervention et 2 régions « témoins » .

Compte tenu de la localisation des registres de morbidité utilisés, les régions pourront être :

Pour les AFTN :

- Intervention : Bas-Rhin et Haut-Rhin,
- Témoins : Centre Est et Paris.

Pour les cardiopathies ischémiques :

- Intervention : Bas-Rhin,
- Témoins : Haute-Garonne et Communauté Urbaine de Lille.

2. Cancers

L'objectif est de mesurer l'évolution de l'incidence des cancers avec la même méthodologie. Les régions sélectionnées pourront être :

- Intervention : Bas-Rhin et Haut-Rhin,
- Témoins : Tarn et Isère.

4. Autres pathologies vasculaires

Un objectif du programme-pilote d'enrichissement est de permettre la surveillance de plusieurs pathologies pour lesquelles il n'existe pas de registre de morbidité. L'utilisation du PMSI comme outil de surveillance n'est pas une méthode validée. Quelques démarches d'évaluation sont en cours dans plusieurs établissements de santé pour comparer la qualité d'indicateurs PMSI par rapport aux données des registres de morbidité, en particulier concernant les AVC¹⁹³. Il est proposé que les données PMSI soient recueillies dans la région d'intervention (Alsace) ainsi que dans les deux autres zones géographiques couvertes par les registres de cardiopathies ischémiques (Haute Garonne et CU Lille).

Le PMSI ne prétend pas être un outil exhaustif de recueil de l'information et pour l'instant le chaînage des séjours n'est pas validé. À ce double titre, il ne permet pas le calcul de l'incidence des pathologies recensées. Par exemple, les patients hospitalisés pour accident vasculaire cérébral (AVC) en long séjour ou dans les hôpitaux militaires ne sont pas couverts par cet enregistrement. Le chaînage des prises en charge n'est actif que depuis 2001. À ce propos, l'InVs va débiter une étude spécifique pour évaluer la fiabilité du PMSI comme indicateur des cardiopathies et AVC ischémiques.

Après audition des représentants des registres du Bas-Rhin et Haut-Rhin, des critères ont été retenus pour constituer un indicateur de surveillance des pathologies vasculaires cérébrales :

- ◆ Diagnostic principal correspondant aux codes : AVC thrombotique, AVC hémorragique et AVC autres,
- ◆ Patients âgés < 75 ans,
- ◆ Domiciliés en Alsace,
- ◆ Hospitalisés en « soins aigus ».

L'objectif est de limiter au maximum la prise en compte de données concernant d'autres pathologies que les AVC chez des patients âgés pour lesquels le diagnostic précis d'AVC est plus difficile ou qui n'habitent pas dans la zone d'intervention.

Par ailleurs, compte tenu des bénéfices potentiels de l'intervention sur d'autres pathologies vasculaires, d'autres indicateurs seront surveillés durant l'intervention, avec les mêmes critères de sélection que pour les AVC :

- ◆ Un indicateur composite de l'ensemble de la pathologie vasculaire,

- ◆ Le nombre de procédures de revascularisation chirurgicales et instrumentales (dilatation) des axes : coronarien, céphalique et périphériques inférieurs,
- ◆ Le nombre de recours pour l'ensemble des démences (diagnostic principal ou associé).

Une première extraction des données de la base régionale de tous les établissements alsaciens de type privé ou des établissements participants au service public hospitalier (PSPH) a été effectuée pour les années 1998 à 2000, à partir des critères ci-dessus. Les pathologies coronariennes aiguës, cérébrovasculaires ou démences vasculaires ont des taux relativement stables au cours du temps. Bien que ces données soient préliminaires et exploratoires, elles illustrent les possibilités d'analyse à partir du PMSI (cf. tableau 25).

5. Surveillance des effets adverses

Comme il a été vu précédemment, le risque théorique de masquage de l'anémie par carence en vitamine B12 doit être envisagé et donc surveillé. Afin de pouvoir répondre à cette question, les séjours mentionnant les diagnostics de neuropathies périphériques ou de démences par carence en vitamine B12 seront surveillés par l'intermédiaire du PMSI. Compte tenu du faible nombre de prises en charge qui seront repérées pour ce diagnostic, il sera nécessaire d'effectuer une recherche individuelle de chacun des dossiers correspondants à ces cas, afin de vérifier l'étiologie et le contexte de survenue de l'événement. L'analyse par année, montre qu'il n'y a pas eu d'hospitalisation pour démence en Alsace sur cette période, et deux hospitalisations pour neuropathie par carence en vitamine B12 ont été réalisées dans l'ensemble de ces structures.

Tableau 25. Données PMSI de la base régionale Alsace de tous les établissements privés et des établissements participant au service public hospitalier (PSPH).

	1998		1999		2000	
	Hommes	Femmes	Hommes	Femmes	Hommes	Femmes
AVC	840	533	891	543	840	514
Infarctus du myocarde	1 061	283	1 173	344	1 075	299
Pathologie coronaire aiguë	2 747	1 106	3 070	1 225	2 386	1 024
Revascularisation	4 304	1 067	4 170	1 244	4 937	1 305
Démence vasculaire	78	46	50	41	68	36
Démence par carence en B12	0	0	0	0	0	0
Neuropathie par déficit en B12	0	0	1	1	2	0

6. Enquêtes de population

1. Objectifs

L'objectif de l'enquête de population est d'estimer les effets de l'enrichissement dans la région d'intervention, sur le plan biologique, d'une part, et des consommations alimentaires d'autre part, et de comparer les résultats avec ceux de régions témoins. Pour cela une enquête transversale de population sera réalisée en Alsace, Haute-Garonne et dans la CU de Lille avant et pendant le programme pilote d'enrichissement.

2. Principes méthodologiques

Le recrutement des échantillons de sujets pourrait être envisagé à partir de listes électorales et leur examen ad hoc réalisé après une prise de contact individuelle. Cependant la lourdeur de l'organisation de telles enquêtes est grande, et leur taux d'acceptation relativement bas (de l'ordre de 55 à 65 %). Ceci n'assure pas une excellente représentativité, en particulier parmi les populations précaires ou défavorisées, pour lesquelles il serait utile d'obtenir des informations spécifiques dans le cadre de cette évaluation.

Il est proposé alternativement un recrutement à partir des populations examinées dans les Centres de Bilan de Santé (CBS) des trois régions d'intérêt en prenant des précautions particulières par la fixation de quotas pour l'âge, le sexe et la répartition socioprofessionnelle.

Le principe serait d'effectuer dans chacune des régions un examen identique pour un échantillon de **400 sujets** (18-60 ans) recrutés séquentiellement dans les CBS concernés parmi les ayants-droits au bilan de Sécurité Sociale. En Alsace, deux échantillons supplémentaires pourront être examinés selon le même protocole : **100** femmes en âge de procréer (18-44 ans) et **100** sujets

âgés (> 60 ans) recrutés dans les CBS. De plus, un échantillon de **100** sujets de plus de 70 ans hospitalisés en moyen et court séjour en Alsace sera étudié.

3. Variables mesurées

- ◆ Biologique : réalisation d'un prélèvement sanguin lors du recrutement des sujets pour dosage des folates plasmatique et érythrocytaire, homocystéinémie plasmatique,
- ◆ Alimentaire : chaque sujet remplira un questionnaire de fréquence alimentaire comprenant une partie détaillée sur la prise de suppléments multi-vitaminiques.

