



HAL
open science

Intérêt et évaluation, au CHU de Rouen, du dosage de la vitamine B12 active, comparaison avec la vitamine B12 totale

Jennifer Guillerme

► **To cite this version:**

Jennifer Guillerme. Intérêt et évaluation, au CHU de Rouen, du dosage de la vitamine B12 active, comparaison avec la vitamine B12 totale. Médecine humaine et pathologie. 2019. dumas-02317699

HAL Id: dumas-02317699

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02317699v1>

Submitted on 16 Oct 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE POUR LE
DOCTORAT EN MEDECINE**

Diplôme d'Etat

DES de BIOLOGIE MEDICALE

Par

Jennifer GUILLERME

Née le 4 Décembre 1990 à Montivilliers

Présentée et soutenue publiquement le 20 Septembre 2019

**Intérêt et évaluation, au CHU de Rouen, du dosage de la vitamine B12
active, comparaison avec la vitamine B12 totale**

PRESIDENT DE JURY :

Monsieur le Professeur Pierre Déchelotte

DIRECTEUR DE THESE :

Madame le Docteur Muriel Quillard

MEMBRES DU JURY :

Monsieur le Professeur Loïc Favennec

Madame le Docteur Hélène Girot

ANNEE UNIVERSITAIRE 2018 - 2019

U.F.R. SANTÉ DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Benoît VEBER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**
Professeur Agnès LIARD-ZMUDA
Professeur Guillaume SAVOYE

I - MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Gisèle APTER	Havre	Pédopsychiatrie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Jean-Marc BASTE	HCN	Chirurgie Thoracique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal BENHAMOU	HCN	Médecine interne
Mr Jacques BENICHOU	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mme Sophie CANDON	HCN	Immunologie
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas CORNU	HCN	Urologie
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition

Mr Stéphane DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Frédéric DI FIORE	HCH-CB	Cancérologie
Mr Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean DOUCET	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard DUBRAY	CB	Radiothérapie
Mr Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
Mr Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
Mr Pierre FREGER	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mr Dominique GUERROT	HCN	Néphrologie
Mr Olivier GUILLIN	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier HANNEQUIN	HCN	Neurologie
Mr Claude HOUDAYER	HCN	Génétique
Mr Fabrice JARDIN	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal JOLY	HCN	Dermato – Vénérologie
Mme Bouchra LAMIA	Havre	Pneumologie
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry LEQUERRE	HB	Rhumatologie
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HB	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique

M. David MALTETE	HCN	Neurologie
Mr Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle MARIE	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul MARIE	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre MICHEL	HCN	Hépatogastro-entérologie
M. Benoit MISSET (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation Médicale Mr Jean-François
MUIR (<i>surnombre</i>)	HB	Pneumologie
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophthalmologie
Mr Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan PREVOST	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe RICHARD (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace ROMAN (<i>disponibilité</i>)	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépatogastrologie
Mme Céline SAVOYE-COLLET	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mr Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
Mr Christian THUILLEZ (<i>surnombre</i>)	HB	Pharmacologie
Mr Hervé TILLY	CB	Hématologie et transfusion
M. Gilles TOURNEL	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier TROST	HCN	Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre VANNIER (<i>surnombre</i>)	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre VERA	CB	Biophysique et traitement de l'image

Mr Eric VERIN	HB	Service Santé Réadaptation
Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VITTECOQ	HB	Rhumatologie
Mme Marie-Laure WELTER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Neurophysiologie
Mme Sophie CLAEYSSENS	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
Mr Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie cellulaire
Mr Thomas MOUREZ (<i>détachement</i>)	HCN	Virologie
Mr Gaël NICOLAS	HCN	Génétique
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia ROLLIN	HCN	Médecine du Travail
Mr Mathieu SALAUN	HCN	Pneumologie
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
Mr David WALLON	HCN	Neurologie
Mr Julien WILS	HCN	Pharmacologie

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mr Thierry WABLE	UFR	Communication
Mme Mélanie AUVRAY-HAMEL	UFR	Anglais

II - PHARMACIE

PROFESSEURS

Mr Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
Mr Roland CAPRON (PU-PH)	Biophysique
Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr François ESTOUR	Chimie Organique
Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre GOULLE (Professeur émérite)	Toxicologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mme Isabelle LEROUX - NICOLLET	Physiologie
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mr Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mr Jérémy BELLIEN (MCU-PH)	Pharmacologie
Mr Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Camille CHARBONNIER (LE CLEZIO)	Statistiques
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Cécile CORBIERE	Biochimie
Mr Eric DITTMAR	Biophysique
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mme Dominique DUTERTE- BOUCHER	Pharmacologie

Mr Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
Mr Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Nejla EL GHARBI-HAMZA	Chimie analytique
Mme Marie-Laure GROULT	Botanique
Mr Hervé HUE	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia LE GOFF	Parasitologie – Immunologie
Mme Hong LU	Biologie
M. Jérémie MARTINET (MCU-PH)	Immunologie
Mme Marine MALLETER	Toxicologie
Mme Sabine MENAGER	Chimie organique
Mme Tiphaine ROGEZ-FLORENT	Chimie analytique
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ	Pharmacie officinale
Mr Jean-François HOUIVET	Pharmacie officinale

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde GUERIN	Anglais
----------------------------	---------

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

Mme Anaïs SOARES	Bactériologie
-------------------------	---------------

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mme Sophie MOHAMED	Chimie Organique
---------------------------	------------------

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
Mr Roland CAPRON	Biophysique
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
Mr Loïc FAVENNEC	Parasitologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mr François ESTOUR	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX-NICOLLET	Physiologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mr Rémi VARIN	Pharmacie clinique
M. Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR DES UNIVERSITES MEDECIN GENERALISTE

Mr Jean-Loup **HERMIL** (PU-MG) UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCE DES UNIVERSITES MEDECIN GENERALISTE

Mr Matthieu **SCHUERS** (MCU-MG) UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTE

Mme Laëtitia **BOURDON** UFR Médecine Générale

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine Générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTES

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

Mr Emmanuel **HAZARD** UFR Médecine Générale

Mme Marianne **LAINÉ** UFR Médecine Générale

Mme Lucile **PELLERIN** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Serguei FETISSOV (med)	Physiologie (ADEN)
Mr Paul MULDER (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su RUAN (med)	Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil ADRIOUCH (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine CLEREN (med)	Neurosciences (Néovasc)
M. Sylvain FRAINEAU (med)	Physiologie (Inserm U 1096)
Mme Pascaline GAILDRAT (med)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas GUEROUT (med)	Chirurgie Expérimentale
Mme Rachel LETELLIER (med)	Physiologie
Mme Christine RONDANINO (med)	Physiologie de la reproduction
Mr Antoine OUVRARD-PASCAUD (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric PASQUET	Sciences du langage, orthophonie
Mr Youssan Var TAN	Immunologie
Mme Isabelle TOURNIER (med)	Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre Henri Becquerel

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

SJ - Saint Julien Rouen

Par délibération en date du 3 mars 1967, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner approbation ni improbation.

REMERCIEMENTS

A Monsieur le **Professeur Pierre Déchelotte**,

Vous me faites l'honneur de présider le jury de ma thèse.

Je vous remercie de l'intérêt que vous portez à ce travail.

J'espère que la collaboration avec votre équipe pourra se poursuivre à l'avenir.

A Monsieur le **Professeur Loïc Favennec**,

Vous me faites l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail.

J'ai particulièrement apprécié mon semestre passé dans votre service.

A Madame le **Docteur Muriel Quillard**,

Vous me faites l'honneur d'avoir dirigé ce travail.

Merci pour votre investissement et vos précieux conseils.

Nos nombreuses relectures ont permis de rendre ce travail possible.

Je suis heureuse de pouvoir continuer à travailler avec vous sur de nombreux projets.

A Madame le **Docteur Hélène Girot**,

Tu me fais l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Merci de ta disponibilité et de ton soutien durant ce projet.

Je suis ravie de continuer à travailler en ta compagnie.

Merci à l'ensemble du service de biochimie générale et particulièrement au **Dr Valéry Brunel** de m'accorder sa confiance pour intégrer son équipe à partir de Novembre au sein du service de Biochimie Générale.

Je tiens à remercier tout d'abord mes parents et ma belle-mère pour leur soutien et leur affection durant ces longues années.

Merci à Sylvie et Patrice de m'avoir accueillie (maintenant officiellement) dans leur famille.

Et merci encore pour l'impression de ce travail.

A Clément, merci pour tout. Ce fut un plaisir de rédiger ces 2 thèses en ta compagnie. Nous allons enfin pouvoir fêter nos deux demi-doctorats ! A toutes les années passées et les nombreuses à venir.

A Jetro des Maine Shags, tu as été plus sage que lors de la rédaction de la thèse de ton papa, encore une preuve que tu me préfères !

A Ségolène et Baptiste (et leurs petits chatons).

C'est toujours un plaisir de découvrir la campagne de l'Eure ou de France à vos côtés. Ségolène, je repense à notre rencontre en P1 et suis très heureuse de partager depuis avec toi les étapes les plus importantes.

PS : Je suis jalouse de ton fabuleux tableau dans ton cabinet de consultation.

A Morgane et François.

De fabuleuses aventures nous attendent Croupi et Croupette (et je ne parle pas que des voyages !). Croupi, il ne tient qu'à toi d'expérimenter une petite parasitose après ce merveilleux épisode de toxi-infection aigue collective. J'espère que l'on se supportera encore très longtemps !

PS : A&A.

A Benoît et Camille.

Camille, merci pour ta bonne humeur si communicative. Benoît, j'ai particulièrement détesté nos séances de révisions ensemble mais apprécié tous les autres (nombreux) moments. Je suis heureuse de ton retour parmi nous et je te souhaite plein de réussite pour la suite.

A Marion.

J'ai eu beaucoup de chance de te rencontrer pendant mon internat et j'espère que nous pourrons continuer à manger ensemble pendant encore de nombreuses années.

A Guillaume.

Merci pour ta présence, ta bonne humeur et tes fluctuations capillaires !

A l'ensemble de mes co-internes, et plus particulièrement Aurélie et Louise qui m'ont supporté durant ce semestre pas toujours évident.

A toute l'équipe des protéines : Alexandra, Béatrice, Claudine, Emmanuelle, Jennifer et Clément. Grâce à vous, c'est un plaisir de venir travailler tous les jours !

Merci au Dr Sébastien Grigioni pour sa relecture et ses précieux conseils concernant la partie statistiques de ce travail.

Table des matières

REMERCIEMENTS	13
Listes des abréviations.....	20
Synonymes	21
I. INTRODUCTION	23
1. Découverte de la vitamine B12 ou cobalamine	23
2. Vitamine B12.....	23
2.1 Structure	23
2.2 Sources et apports nutritionnels recommandés.....	26
2.3 Mécanismes d'absorption : vue générale	27
2.3.1 Métabolisme digestif gastrique	27
2.3.2 Métabolisme digestif intestinal proximal	28
2.3.3 Métabolisme digestif intestinal distal	28
2.4 Transport sanguin.....	29
2.5 Excrétion et élimination	30
2.6 Mécanismes d'action	31
3. Dysvitaminoses B12	32
3.1 Cas particuliers des patients atteints de néoplasies.....	32
3.2 Cas particuliers des femmes enceintes.....	32
3.3 La carence en vitamine B12.....	33
3.3.1 Prévalence	33
3.3.2 Etiologies	33
3.3.3 Conséquences physiopathologiques d'une carence en B12.....	37
3.3.4 Clinique.....	37
3.3.5 Manifestations neurologiques	39
3.3.6 Manifestations hématologiques	39

3.3.7	Traitement des carences en vitamine B12	41
4.	Méthodes d'exploration biologique.....	42
4.1	Cobalamine totale circulante.....	42
4.2	Homocystéine plasmatique (Hcy).....	44
4.3	Acide méthylmalonique sérique (MMA).....	47
4.4	Holotranscobalamine (HoloTC) ou B12 active	49
4.4.1	Généralités	49
4.4.2	Différentes trousse de dosage de la vitamine B12 active.....	51
4.4.3	Comparaison holotranscobalamine et vitamine B12 totale	52
4.5	Existence de zones d'incertitude.....	54
	OBJECTIFS DU TRAVAIL	57
II.	MATERIELS ET METHODE	58
1.	Type d'étude	58
2.	Populations étudiées	58
2.1	Etude principale	58
2.1.1	Critères d'inclusion.....	58
2.1.2	Critères d'exclusion	59
2.1.3	Patients sélectionnés	59
2.2	Etude complémentaire 1 – Femmes enceintes	59
2.2.1	Critères d'inclusion.....	59
2.2.2	Critères d'exclusion	59
2.2.3	Patients sélectionnés	60
2.3	Etude complémentaire 2 – B12 totale > 500 pmol/L.....	60
2.3.1	Critères d'inclusion.....	60
2.3.2	Critères d'exclusion	60
2.3.3	Patients sélectionnés	60

3.	Données recueillies et dosages réalisés	61
3.1	Dosages de vitamine B12 totale.....	61
3.2	Dosages de vitamine B12 active	61
3.2.1	Etude principale	62
3.2.2	Etude complémentaire 1 – femmes enceintes.....	62
3.2.3	Etude complémentaire 2 – B12 totale > 500 pmol/L.....	62
3.3	Autres dosages	63
4.	Tests statistiques	63
III.	RESULTATS	65
1.	Performances analytiques de la technique B12 active.....	65
2.	Etude principale.....	66
2.1	Prescriptions des dosages de B12	66
2.2	Répartition des valeurs de B12 selon le sexe.....	67
2.3	Répartition des valeurs de B12 selon l'âge.....	68
2.4	Répartition des valeurs de B12 en fonction des caractéristiques hématologiques.....	70
2.5	Etude de corrélation entre la B12 totale et la B12 active.....	71
2.6	Ratio B12 active/B12 totale	72
2.7	Comparaisons.....	74
2.7.1	Statut en B12 active par rapport à la B12 totale	74
2.7.2	Statut en B12 totale par rapport à la B12 active	76
2.8	Discordances entre B12 totale et B12 active	78
2.9	Dosages de l'acide méthylmalonique sanguin	80
3.	Etudes complémentaires	84
3.1	Etude complémentaire 1 – Femmes enceintes	84
3.2	Etude complémentaire 2 – B12 totale > 500 pmol/L.....	85

IV. DISCUSSION	87
V. CONCLUSION.....	96
ANNEXE 1.....	97
ANNEXE 2.....	98
ANNEXE 3.....	101
ANNEXE 4.....	102
BIBLIOGRAPHIE	103

Listes des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

CHU : Centre hospitalier universitaire

COFRAC : Comité français d'accréditation

ECLIA : Test immunologique par électrochimiluminescence

EOGD : Endoscopie oeso-gastro-duodénale

FI : Facteur intrinsèque

Hb : Hémoglobine

HC : Haptocorrine

HCs : Haptocorrine d'origine salivaire

Hcy : Homocystéine

HoloHC : Holohaptocorrine

HoloTC : Holotranscobalamine

MMA : Acide méthylmalonique sanguin

PNN : Polynucléaires neutrophiles

TC : Transcobalamine

VGM : Volume globulaire moyen

Synonymes

B12-HC = B12-TCI = B12 liée à l'haptocorrine ou transcobalamine I

Haptocorrine = Transcobalamine I

Vitamine B12 = Cobalamine

Vitamine B12 totale = Vitamine B12 transportée dans le sang = HoloHC + HoloTC

Vitamine B12 active = Holotranscobalamine = HoloTC = B12-TCII

I. INTRODUCTION

1. Découverte de la vitamine B12 ou cobalamine

En 1849, Thomas Addison, suivi en 1872 par Anton Biermer, a décrit une forme d'anémie, que son évolution mortelle lui a permis de qualifier de « pernicieuse ». Le rôle de la vitamine B12 dans cette anémie et dans la synthèse des globules rouges a été découvert par la suite.

En effet, les désordres sanguins et les signes neurologiques observés, ainsi que la relation avec les gastrites atrophiques et les pathologies liées à l'activité protéolytique du suc gastrique, ont amené quelques médecins, dont George Minot, William Murphy et George Whipple (prix Nobel de médecine et physiologie en 1934), à montrer l'efficacité thérapeutique des extraits de foie de veau. Ce facteur curatif ne fut purifié et isolé qu'en 1948 par George Whipple, il reçut alors le nom de vitamine B12.

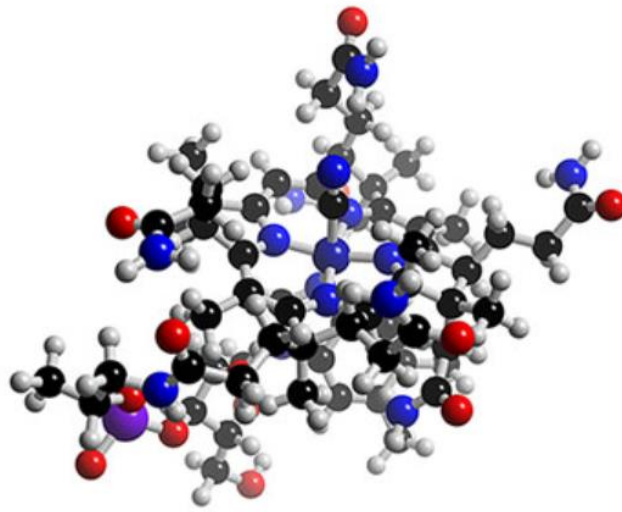
La structure tridimensionnelle de la vitamine B12 a été définitivement identifiée au début des années 1960 par l'équipe de Dorothy Hodgkin à Oxford (prix Nobel de Chimie en 1964).

2. Vitamine B12

2.1 Structure

La vitamine B12 est une vitamine hydrosoluble que l'on retrouve dans la quasi-totalité des cellules humaines. Sa molécule est considérée comme la plus grosse ainsi que la plus complexe de toutes les vitamines B (environ 1355 g/mol).