7. Surveillance pratique de l'enrichissement

Parallèlement à l'évaluation des conséquences de santé liées à l'enrichissement, il faut pouvoir vérifier que les aspects matériels de l'enrichissement se déroulent dans de bonnes conditions. La Direction Générale de la Concurrence Consommation et Répression des Fraudes peut réaliser des prélèvements de farine (chez les meuniers), mais aussi de pain dans les sites de distribution (boulangeries, ateliers de boulangerie des grandes surfaces...), afin d'y effectuer un contrôle du dosage en vitamines B.

L'expérience nord-américaine a montré qu'il était fréquent de retrouver, dans les produits enrichis, des concentrations supérieures à ce qui était prévu par l'étiquetage¹⁵⁶. Pour tenir compte des pertes dues au stockage des farines, tout en respectant la mention légale précisée par l'étiquetage, il est possible que des quantités plus importantes de vitamines soient ajoutées par les professionnels concernés. Ceci justifie une surveillance régulière sur le terrain des farines, pains et viennoiseries enrichies en vitamines B.

C. Perspectives d'évolution du programme-pilote durant les 5 années

La réorientation du programme-pilote en un programme national d'enrichissement pourrait intervenir, par exemple, dans les cas suivants :

- Une décision de la Commission Européenne pour que l'ensemble des pays Européens adapte leur législation en faveur d'un enrichissement des farines. Ceci aurait pour conséquence de passer progressivement, en France, à un enrichissement généralisé sur l'ensemble du territoire, tout en bénéficiant d'une ou plusieurs années de recul nécessaires pour une comparaison fiable de l'intervention dans les régions témoins et la région d'intervention ;
- La publication des essais contrôlés de prévention cardio et cérébrovasculaire montrant un effet protecteur de l'acide folique. Dans ce cas, l'enrichissement pourrait, encore, être étendu à l'ensemble du pays.

Par ailleurs, il convient de remarquer que le programme-pilote pourrait être interrompu facilement en cas de mise en évidence d'un effet délétère de l'enrichissement en France, ou à l'étranger.

D. Coût du programme-pilote

1. Coût de l'enrichissement

La charge porte essentiellement sur le coût de l'incorporation des vitamines à la farine : achat des vitamines et acheminement, auquel s'ajoute le coût supplémentaire de fonctionnement de la production de farine enrichie. Par contre, l'infrastructure technologique nécessaire existe actuellement chez les meuniers et ne devrait pas faire l'objet de coût additionnel.

Sur un total d'environ 54 000 tonnes de farine, produites et utilisées annuellement en Alsace, il est possible de faire une estimation du coût à partir du prix au kilo de l'acide folique (140 €) et de la vitamine B12 (19 000 €). Pour un enrichissement en acide folique à 350 µg/100 g de farine et en vitamine B12 à 10 µg/100 g de farine, le coût annuel serait de :

- Acide folique : 26 460 €
- Vitamine B12 : 102 600 €.

Le coût total serait de : $129\,060 \times 5 = 646\,000$ K€ □ pour une durée de 5 ans, auquel devra s'ajouter un coût d'acheminement et une subvention de fonctionnement à définir. Remarquons que le coût de la matière première devrait correspondre à moins de 20 K€ par cas d'AFTN évité.

2. Coût de l'Évaluation

L'intérêt du programme-pilote tel qu'il est proposé est de pouvoir s'appuyer sur les structures d'évaluation qui existent déjà, c'est-à-dire : les centres de bilan de santé, les registres (malformation, cardiopathies ischémiques et cancers) et le PMSI hospitalier. Seuls les coûts supplémentaires engendrés par le programme-pilote seront pris en compte.

1. Enquêtes de population

Le coût de cette partie de l'évaluation concerne essentiellement le recrutement des sujets, les examens biologiques (vitamines B9 et B12, homocystéine), l'analyse par une diététicienne des questionnaires alimentaires, ainsi que la saisie et l'exploitation des données. En Alsace, deux enquêtes seront réalisées au total, sur 700 sujets, soit 1400 examens biologiques et enquêtes alimentaires auto-administrées. Dans les deux régions témoins, deux enquêtes seront réalisées sur 400 sujets, soit : $2 \times 2 \times 400 = 1\ 600$ sujets. Pour un coût unitaire par sujet estimé à 200 €, le coût total des enquêtes en population est estimé à $3000 \times 200 = 600\ \text{K€}$.

2. Registres, PMSI et coordination

Le poste le plus important correspond à la coordination de tous les aspects du programme réalisé en Alsace, par un médecin temps plein recruté sur une période de 5 ans, soit une estimation totale du coût de 250 K€.

Par ailleurs, des vacations de médecin enquêteur devraient permettre de renforcer les moyens de tous les registres participant au programme à hauteur de deux vacations par semaine et par registre. Une estimation du coût total est de 400 K€ pour la période de 5 ans.

3. Communication

Le programme-pilote doit comporter une phase de communication à destination des professionnels et des consommateurs en Alsace, à définir avant et pendant la période d'enrichissement. Il devra vraisemblablement faire appel à une agence de communication et son coût ne peut être estimé à l'heure actuelle.

E. Études complémentaires nécessaires

Si à la suite de ce rapport une décision d'enrichissement de la farine en vitamines B était prise, le Comité de Pilotage recommande la réalisation d'expérimentations complémentaires afin de définir les taux d'enrichissement souhaitables avec une rigueur accrue.

a) Les expériences de stabilité des vitamines à la cuisson (acide folique et B12), réalisées sur un petit nombre d'échantillons de farines et pains fabriqués selon les habitudes françaises ont constitué une étape nécessaire. Devant le peu de données scientifiques disponibles, il a semblé indispensable de fournir une réponse préliminaire dans ce rapport. Les expériences apportent un ordre de grandeur du niveau de destruction de ces vitamines, qu'il convient de préciser plus finement par une expérimentation à plus large échelle, réalisable à très court terme, dans un laboratoire spécialisé dans les dosages alimentaires.

b) Peu de données sont disponibles dans la littérature et aucune dans le contexte français sur l'effet de la supplémentation orale par de faibles doses de vitamine B12, sur les taux plasmatiques de sujets carencés en vitamine B12 par malabsorption. L'objectif est de déterminer la dose minimale de supplémentation conduisant à une normalisation des taux plasmatiques de vitamine B12. La dose de 5 µg efficace /100 g de farine proposée dans le rapport se base sur des simulations à partir des rares données de la littérature.

D'ores et déjà, un essai randomisé contrôlé en double-aveugle, financé par la Direction Régionale de la Recherche Clinique d'Ile de France de l'Assistance publique des Hôpitaux de Paris, a débuté. Il porte sur 60 sujets ayant un déficit asymptomatique en vitamine B12 par malabsorption et hospitalisés en gériatrie à l'hôpital E. Roux (Val de Marne). L'objectif est de rechercher une relation dose-effet par une supplémentation en vitamine B12 pendant 1 mois. Différentes doses de niveau nutritionnel allant de 2,5 à 80 µg/j sont testées.

VI. Synthèse et recommandations

Il a été montré dans les années 80 que la prévention d'une classe de malformations congénitales graves : les anomalies de fermeture du tube neural (AFTN) était réalisable dans un pourcentage élevé de cas par un apport supplémentaire d'acide folique (vitamine B9) au cours d'une période périconceptionnelle précise. Il a fallu attendre une dizaine d'années avant qu'une politique de santé publique prônant la supplémentation soit instaurée dans de nombreux pays dont la France. Le constat d'un échec relatif de cette politique est aujourd'hui général et d'ailleurs, très vite, certains pays avaient envisagé la possibilité d'enrichir en acide folique un vecteur alimentaire courant. C'est ainsi que les Etats-Unis et le Canada, entre autres, ont rendu obligatoire en 1998 l'adjonction de 140 µg de B9/100g de farine alimentaire (en dehors de la farine sans aucun additif). La possibilité, non encore démontrée, d'un bénéfice cardiovasculaire attaché à l'augmentation des apports en acide folique n'est pas étrangère à cette décision qui concerne l'ensemble de la population.

Le présent rapport a pour but de faire le point des connaissances scientifiques en décembre 2002, d'analyser la situation propre à la France à cette date et d'effectuer d'éventuelles recommandations de santé publique.

Synthèse des connaissances

Aucun élément scientifique nouveau n'est intervenu récemment pour remettre en cause l'efficacité de l'acide folique dans la prévention des AFTN et la simple observation des fréquences rapportées aux USA et au Canada indique d'ailleurs une diminution de leur fréquence depuis 1998. Une estimation du pourcentage de cas évités en fonction de la dose peut être obtenue et atteint 70 % pour un apport supplémentaire de 1mg/j. Il est vraisemblable que la prévention d'autres formes de malformations peut bénéficier également de cet apport. À l'opposé, les résultats d'observation se sont accumulés en faveur de l'efficacité d'un apport supplémentaire d'acide folique sur la morbi-mortalité cardio et cérébrovasculaire bien qu'une démonstration formelle par un essai contrôlé n'ait pas encore été apportée, mais elle pourrait l'être dans les 5 années à venir. Des estimations utilisant en particulier l'abaissement de l'homocystéinémie par l'acide folique montrent des réductions potentielles de l'ordre de 5 à 15 %. D'autres effets bénéfiques sont vraisemblables (pathologie thromboembolique veineuse) ou possibles (fonctions cognitives, certains cancers...).

Aucune toxicité des apports en vitamine B9 pour un apport total maximum de quelques mg/j n'est décrite. L'existence d'éventuels effets adverses a pu être évoquée à des doses dépassant un mg/j chez certains malades (épileptiques, traitement par methrotrexate...). En particulier, un effet secondaire peut se révéler négatif chez des sujets carencés en B12 (Biermer, sujets âgés avec malabsorption de la B12 alimentaire), alors que le diagnostic n'a pas été porté. La correction d'une éventuelle anémie par un apport important de B9 (à partir de 1mg/j) pourrait en effet retarder le diagnostic et de ce fait augmenter la probabilité d'une atteinte neurologique. Bien qu'aucun cas ne semble avoir été rapporté, cet effet est aujourd'hui pris au sérieux par de nombreux auteurs qui recommandent l'adjonction complémentaire de B12 au vecteur alimentaire pour éviter cet inconvénient. Les données actuelles de la littérature ne permettent cependant pas de valider entièrement l'efficacité de ce choix. Néanmoins la disponibilité biologique de la vitamine B12 cristalline chez les sujets mal absorbant la B12 alimentaire a pu être testée indirectement en montrant que la vitamine B12 ne se complexait pas avec les protéines et autres macromolécules présentes dans le pain.

Recommandations pour la situation française en 2002

Le seul vecteur alimentaire courant utilisable en France pour l'enrichissement est la farine panifiable (pains et viennoiseries), compte tenu des importations d'autres farines ou d'aliments contenant d'autres farines (pâtes...). La comparabilité des doses d'enrichissement avec le choix effectué en Amérique du Nord est de ce fait limitée.

Un ensemble de simulations effectuées à partir des données de l'enquête INCA montre qu'un enrichissement de 240 µg /100g farine de vitamine B9 permettrait d'élever à 0,4 mg/j la moyenne

des apports totaux des femmes de la tranche d'âge 18-44 ans. Cette quantité est considérée comme la dose de B9 supplémentaire permettant une couverture acceptable pour les femmes en âge de procréer. **L'estimation du bénéfice dans la population française est alors de 170 à 210 cas d'AFTN évités annuellement sur un total de 800 à 1000 cas.** De la même façon les simulations montrent qu'il est envisageable que cet enrichissement puisse conduire à **une réduction de 10 % des événements cérébrovasculaires et de 6% des événements coronaires chez les adultes de plus de 45 ans.** Toujours à la même dose de vitamine B9 incorporée dans la farine, les simulations montrent que 5 % de la population française présenteraient un apport total d'acide folique dépassant 1mg/j et donc potentiellement « à risque » en cas de carence en B12, conventionnellement définie par un taux plasmatique inférieur à 200 pg/ml. Des données récentes de la littérature (à confirmer dans une étude expérimentale de relation dose-effet) montrent qu'un enrichissement en B12 de 5 µg /100g farine permettrait que les sujets sub carencés (taux : 150-200 pg/ml) voient leur taux plasmatique s'élever au-dessus du seuil de 200 pg/ml. Bien entendu les rares carences par maladie de Biermer ne peuvent pas être corrigées avec des apports de ce type.

Des expériences préliminaires de disponibilité des vitamines, après fabrication et cuisson du pain, réalisées dans le cadre du présent rapport, montrent qu'environ 30% de la vitamine B9 et 50% de la vitamine B12 sont détruites justifiant une augmentation proportionnelle des taux d'enrichissement de la farine pour obtenir les effets escomptés, soit **350 µg de B9 et 10 µg de B12 pour 100 g de farine.**

Une décision éventuelle d'enrichissement doit prendre en compte un ensemble de **considérations éthiques** dont la littérature internationale se fait l'écho et qui ont conduit en grande partie, le Royaume-Uni à surseoir à cette décision, il y a quelques mois. De ce point de vue, on peut remarquer que :

- L'abstention n'ouvre aucune perspective pour une prévention efficace des AFTN en France,
- L'adjonction de B12 doit permettre d'éviter l'effet indésirable de masquage des carences chez les personnes âgées,
- La difficulté de faire supporter par les personnes âgées d'éventuels effets secondaires, en l'absence de bénéfice direct démontré est affaire de solidarité entre générations, mais disparaîtrait d'elle-même si d'autres bénéfices de santé étaient définitivement prouvés,
- La liberté de choix de consommer du pain non enrichi pourrait être préservée grâce à la production de pain dit de "tradition française", sans additif.

En dépit des réponses apportées à ces différentes questions, l'absence actuelle d'une véritable évaluation de santé publique (quel que soit le pays) des bénéfices (certains et probables) et des risques (hypothétiques) de l'enrichissement conduit pour des raisons à la fois éthiques et scientifiques, à recommander aujourd'hui un programme pilote d'enrichissement, aux doses indiquées précédemment, de cinq ans, dans une région française à condition qu'il comporte un volet important d'évaluation.

La **réglementation** actuelle dans le domaine de l'enrichissement ne devrait pas faire obstacle à la réalisation du programme. À l'opposé, **l'acceptabilité** par les professionnels (meunerie, boulangerie...) et particulièrement par les consommateurs et leurs associations est un aspect essentiel qui conditionne la faisabilité du programme. Certains contacts préliminaires laissent penser que cet objectif pourrait être atteint.