Figure 1 : Structure 3D de la cyanocobalamine (Formule chimique : $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$)

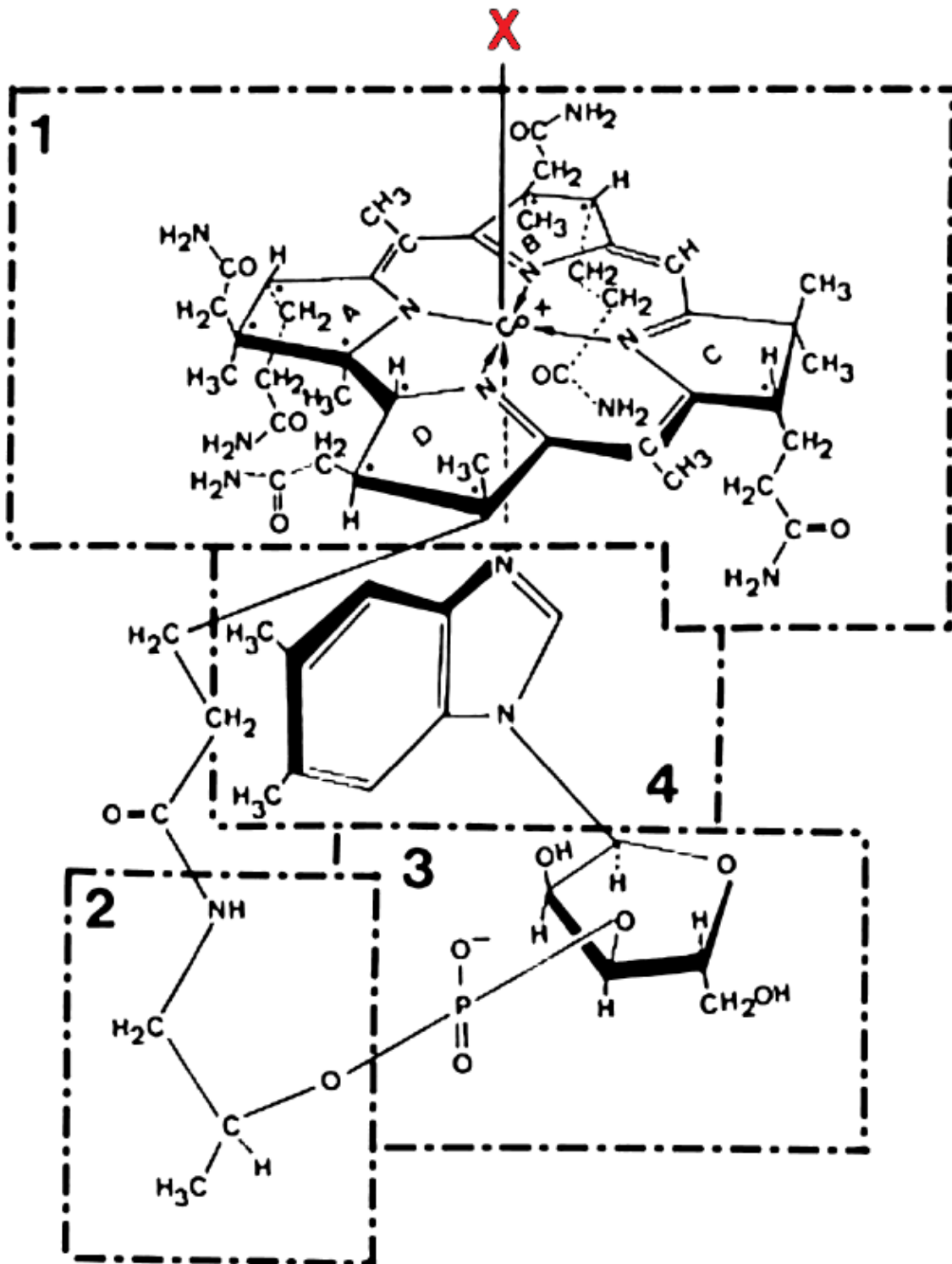


© Karl Harrison 3DChem.com

Selon la définition donnée par Guéant et al. (1), la vitamine B12 est une 5,6-diméthylbenzimidazole-cobamide. Les cobamides sont obtenus par addition, sous la structure plane tétrapyrrolique (position alpha), d'un ribonucléotide lié au cobalt et d'un pyrrol D aminopropanol, et au-dessus du plan (position beta) d'un second ligand coordonnant l'atome de cobalt. Une de ces caractéristiques structurales de la vitamine B12 serait d'être la seule molécule connue dans la nature ayant un ribonucléotide incorporant une base 5,6-diméthylbenzimidazole.

A noter, la cobalamine possède une structure analogue à celle de l'hème (noyau tétrapyrrol, ici appelé noyau corrine). L'atome central de fer est remplacé par un atome de cobalt.

Figure 2 : Structure des cobalamines (isoformes cellulaires et circulantes de la vitamine B12), adaptée de (1)



1: groupe tetrapyrrol ; 2: amino-1-propanol-2 ; 3: groupe ribose-3P ; 4: groupe 5,6-diméthyl-benzimidazole ; **X: groupe hydroxyle, méthyle, 5'-désoxy, cyanate ou adénosyle.**

Les principales formes de cobalamine sont les suivantes :

-Hydroxocobalamine (X : groupe hydroxyle, OH) : Forme naturelle, synthétisée par des bactéries, convertie par notre organisme en forme biologiquement active (méthyl ou adénosyl cobalamine). Elle est principalement utilisée en thérapeutique pour le traitement des intoxications au cyanure.

-Cyanocobalamine (X : groupe cyanate, CN) : Cobalamine de synthèse, stable, la plus utilisée en thérapeutique.

-Méthylcobalamine (X : groupe méthyle, CH₃) : Coenzyme actif biologiquement.

-Adénosylcobalamine (X : groupe 5'-déoxy-adénosyle) : Coenzyme actif biologiquement.

2.2 Sources et apports nutritionnels recommandés

La vitamine B12 est nécessaire au fonctionnement du corps humain mais elle n'est pas synthétisable par celui-ci. L'apport est donc presque exclusivement exogène.

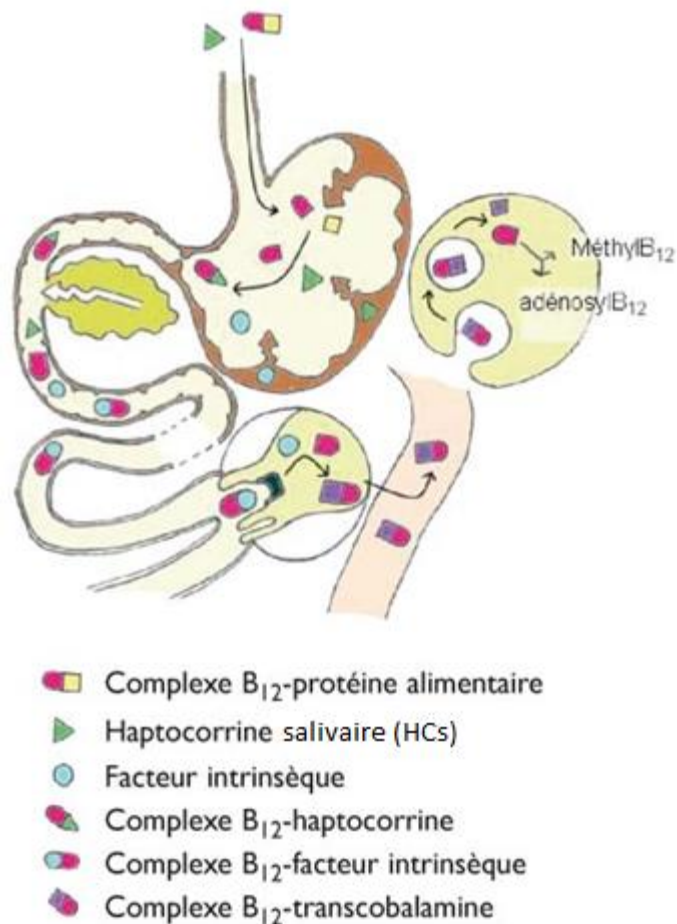
Les principales sources alimentaires sont les aliments d'origine animale : viandes et abats (foie par exemple), poissons et fruits de mer, œufs, le lait et les laitages. Il existe également une très faible synthèse des cobalamines par les bactéries intestinales. En cas de régime végétarien strict, une carence peut apparaître car les végétaux sont presque totalement dépourvus de vitamine B12. Le régime alimentaire normal fournit entre 3 et 30 µg/jour de vitamine B12, ce qui couvre amplement les besoins estimés entre 2 et 10 µg/jour chez l'adulte. Les réserves de l'organisme sont importantes, comprises entre 3 et 5 mg, en grande partie stockées dans le foie (plus de 50%). Ces réserves suffisent à couvrir les besoins pendant 3 à 5 ans.

Chez les patients végétariens, ne consommant pas ou peu de protéines d'origine animale, la carence s'installe progressivement (consommation et épuisement des stocks de B12 pendant plusieurs mois, voire années). (2,3)

2.3 Mécanismes d'absorption : vue générale

L'absorption de la vitamine B12 d'origine alimentaire s'effectue en plusieurs étapes : gastriques, intestinales proximales et distales (Figure 3).

Figure 3 : Schéma des étapes du métabolisme de la vitamine B12, adapté de (4)



2.3.1 Métabolisme digestif gastrique

La vitamine B12 d'origine alimentaire arrive dans l'estomac sous forme exclusivement liée aux protéines alimentaires.

Deux mécanismes se produisent au niveau gastrique :

- la libération de la vitamine B12 des protéines alimentaires ;
- et sa liaison aux transporteurs endogènes.

Au niveau gastrique, l'association des sécrétions acides (HCl) et pepsiques libère la B12 des protéines alimentaires, qui va pouvoir se lier à des molécules protéiques d'haptocorrine d'origine essentiellement salivaire (HCs), un des deux transporteurs endogènes présents. Leur affinité pour la B12 est plus grande que celle du facteur intrinsèque (FI), second transporteur présent au niveau de l'estomac. Le FI est sécrété par les cellules pariétales de l'estomac. Il facilite l'assimilation de la vitamine B12 dans l'iléon.

2.3.2 Métabolisme digestif intestinal proximal

Il s'agit d'une étape importante du métabolisme digestif de la vitamine B12, ce qui permet le transfert de la B12 vers le FI et la formation du complexe FI-B12 (Figure 4).

Dans le duodénum, l'HCs est dégradée par des protéases pancréatiques.

2.3.3 Métabolisme digestif intestinal distal

Il existe deux mécanismes participant à l'absorption de la B12 dans l'iléon :

- l'absorption par le récepteur spécifique du complexe FI-B12, majoritaire ;
- la diffusion passive, très minoritaire.

L'absorption du complexe FI-B12 par son récepteur est le mécanisme physiologique privilégié concernant la vitamine B12 d'origine alimentaire. Cette voie d'absorption est néanmoins saturable. Le complexe FI-B12 se lie à son récepteur qui est exprimé au niveau de l'iléon distal. Le récepteur spécifique de la bordure en brosse est le complexe Cubam. Il se compose principalement des protéines cubuline, protéine de liaison multi-ligands et amnionless, protéine transmembranaire. Il comporte aussi la mégaline, également protéine de liaison multi-ligands. La RAP (receptor associated protein) est une protéine d'escorte, indispensable à l'expression membranaire de la mégaline. L'internalisation (endocytose) du complexe, une fois fixé, est rapide. Il y a ensuite dissociation de la vitamine B12 du FI, dégradé dans le compartiment lysosomal. La vitamine B12 passe ensuite dans la circulation sanguine, grâce au récepteur MRP1, situé au pôle basal des entérocytes. Puis, dans le plasma, la B12 se lie aux transcobalamines (I et II) afin de former les complexes suivants : B12-TCI (B12-HC) et B12-TCII, permettant le transport de la vitamine B12 vers les cellules des tissus utilisateurs.

Le second mécanisme d'absorption, passif, au niveau de l'iléon distal, est très minoritaire, non spécifique, mais présente l'avantage d'être non saturable. La diffusion passive représente environ 1 à 5% de l'absorption de la dose ingérée. Cette voie n'est pas suffisante pour répondre aux besoins quotidiens si la dose ingérée provient uniquement d'un apport alimentaire standard. Elle est cependant utile en thérapeutique grâce à son caractère non saturable.

2.4 Transport sanguin

Deux protéines participent au transport de la B12 dans l'organisme : la transcobalamine II (TCII) et l'haptocorrine (HC ou transcobalamine I) (5).

Lors de la liaison de la TCII et de l'HC (TCI) à la B12, il se forme des complexes que l'on nomme : holotranscobalamine (HoloTC) et holohaptocorrine (HoloHC). Le complexe HoloHC représente environ 70 à 90% de la B12 présente dans le sang et correspond à une forme biologiquement inactive. Le complexe HoloTC représente, quant à lui, environ 10 à 30% de la B12 présente dans le sang et correspond à la forme biologiquement active (forme absorbée par les cellules).

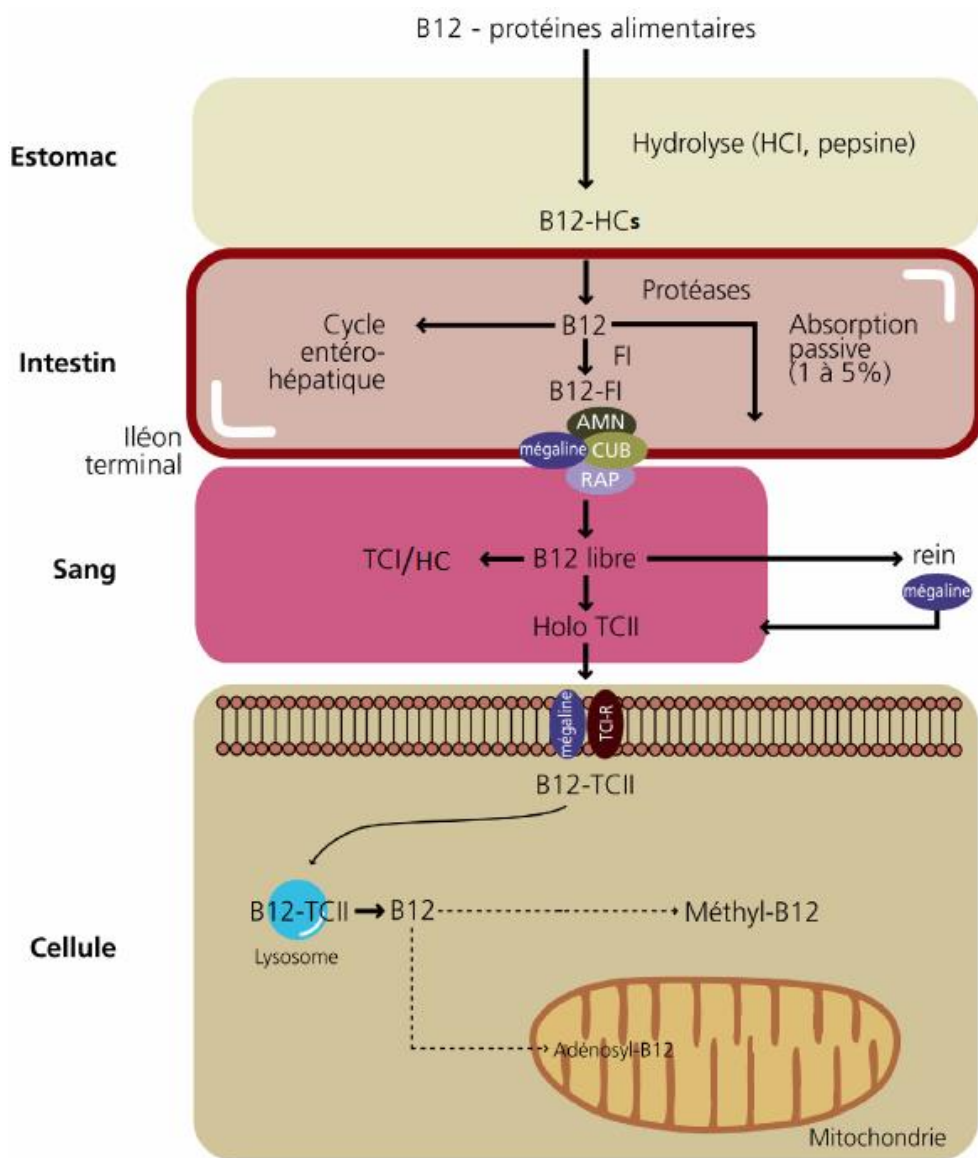
Lors de la phase sérique, il existe donc un transport de la B12 par ces 2 transcobalamines (I et II). Seule la transcobalamine II semble avoir un rôle physiologiquement important en permettant l'apport vitaminique aux cellules et tissus de l'organisme par liaison spécifique à la membrane cellulaire. L'internalisation (ou endocytose) dans ces tissus s'effectue grâce à la mégaline et au récepteur de la transcobalamine II, le CD320 (TCI-R sur la Figure 4).

La transcobalamine II, codée par le gène *TCN2* (22q12.2), est synthétisée par l'hépatocyte essentiellement mais aussi les entérocytes, les cellules endothéliales et les cellules monocytaires.

La transcobalamine I, codée par le gène *TCN1* (11q12.1), appartenant à la famille des haptocorrines, est dérivée de la lignée granuleuse neutrophile et transporte la vitamine B12 aux organes de réserve (foie principalement mais aussi reins, cœur, rate et cerveau).

La transcobalamine III, décrite à tort comme une transcobalamine à part entière dans de nombreux articles et ouvrages correspond à des isoformes de la transcobalamine I.

Figure 4 : Voies métaboliques de l'absorption de la vitamine B12, adaptée de (6)



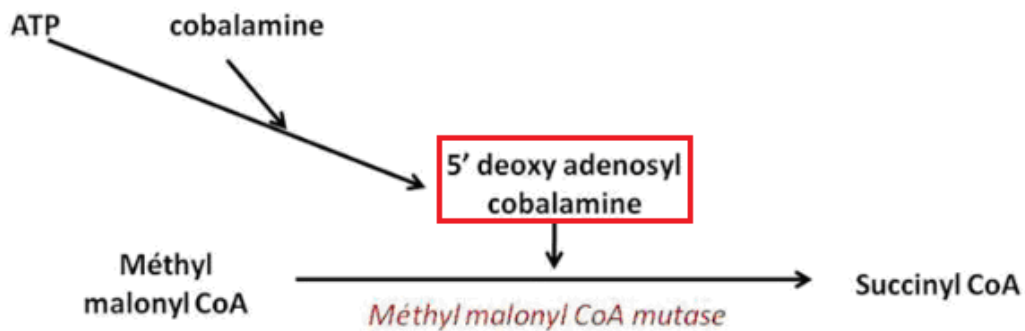
2.5 Excrétion et élimination

La vitamine B12 excédentaire est excrétée dans la bile, liée à l'HC (moins de 0,5 µg par jour) et en majeure partie réabsorbée. Elle subit un cycle entéro-hépatique avec réabsorption au niveau de l'iléon. L'élimination est principalement digestive (60-80%) et urinaire.

2.6 Mécanismes d'action

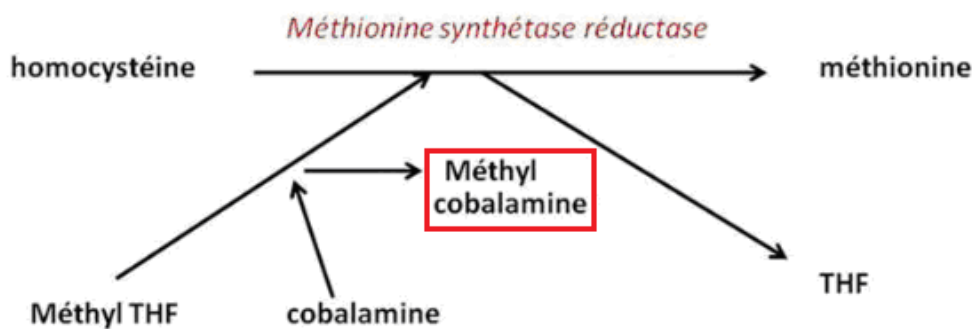
La vitamine B12 est impliquée en tant que coenzyme dans 2 voies ubiquitaires du métabolisme cellulaire :

- l'adénosylcobalamine (intramitochondriale): Elle permet la conversion du méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA. Le succinyl-CoA est un métabolite intermédiaire du cycle de Krebs.