L'Alsace apparaît la région de choix pour l'implantation du programme-pilote, à la fois pour des raisons démographiques et épidémiologiques, par les caractéristiques favorables de son approvisionnement en farine mais surtout par sa capacité à permettre une évaluation rigoureuse, en comparaison avec des régions témoins, grâce à ses **registres de morbidité** (malformations, événements coronaires aigus, cancers). En association avec la **réalisation d'enquêtes individuelles "avant-après"** dans la population alsacienne et dans celle de deux régions témoins et avec **la surveillance des indicateurs PMSI**, ces registres permettent une évaluation de santé publique utilisant au maximum les ressources épidémiologiques existantes. Même si l'enrichissement de la farine devait être généralisé avant la conclusion du programme-pilote, ce dernier aurait permis d'acquérir une expérience particulièrement précieuse dans la maîtrise technologique et opérationnelle de l'enrichissement de la farine et resterait entièrement valable pour poursuivre l'évaluation.

VII. Références

1. Shurtleff DB, Luthy DA, Nyberg DA, Benedetti TJ, Mack LA. Meningocele: management in utero and post natum. *Ciba Found Symp* 1994;181:270-80.
2. Vodovar V, Dufouil C, Decker J, Goujar J. Spina bifida et handicap de l'enfant. in : *Ducimetière P, Montaville B, Schaffer P, Spira N. Recherche et politiques de santé. L'apport des registres de morbidité* 1992;pp 99-102, 225-228.
3. Goujard J, Ayme S, Robert E, Stoll C, De Vigan C, Dott B, et al. Impact des actions de dépistage en France sur la prévalence des naissances malformées, période 1990-1994. *BEH [13/97]* 1997.
4. Doisneau L. Bilan démographique 2001. Le regain des naissances et des mariages se confirme. *INSEE Première* février 2002;825, 4p.
5. Cherie-Challine L. La situation des registres en France en 1997. *BEH [17/97]* 1997.
6. Goujard J. Comparison of changes in neural tube defects (NTDs) prevalence in relation to primary prevention strategies: public health policy-making and implementation. Rapport du contrat du projet BIOMED II, PL 963969: INSERM 131p, 2001.
7. A EUROCAT working Group. Report 8: surveillance of congenital anomalies in Europe 1980-1999: University of Ulster, Ireland, 2002.
8. National Birth Defect Prevention Network. Congenital Malformations Surveillance Report. *Teratology* 1997;56(1/2):116-175.
9. Feinleib M, Beresford SA, Bowman BA, Mills JL, Rader JI, Selhub J, et al. Folate fortification for the prevention of birth defects: case study. *Am J Epidemiol* 2001;154(12 Suppl):S60-9.
10. Acuña J, Yoon P, Erickson J. The prevention of neural tube defects with folic acid: Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 16p, 1999.
11. Hobbs CA, Hopkins SE, Simmons CJ. Sources of variability in birth defects prevalence rates. *Teratology* 2001;64(Suppl 1):S8-S13.
12. Martin AC. Apports Nutritionnels Conseillés pour la population française. 3e édition: Tec&Doc, 2001.
13. Sauberlich HE, Kretsch MJ, Skala JH, Johnson HL, Taylor PC. Folate requirement and metabolism in nonpregnant women. *Am J Clin Nutr* 1987;46(6):1016-28.
14. Gregory JF, 3rd. Case study: folate bioavailability. *J Nutr* 2001;131(4 Suppl):1376S-82S.
15. Brouwer IA, van Dusseldorp M, West CE, Meyboom S, Thomas CM, Duran M, et al. Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled trial. *J Nutr* 1999;129(6):1135-9.
16. Hercberg S, Preziosi P, Galan P, Devanlay M, Keller H, Bourgeois C, et al. Vitamin status of a healthy French population: dietary intakes and biochemical markers. *Int J Vitam Nutr Res* 1994;64(3):220-32.
17. Observatoire des Consommations Alimentaires. Simulations d'enrichissement de la farine en folates selon plusieurs scénarios et pour différentes catégories de consommateurs. Note technique: OCA/AD/MT/2002-411: Afssa, 2002.
18. Mennen LI, de Courcy GP, Guillard JC, Ducros V, Bertrais S, Nicolas JP, et al. Homocysteine, cardiovascular disease risk factors, and habitual diet in the French Supplementation with Antioxidant Vitamins and Minerals Study. *Am J Clin Nutr* 2002;76(6):1279-89.
19. Butterworth CE, Jr., Tamura T. Folic acid safety and toxicity: a brief review. *Am J Clin Nutr* 1989;50(2):353-8.
20. Campbell NR. How safe are folic acid supplements? *Arch Intern Med* 1996;156(15):1638-44.
21. Czeizel AE, M. T. Acute toxicity of folic acid in pregnant women. *Teratology* 1999;60(1):3-4.
22. Carmel R. Cobalamin, the stomach, and aging. *Am J Clin Nutr* 1997;66(4):750-9.
23. Carmel R. Current concepts in cobalamin deficiency. *Annu Rev Med* 2000;51:357-75.
24. Lindenbaum J, Rosenberg IH, Wilson PW, Stabler SP, Allen RH. Prevalence of cobalamin deficiency in the Framingham elderly population. *Am J Clin Nutr* 1994;60(1):2-11.
25. Stabler SP, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J. Clinical spectrum and diagnosis of cobalamin deficiency. *Blood* 1990;76(5):871-81.
26. Lindenbaum J, Heaton EB, Savage DG, Brust JC, Garrett TJ, Podell ER, et al. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. *N Engl J Med* 1988;318(26):1720-8.
27. Zittoun J, Zittoun R. Modern clinical testing strategies in cobalamin and folate deficiency. *Semin Hematol* 1999;36(1):35-46.
28. Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects. *MMWR Recomm Rep* 1992;41(RR-14):1-7.
29. Institute of Medicine. *Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline*. Washington, D.C.: National Academy Press, 1998.
30. Olney JW, Fuller TA, de Gubareff T, Labruyere J. Intrastriatal folic acid mimics the distant but not local brain damaging properties of kainic acid. *Neurosci Lett* 1981;25(2):185-91.
31. Baxter MG, Miller AA, Webster RA. Some studies on the convulsant action of folic acid. *Br J Pharmacol* 1973;48(2):350P-351P.
32. Weller M, Marini AM, Martin B, Paul SM. The reduced unsubstituted pteroyl moiety is required for folate toxicity of cultured cerebellar granule neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;269(1):393-401.
33. Ch'ien LT, Krumdieck CL, Scott CW, Jr., Butterworth CE, Jr. Harmful effect of megadoses of vitamins: electroencephalogram abnormalities and seizures induced by intravenous folate in drug-treated epileptics. *Am J Clin Nutr* 1975;28(1):51-8.
34. van Ede AE, Laan RF, Rood MJ, Huizinga TW, van de Laar MA, van Denderen CJ, et al. Effect of folic or folinic acid supplementation on the toxicity and efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis: a forty-eight week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum* 2001;44(7):1515-24.
35. Zhao R, Gao F, Goldman ID. Marked suppression of the activity of some, but not all, antifolate compounds by augmentation of folate cofactor pools within tumor cells. *Biochem Pharmacol* 2001;61(7):857-65.
36. Herbert V, Bigaouette J. Call for endorsement of a petition to the Food and Drug Administration to always add vitamin B-12 to any folate fortification or supplement. *Am J Clin Nutr* 1997;65(2):572-3.
37. Shane B. Folate fortification: enough already? *Am J Clin Nutr* 2003;77(1):8-9.
38. Rajan S, Wallace JI, Beresford SA, Brodtkin KI, Allen RA, Stabler SP. Screening for cobalamin deficiency in geriatric outpatients: prevalence and influence of synthetic cobalamin intake. *J Am Geriatr Soc* 2002;50(4):624-30.
39. Chui CH, Lau FY, Wong R, Soo OY, Lam CK, Lee PW, et al. Vitamin B12 deficiency—need for a new guideline. *Nutrition* 2001;17(11-12):917-20.
40. Yates AA. National nutrition and public health policies: issues related to bioavailability of nutrients when developing dietary reference intakes. *J Nutr* 2001;131(4 Suppl):1331S-4S.
41. Heyssel RM, Bozian RC, Darby WJ, Bell MC. Vitamin B12 turnover in man. The assimilation of vitamin B12 from natural foodstuff by man and estimates of minimal daily dietary requirements. *Am J Clin Nutr* 1966;18(3):176-84.
42. Berlin H, Berlin R, Brante G. Oral treatment of pernicious anemia with high doses of vitamin B12 without intrinsic factor. *Acta Med Scand* 1968;184(4):247-58.
43. Adams JF, Ross SK, Mervyn L, Boddy K, King P. Absorption of cyanocobalamin, coenzyme B 12, methylcobalamin, and hydroxycobalamin at different dose levels. *Scand J Gastroenterol* 1971;6(3):249-52.
44. Laurence KM, James N, Miller MH, Tennant GB, Campbell H. Double-blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1981;282(6275):1509-11.