Tiré de Hematocell (7)

- la méthylcobalamine (intracytoplasmique): Elle permet la conversion de l'homocystéine en méthionine (voie de reméthylation) et l'utilisation des folates dans la synthèse des purines et pyrimidines, participant à la synthèse de l'ADN, par conversion du méthyltétrahydrofolate (méthylTHF) en tétrahydrofolate (THF).



Tiré de Hematocell (7)

3. Dysvitaminoses B12

Les élévations des concentrations circulantes de B12 peuvent être rencontrées dans 3 situations principalement :

- un excès d'apport en vitamine B12 : lors d'une substitution par exemple. L'élévation de la concentration plasmatique est assez faible (régulation par élimination rénale) et le surdosage ne présente pas de toxicité décrite à l'heure actuelle (consensus international).

- l'augmentation de protéines de transport (transcobalamines) : par excès de production (syndromes myéloprolifératifs, néoplasies, hépatopathies, inflammation) et/ou par défaut de clairance (insuffisance rénale).

- un relargage des stocks hépatiques : lors des hépatopathies.

Les diminutions des concentrations sanguines et les carences en B12 sont expliquées par des apports insuffisants ou des troubles de l'absorption qui seront détaillés au chapitre 3.3.

3.1 Cas particuliers des patients atteints de néoplasies

L'association hypervitaminémie B12 et néoplasies est connue depuis de nombreuses années. Celle-ci a un caractère pronostique dans les pathologies tumorales. En effet, plus la valeur de vitamine B12 est élevée, plus le pronostic est mauvais (8).

Le mécanisme conduisant à des concentrations élevées en cobalamine chez les patients atteints de cancers n'est pas entièrement compris. Il a été suggéré que la pathologie cancéreuse induirait des modifications dans le métabolisme de la B12 entraînant des concentrations plasmatiques élevées.

Chez les patients atteints d'un cancer, l'haptocorrine, synthétisée au niveau hépatique, a été retrouvée augmentée en parallèle de la cobalamine.

Concernant les patients atteints de syndromes myéloprolifératifs, il existe une augmentation de la production de l'haptocorrine par les polynucléaires (9).

3.2 Cas particuliers des femmes enceintes

Chez les femmes enceintes, la cobalamine plasmatique totale diminue progressivement au cours de la grossesse (10). Il a été suggéré que la concentration en holohaptocorrine

diminuerait durant la grossesse tandis que la concentration en holotranscobalamine resterait plus stable (11,12). En effet, après une réduction initiale de l'HoloTCII plasmatique, au 1^{er} trimestre de la grossesse, elle atteindrait ensuite un plateau jusqu'à la fin de la grossesse. La diminution de la concentration en vitamine B12 totale serait due à une modification des protéines de liaison durant la grossesse et non à l'apparition d'une réelle carence. La présence de mécanismes compensatoires garantirait une quantité suffisante de cobalamine disponible pour répondre aux besoins accrus de la mère et du fœtus pendant la grossesse (13).

3.3 La carence en vitamine B12

3.3.1 Prévalence

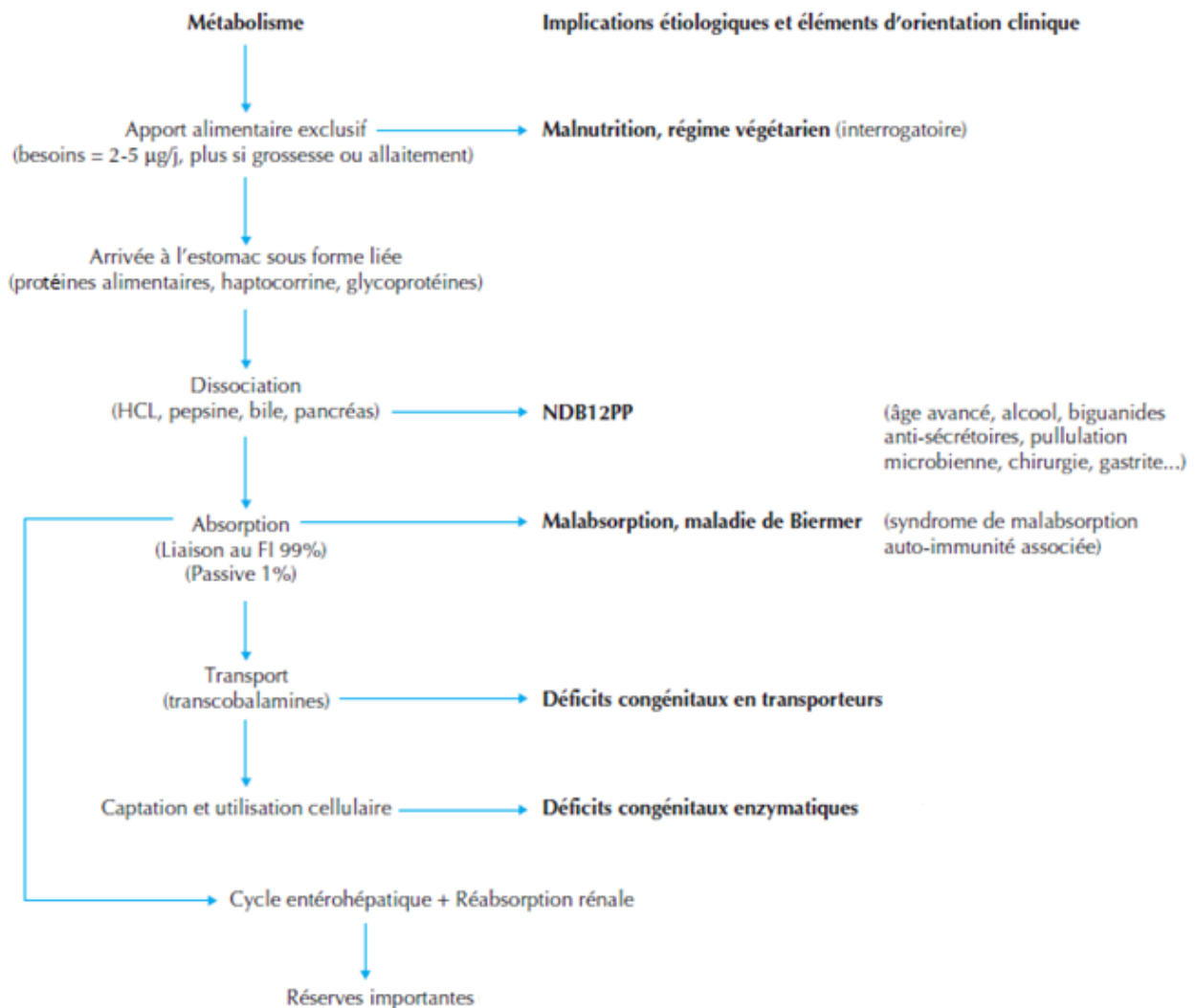
La prévalence de la carence en vitamine B12 est évaluée à 1 à 2 % de la population générale et jusqu'à plus de 10 % chez les personnes âgées de plus de 65 ans (14). Elle est plus importante chez les patients âgés et institutionnalisés (5). La prévalence varie cependant selon les critères diagnostiques utilisés et notamment le seuil biologique de normalité de la vitamine B12 totale. Ainsi selon Bailey et al., la carence est présente chez 3 à 26% de la population générale (15). Dans une étude de 2015 menée dans un service de médecine interne, au CHU d'Angers, la prévalence retrouvée est de 22,4% (14). Cette valeur est proche des 17,2% d'une importante étude réalisée en France chez 14 904 patients âgés (16).

Il est important de noter qu'il existe des populations à risque de carence plus importante, comme les personnes âgées, les enfants et les femmes enceintes, les personnes ayant un régime alimentaire excluant les protéines d'origine animale, par exemple végétalien (17). A ces populations s'ajoutent les patients ayant bénéficié d'une chirurgie bariatrique (18), les patients souffrant de pathologies gastro-intestinales (résection iléale > 20 cm) ou encore les patients traités par Metformine (19) ou par Inhibiteurs de la pompe à protons (IPP) (20).

3.3.2 Etiologies

Il existe différentes situations ayant pour conséquence une carence en vitamine B12. Elles sont classées selon leurs mécanismes physiopathologiques (Figure 5) (6).

Figure 5 : Étapes du métabolisme de la vitamine B12 et étiologies des carences, adaptée de (21)



Carence d'apport :

On la retrouve rarement dans les pays industrialisés (5) (où elle correspond à environ 1 à 2% des étiologies de carence en vitamine B12), essentiellement chez des sujets à risques comme les personnes ayant un régime végétarien strict, les sujets dénutris, les sujets âgés ou institutionnalisés, ou encore les bébés allaités exclusivement dont la mère est carencée en B12 (régime végétarien strict ou malnutrition dans les pays en voie de développement par exemple).

**Syndrome de non-dissociation de la vitamine B12 des protéines porteuses :
NDB12PP ou encore « Food cobalamin malabsorption » :**

Ce syndrome regroupe environ 50 à 60% des étiologies de carence en vitamine B12. Il correspond, comme son nom l'indique, à l'incapacité de libération de la vitamine des protéines porteuses (alimentaires et/ou intestinales de transport). Il comporte les pathologies responsables d'une rupture de l'intégrité du système de transport. Il s'agit de l'étiologie principale de carence en vitamine B12 dans les pays développés mais elle correspond néanmoins à un diagnostic d'exclusion.

L'atteinte la plus fréquente dans le syndrome de non-dissociation est l'atrophie gastrique, plus ou moins associée à une infection à *Helicobacter pylori*.

Il existe de nombreuses autres étiologies : la pullulation microbienne, la prise au long cours de traitements médicamenteux comme les inhibiteurs de la pompe à protons (achlorhydrie induite), l'intoxication alcoolique chronique, les chirurgies gastriques type By Pass ou Sleeve gastrectomie. On retrouve ce syndrome chez les patients présentant un déficit de la fonction exocrine du pancréas (complication d'une pancréatite chronique par exemple) mais aussi chez les patients ayant eu une résection de l'intestin grêle terminal ou souffrant d'une atteinte digestive due à une maladie inflammatoire chronique (MICI) telle la maladie de Crohn (22). La malabsorption peut aussi être secondaire à la prise de traitement comme la Metformine, les anti-acides autres que les IPP, les anti-histaminiques de type II (comme la Ranitidine par exemple). La malabsorption est partielle, car il existe une conservation de l'absorption passive par diffusion simple : l'installation de la carence est donc le plus souvent lente (23).

Concernant la Metformine, il existerait un risque carenciel à partir d'une dose moyenne de 2g/j et après une durée d'environ 4 ans de traitement (24). La Metformine confère à la membrane des cellules pariétales de l'iléon une charge positive qui inhibe l'endocytose calcium dépendante du complexe vitamine B12-FI ; cette inhibition est réversible après un apport calcique. Selon une étude américaine, une supplémentation orale de carbonate de calcium (1,2g/jour) majorerait la concentration en HoloTC (25). Il n'existe pas à ce jour de recommandations en France pour une telle supplémentation.

Maladie de Biermer ou anémie pernicieuse (26):

Cette pathologie représente environ 20 à 30% des étiologies de carence en vitamine B12. Il s'agit d'une maladie d'origine auto-immune survenant vers 50-60 ans avec une légère prédominance féminine (1,5/1). La maladie de Biermer peut être associée à de nombreuses maladies auto-immunes : vitiligo, maladie d'Addison, syndrome de Sjögren, par exemple.

L'anémie de Biermer est caractérisée par une atrophie de la muqueuse gastrique, particulièrement de la muqueuse fundique, entraînant un effondrement des débits de facteur intrinsèque. On peut observer également une hypergastrinémie réactionnelle. Deux anticorps peuvent être retrouvés dans le plasma et les sécrétions gastriques :

- un anticorps anti-FI (sensibilité 50 %, spécificité supérieure à 98 %) ;

- un anticorps anti-cellules pariétales gastriques spécifiquement dirigé contre la pompe à protons H⁺ /K⁺ ATPase (sensibilité 90 %, spécificité 50 %).

Le dosage combiné de ces deux anticorps permet un diagnostic relativement fiable, particulièrement chez les patients présentant des anomalies biologiques associées : anémie macrocytaire et carence en vitamine B12. En cas de suspicion de maladie de Biermer, une endoscopie oeso-gastro-duodénale (EOGD) permet de confirmer le diagnostic. De plus, elle permet le diagnostic de gastrite atrophique et/ou de confirmer la présence d'une infection à *Helicobacter pylori*. Environ 20% des patients ayant une maladie de Biermer présentent également une gastrite à *H.Pylori*, qu'il convient de traiter.

Déficits congénitaux enzymatiques ou en transporteurs :

Ces déficits sont très rares. Par exemple, le déficit en transcobalamine II est un trouble héréditaire du transport de la cobalamine, de transmission autosomique récessive. Il est causé par des mutations du gène *TCN2*. Une quarantaine de cas a été décrit dans la littérature actuellement (Orphanet).

Il existe également des déficits en cobalamine. Par exemple, le déficit en cobalamine de type F correspond à une pathologie héréditaire, de transmission autosomique récessive. Sa prévalence est estimée à moins de 1 pour 1 million. Ce déficit entraîne un défaut de libération lysosomale de la vitamine B12, et par conséquent, un déficit combiné de synthèse de l'adénosylcobalamine et de la méthylcobalamine.

Cause indéterminée :

Il est important de noter que l'étiologie de la carence en vitamine B12 reste indéterminée dans environ 10% des cas.

3.3.3 Conséquences physiopathologiques d'une carence en B12

La vitamine B12 joue un rôle important dans la synthèse des bases puriques nécessaires pour la production de nouveaux acides nucléiques, nécessaires à la multiplication cellulaire.

L'altération de la synthèse de l'ADN entraîne un blocage de la maturation cellulaire qui se traduit par un retard de la division cellulaire et par un ralentissement du turn-over des tissus. Cette atteinte touche en premier lieu les tissus à renouvellement rapide (épithélium buccal, digestif, génital et urinaire, moelle osseuse), entraînant des manifestations hématologiques et cutanéomuqueuses au premier plan.

L'altération de la conversion de l'homocystéine en méthionine se traduit par un défaut de synthèse de la protéine de base de la myéline (conduction de l'influx nerveux) (27). Ce défaut de synthèse serait responsable de l'apparition des anomalies de la conduction nerveuse par rupture de l'intégrité fonctionnelle et structurale de la myéline. De plus, une augmentation de l'homocystéine plasmatique peut entraîner des états d'hypercoagulabilité et des accidents thrombo-emboliques.

Le défaut de conversion du méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA entraîne une accumulation de MMA détectable dans le sang et une diminution de la création d'énergie au niveau du cycle de Krebs dans les mitochondries (Figure 8) par diminution de la production de succinate.

3.3.4 Clinique

Les manifestations cliniques de la carence en B12 sont pour la majorité frustes, ce qui peut engendrer un déficit d'exploration.

Tableau I : Manifestations cliniques de la carence en Vitamine B12, tiré de (28)

	Lien certain	Lien probable
Manifestations hématologiques	Anémie mégaloblastique Thrombopénie Leucopénie Pancytopénie Hémolyse intramédullaire Pseudomicroangiopathie thrombotique ^a	
Manifestations neuropsychiatriques	Sclérose combinée de la moelle Polynévrite – ataxie – Babinski Syndrome cérébelleux ^a Atteinte des nerfs crâniens ^a Troubles sphinctériens ^a	Troubles cognitifs Dépression Troubles du sommeil
Manifestations épithéliales	Glossite de Hunter	Troubles digestifs Atrophie vaginale Infections urinaires Ulcères cutanés rebelles
Manifestations vasculaires	Thrombose veineuse profonde	Athérosclérose
Autres		Hypofertilité Avortements

^a Manifestations plus rares que les autres.

Les principales manifestations cliniques (Tableau I) d'une carence en vitamine B12 sont polymorphes, de gravité variable (6,28) et souvent peu spécifiques (exemples : anomalie isolée de l'hémogramme, polynévrite sensitive) (29).

La carence subclinique en B12 se caractérise par l'absence des symptômes les plus spécifiques et la présence de certains symptômes peu spécifiques, pouvant être attribués à d'autres troubles non liés à la carence (asthénie isolée par exemple). Dans ces cas ou la carence, d'installation progressive, n'est pas encore cliniquement décelable (phase d'insuffisance en vitamine B12), la difficulté diagnostique est souvent renforcée au niveau biologique, par des concentrations en B12 totale souvent elles-mêmes limites et ne permettant pas d'affirmer une carence certaine en B12. Seules existent des concentrations élevées en acide méthylmalonique sérique (MMA) ou en homocystéine plasmatique (Hcy) (30) et parfois des concentrations diminuées en B12 active. De ces constatations est né le concept de zone grise ou d'incertitude concernant des concentrations sanguines de B12 subnormales fréquemment rencontrées dans les formes pré ou pauci-symptomatiques.

3.3.5 Manifestations neurologiques

Les troubles neurologiques pouvant être retrouvés sont polymorphes. Ils peuvent être isolés et survenir en dehors de toute anomalie hématologique. Comme énoncé précédemment, l'atteinte neurologique serait due à un trouble de la méthylation des gaines de myéline (altération de la conversion de l'homocystéine en méthionine).

A noter, la supplémentation isolée en folates chez un patient atteint d'une carence en vitamine B12 pourrait aggraver les troubles neurologiques (carence en B12 masquée/ interactions folates/B12) et entraîner des atteintes irréversibles (31).

3.3.6 Manifestations hématologiques

Les manifestations hématologiques que l'on peut retrouver sur l'héмограмme sont :

- la présence d'une anémie normochrome arégénérative, macrocytaire ou non, d'une thrombopénie, voire d'une pancytopénie ;

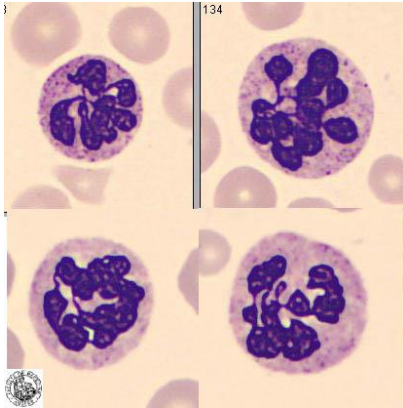
- l'augmentation du volume globulaire moyen (VGM) (> 100 fL chez l'adulte). Elle peut être présente mais n'est pas un marqueur ni sensible ni spécifique de carence en vitamine B12. En effet, celui-ci peut être également augmenté par exemple chez les patients présentant une carence en folates, chez les patients alcooliques chroniques ou parfois dans les syndromes myélodysplasiques (SMD).