45. Milunsky A, Jick H, Jick SS, Bruell CL, MacLaughlin DS, Rothman KJ, et al. Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. *Jama* 1989;262(20):2847-52.
46. Mulinare J, Cordero JF, Erickson JD, Berry RJ. Periconceptional use of multivitamins and the occurrence of neural tube defects. *Jama* 1988;260(21):3141-5.
47. Bower C, Stanley FJ. Dietary folate as a risk factor for neural-tube defects: evidence from a case-control study in Western Australia. *Med J Aust* 1989;150(11):613-9.
48. Mills JL, Rhoads GG, Simpson JL, Cunningham GC, Conley MR, Lassman MR, et al. The absence of a relation between the periconceptional use of vitamins and neural-tube defects. National Institute of Child Health and Human Development Neural Tube Defects Study Group. *N Engl J Med* 1989;321(7):430-5.
49. Werler MM, Shapiro S, Mitchell AA. Periconceptional folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects. *Jama* 1993;269(10):1257-61.
50. Shaw GM, Schaffer D, Velie EM, Morland K, Harris JA. Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects. *Epidemiology* 1995;6(3):219-26.
51. Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, et al. Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention. *N Engl J Med* 1999;341(20):1485-90.
52. Czeizel AE, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992;327(26):1832-5.
53. Smithells RW, Nevin NC, Seller MJ, Sheppard S, Harris R, Read AP, et al. Further experience of vitamin supplementation for prevention of neural tube defect recurrences. *Lancet* 1983;1(8332):1027-31.
54. MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. *Lancet* 1991;338(8760):131-7.
55. Kirke PN, Daly LE, Elwood JH. A randomised trial of low dose folic acid to prevent neural tube defects. The Irish Vitamin Study Group. *Arch Dis Child* 1992;67(12):1442-6.
56. Vergel RG, Sanchez LR, Heredero BL, Rodriguez PL, Martinez AJ. Primary prevention of neural tube defects with folic acid supplementation: Cuban experience. *Prenat Diagn* 1990;10(3):149-52.
57. Kirke PN, Molloy AM, Daly LE, Burke H, Weir DG, Scott JM. Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. *Q J Med* 1993;86(11):703-8.
58. Smits LJ, Essed GG. Short interpregnancy intervals and unfavourable pregnancy outcome: role of folate depletion. *Lancet* 2001;358(9298):2074-7.
59. Fleming A, Copp AJ. A genetic risk factor for mouse neural tube defects: defining the embryonic basis. *Hum Mol Genet* 2000;9(4):575-81.
60. van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995;346(8982):1070-1.
61. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996;93(1):7-9.
62. van der Put NM, Eskes TK, Blom HJ. Is the common 677C→T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A meta-analysis. *Qjm* 1997;90(2):111-5.
63. Shields DC, Kirke PN, Mills JL, Ramsbottom D, Molloy AM, Burke H, et al. 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(4):1045-55.
64. Ashfield-Watt PA, Pullin CH, Whiting JM, Clark ZE, Moat SJ, Newcombe RG, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T genotype modulates homocysteine responses to a folate-rich diet or a low-dose folic acid supplement: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2002;76(1):180-6.
65. Hayes C, Werler MM, Willett WC, Mitchell AA. Case-control study of periconceptional folic acid supplementation and oral clefts. *Am J Epidemiol* 1996;143(12):1229-34.
66. Czeizel AE, Toth M, Rockenbauer M. Population-based case control study of folic acid supplementation during pregnancy. *Teratology* 1996;53(6):345-51.
67. Werler MM, Hayes C, Louik C, Shapiro S, Mitchell AA. Multivitamin supplementation and risk of birth defects. *Am J Epidemiol* 1999;150(7):675-82.
68. Itikala PR, Watkins ML, Mulinare J, Moore CA, Liu Y. Maternal multivitamin use and orofacial clefts in offspring. *Teratology* 2001;63(2):79-86.
69. Shaw GM, Lammer EJ, Wasserman CR, O'Malley CD, Tolarova MM. Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. *Lancet* 1995;12(346):393-396.
70. Tolarova MH, J. Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptional supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. *Teratology* 1995;51(2):71-78.
71. Hernandez-Diaz SW, M.M. Walker, A.M. Mitchell, A.A. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N Engl J Med* 2000;343(22):1608-14.
72. Lumley J, Watson L, Watson M, Bower C. Periconceptional supplementation with folate and/or multivitamins for preventing neural tube defects. *Cochrane Database Syst Rev* 2001;3.
73. Czeizel AE, Metneki J, Dudas I. The higher rate of multiple births after periconceptional multivitamin supplementation: an analysis of causes. *Acta Genet Med Gemellol* 1994;43(3-4):175-84.
74. Ray JG, Laskin CA. Folic acid and homocyst(e)ine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: A systematic review. *Placenta* 1999;20(7):519-29.
75. George L, Mills JL, Johansson AL, Nordmark A, Olander B, Granath F, et al. Plasma folate levels and risk of spontaneous abortion. *Jama* 2002;288(15):1867-73.
76. Mathews F, Yuckin P, Neil A. Foliates in the periconceptional period: are women getting enough? *Br J Obstet Gynaecol* 1998;105(9):954-9.
77. Mathews F, Murphy M, Wald NJ, Hackshaw A. Twinning and folic acid use. *Lancet* 1999;353(9149):291-2.
78. Hernandez-Diaz S, Werler MM, Louik C, Mitchell AA. Risk of Gestational Hypertension in Relation to Folic Acid Supplementation during Pregnancy. *Am J Epidemiol* 2002;156(9):806-12.
79. de Bree A, Verschuren WM, Blom HJ, Kromhout D. Association between B vitamin intake and plasma homocysteine concentration in the general Dutch population aged 20-65 y. *Am J Clin Nutr* 2001;73(6):1027-33.
80. Rasmussen LB, Ovesen L, Bulow I, Knudsen N, Laurberg P, Pernil H. Folate intake, lifestyle factors, and homocysteine concentrations in younger and older women. *Am J Clin Nutr* 2000;72(5):1156-63.
81. Koehler KM, Baumgartner RN, Gary PJ, Allen RH, Stabler SP, Rimm EB. Association of folate intake and serum homocysteine in elderly persons according to vitamin supplementation and alcohol use. *Am J Clin Nutr* 2001;73(3):628-37.
82. Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Wilson PW, Rosenberg IH. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Engl J Med* 1999;340(19):1449-54.
83. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. *Brmj* 1998;316(7135):894-8.
84. Bronstrup A, Hages M, Prinz-Langenohl R, Pietrzik K. Effects of folic acid and combinations of folic acid and vitamin B-12 on plasma homocysteine concentrations in healthy, young women. *Am J Clin Nutr* 1998;68(5):1104-10.
85. Cafolla A, Dragoni F, Girelli G, Tosti ME, Costante A, De Luca AM, et al. Effect of folic acid and vitamin C supplementation on folate status and homocysteine level: a randomised controlled trial in Italian smoker- blood donors. *Atherosclerosis* 2002;163(1):105-11.

86. Brouwer IA, van Dusseldorp M, Thomas CM, Duran M, Hautvast JG, Eskes TK, et al. Low-dose folic acid supplementation decreases plasma homocysteine concentrations: a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 1999;69(1):99-104.
87. Quinlivan EP, McPartlin J, McNulty H, Ward M, Strain JJ, Weir DG, et al. Importance of both folic acid and vitamin B12 in reduction of risk of vascular disease. *Lancet* 2002;359(9302):227-8.
88. Neal B, MacMahon S, Ohkubo T, Tonkin A, Wilcken D. Dose-dependent effects of folic acid on plasma homocysteine in a randomized trial conducted among 723 individuals with coronary heart disease. *Eur Heart J* 2002;23(19):1509-15.
89. Wald DS, Bishop L, Wald NJ, Law M, Hennessy E, Weir D, et al. Randomized trial of folic acid supplementation and serum homocysteine levels. *Arch Intern Med* 2001;161(5):695-700.
90. Rydlewicz A, Simpson JA, Taylor RJ, Bond CM, Golden MH. The effect of folic acid supplementation on plasma homocysteine in an elderly population. *Qjm* 2002;95(1):27-35.
91. De Leo V, La Marca A, Morgante G, Ciani F, Zammarchi E, Setacci C. Low-dose folic acid supplementation reduces plasma levels of the cardiovascular risk factor homocysteine in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183(4):945-7.
92. den Heijer M, Brouwer IA, Bos GM, Blom HJ, van der Put NM, Spaans AP, et al. Vitamin supplementation reduces blood homocysteine levels: a controlled trial in patients with venous thrombosis and healthy volunteers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18(3):356-61.
93. Ward M, McNulty H, McPartlin J, Strain JJ, Weir DG, Scott JM. Plasma homocysteine, a risk factor for cardiovascular disease, is lowered by physiological doses of folic acid. *Qjm* 1997;90(8):519-24.
94. Dierkes J, Kroesen M, Pietrzik K. Folic acid and Vitamin B6 supplementation and plasma homocysteine concentrations in healthy young women. *Int J Vitam Nutr Res* 1998;68(2):98-103.
95. Ubbink JB, Vermaak WJ, van der Merwe A, Becker PJ, Delport R, Potgieter HC. Vitamin requirements for the treatment of hyperhomocysteinemia in humans. *J Nutr* 1994;124(10):1927-33.
96. Malinow MR, Duell PB, Hess DL, Anderson PH, Kruger WD, Phillipson BE, et al. Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary heart disease. *N Engl J Med* 1998;338(15):1009-15.
97. Venn BJ, Mann JI, Williams SM, Riddell LJ, Chisholm A, Harper MJ, et al. Assessment of three levels of folic acid on serum folate and plasma homocysteine: a randomised placebo-controlled double-blind dietary intervention trial. *Eur J Clin Nutr* 2002;56(8):748-54.
98. Broekmans WM, Klopping-Ketelaars IA, Schuurman CR, Verhagen H, van den Berg H, Kok FJ, et al. Fruits and vegetables increase plasma carotenoids and vitamins and decrease homocysteine in humans. *J Nutr* 2000;130(6):1578-83.
99. Hernandez-Diaz S, Martinez-Losa E, Fernandez-Jame E, Serrano-Martinez M, Martinez-Gonzalez MA. Dietary folate and the risk of nonfatal myocardial infarction. *Epidemiology* 2002;13(6):700-6.
100. Verhoef P, Stampfer MJ, Buring JE, Gaziano JM, Allen RH, Stabler SP, et al. Homocysteine metabolism and risk of myocardial infarction: relation with vitamins B6, B12, and folate. *Am J Epidemiol* 1996;143(9):845-59.
101. Bazzano LA, He J, Ogden LG, Loria C, Vupputuri S, Myers L, et al. Dietary intake of folate and risk of stroke in US men and women: NHANES I Epidemiologic Follow-up Study. National Health and Nutrition Examination Survey. *Stroke* 2002;33(5):1183-9; discussion 1183-9.
102. Rimm EB, Willett WC, Hu FB, Sampson L, Colditz GA, Manson JE, et al. Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *Jama* 1998;279(5):359-64.
103. Voutilainen S, Rissanen TH, Virtanen J, Lakka TA, Salonen JT. Low dietary folate intake is associated with an excess incidence of acute coronary events: The Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study. *Circulation* 2001;103(22):2674-80.
104. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *Jama* 1995;274(13):1049-57.
105. Ford ES, Smith SJ, Stroup DF, Steinberg KK, Mueller PW, Thacker SB. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a systematic review of the evidence with special emphasis on case-control studies and nested case-control studies. *Int J Epidemiol* 2002;31(1):59-70.
106. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *Jama* 2002;288(16):2015-22.
107. Bautista LE, Arenas IA, Penuela A, Martinez LX. Total plasma homocysteine level and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis of prospective cohort studies. *J Clin Epidemiol* 2002;55(9):882-7.
108. Danesh J, Lewington S. Plasma homocysteine and coronary heart disease: systematic review of published epidemiological studies. *J Cardiovasc Risk* 1998;5(4):229-32.
109. Wald DSL, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 2002;325:1202-1208.
110. Clarke R, Lewington S, Donald A, Johnston C, Refsum H, Strattin I, et al. Underestimation of the importance of homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease in epidemiological studies. *J Cardiovasc Risk* 2001;8(6):363-9.
111. Taylor LM, Jr., DeFrang RD, Harris EJ, Jr., Porter JM. The association of elevated plasma homocyst(e)ine with progression of symptomatic peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 1991;13(1):128-36.
112. Molgaard J, Malinow MR, Lassvik C, Holm AC, Upson B, Olsson AG. Hyperhomocyst(e)inaemia: an independent risk factor for intermittent claudication. *J Intern Med* 1992;231(3):273-9.
113. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *Jama* 1997;277(22):1775-81.
114. Schnyder G, Roffi M, Pin R, Flammer Y, Lange H, Eberli FR, et al. Decreased rate of coronary restenosis after lowering of plasma homocysteine levels. *N Engl J Med* 2001;345(22):1593-600.
115. Schnyder G, Roffi M, Flammer Y, Pin R, Hess OM. Effect of homocysteine-lowering therapy with folic acid, vitamin B12, and vitamin B6 on clinical outcome after percutaneous coronary intervention: the Swiss Heart study: a randomized controlled trial. *Jama* 2002;288(8):973-9.
116. Eikelboom JW, Lonn E, Genest J, Jr., Hankey G, Yusuf S. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med* 1999;131(5):363-75.
117. Ridker PM, Hennekens CH, Selhub J, Miletich JP, Malinow MR, Stampfer MJ. Interrelation of hyperhomocyst(e)inemia, factor V Leiden, and risk of future venous thromboembolism. *Circulation* 1997;95(7):1777-82.
118. Eichinger S, Stumpfen A, Hirschl M, Bialonczyk C, Herkner K, Stain M, et al. Hyperhomocysteinemia is a risk factor of recurrent venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 1998;80(4):566-9.
119. Bell IR, Edman JS, Selhub J, Morrow FD, Marby DW, Kayne HL, et al. Plasma homocysteine in vascular disease and in nonvascular dementia of depressed elderly people. *Acta Psychiatr Scand* 1992;86(5):386-90.
120. Riggs KM, Spiro A, 3rd, Tucker K, Rush D. Relations of vitamin B-12, vitamin B-6, folate, and homocysteine to cognitive performance in the Normative Aging Study. *Am J Clin Nutr* 1996;63(3):306-14.
121. Lehmann M, Gottfries CG, Regland B. Identification of cognitive impairment in the elderly: homocysteine is an early marker. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1999;10(1):12-20.

122. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Hyperhomocysteinemia associated with poor recall in the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Clin Nutr* 2001;73(5):927-33.
123. Prins ND, Den Heijer T, Hofman A, Koudstaal PJ, Jolles J, Clarke R, et al. Homocysteine and cognitive function in the elderly: the Rotterdam Scan Study. *Neurology* 2002;59(9):1375-80.
124. McIlroy SP, Dynan KB, Lawson JT, Patterson CC, Passmore AP. Moderately elevated plasma homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase genotype, and risk for stroke, vascular dementia, and Alzheimer disease in Northern Ireland. *Stroke* 2002;33(10):2351-6.
125. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002;346(7):476-83.
126. McCaddon A, Hudson P, Davies G, Hughes A, Williams JH, Wilkinson C. Homocysteine and cognitive decline in healthy elderly. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2001;12(5):309-13.
127. Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1998;55(11):1449-55.
128. Wang HX, Wahlin A, Basun H, Fastbom J, Winblad B, Fratiglioni L. Vitamin B12 and folate in relation to the development of Alzheimer's disease. *Neurology* 2001;56(9):1188-94.
129. Giovannucci E. Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia: a review. *J Nutr* 2002;132(8 Suppl):2350S-2355S.
130. Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA, Hunter DJ, Fuchs C, Rosner BA, et al. Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurses' Health Study. *Ann Intern Med* 1998;129(7):517-24.
131. Kato I, Dnistrian AM, Schwartz M, Toniolo P, Koenig K, Shore RE, et al. Serum folate, homocysteine and colorectal cancer risk in women: a nested case-control study. *Br J Cancer* 1999;79(11-12):1917-22.
132. Glynn SA, Albanes D, Pietinen P, Brown CC, Rautalahti M, Tangrea JA, et al. Colorectal cancer and folate status: a nested case-control study among male smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996;5(7):487-94.
133. Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Alcohol, low-methionine-low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *J Natl Cancer Inst* 1995;87(4):265-73.
134. Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, Fuchs C, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1997;57(6):1098-102.
135. Levine AJ, Siegmund KD, Ervin CM, Diep A, Lee ER, Frankl HD, et al. The methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T polymorphism and distal colorectal adenoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9(7):657-63.
136. Ulrich CM, Kampman E, Bigler J, Schwartz SM, Chen C, Bostick R, et al. Colorectal adenomas and the C677T MTHFR polymorphism: evidence for gene-environment interaction? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8(8):659-68.
137. Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Schaffer D, Leppert M. Methylenetetrahydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8(6):513-8.
138. Ulrich CM, Kampman E, Bigler J, Schwartz SM, Chen C, Bostick R, et al. Lack of association between the C677T MTHFR polymorphism and colorectal hyperplastic polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9(4):427-33.
139. Shrubsole MJ, Jin F, Dai Q, Shu XO, Potter JD, Hebert JR, et al. Dietary folate intake and breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Res* 2001;61(19):7136-41.
140. Zhang S, Hunter DJ, Hankinson SE, Giovannucci EL, Rosner BA, Colditz GA, et al. A prospective study of folate intake and the risk of breast cancer. *Jama* 1999;281(17):1632-7.
141. Dehe S, Vodovar V, Verite V, Goujard J. Prévention primaire des anomalies de fermeture du tube neural par supplémentation périconceptionnelle en acide folique. Situation à Paris en 1999. *BEH [21/01]* 2000.
142. Clark NA, Fisk NM. Minimal compliance with the Department of Health recommendation for routine folate prophylaxis to prevent fetal neural tube defects. *Br J Obstet Gynaecol* 1994;101(8):709-10.
143. de Walle HE, van der Pal KM, de Jong-van den Berg LT, Schouten J, de Rover CM, Buitendijk SE, et al. Periconceptional folic acid in The Netherlands in 1995. Socioeconomic differences. *J Epidemiol Community Health* 1998;52(12):826-7.
144. de Walle HE, Cornel MC, de Jong-van den Berg LT. Three years after the dutch folic acid campaign: growing socioeconomic differences. *Prev Med* 2002;35(1):65-9.
145. McGovern E, Moss H, Grewal G, Taylor A, Bjornsson S, Pell J. Factors affecting the use of folic acid supplements in pregnant women in Glasgow. *Br J Gen Pract* 1997;47(423):635-7.
146. McDonnell R, Johnson Z, Doyle A, Sayers G. Folic acid knowledge and use among expectant mothers in 1997: a comparison with 1996. *Ir Med J* 1999;92(3):296-9.
147. de Walle HE, van der Pal KM, de Jong-van den Berg LT, Jeeninga W, Schouten JS, de Rover CM, et al. Effect of mass media campaign to reduce socioeconomic differences in women's awareness and behaviour concerning use of folic acid: cross sectional study. *BMJ* 1999;319(7205):291-2.
148. De Walle HE, De Jong-Van Den Berg LT. Insufficient folic acid intake in the Netherlands: What about the future? *Teratology* 2002;66(1):40-3.
149. CDC. Knowledge and use of folic acid by women of childbearing age—United States, 1995 and 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1999;48(16):325-7.
150. Food and Drug Administration. Food standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. *Federal Register* 1996;61:8781-8797.
151. Morin P, De Wals P, St-Cyr-Tribble D, Niyonsenga T, Payette H. Pregnancy planning: a determinant of folic acid supplements use for the primary prevention of neural tube defects. *Can J Public Health* 2002;93(4):259-63.
152. Henry A, Crowther CA. Universal periconceptional folate supplementation: chasing a dream? *Med J Aust* 2000;172(8):407-8.
153. Venn BJ, Mann JI, Williams SM, Riddell LJ, Chisholm A, Harper MJ, et al. Dietary counseling to increase natural folate intake: a randomized, placebo-controlled trial in free-living subjects to assess effects on serum folate and plasma total homocysteine. *Am J Clin Nutr* 2002;76(4):758-65.
154. Martinez De Villarreal L, Perez JZ, Vazquez PA, Herrera RH, Campos Mdel R, Lopez RA, et al. Decline of neural tube defects cases after a folic acid campaign in Nuevo Leon, Mexico. *Teratology* 2002;66(5):249-56.
155. Stepanuk KM, Tolosa JE, Lewis D, Myers V, Royds C, Sabogal JC, et al. Folic acid supplementation use among women who contact a teratology information service. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187(4):964-7.
156. Rader JI, Weaver CM, Agyal G. Total folate in enriched cereal-grain products in the United States following fortification. *Food Chemistry* 2000;70:275-289.
157. Choumenkovitch SF, Selhub J, Wilson PW, Rader JI, Rosenberg IH, Jacques PF. Folic Acid Intake from Fortification in United States Exceeds Predictions. *J Nutr* 2002;132(9):2792-2798.
158. Lawrence JM, Petitti DB, Watkins M, Umekubo MA. Trends in serum folate after food fortification. *Lancet* 1999;354(9182):915-6.
159. Caudill MA, Le T, Moonie SA, Esfahani ST, Cogger EA. Folate status in women of childbearing age residing in Southern California after folic acid fortification. *J Am Coll Nutr* 2001;20(2 Suppl):129-34.