Les anomalies pouvant être identifiées sur le frottis sanguin sont :

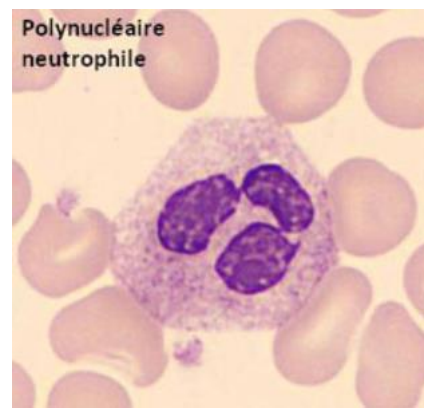
- des anomalies morphologiques des globules rouges : anisocytose, polychromatophilie, présence de macro ovalocytes (morphologie différente de celle des réticulocytes), poïkilocytose. Dans les formes les plus sévères : présence d'hématies fragmentées ressemblant à des schizocytes, présence de dacryocytes, et parfois quelques érythroblastes ($< 3\%$) ;

- des anomalies morphologiques des granulocytes : présence de granulocytes neutrophiles de taille augmentée avec noyau hyperlobé (plus de 3% des polynucléaires avec au moins 5 lobes), appelés macropolycytes ou pléiocaryocytes.

L'hypersegmentation des PNN n'est pas spécifique de la carence en B12. On peut également retrouver cette anomalie dans les carences en folates, certaines chimiothérapies (hydroxyurée principalement), et plus rarement en cas de carence en fer ou au cours des myélodysplasies.



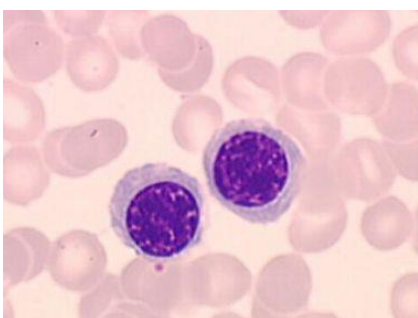
PNN avec noyaux hypersegmentés,
Hematocell (7)



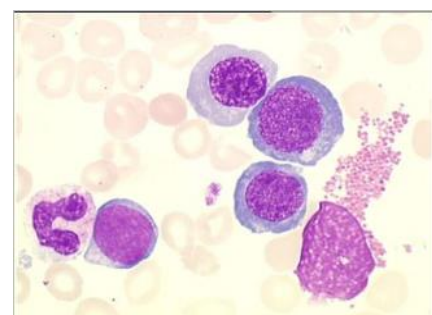
PNN normal, Hematocell (7)

Les anomalies pouvant être visibles sur le frottis de moelle osseuse sont :

- au niveau de l'aspect : une moelle riche, paraissant « bleue » au faible grossissement (par excès d'érythroblastes immatures très basophiles) ;
- au niveau des érythroblastes : la dysérythropoïèse entraîne la présence d'érythroblastes particuliers appelés mégaloblastes (caractérisés par une grande taille et un asynchronisme de maturation nucléo-cytoplasmique) ;

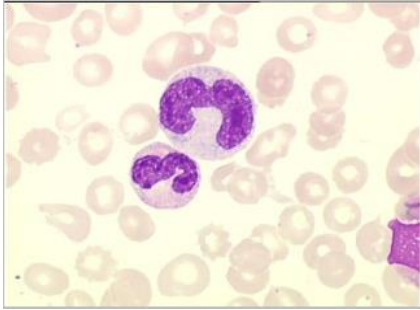


Erythroblastes, Hematocell (7)

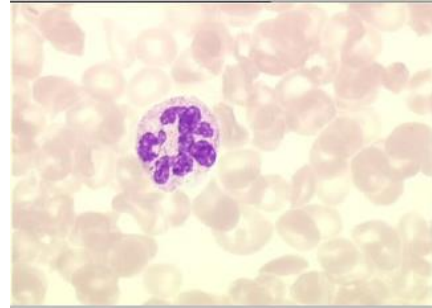


Mégaloblastes, Hematocell (7)

- au niveau de la lignée granulocytaire : Présence d'un gigantisme avec des métamyélocytes géants, des polynucléaires matures géants avec noyau hyperlobé.



Métamyélocyte géant, Hematocell (7)



PNN hypersegmenté, Hematocell (7)

3.3.7 Traitement des carences en vitamine B12

En France, le traitement le plus utilisé est la cyanocobalamine.

En fonction de la pathologie à l'origine de la carence, et en particulier selon le niveau de l'atteinte, les protocoles et posologies de traitement varient.

S'il existe une atteinte gastrique ou une carence d'apport, le traitement de la carence se fera par voie orale (préférentiellement), SC ou IM (32). Lors d'une atteinte au niveau gastrique, le système d'absorption au niveau de l'iléon distal, par diffusion passive, reste fonctionnel et permet de pallier en partie au défaut d'absorption spécifique (par les protéines de transport). Environ 1 à 5 % de la dose ingérée peut alors être absorbée par diffusion passive.

S'il existe une atteinte au niveau de l'iléon terminal (ilectomie, maladie de Crohn par exemple), le traitement de la carence s'effectuera par une substitution parentérale (intramusculaire (IM) ou sous-cutanée (SC)) obligatoire.

Tableau II : Modalités de traitement d'une carence en vitamine B12, adapté de (33)

Atteintes	Administration IM ou SC		Administration per os
Atteinte neurologique ou Atteinte de la muqueuse iléale	Dose de charge : 1000 µg 1x/j pendant 5 jours, puis 1x/semaine pendant 1 mois. Entretien : 1000 µg 1x/mois au long cours. La fréquence dépendant de la réponse clinique et biologique.		Encore non indiquée.
Anémie de Biermer et Syndrome de non-dissociation de la vitamine B12	Dose de charge : 1000 µg 1x/j pendant 5 jours, puis 1x/semaine pendant 1 mois Entretien : 1000 µg 1x/mois au long cours. La fréquence dépendant de la réponse clinique et biologique	ou	1000 µg jusqu'à normalisation des valeurs si éviction des FR 1000 µg à vie si Biermer ou non-correction des FR
Végétalisme Végétarisme			1000 µg jusqu'à normalisation des valeurs. 15 µg une fois la carence substituée.

4. Méthodes d'exploration biologique

4.1 Cobalamine totale circulante

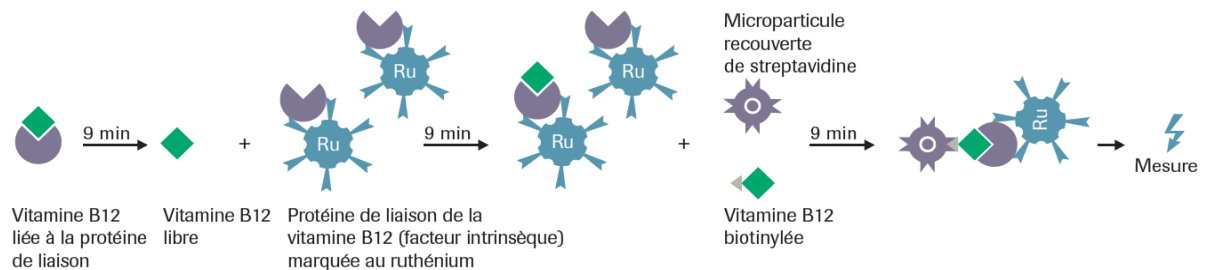
A l'origine, le dosage de la vitamine B12, dite « fonctionnelle » était microbiologique. La méthode consistait à quantifier la croissance de micro-organismes (par exemple E.Coli 113-3) dont la vitamine B12 est un facteur de croissance. La méthode était peu précise et connaissait de nombreuses interférences. Le délai d'obtention des résultats était d'environ 2 à 3 jours (34).

Depuis les années 1990, l'immunodosage direct de la cobalamine est l'examen biologique de première ligne permettant de mettre en évidence une carence en vitamine B12. Selon la NABM (Nomenclature des actes de biologie médicale), il correspond à l'acte 1374, côté B38 soit 10,26 euros en 2019. Il s'agit de la mesure de la concentration totale de vitamine B12 circulant dans le sang (liée aux protéines de transport : les transcobalamines I et II). Il s'agit d'un dosage par immuno-analyse accessible sur la plupart des automates utilisés en routine dans les laboratoires modernes et peu coûteux.

Au CHU de Rouen, cette technique est réalisée sur les modules e602 des automates cobas 8000 (Roche) en électrochimiluminescence (ECLIA). Il s'agit d'une technique d'immunodosage dite par compétition (35).

Figure 6 : Principe de la méthode de mesure de la vitamine B12 par électrochimiluminescence (ECLIA), tiré de la fiche technique Roche

Principe du test: test de compétition



Etape 1 (9 minutes):

Un échantillon de 15 µl est incubé avec le réactif de prétraitement 1 et le réactif de prétraitement 2 de la vitamine B12. La vitamine B12 liée est libérée.

Etape 2 (9 minutes):

L'ajout du «facteur intrinsèque» marqué au ruthénium entraîne la formation d'un complexe protéine de liaison/vitamine B12 dont la quantité dépend de la concentration de l'analyte dans l'échantillon.

Etape 3 (9 minutes):

Suite à l'ajout de microparticules recouvertes de streptavidine et de vitamine B12 biotinylée, les sites non liés du «facteur intrinsèque» marqué au ruthénium sont occupés. Il en résulte un complexe «facteur intrinsèque» marqué au ruthénium/vitamine B12 biotinylée qui se lie à une phase solide par l'interaction de la biotine et de la streptavidine.

Le domaine de mesure est défini par des valeurs comprises entre 36,9 et 1476 pmol/L.

Les valeurs usuelles recommandées par le fournisseur Roche dans la fiche technique sont les suivantes : 145-569 pmol/L (2,5-97,5 èmes percentiles). Les valeurs usuelles définies au CHU sont comprises dans l'intervalle 141-489 pmol/L.

Il peut exister des interférences avec des anticorps anti-FI (théoriquement présents chez les patients porteurs d'une maladie de Biermer), pouvant donner des valeurs faussement normales de vitamine B12 totale. Cela est dû à la présence de facteur intrinsèque dans le réactif utilisé comme protéine de liaison dans ce test. Cependant, le test a été modifié par le fournisseur pour minimiser cette interférence (36).

De manière générale, le dosage de la vitamine B12 comporte quelques désavantages. Il existe des variations intra-individuelles des concentrations et des variations entre les

différentes méthodes d'immunoanalyse. Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de consensus concernant les intervalles de référence pour cette analyse et les cut-off à utiliser. D'autre part, ce dosage quantifie les formes active et inactive de vitamine B12 alors que la forme active (holotranscobalamine), biodisponible, ne correspond qu'à environ 20% de la B12 sérique. Des faux positifs sont donc possibles, si l'haptocorrine est diminuée (grossesse). Des faux négatifs sont également possibles lorsque l'haptocorrine est augmentée (néoplasies myéloprolifératives, hépatomes) (37).

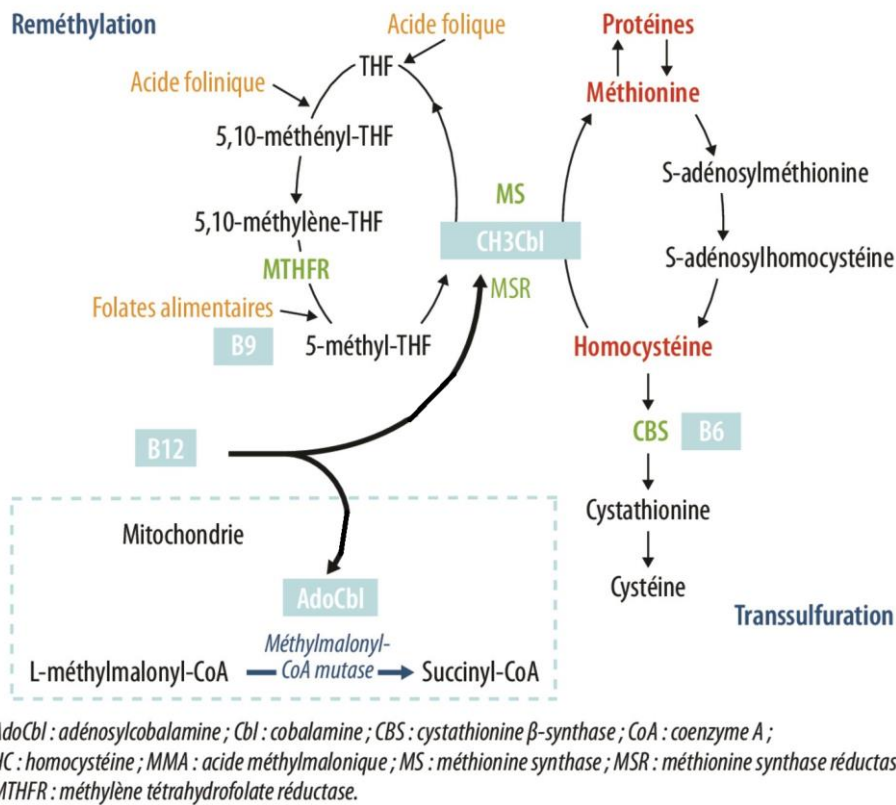
4.2 Homocystéine plasmatique (Hcy)

L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé soufré, présent à de très faibles concentrations sanguines, exerçant une toxicité cellulaire et nécessitant une retransformation en cystéine ou en méthionine :

-il peut être transformé en méthionine par reméthylation (via la méthionine synthase). La méthyl-cobalamine et les folates sont des co-facteurs de cette voie réactionnelle.

-il peut être converti en cystéine (transsulfuration) avec pour cofacteurs les vitamines B2 et B6.

Figure 7 : L'homocystéine plasmatique, adaptée de (38)



L'Hcy augmente lors d'une carence en vitamine B12 car la cobalamine, sous forme de méthylcobalamine, est un cofacteur nécessaire pour la conversion de l'homocystéine en méthionine.

L'homocystéine est définie comme un marqueur indirect d'une carence en vitamine B12. Les valeurs usuelles utilisées au CHU de Rouen sont les suivantes : 5 – 15 µmol/L. Il s'agit d'une analyse actuellement non remboursée (60 euros, hors nomenclature). Il existe différentes techniques de dosages : immunodosage, immunodosage couplé à une réaction enzymatique, HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance) ou spectrométrie de masse.

Ce marqueur est considéré comme ayant une bonne sensibilité mais avec une spécificité inférieure à l'acide méthylmalonique sanguin. Il existe des faux positifs lors d'une carence en acide folique (B9) et vitamine B6 :

En cas de carence en vitamine B9, il existe une élévation de l'Hcy par défaut de conversion en méthionine (voie de reméthylation).

La vitamine B6 joue quant à elle un rôle de co-facteur de 2 enzymes de la voie de transsulfuration : la cystathionine- β -synthase (CBS) et la γ -cystathionase. En cas de carence en vitamine B6, il y a donc une augmentation de l'Hcy par défaut de conversion en cystathionine.

La concentration sanguine en Hcy est également augmentée en cas d'insuffisance rénale ou de consommation alcoolique et plus anecdotiquement en cas de consommation de café et de tabac.

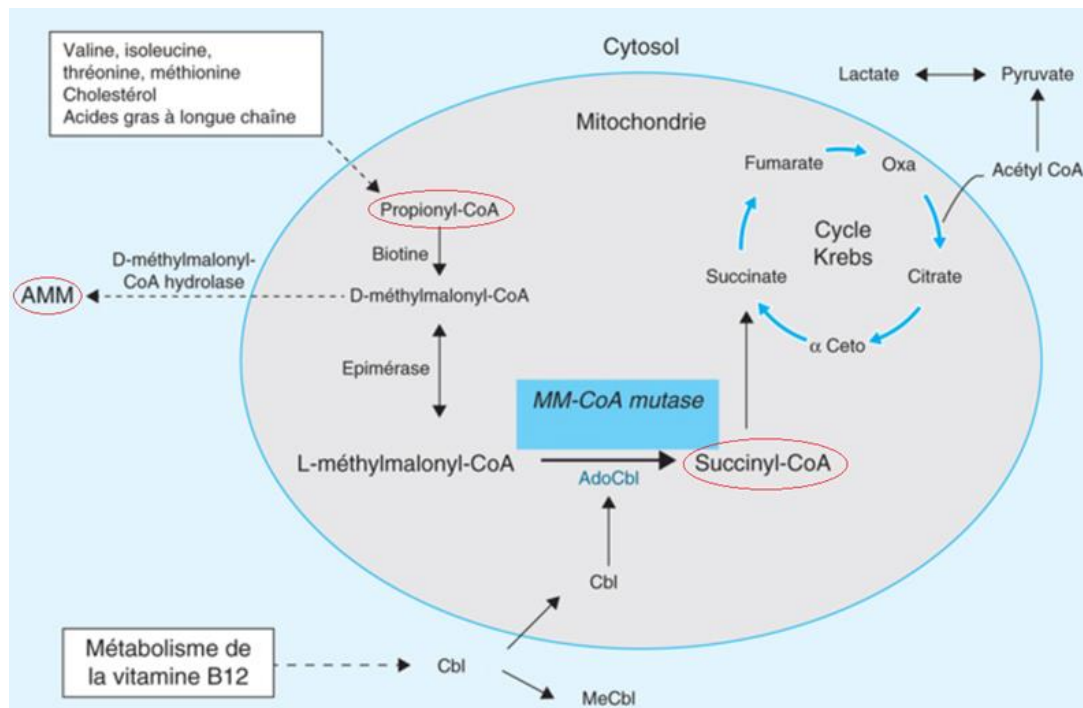
Le paramètre biologique Hcy souffre en outre d'un traitement préanalytique délicat. Le prélèvement doit s'effectuer à jeun, de préférence sur tube EDTA. L'échantillon doit être acheminé au laboratoire dans la glace, immédiatement après le prélèvement, centrifugé, décanté et dosé rapidement, dans les 4 heures suivant le prélèvement idéalement. Si l'analyse est différée, le prélèvement doit être centrifugé, décanté et congelé rapidement après réception (si possible dans les 4 heures). Le non-respect de ces conditions préanalytiques, entraîne une production et un relargage d'homocystéine par les globules rouges dans le plasma et une surestimation de la concentration plasmatique d'homocystéine.

Au total, l'Hcy n'est pas d'un marqueur utilisable en routine pour dépister une carence en vitamine B12 mais peut constituer un marqueur de seconde ligne.

4.3 Acide méthylmalonique sérique (MMA)

Le MMA est un acide dicarboxylique. C'est un métabolite intermédiaire du métabolisme des lipides et des protéines.

Figure 8 : Conversion du Propionyl-CoA en Succinyl CoA, adaptée de (39)



AMM : acide méthylmalonique, AdoCbl : adénosylcobalamine, MeCobl : méthylcobalamine, Cbl : cobalamine, MM-CoA mutase : méthylmalonyl-CoA mutase, oxa : oxaloacétate, α Ceto : α Cétoglutarate

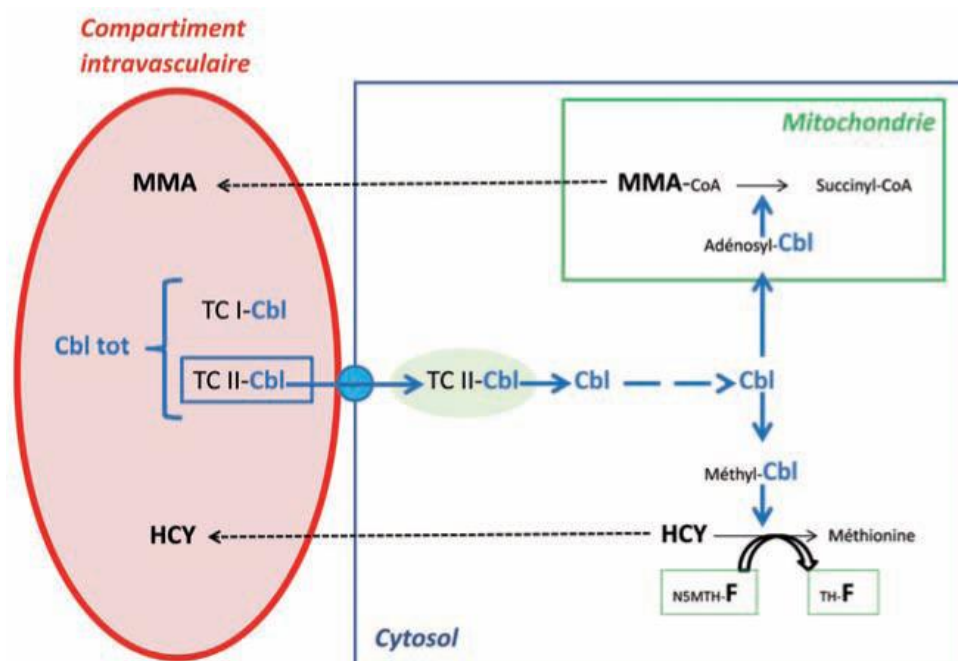
L'adénosylcobalamine est nécessaire à la conversion enzymatique (par la méthylmalonyl-CoA mutase) du MMA en succinyl CoA. Un déficit en adénosylcobalamine conduit ainsi à une augmentation du MMA plasmatique. Le MMA est donc également considéré comme un marqueur indirect d'une carence en vitamine B12.

Ce marqueur augmente en cas d'insuffisance rénale (faux positifs), et peut être modifié lors d'une atteinte hépatique. Certaines études ont confirmé que des concentrations normales

en MMA peuvent être mesurés même dans des cas de très faibles niveaux de vitamine B12 (40). Il présente toutefois une bonne sensibilité et une meilleure spécificité que l'Hcy et il est actuellement considéré comme le marqueur de référence (gold standard) en recherche clinique (41).

Le MMA est quantifié en chromatographie couplée à la spectrométrie de masse. Son coût est plus élevé que celui de la B12 totale (B120 soit 32,4 euros – NABM 4002) et sa disponibilité est très limitée puisque seuls de rares laboratoires ultra spécialisés le mesurent en France. Il ne s'agit donc pas d'un marqueur utilisable en routine pour dépister une carence en vitamine B12 mais plutôt un marqueur de seconde ligne.

Figure 9 : Schéma récapitulatif des différents marqueurs biologiques, tiré de (42)



Cbl-Tot : cobalamine totale ; Méthyl-Cbl : méthyl-cobalamine ; Adénosyl-Cbl : adénosyl-cobalamine ; TC I : transcobalamine I (haptocorine) ; TC II : transcobalamine II ; TC II – Cbl : holotranscobalamine II ; MMA : acide méthylmalonique ; HCY : homocystéine ; F : folate ; N5MTH-F : N5 méthyl tétrahydrofolate

4.4 Holotranscobalamine (HoloTC) ou B12 active

4.4.1 Généralités

L'HoloTC (ou TCII-Cbl sur les figures) n'est pas un marqueur récent (années 1980) mais il était rarement utilisé de par ses méthodes de dosage, difficiles et coûteuses, utilisant des radio éléments (radioimmunoassay (RIA)) (43).

Le dosage de ce marqueur est aujourd'hui disponible par immunoanalyse couplée à la chimiluminescence. Il est toutefois encore peu utilisé en routine en France, son coût est élevé dans les rares laboratoires proposant cette analyse (Biomnis : 149 euros, non remboursable ; non disponible chez Cerba).

Il correspond au dosage de la fraction biodisponible ou forme active, de la vitamine B12. Ses valeurs fluctuent peu au cours d'une journée. Sa demi-vie, plus courte que celle de l'HoloHC (demi-vie de quelques minutes/heures et de quelques jours respectivement (44)), permet de mettre en évidence plus rapidement une évolution du statut vitaminique notamment après un changement d'apport en vitamine B12 (dès 2 jours) (45).

Il s'agirait d'un marqueur plus précoce de carence en vitamine B12 (46,47). Lors d'une carence subclinique ou latente, l'organisme utilise en premier lieu les réserves se trouvant dans le plasma et les cellules. A ce stade, seule l'HoloTC serait diminuée, avant l'apparition d'une carence fonctionnelle, visible quant à elle sur le dosage de la vitamine B12 totale.

Sa concentration ne semble pas influencée par la grossesse, à partir du 2^{ème} trimestre (contrairement au dosage de la cobalamine totale).

Ce marqueur possède une sensibilité et une spécificité légèrement supérieure à celle de la cobalamine. Pour exemple, les résultats de l'étude de Heil et al. (48) figurant dans le Tableau III. Des observations similaires et d'autres, plus rares, montrant l'absence de supériorité de la B12 active, ont été publiés (annexe 3).

Tableau III : Sensibilités et spécificités de la vitamine B12 totale et active selon le cut-off, adapté de Heil et al (48)

Test diagnostique	Cut-off	Sensibilité	Spécificité
B12 totale (pmol/L)	145	53 %	84 %
B12 totale (pmol/L)	180	64 %	64 %
B12 active (pmol/L)	21	64 %	88 %
B12 active (pmol/L)	32	83 %	60 %

La sensibilité et la spécificité ne varient pas lors du dosage combiné de la vitamine B12 totale et de l'HoloTC dans cette étude réalisée par Heil et al (48). Ils ont défini une carence en vitamine B12 par un dosage de MMA > 0,45 µmol/L. Ils ont comparé le gain des vrais positifs en ajoutant un dosage d'HoloTC en seconde intention après avoir effectué un dosage de vitamine B12 totale retrouvant des valeurs normales. Ils ont obtenu un gain de 10 vrais positifs et 7 faux positifs par rapport au dosage de la vitamine B12 totale seule. Un nombre total de 40 vrais positifs a été identifié, ce qui est comparable avec le nombre total de vrais positifs identifiés par le test HoloTC seul (39 vrais positifs).

L'analyse HoloTC possède néanmoins quelques limites. La concentration est augmentée chez les patients atteints d'une insuffisance rénale (DFG < 60 ml/ min/ 1,73 m²). En effet, l'HoloTC est une petite protéine (poids moléculaire environ 40 kDa, contre environ 65 kDa pour l'haptocorrine (49)), filtrée par le rein. Par conséquent, des patients atteints d'insuffisance rénale avec une hypovitaminose B12 ont montré des concentrations normales d'HoloTC, avec des concentrations élevées de MMA (50).

Il existe également des polymorphismes génétiques qui peuvent avoir une influence sur les résultats du test (51). Par exemple, un variant génétique (776G>C) du gène de la transcobalamine II (*TCN2*) affecte la concentration plasmatique en HoloTC.

Comme pour la vitamine B12 totale, aucun consensus concernant des valeurs de référence pour l'HoloTC n'a été établi. Il n'existe pas de standardisation entre les fournisseurs des trousseaux disponibles sur le marché.

4.4.2 Différentes trousse de dosage de la vitamine B12 active

Il existe plusieurs trousse de dosage de la vitamine B12 active :

- Abbott ARCHITECT Active-B12 :

La première version de cette trousse était une technique MEIA (microparticle enzyme immunoassay), en immunochimie fluorescence, réalisée sur Abbott AxSYM system. La plupart des études publiées ont été réalisées à l'aide de cette méthode.

Elle a été remplacée en 2011 par la trousse Abbott ARCHITECT Active-B12, technique immunologique microparticulaire par chimiluminescence (CMIA), disponible sur les automates Abbott ARCHITECT i2000SR ou i1000SR.

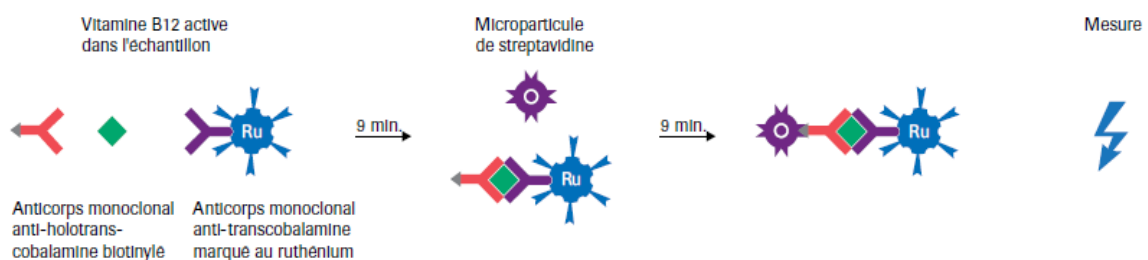
Il s'agit d'une technique sandwich, dont les principes, issus de la fiche technique fournie par Abbott sont visibles en annexe 1.

Les valeurs de référence sont les suivantes : **25,1 à 165,0 pmol/L** (IC 95%). Elles ont été obtenues à partir de 181 (83 hommes/98 femmes) donneurs apparemment en bonne santé de 18 à 69 ans.

- Roche cobas Elecsys Active B12 (extrait de la fiche technique en annexe 2) :

Il s'agit de la technique que nous avons souhaité évaluer dans l'étude présente, au CHU, sur cobas 8000, module e602. Ce test immunologique est une technique sandwich révélée par électrochimiluminescence (ECLIA). La standardisation de cette méthode a été effectuée par rapport à l'étalon international NIBSC de l'OMS, code 03/178.

Figure 10 : Procédure d'analyse d'après la fiche technique élaborée par le fournisseur Roche



Le domaine de mesure est défini par des valeurs comprises entre 3,0 et 150 pmol/L.

Les valeurs de référence sont les suivantes : **37,5 à 188,0 pmol/L** (IC 95%). Elles ont été obtenues à partir de 214 (99 hommes/115 femmes) personnes apparemment en bonne santé âgées de 20 à 79 ans. Les femmes enceintes ont été exclues et les patients avaient des concentrations en homocystéine normales.

Il existe des interférences décrites pour cette méthode : les échantillons de patients traités par de fortes doses de Biotine (> 5mg/jour), des titres élevés d'anticorps dirigés contre les anticorps spécifiques de l'analyte, des anticorps anti-streptavidine ou anti-ruthénium (rarissimes).

4.4.3 Comparaison holotranscobalamine et vitamine B12 totale

Plusieurs études de performance diagnostique ont été menées afin de comparer l'HoloTC et les autres marqueurs sanguins du métabolisme de la vitamine B12.

Le National Institute for Health and Care Excellence (NICE) a publié une synthèse de ces publications, et parmi 8 études de performances diagnostiques (52) :

- 4 ont reporté que l'HoloTC est un marqueur présentant une meilleure exactitude diagnostique que les dosages de vitamine B12 totale, Hcy et MMA.
- 1 étude a démontré une faible concordance entre les résultats d'HoloTC et les valeurs de MMA dans des échantillons avec une vitamine B12 totale basse ou limite (zone grise), suggérant ainsi la survenue de résultats faux négatifs pour l'HoloTC.
- 1 étude a retrouvé des valeurs élevées de MMA chez 31% des échantillons avec des résultats indéterminés (zone grise) d'HoloTC.
- 2 études ont démontré que l'HoloTC était un marqueur de carence en vitamine B12 plus sensible que la vitamine B12 totale.

Il existe une étude, réalisée par Al Aisari et al (53), suggérant une efficacité diagnostique presque identique entre HoloTC et B12 totale, utilisés seuls ou en association, dans le dépistage/diagnostic d'une carence en vitamine B12 chez la majorité des patients. Dans cette population, il existait une corrélation significative entre ces deux paramètres

($p < 0,001$) avec 90,8% des échantillons concordants entre eux (selon les valeurs de référence des kits utilisés dans l'étude).

Plusieurs études ont suggéré que le dosage de l'HoloTC possède une meilleure précision diagnostique par rapport au dosage de la cobalamine (43,48,54), particulièrement dans des populations à risque de carence, comme les personnes âgées (47) ou les femmes enceintes (voir annexe 3).

Cependant, il est important de préciser que l'HoloTC possède également un intervalle assez large de concentrations indéterminées (zone grise). Le test HoloTC semble souffrir d'une limitation similaire à celle observée pour la vitamine B12 totale concernant cet intervalle. Les valeurs de référence sont aussi dépendantes de la méthode de dosage utilisée.

Il existe dans la littérature, certains désaccords notables concernant ces 2 paramètres (55):

- la demi-vie de l'HoloTC est plus courte que celle de l'HoloHC mais varie de quelques minutes à quelques heures selon les études ;

- la corrélation entre B12 totale et B12 active varie également ;

- le comportement de l'HoloHC et de l'HoloTC après absorption récente de B12 ;

- la valeur de cut-off de l'HoloTC utilisée pour déterminer le seuil de carence en vitamine B12.

Concernant la stabilité des échantillons, la société Roche annonce que l'HoloTC est plus stable que la cobalamine, que ce soit à température ambiante (5 jours entre 15 et 25 degrés contre 2 heures), entre 2 et 8°C (14 jours contre 48 heures) ou encore à -20°C (6 mois contre 56 jours). Il est également possible de congeler les échantillons 5 fois pour l'HoloTC contre 1 seule congélation possible pour la cobalamine (tests de stabilité réalisés par le fournisseur Roche sur une sélection de tubes de prélèvement disponibles dans le commerce).

Dans une étude de stabilité, réalisée en 2012 par Oddoze et al. (56), le délai de stabilité validé pour la B12 totale est de 72h avant et après centrifugation. Au vu de cette publication et de la fiche technique du fournisseur, au laboratoire nous avons adopté un délai d'acheminement dans les 6 heures et une conservation 4 jours à 4°C après centrifugation.

En comparaison, sur la fiche technique de la méthode Abbott ARCHITECT Active-B12, les délais maximums de conservation des échantillons, en fonction de la température

sont les suivants : Jusqu'à 16h à température ambiante, jusqu'à 3 jours entre 2 et 8 degrés et jusqu'à 6 mois pour une température inférieure ou égale à -20 degrés. Il est également précisé d'éviter plus de 3 cycles de congélation/décongélation.

4.5 Existence de zones d'incertitude

De nombreuses études ont noté l'existence d'une zone grise ou zone d'incertitude concernant les valeurs de vitamine B12 totale et active. Selon les études, ces zones d'incertitudes ont une étendue plus ou moins large et des limites variables (Tableaux IVa et IVb). Ci-dessous, les données issues de la littérature concernant les intervalles de zone grise ou zone d'incertitude :

Tableau IVa : Zones d'incertitude décrites concernant la B12 totale

Intervalles zone incertitude B12 totale (pmol/L)	Date	Auteurs	Trousse / Fournisseur
125 - 250	2003	Hvas et al (57)	Non cité
151 - 300	2007	Non cités	Axis-Shield
150 - 220	2012	Bosco et al (58)	Non cité
131 - 315	2015	Risch et al (59)	Abbott ARCHITECT i2000
150 - 300	2017	Mazouri et al (33)	Access Vitamin B12 assay, Beckman Coulter

Tableau IVb : Zones d'incertitude décrites concernant la B12 active

Intervalles zone incertitude B12 active (pmol/L)	Date	Auteurs	Trousse / Fournisseur
25 -50	2003	Lloyd-Wright et al (60)	ELISA sur BEP-2000
40 – 70 puis 23 - 75	2007/2013	Herrmann & Obeid (61,62)	Non cité
20 - 30	2011	Valente et al (47)	Abbott AxSYM
30 - 40	2013	Palacios et al (63)	Axis-Shield
25,8 – 56,9	2015	Risch et al (59)	Abbott AxSYM

Ces zones d'incertitude correspondent à des valeurs de B12 mesurées qui appartiennent à l'intervalle des valeurs de référence établies chez des sujets bien portants mais que l'on trouve parfois associées soit à des signes cliniques imputables à une carence en B12 ou bien à une élévation de marqueur indirect (Hcy ou MMA) imputable à une carence.

Les dosages réalisés lors de ces études ont été effectués avec des techniques et des automates différents expliquant partiellement la variabilité. Une autre part s'explique par la variabilité, la faible robustesse et le manque de spécificité des critères cliniques ou biologiques utilisés pour définir ces zones grises.

Il est intéressant de noter que la notion de zone grise est évoquée dans de nombreux articles et revues mais n'est pas intégrée à la pratique dans les laboratoires de biologie médicale (par exemple : absence de commentaire particulier apporté à un résultat situé dans la zone d'incertitude).

Nous nous sommes particulièrement intéressés à cette zone d'incertitude pour la suite de notre travail, c'est pourquoi notre population principale se compose de patients dont la concentration mesurée en vitamine B12 totale est comprise entre < 50 et 300 pmol/L ; des concentrations franchement basses de B12 totale jusqu'à la limite haute de la zone d'incertitude.