160. Anonymous. Folate status in women of childbearing age—United States, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2000;49(42):962-5.
161. Honein MA, Paulozzi LJ, Mathews TJ, Erickson JD, Wong LY. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *Jama* 2001;285(23):2981-6.
162. Williams LJ, Mai CT, Edmonds LD, Shaw GM, Kirby RS, Hobbs CA, et al. Prevalence of spina bifida and anencephaly during the transition to mandatory folic acid fortification in the United States. *Teratology* 2002;66(1):33-9.
163. Ray JG, Vermeulen MJ, Boss SC, Cole DE. Increased red cell folate concentrations in women of reproductive age after Canadian folic acid food fortification. *Epidemiology* 2002;13(2):238-40.
164. Ray JG, Vermeulen MJ, Boss SC, Cole DE. Declining rate of folate insufficiency among adults following increased folic acid food fortification in Canada. *Can J Public Health* 2002;93(4):249-53.
165. Persad VL, Van den Hof MC, Dube JM, Zimmer P. Incidence of open neural tube defects in Nova Scotia after folic acid fortification. *Cmaj* 2002;167(3):241-5.
166. Gucciardi E, Pietrusiak MA, Reynolds DL, Rouleau J. Incidence of neural tube defects in Ontario, 1986-1999. *Cmaj* 2002;167(3):237-40.
167. Freire WB, Hertrampf E, Cortes F. Effect of folic acid fortification in Chile: preliminary results. *Eur J Pediatr Surg* 2000;10 Suppl 1:42-3.
168. Blum M. Nutriview-Micronutrients and health. Basel, Suisse: Roche Vitamins Europe Ltd, 2000 - Special issue:8 p.
169. Czeizel AE, Merhala Z. Bread fortification with folic acid, vitamin B12, and vitamin B6 in Hungary. *Lancet* 1998;352(9135):1225.
170. Baerlocher K, Eichholzer M, Lüthy J, Moser U, Tönz O. Massnahmen zur prophylaxe von neuralrohr-defekten und zur verbesserung der folsäure-versorgung in der schweiz. 2002:70 p.
171. COMA. Folic acid and the prevention of disease: report of the committee on medical aspects of food and nutrition policy. Report on health and social aspects: Her Majesty's Stationery Office, 2000:50 p.
172. WHO/EURO. WHO/EURO meeting on the Regional Policy for Prevention of Congenital Disorders. Instituto Superiore di Sanità (ISS), Rome (Italie): WHO/European Centre for Environment and Health, Rome Office, 2002.
173. Rosano A, Smithells D, Cacciani L, Botting B, Castilla E, Cornel M, et al. Time trends in neural tube defects prevalence in relation to preventive strategies: an international study. *J Epidemiol Community Health* 1999;53(10):630-5.
174. Quinlivan EP, Gregory JF, 3rd. Effect of food fortification on folic acid intake in the United States. *Am J Clin Nutr* 2003;77(1):221-5.
175. Volatier JL, Brousseau-Kowalski AD, Calamassi-Tran G, Couvreur A, Dufour A, Maffre J. Enquête Individuelle et Nationale sur les Consommations Alimentaires. *Tec & Doc, Lavoisier* 2000.
176. Wald NJ, Law MR, Morris JK, Wald DS. Quantifying the effect of folic acid. *Lancet* 2001;358(9298):2069-73.
177. Daly LE, Kirke PN, Molloy A, Weir DG, Scott JM. Folate levels and neural tube defects. Implications for prevention. *Jama* 1995;274(21):1698-702.
178. Tucker KL, Mahnken B, Wilson PW, Jacques P, Selhub J. Folic acid fortification of the food supply. Potential benefits and risks for the elderly population. *Jama* 1996;276(23):1879-85.
179. Seal EC, Metz J, Flicker L, Melny J. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of oral vitamin B12 supplementation in older patients with subnormal or borderline serum vitamin B12 concentrations. *J Am Geriatr Soc* 2002;50(1):146-51.
180. Verhaeverbeke I, Mets T, Mulkens K, Vandewoude M. Normalization of low vitamin B12 serum levels in older people by oral treatment. *J Am Geriatr Soc* 1997;45(1):124-5.
181. Andres E, Kaltenbach G, Noel E, Noblet-Dick M, Perrin AE, Vogel T, et al. Efficacy of short-term oral cobalamin therapy for the treatment of cobalamin deficiencies related to food-cobalamin malabsorption. A study of 30 patients. *Clin Lab Haematol (in press)*.
182. Dufouil C, Ducimetiere P, Alperovitch A. Sex differences in the association between alcohol consumption and cognitive performance. EVA Study Group. *Epidemiology of Vascular Aging. Am J Epidemiol* 1997;146(5):405-12.
183. Colman N, Green R, Metz J. Prevention of folate deficiency by food fortification. II. Absorption of folic acid from fortified staple foods. *Am J Clin Nutr* 1975;28(5):459-64.
184. Keagy p, Stokstad e, Fellers d. Folacin stability during bread processing and family flour storage. *Cereal Chem* 1975;52:348-356.
185. Pfeiffer CM, Rogers LM, Bailey LB, Gregory JF, 3rd. Absorption of folate from fortified cereal-grain products and of supplemental folate consumed with or without food determined by using a dual-label stable-isotope protocol. *Am J Clin Nutr* 1997;66(6):1388-97.
186. Favier JC, Ireland-Ripert J, Toque C, Feinberg M. Répertoire Général des Aliments. Table de composition (2e édition). *Tec & Doc, Lavoisier* 1995.
187. Strouts b. Evaluation of production and finished quality characteristics of white pan bread fortified with vitamin B-12. Research report. Manhattan, Kansas: American Institute of Baking, 1998:19.
188. Food Standards Agency Board reaches conclusion on folic acid. www.foodstandards.gov.uk/news/newsarchive/62488.
189. Wharton B, Booth I. Fortification of flour with folic acid. *Bmj* 2001;323(7323):1198-9.
190. Oakley GP. Delaying folic acid fortification of flour. *Bmj* 2002;324(7350):1348-9.
191. Mills JL. Fortification of foods with folic acid—how much is enough? *N Engl J Med* 2000;342(19):1442-5.
192. Cottel D, Dallongeville J, Wagner A, Ruidavets JB, Arveiler D, Ferrieres J, et al. The North-East-South gradient of coronary heart disease mortality and case fatality rates in France is consistent with a similar gradient in risk factor clusters. *Eur J Epidemiol* 2000;16(4):317-22.
193. Giroud M, Lemesle M, Quantin C, Vourch M, Becker F, Milan C, et al. A hospital-based and a population-based stroke registry yield different results: the experience in Dijon, France. *Neuroepidemiology* 1997;16(1):15-21.