Tableau V : Comparaison avantages et inconvénients, B12 totale et B12 active

	B12 totale Roche	B12 active Roche
Avantages	<p>Dosage le plus utilisé en routine = disponibilité</p> <p>Bibliographie abondante</p> <p>Connaissance de diverses interférences et amélioration des techniques (ex : FI)</p> <p>Utilisable en routine, peu coûteux</p> <p>Connaissance du biomarqueur et de ses valeurs usuelles par les professionnels de santé</p> <p>Bonne sensibilité et spécificité (selon cut-off utilisé)</p>	<p>Dosage de la fraction biologiquement active de la B12</p> <p>½ vie circulante plus courte</p> <p>Concentrations reflètent le bilan de B12 indépendamment d' une absorption récente de B12 (64)</p> <p>Intérêt en 1^{ère} intention dans certaines populations à risque de carence : Femmes enceintes, personnes âgées... (62,65)</p> <p>Meilleure sensibilité selon certaines études comparatives</p>
Inconvénients	<p>Mesure de la totalité de la vitamine B12 (HoloTC+HoloHC)</p> <p>Absence de consensus concernant les valeurs de référence</p> <p>Mutation haptocorrine (HC) rare mais difficile à explorer : concentration faussement abaissée</p> <p>Interférences existantes (ex : complexes immunoglobuline-vitamine B12, Biotine)</p>	<p>Peu d' études comparatives disponibles et sur faible effectif</p> <p>Absence de consensus concernant les valeurs de référence</p> <p>Peu de connaissances et recul concernant les interférences possibles</p> <p>Peu utilisé en routine et plus coûteux</p> <p>Polymorphismes <i>TCN2</i> : concentration faussement abaissée</p> <p>Interférences existantes (ex : Anticorps spécifiques, Biotine...)</p>

OBJECTIFS DU TRAVAIL

L'objectif de notre travail a été d'évaluer l'intérêt du dosage de la vitamine B12 active, marqueur récemment développé sur les automates modernes d'immunoanalyse, désormais disponible sur les plateformes cobas Roche, déployées au laboratoire depuis 2011, et de déterminer quelle place il pourrait prendre à l'avenir dans la pratique d'exploration biologique des dysvitaminoses B12 dans notre laboratoire, au CHU de Rouen.

Cet objectif s'est décliné en plusieurs étapes :

- Une vérification des performances analytiques de la trousse B12 active Roche puis,
- Une évaluation des performances diagnostiques de la B12 active en comparaison avec le dosage de la vitamine B12 totale, utilisé actuellement au laboratoire, et,
- Un arbitrage des discordances éventuelles entre les dosages de B12 totale et active à l'aide du dosage de l'acide méthylmalonique sanguin, considéré comme le gold standard des marqueurs de carence fonctionnelle en B12 en recherche bioclinique.

Une population principale constituée de patients présentant des concentrations sanguines en B12 totale autour de la zone d'incertitude diagnostique (< 50 à 300 pmol/L) et 2 groupes de patients complémentaires, les femmes enceintes en fin de grossesse (3^{ème} trimestre) et les patients atteints de néoplasies et présentant une hypervitaminémie B12 ont été sélectionnés pour évaluer l'intérêt du marqueur.

Le choix de la population principale a été guidé par un objectif secondaire très important à nos yeux : mieux cerner la notion de zone d'incertitude diagnostique, décrite dans la littérature mais peu intégrée dans les pratiques de la biologie, et affiner notre interprétation et notre prestation de conseils pour les explorations des dysvitaminoses B12 réalisées au laboratoire.

II. MATERIELS ET METHODE

1. Type d'étude

Il s'agit d'une étude analytique expérimentale prospective chez des patients ayant eu un prélèvement sanguin dans le but d'évaluer leur statut vitaminique par la prescription et la réalisation d'un dosage de la vitamine B12 totale au CHU de Rouen entre Novembre 2018 et Mars 2019.

Nous avons soumis notre projet à la Commission d'évaluation scientifique des projets de recherche du CHU qui a confirmé que celui-ci ne rentrait pas dans le champ d'application de la loi Jardé, les tests étant effectués sur une collection biologique préexistante, et ne requérant pas de consentement signé des patients.

2. Populations étudiées

2.1 Etude principale

2.1.1 Critères d'inclusion

Les critères d'inclusion ont été les suivants :

- Patients ayant bénéficié d'un dosage de vitamine B12 totale et de folates au laboratoire avec :
 - Une concentration en folates > 8,8 nmol/L (valeurs au-dessus des valeurs de référence d'une population saine)
 - Un dosage de vitamine B12 totale compris entre < 50 pmol/L et 300 pmol/L
- Patients ayant bénéficié de dosages de l'urée et de la créatinine sanguines concomitants
- Patients inclus sur la période de Novembre 2018 à Mars 2019

2.1.2 Critères d'exclusion

Les critères d'exclusion ont été les suivants :

- Patients âgés de moins de 16 ans
- Patients avec une créatininémie augmentée ($>104 \mu\text{mol/L}$ pour un homme, $>84 \mu\text{mol/L}$ pour une femme) et/ou urémie augmentée ($>7,0 \text{ mmol/L}$) (fonction rénale anormale)

2.1.3 Patients sélectionnés

Au total, nous avons inclus, sur la période de recueil, 175 patients avec une vitamine B12 totale comprise entre $< 50 \text{ pmol/L}$ (valeur seuil de détection avec la trousse actuellement utilisée) et 300 pmol/L .

2.2 Etude complémentaire 1 – Femmes enceintes

2.2.1 Critères d'inclusion

- Les critères d'inclusion ont été les suivants :
- Femmes enceintes au 3^{ème} trimestre de grossesse ($> 25\text{SA}$)
- Femmes enceintes ayant eu une demande de sérologie toxoplasmose au CHU de Rouen, réalisée dans le service de parasitologie-mycologie (matériel d'étude : fond de tube)
- Patientes incluses sur la période du 4 au 8 Février 2019

2.2.2 Critères d'exclusion

Les critères d'exclusion ont été les suivants :

- Patientes âgées de moins de 18 ans
- Patientes dont le terme de la grossesse n'était pas renseigné
- Patientes pour lesquelles les échantillons disponibles étaient en quantité insuffisante pour ajout des 3 analyses : vitamine B12 totale, folates et vitamine B12 active

2.2.3 Patients sélectionnés

Nous avons inclus 11 femmes enceintes au 3^{ème} trimestre de grossesse sur la période de recueil.

2.3 Etude complémentaire 2 – B12 totale > 500 pmol/L

2.3.1 Critères d'inclusion

Les critères d'inclusion ont été les suivants :

- Patients ayant bénéficié d'un dosage de vitamine B12 totale et de folates au CHU avec :
 - o Une concentration en folates > 8,8 nmol/L (valeurs au-dessus des valeurs de référence d'une population saine)
 - o Un dosage de vitamine B12 totale >500 pmol/L, en dehors d'une supplémentation
- Patients ayant bénéficié de dosages de l'urée et de la créatinine sanguines concomitants
- Patients inclus sur la période Décembre 2018 à Mars 2019

2.3.2 Critères d'exclusion

Les critères d'exclusion ont été les suivants :

- Patients âgés de moins de 16 ans
- Patients avec une créatininémie augmentée (>104 µmol/L pour un homme, >84 µmol/L pour une femme) et/ou urémie augmentée (>7,0 mmol/L) (fonction rénale anormale)

2.3.3 Patients sélectionnés

Nous avons inclus 15 patients, sur la période de recueil, présentant une hypervitaminémie B12 dont 7 patients atteints d'une néoplasie active active (ORL, digestive ou pulmonaire) et 8 patients à priori non atteints de néoplasie au moment du recueil.

3. Données recueillies et dosages réalisés

En parallèle des dosages mis en œuvre, nous avons compilé des informations cliniques et biologiques complémentaires concernant nos populations d'étude : âge, sexe, service prescripteur, contexte clinique, hémoglobine, VGM, urée et créatinine sanguine.

3.1 Dosages de vitamine B12 totale

Le dosage de la vitamine B12 totale a été réalisé sur un automate cobas 8000 module e602 (Roche). Les vitamines B12 totale ont été dosées selon la méthode utilisée en routine au CHU de Rouen : Vitamin B12 II, Elecsys 2010. Il s'agit d'un dosage par électrochimiluminescence (ECLIA), méthode par compétition.

3.2 Dosages de vitamine B12 active

Nous avons réalisé, avant de doser les patients, une vérification des performances analytiques de ce nouveau dosage sur notre automate (répétabilité et reproductibilité) afin d'évaluer la fidélité du dosage et de vérifier notre maîtrise de la trousse. La répétabilité consiste à analyser un même échantillon dans les conditions suivantes : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage dans un délai le plus court possible. L'objectif est de caractériser la meilleure performance possible, dans des conditions optimales et de vérifier le bon fonctionnement du système (instrument/réactif) pour l'analyte concerné. La reproductibilité intra-laboratoire (fidélité intermédiaire) consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages ou autres. Il permet de caractériser la performance en conditions réelles de fonctionnement et de paramétrer les critères d'acceptation des antécédents en combinaison avec les variations biologiques notamment dans le cas de systèmes d'aides à la décision.

Ces vérifications faites, nous avons dosé la vitamine B12 active des patients sur échantillon préalablement congelé (maximum 1 mois), sur un automate cobas 8000 module e602 (Roche) avec la technique suivante : Elecsys active B12. Il s'agit d'un immunodosage en sandwich et en phase homogène avec une révélation par électrochimiluminescence (ECLIA). Les dosages de la vitamine B12 active ont été effectués sur l'automate entourés de passages de contrôles de qualité internes (niveau 1 et niveau 2) en début et fin de série.

3.2.1 Etude principale

Le jour même ou le lendemain du dosage, nous avons recueilli et congelé le plasma résiduel des patients à partir du tube hépariné utilisé pour le dosage de la vitamine B12 totale initialement prescrit.

Lors des dosages de vitamine B12 active, qui ont été réalisés par séries de patients, les échantillons ont été décongelés à température ambiante, centrifugés et le plasma a été transféré dans des godets Hitachi (environ 250 microlitres). Les échantillons ont été programmés avec un numéro attribué par échantillon. Nous avons ensuite récupéré les résultats après dosage, imprimé les feuilles de travail issues de l'automate et analysé les résultats en différé.

3.2.2 Etude complémentaire 1 – femmes enceintes

Les échantillons ont été collectés chaque jour de la semaine de recueil et congelés immédiatement. Les dosages de vitamine B12 totale, folates et vitamine B12 active ont été réalisés en une seule série à la fin de la période de recueil sur 2 automates : cobas 8000 module e602 (Roche), ligne « Bleue » pour les dosages de vitamine B12 totale et folates : cobas 8000 module e602 (Roche), ligne « Jaune » pour le dosage de la vitamine B12 active.

3.2.3 Etude complémentaire 2 – B12 totale > 500 pmol/L

Nous avons recueilli et congelé le plasma des patients à partir du tube hépariné utilisé pour le dosage de la vitamine B12 totale, le jour même ou le lendemain du dosage. Le dosage de la vitamine B12 active a été réalisé sur une seule série pour tous les patients, selon la même méthode que pour la population de l'étude principale 1.

3.3 Autres dosages

Les autres paramètres biologiques utilisés lors de notre étude ont été mesurés selon les techniques suivantes :

- Analyses réalisées par le laboratoire de Biochimie Générale au CHU de Rouen, sur des automates cobas, Roche :

- Folates (valeurs de référence : $> 8,8$ nmol/L): Immunoanalyse par compétition (ECLIA), trousse Elecsys Folate III – Roche sur automate cobas
- Urée (valeurs de référence : $2,5 - 7,0$ mmol/L): Méthode de dosage enzymatique, trousse UREAL – Roche sur automate cobas
- Créatinine (valeurs de référence : homme : $59 - 104$ μ mol/L, femme : $45 - 84$ μ mol/L): Méthode de dosage enzymatique, trousse CREP2 – Roche sur automate cobas

- Analyses réalisées par le laboratoire d'Hématologie au CHU de Rouen sur des automates XN-9000, SYSMEX® :

- Hémoglobine (valeurs de référence pour un adulte : homme : $13-17,5$ g/dL, femme : $12,5-15,5$ g/dL) : Mesure par photométrie, méthode de détection SLS (Sodium Lauryl Sulfate)
- VGM (valeurs de référence : $80-100$ fl) : Mesure par impédance

- Analyse externalisée, réalisée par l'unité de pathologies métaboliques, érythrocytaires et dépistage périnatal, du service de Biochimie et Biologie Moléculaire Grand Est, au CHU de Lyon :

- MMA (valeurs de référence : $< 0,5$ μ mol/L) : selon une technique de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (d'après Magera et al. Clin. Chem. 2000 ; 46 :1804-1810).

4. Tests statistiques

La corrélation entre les deux méthodes d'analyse vitamine B12 totale et vitamine B12 active a été réalisée à l'aide d'un coefficient de corrélation de Pearson.

Les variables ont été analysées en termes d'effectifs, de moyenne avec écart type, de médiane et de pourcentage. La carence en vitamine B12 totale a été définie par une valeur inférieure à 141 pmol/L (valeur usuelle basse définie au CHU de Rouen). La carence en vitamine B12 active a été définie par une valeur inférieure à 37,5 pmol/L (valeur usuelle basse de la fiche technique du fournisseur). La carence cellulaire fonctionnelle en B12 évaluée par le dosage d'acide méthylmalonique a été définie par une valeur de MMA supérieure à 0,5 μ mol/L (valeur usuelle définie par le CHU de Lyon).

Les valeurs de vitamine B12 totale et active ont été regroupées sous forme de classes afin d'obtenir une variable qualitative. Les analyses comparatives des variables qualitatives nominales ont été réalisées par le test du Chi², le test exact de Fischer lorsque les effectifs le nécessitaient et le test de Mc Nemar (Chi² apparié) pour les données appariées. Les analyses comparatives des variables quantitatives ont été réalisées par le test T de Student (entre 2 groupes) et le test d'ANOVA (plus de 2 groupes). La concordance entre la B12 totale et la B12 active et entre la vitamine B12 totale ou active et le dosage de MMA et a été évalué par un coefficient kappa de Cohen. Les principaux croisements réalisés portaient sur les variables sexe, âge, hémoglobine, VGM, statut carenciel selon la technique de vitamine B12 totale, active et d'acide méthylmalonique. La significativité statistique a été déterminée au seuil p inférieur à 5%. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel MedCalc version 13.0.

III. RESULTATS

1. Performances analytiques de la technique B12 active

Nous avons mené une étude de performance de la méthode de dosage Elecsys active B12, selon les recommandations du Comité français d'accréditation, COFRAC (SH GTA 04), pour répondre aux exigences de la norme ISO 15189, qui spécifie les exigences de qualité et de compétence propres aux laboratoires de biologie médicale.

Nous avons réalisé une étude de répétabilité et reproductibilité intra-laboratoire (Fidélité intermédiaire) de la méthode sur notre automate cobas 8000 module e602, ligne « Jaune ».

Pour la répétabilité, nous avons dosé 15 fois à la suite les contrôles internes bas (niveau 1) et haut (niveau 2) fournis par Roche. Pour la reproductibilité, nous avons dosé 2 fois par jour (début et fin de journée sur une période de 15 jours) les contrôles internes bas et haut afin d'obtenir 30 valeurs par contrôle.

Les moyennes des valeurs, les écart-types et le calcul des CV (coefficient de variation) sont reportés dans le Tableau VI.

Tableau VI : Valeurs de répétabilité et reproductibilité de la méthode dosage Elecsys active B12

Contrôles	Répétabilité		Reproductibilité	
	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 1	Niveau 2
Moyenne (pmol/L)	26,35	56,38	26,48	55,53
Ecart-type (pmol/L)	0,95	2,13	0,75	1,88
CV (%)	3,61	3,78	2,83	3,39
CV recommandé fournisseur (%)	< 4	< 4	< 6	< 6

2. Etude principale

Nous avons inclus au total 175 patients. Nous avons étudié les variables âge, sexe, hémoglobine et VGM selon les valeurs de vitamine B12 totale et active.

Trois patients présentaient des anticorps anti-facteur intrinsèque positifs. Leurs dosages de vitamine B12 totale et active étaient concordants et fortement diminués. Les valeurs mesurées de B12 totale et B12 active étaient les suivantes :

- B12 totale : < 37 ; < 37 et 67 pmol/L,
- B12 active : 8,03 ; 17,86 et 13,15 pmol/L respectivement.

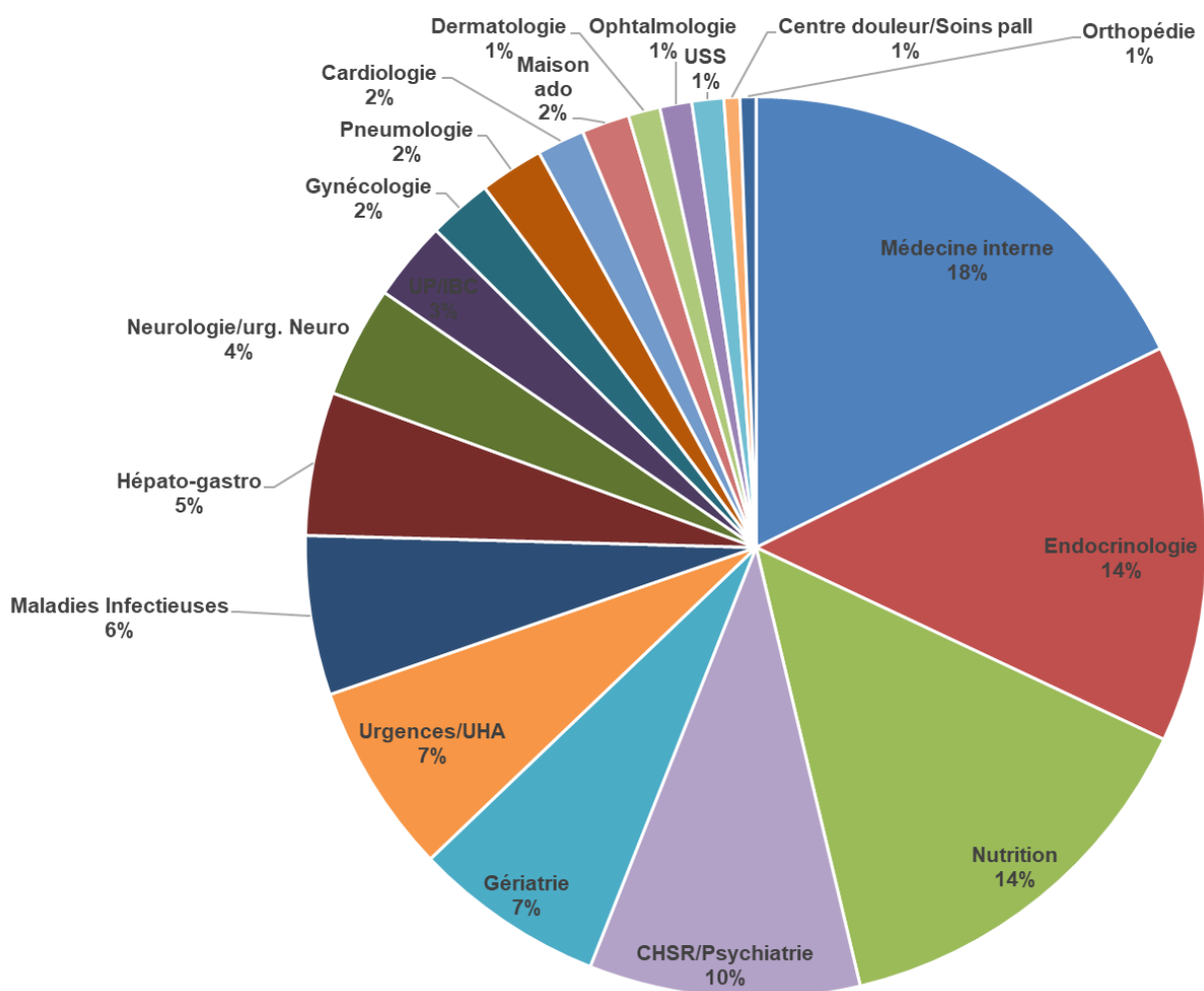
2.1 Prescriptions des dosages de B12

La médecine interne était le plus important service prescripteur suivie par l'endocrinologie et la nutrition. La médecine interne, l'endocrinologie, la nutrition, la psychiatrie, la gériatrie et les urgences représentaient 70% des demandes (Figure 11).

Parmi les services prescripteurs, nous pouvons relever un certain nombre de contextes cliniques particuliers, liés à leur activité.

- Médecine interne : exploration des anémies complexes normo/macrocytaires, bilan de néoplasies, découverte et bilan des pathologies auto-immunes (Biermer)
- Endocrinologie : bilan et suivi des chirurgies bariatriques, patients traités par Metformine, diagnostic et suivi de maladies auto-immunes
- Nutrition : bilan et suivi des chirurgies bariatriques, dénutrition (TCA, pathologies organiques), suivi des patients végétariens
- Psychiatrie : bilan des troubles neuropsychiatriques atypiques
- Gériatrie : population à risque (patients âgés), exploration des anémies normo/macrocytaires, bilan de néoplasies, dénutrition
- Urgences : service de premier recours à l'hôpital

Figure 11 : Répartition des services prescripteurs



2.2 Répartition des valeurs de B12 selon le sexe

La population se composait de 113 femmes et 62 hommes (respectivement 64,6% et 35,4%). Il n'existe pas de différence significative selon le sexe et les catégories de vitamine B12 totale ($p=0,880$; test de Chi2) et selon le sexe et les catégories de vitamine B12 active ($p=0,233$; test de Chi2).

Tableau VIIa : Valeur de vitamine B12 totale selon le sexe

Vit B12 totale (pmol/L)	< 50	50 à 99	100 à 149	150 à 199	200 à 249	250 à 300	p
n =175	5	12	37	77	33	11	
Homme	40% (2)	50% (6)	37,8% (14)	33,8% (26)	30,3% (10)	36,4% (4)	0,880
Femme	60% (3)	50% (6)	62,2% (23)	66,2% (51)	69,7% (23)	63,6% (7)	

Tableau VIIb : Valeur de vitamine B12 active selon le sexe

Vit B12 active (pmol/L)	< 30	30 à 37,5	37,5 à 45	> 45	p
n =171	19	11	21	124	
Homme	36,8% (7)	54,5% (6)	19,0% (4)	36,3% (45)	0,233
Femme	63,2% (12)	45,5% (5)	81% (17)	63,7% (79)	

2.3 Répartition des valeurs de B12 selon l'âge

L'âge moyen total de notre population était de 54,8 ans ($\pm 18,0$). L'âge médian était de 55 ans. L'âge minimum était de 16 ans et l'âge maximum de 97 ans.

Tableau VIIIa : Age en fonction du statut en vitamine B12 totale

Vit B12 totale (pmol/L)	< 50	50 à 99	100 à 149	150 à 199	200 à 249	250 à 300	p
n =175	5	12	37	77	33	11	
Age moyen	44,2	70,6	54,2	54,2	55,3	46,5	0,091
Age médian	42	69	56	53	54	49	
Ecart type de l'âge	± 10,0	± 19,8	± 21,4	± 20,9	± 23,3	± 14,8	

Dans le groupe vitamine B12 totale comprise entre 50 et 99 pmol/L, l'âge moyen est plus élevé que dans les autres groupes. Cependant, ce résultat n'est pas significativement différent dans notre étude en comparaison des moyennes d'âge des autres groupes ($p = 0,091$; test d'ANOVA).

Tableau VIIIb : Age en fonction du statut en vitamine B12 active

Vit B12 active (pmol/L)	< 30	30 à 37,5	37,5 à 45	> 45	p
n =175	19	11	21	124	
Age moyen	59,6	54,0	52,8	54,4	0,757
Age médian	56	62	50	54,5	
Ecart type de l'âge	± 22,3	± 19,6	± 25,8	± 20,5	

Il n'existe pas de différence significative entre l'âge et la valeur mesurée de vitamine B12 active.

2.4 Répartition des valeurs de B12 en fonction des caractéristiques hématologiques

Le VGM moyen était de 89,1 fL ($\pm 6,2$), pour des valeurs usuelles comprises entre 80 et 100 fL. Le VGM médian était de 89 fL. Le VGM minimum était de 52,4 fL et le VGM maximum était de 118,6 fL.

L'hémoglobine moyenne était de 12 g/dL ($\pm 2,4$) tous sexes confondus ; 12,1 g/dL ($\pm 2,1$) chez les femmes (minimum 3,4 / maximum 15,5) et 11,7 g/dL ($\pm 2,9$) chez les hommes (minimum 3,6 / maximum 16,8).

Tableau IXa : Caractéristiques hématologiques en fonction du statut en vitamine B12 totale (données manquantes pour 4 patients)

Vit B12 totale (pmol/L)	< 50	50 à 99	100 à 149	150 à 199	200 à 249	250 à 300	p
n =171	5	12	37	74	32	11	
VGM moyen (fL)	99,2	93,3	88,3	88,1	88,3	91,8	0,047
VGM médian (fL)	98,2	94,7	89,9	88,6	87,4	89,3	
Ecarts type du VGM	$\pm 12,0$	$\pm 15,2$	$\pm 7,36$	$\pm 8,9$	$\pm 6,9$	$\pm 4,9$	
Hb moyenne (g/dL)	8,8	10,4	11,4	12,5	12,2	13,0	<0,001
Hb médiane (g/dL)	9,7	11,05	11,4	13	12,75	13,1	
Ecarts type de l'Hb	$\pm 3,7$	± 2	$\pm 1,9$	$\pm 2,3$	$\pm 2,6$	$\pm 1,6$	

Le VGM moyen est statistiquement différent selon les classes de vitamines B12 totale (**p=0,047** ; test d'ANOVA). On remarque une macrocytose plus importante lorsque la concentration en vitamine B12 totale est plus basse.

L'hémoglobine moyenne est statistiquement différente selon les classes de vitamine B12 totale (**p<0,001** ; test d'ANOVA). On remarque une hémoglobine plus basse lorsque la concentration en vitamine B12 totale est également plus basse.

Tableau IXb : Caractéristiques hématologiques en fonction du statut en vitamine B12 active
(données manquantes pour 4 patients)

Vit B12 active (pmol/L)	< 30	30 à 37,5	37,5 à 45	>45	p
n =171	19	11	20	121	
VGM moyen (fL)	93,1	90,0	87,2	88,7	0,183
VGM médian (fL)	93,2	90,2	87,7	88,7	
Ecart type du VGM	± 14,2	± 14,1	± 6,7	± 7,5	
Hb moyenne (g/dL)	10,0	11,2	11,5	12,4	<0,001
Hb médiane (g/dL)	10,6	11,4	12,0	12,8	
Ecart type de l'Hb	± 2,7	± 3,0	± 1,6	± 2,2	

Le VGM moyen n'est pas statistiquement différent selon les classes de vitamine B12 active ($p = 0,183$; test d'ANOVA).

L'hémoglobine moyenne est statistiquement différente selon les classes de vitamine B12 active ($p < 0,001$; test d'ANOVA). On remarque une hémoglobine plus basse lorsque la concentration en vitamine B12 active est également plus basse.

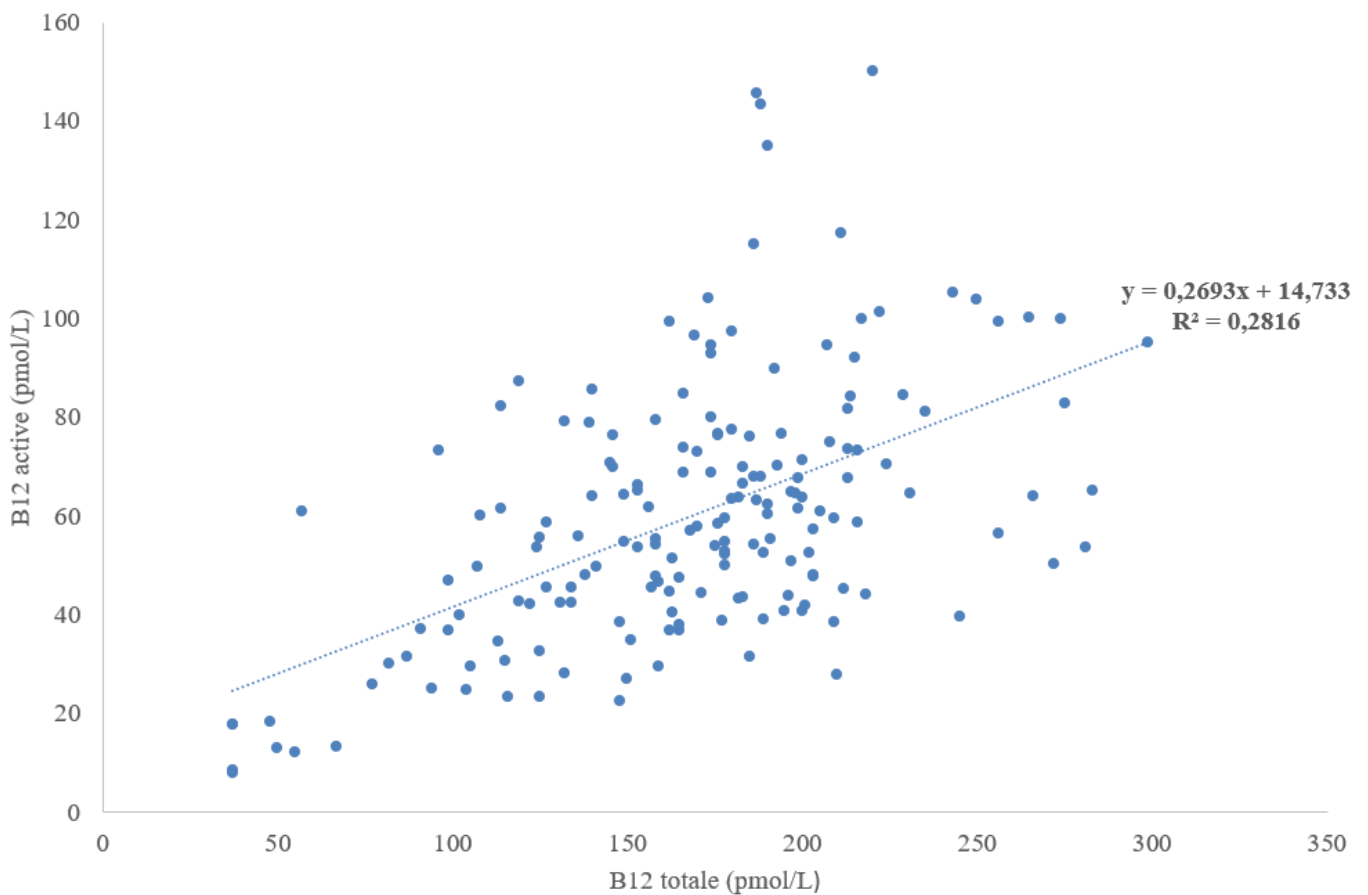
2.5 Etude de corrélation entre la B12 totale et la B12 active

Les dosages réalisés pour la population de l'étude principale, nous ont permis d'étudier la corrélation des 2 marqueurs biologiques B12 totale et B12 active dans les zones basses et moyennes des valeurs (zone d'incertitude pour le diagnostic des carences).

Dans notre étude, nous avons trouvé une corrélation positive modérée entre les 2 marqueurs avec un coefficient de corrélation (Pearson) $r = 0,53$ ($p < 0,0001$). Ce coefficient correspond à l'intensité de la relation entre 2 variables, ici la vitamine B12 totale et la vitamine B12 active.

Reprécisons que le dosage de la vitamine B12 totale évalue la partie active de la B12 (B12 active) plus la partie inactive (B12 liée à l'haptocorrine).

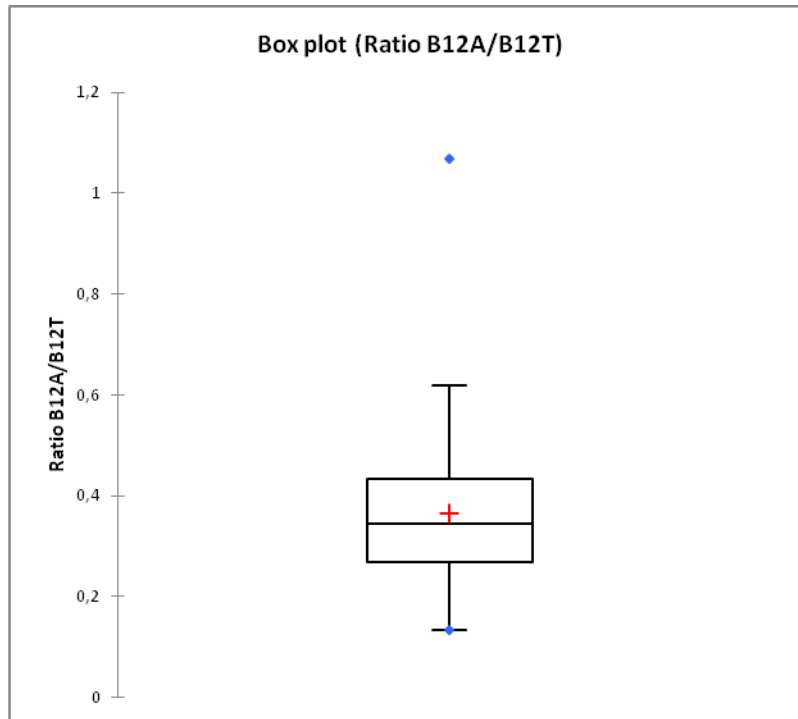
Figure 12 : Corrélation entre la vitamine B12 active Roche et la vitamine B12 totale Roche



2.6 Ratio B12 active/B12 totale

Nous avons calculé le ratio B12 active/B12 totale dans notre étude principale (Figure 13). Ce ratio correspond à la concentration en vitamine B12 biodisponible par rapport à la concentration en vitamine B12 totale présente dans le sang.

Figure 13 : Diagramme en boîte : Ratio B12 active / B12 totale



n = 175	Moyenne	Ecart - type	Min	Q1	Médiane	Q3	Max
Ratio	0,365	0,142	0,133	0,267	0,344	0,433	1,068

Nous avons dénombré les valeurs de ratios extrêmes, c'est à dire les valeurs extérieures à la moyenne des ratios (0,365) plus ou moins l'écart-type (0,142), soit les valeurs en dehors de l'intervalle suivant : 0,223 – 0,507. Cela correspondait au total à 48 valeurs (27% de l'effectif). Selon la distribution des valeurs, nous avons déterminé que cet intervalle permettait de classer au mieux les ratios entre extrêmes et non extrêmes. Un intervalle plus large ne permet pas de réaliser un test statistique par manque d'effectif dans le groupe ratio extrême.

Il n'y avait pas de différence significative entre les groupes ratio extrême et ratio non extrême selon le sexe ($p=0,861$, test de Chi2), l'âge (55,7 vs 54,4 ans ; $p=0,727$, test de Student), l'hémoglobine (12,0 vs 12,0 g/dL ; $p=0,969$, test de Student) et le VGM (89 vs 89,1 fL ; $p=0,919$, test de Student).

Un ratio > 1 apparaît sur le diagramme (Figure 13). Celui-ci paraît aberrant car correspondrait à une concentration en vitamine B12 active supérieure à la concentration en vitamine B12 totale. Nous reviendrons sur ce résultat particulier dans la partie discussion du document.

2.7 Comparaisons

26,3% des patients (46/175) présentaient une vitamine B12 totale basse (< 141 pmol/L) contre 17,1% de patients (30/175) présentant une vitamine B12 active basse ($< 37,5$ pmol/L).

2.7.1 Statut en B12 active par rapport à la B12 totale

Nous avons trié la population par tranches de valeurs de B12 totale et observé la répartition des valeurs de B12 active en fonction de ces tranches (Figures 14a et 14b).

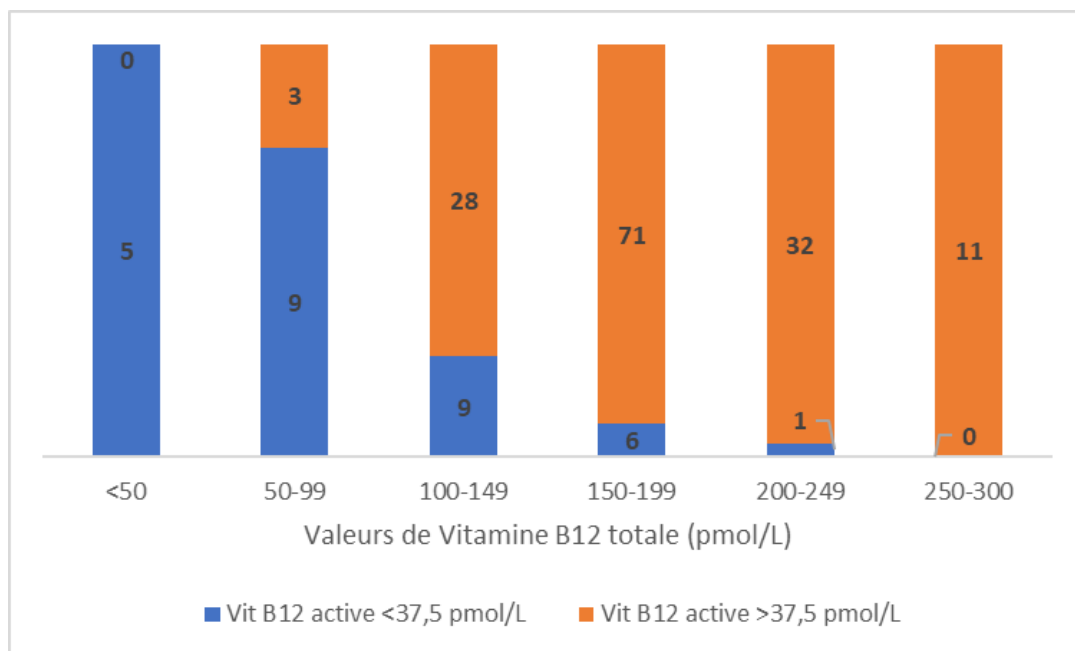
Dans le groupe avec une vitamine B12 totale entre 50 pmol/L et 99 pmol/L, 3 patients avaient une vitamine B12 active normale (soit 25%), considérés non carencés selon cette technique alors que le dosage de vitamine B12 totale indiquait une carence. Ces 3 patients présentaient une anémie, microcytaire pour l'un et normocytaire pour les 2 autres. Pour 2 de ces patients, les dosages de vitamine B12 active et de MMA indiquaient une absence de carence en vitamine B12, alors que pour l'autre patient, la vitamine B12 totale et le MMA indiquaient une carence en vitamine B12.

Dans le groupe avec une vitamine B12 totale entre 150 et 199 pmol/L, 6 patients avaient une vitamine B12 active basse (7,8%) alors que leur vitamine B12 totale était considérée normale et présentaient donc une possible carence.

Dans le groupe avec une vitamine B12 totale entre 200 et 249 pmol/L, 1 patient (3%) était retrouvé potentiellement carencé selon la technique de vitamine B12 active. Il s'agissait d'une patiente ne présentant ni anémie, ni macrocytose, suivie en psychiatrie pour psychose héréditaire. L'indication du dosage de la vitamine B12 n'a pas pu être retrouvée. Sa valeur de MMA était augmentée, en faveur d'une carence en vitamine B12.

Parmi les deux groupes extrêmes concernant la vitamine B12 totale (< 50 pmol/L et entre 250 et 300 pmol/L), nous n'avons pas retrouvé de dosages discordants en comparaison avec la vitamine B12 active.

Figure 14a : Histogramme du statut en vitamine B12 active par rapport à la valeur mesurée de vitamine B12 totale

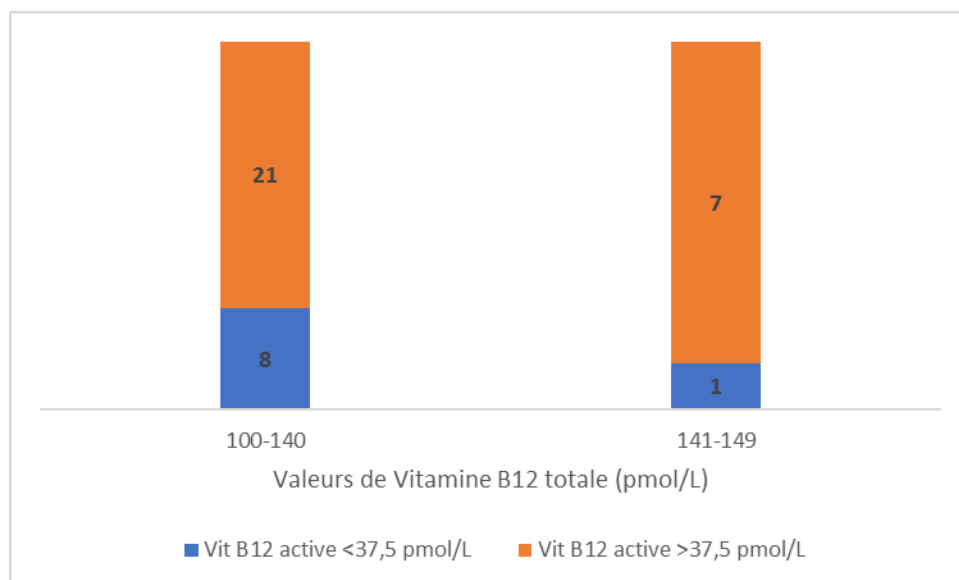


Dans le groupe de valeurs de vitamine B12 totale comprise entre 100 et 149 pmol/L, il a fallu le diviser en deux, en fonction de notre valeur seuil basse de vitamine B12 totale (< 141 pmol/L), pour poursuivre l'analyse de discordance (Figure 14b) :

- entre 100 et 140 pmol/L (carencés selon B12 totale) : 8 patients concordants (28%) avec une vitamine B12 active diminuée contre 21 patients discordants (72%) avec une vitamine B12 active considérée normale.

- entre 141 et 149 pmol/L (non carencés selon B12 totale) : 7 patients concordants (87,5%) avec une vitamine B12 active considérée normale contre 1 patient discordant (12,5%) avec une vitamine B12 active diminuée.

Figure 14b : Histogramme du statut en vitamine B12 active par rapport à la valeur mesurée de vitamine B12 totale sur la zone 100 à 149 pmol/L

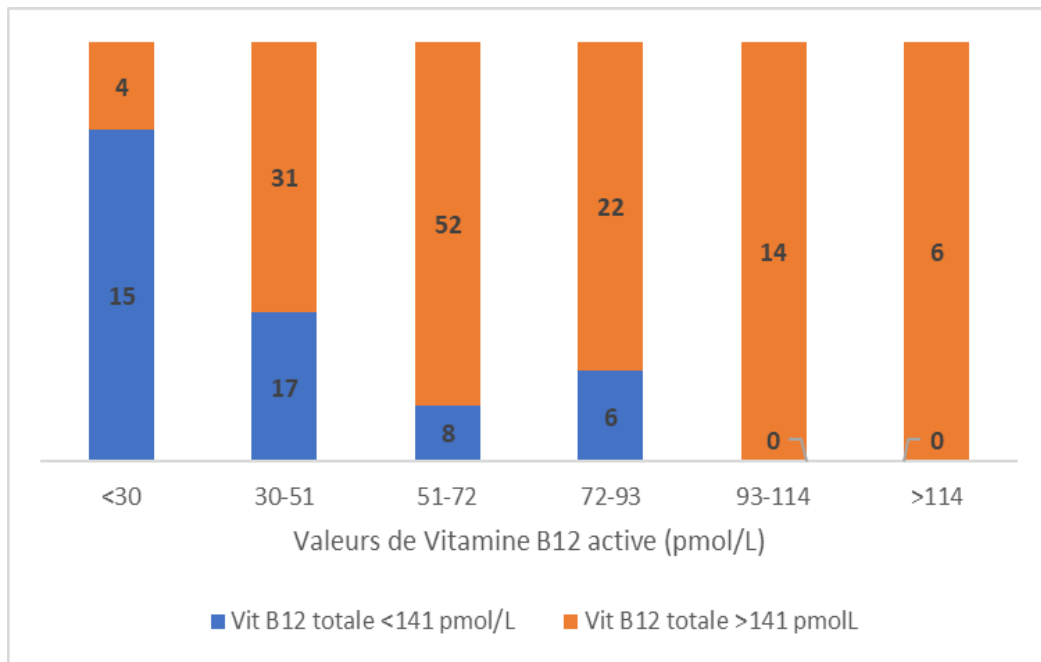


2.7.2 Statut en B12 totale par rapport à la B12 active

Nous avons trié la population par tranches de valeurs de B12 active et observé la répartition des valeurs de B12 totale en fonction de ces tranches (Figures 14c et 14d).

Parmi les deux groupes comprenant des valeurs de vitamine B12 active supérieures à 93 pmol/L, nous n'avons pas retrouvé de dosages discordants en comparaison avec la vitamine B12 totale.

Figure 14c : Histogramme du statut en vitamine B12 totale par rapport à la valeur mesurée de vitamine B12 active

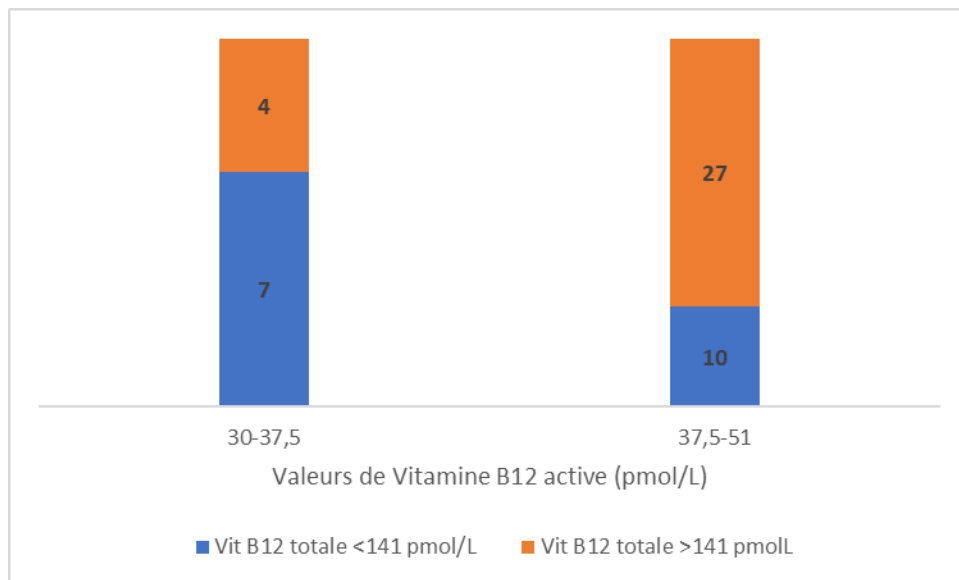


Dans le groupe avec une vitamine B12 active < 30 pmol/L, 4 patients avaient une B12 totale normale (21,1%) et étaient donc discordants.

Dans le groupe avec une vitamine B12 active comprise entre 51 et 72 pmol/L, 8 patients avaient une B12 totale basse (13,3%) et étaient donc discordants.

Dans le groupe avec une vitamine B12 active comprise entre 72 et 93 pmol/L, 6 patients avaient une B12 totale basse (21,4%) et étaient donc discordants. Parmi ces 6 patients, 1 seul présentait un MMA augmenté (0,7 μ mol/L).

Figure 14d : Histogramme du statut en vitamine B12 totale par rapport à la valeur mesurée de vitamine B12 active sur la zone 30 à 50 pmol/L



Dans le groupe de valeurs de vitamine B12 active comprise entre 30 et 51 pmol/L, il a fallu le séparer en deux, en fonction de notre valeur seuil basse de vitamine B12 active (< 37,5 pmol/L), pour poursuivre l'analyse de discordance (Figure 14d) :

- entre 30 et 37,5 pmol/L (carencés selon B12 active) : 4 patients discordants (36,4%) avec une vitamine B12 totale considérée normale contre 7 patients concordants (63,6%) avec une vitamine B12 totale diminuée.

- entre 37,5 et 50 pmol/L (non carencés selon B12 active) : 27 patients concordants (73,0%) avec une vitamine B12 totale considérée normale contre 10 patients discordants (27%) avec une vitamine B12 totale diminuée.

2.8 Discordances entre B12 totale et B12 active

Sur les 175 patients inclus, 129 (73,7%) avaient une vitamine B12 totale normale et 46 (26,3%) avaient une vitamine B12 totale basse (< 141 pmol/L), pouvant être considérés comme carencés (Figure 15).

Concernant les 46 patients avec une vitamine B12 totale basse, 22 patients concordants présentaient une vitamine B12 active basse (48%) et 24 patients discordants présentaient une vitamine B12 active normale (52%).

Concernant les 129 patients avec une vitamine B12 totale normale, 8 patients discordants avaient une vitamine B12 active basse (< 37,5 pmol/L) soit 6,2%.

La vitamine B12 active basse est significativement plus présente chez les patients présentant une vitamine B12 totale basse ($p= 0,008$, test de Chi2 apparié Mc Nemar).

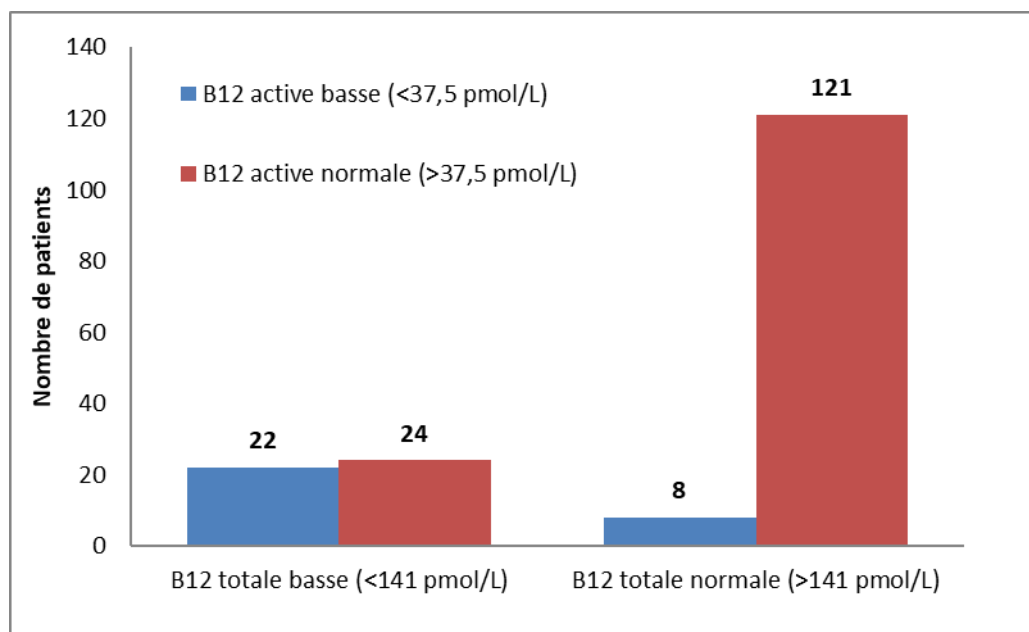
Nous avons ainsi mis en évidence 32 dosages discordants entre la vitamine B12 totale et la vitamine B12 active :

- 24 patients : B12 totale basse (< 141 pmol/L) et B12 active normale (> 37,5 pmol/L) (13.7%)

- 8 patients : B12 totale normale (> 141 pmol/L) et B12 active basse (< 37,5 pmol/L) (4.6%)

Ceci correspond à **18.3 %** de valeurs discordantes pour une population présentant des valeurs de vitamine B12 totale comprises entre < 50 pmol/L et 300 pmol/L.

Figure 15 : Histogramme de comparaison de discordance entre vitamine B12 totale et active



Le test de concordance kappa de Cohen retrouve une valeur de 0,47. Par définition, il s'agit d'un accord modéré. Le pourcentage de concordance est de 81,7%.

2.9 Dosages de l'acide méthylmalonique sanguin

Nous avons voulu pousser plus loin l'analyse des échantillons présentant des discordances entre B12 totale et B12 active en envoyant ces échantillons au laboratoire des pathologies métaboliques, érythrocytaires et dépistage périnatal du CHU de Lyon, pour la réalisation d'un dosage de MMA sanguin, dans le but de conclure à la supériorité de l'une ou l'autre des méthodes de dosage, B12 totale et B12 active, par rapport au paramètre biologique considéré comme la référence en recherche clinique.

Sur 32 échantillons discordants, nous en avons fait analyser 31 (un échantillon était en quantité insuffisante pour dosage). Les valeurs usuelles de MMA sanguin du laboratoire sont $< 0,5 \mu\text{mol/L}$ quel que soit l'âge ou le sexe. Pour rappel, une élévation du MMA est un marqueur de déficit intracellulaire en B12 et donc un marqueur indirect de carence.

Tableau X : Résultats des trois dosages (B12 totale, B12 active et MMA) chez 32 patients discordants entre les méthodes de dosage B12 totale et B12 active

Patients	B12 totale (pmol/L)	B12 active (pmol/L)	MMA (µmol/L)	VGM	Anémie
	Valeurs usuelles : 141-489	Valeurs usuelles : 37,5-188	Valeurs usuelles : < 0,5	> 100 fL	
1	57	60,86	0,4	N	O
2	96	73,41	0,7	N	O
3	99	46,86	0,4	N	O
4	102	40,03	1,7	N	O
5	107	49,82	< 0,3	N	O
6	108	60,14	< 0,3	N	N
7	114	82,34	0,4	N	O
8	114	61,64	0,3	N	O
9	119	87,19	< 0,3	N	O
10	119	42,71	< 0,3	N	O
11	122	42,05	0,3	N	O
12	124	53,78	< 0,3	N	N
13	125	55,67	< 0,3	N	O
14	127	58,71	< 0,3	N	O
15	127	45,48	0,5	N	O
16	131	42,50	< 0,3	N	O
17	132	79,17	< 0,3	N	O
18	134	45,49	0,4	O	N
19	134	42,55	< 0,3	N	O
20	136	55,94	0,4	N	O
21	138	48,02	0,6	N	N
22	139	78,81	< 0,3	N	N
23	140	85,64	0,3	N	O
24	140	63,93	< 0,3	N	O
25	148	22,49	0,8	N	O
26	150	27,09	< 0,3	N	N
27	151	34,98	< 0,3	N	O
28	159	29,46	0,4	O	O
29	162	36,92	NC	N	N
30	165	36,84	0,4	N	N
31	185	31,58	< 0,3	N	N
32	210	28	0,5	N	N

En rouge, les valeurs considérées pathologiques selon la méthode de dosage utilisée.

O = oui ; N = non

À la suite de cette analyse, nous obtenons 22 résultats concordants entre B12 active et MMA (soit 71%) contre 9 résultats concordants entre B12 totale et MMA (29%), sur nos 31 échantillons discordants (Tableau X).

Concernant les 9 patients discordants ne présentant ni anémie, ni macrocytose, nous avons cherché l'indication du dosage de la vitamine B12. Trois patientes avaient une indication pour bilan pré ou post chirurgie bariatrique, 3 patientes pour le suivi dans un contexte de TCA (deux anorexies restrictives, une obésité de grade I), 2 patientes étaient hospitalisées au CHSR (une suivie pour psychose héréditaire avec contexte de dénutrition et concernant l'autre patiente, nous n'avions pas d'informations cliniques), et une patiente consultait en hépato-gastro-entérologie dans un contexte de recherche de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI).

Nous avons ensuite étudié le lien entre B12 totale et MMA et B12 active et MMA (Tableaux XIa et XIb).

Les effectifs concordants sont en noir et les discordants en rouge.

Tableau XIa : Statut en B12 totale et en MMA selon les valeurs seuils

	MMA \geq 0,5 ($\mu\text{mol/L}$)	MMA $<$ 0,5 ($\mu\text{mol/L}$)	P
Vitamine B12 totale $<$ 141 (pmol/L)	4	20	$<$ 0,001
Vitamine B12 totale $>$ 141 (pmol/L)	2	5	

Le dosage de la vitamine B12 totale et le dosage de MMA sont indépendants entre eux ($p < 0,001$: Chi2 apparié, test de Mc Nemar).

Le kappa de Cohen est de -0,06. Le pourcentage de concordance est de 29,0%. Il n'existe pas d'accord.

Tableau XIb : Statut en B12 active et en MMA selon les valeurs seuils

	MMA \geq 0,5 ($\mu\text{mol/L}$)	MMA $<$ 0,5 ($\mu\text{mol/L}$)	p
Vitamine B12 active $<$ 37,5 (pmol/L)	2	5	1
Vitamine B12 active $>$ 37,5 (pmol/L)	4	20	

Le dosage de la vitamine B12 active et le dosage de MMA ne sont pas indépendants entre eux ($p=1$: Chi2 apparié, test de Mc Nemar).

Le kappa de Cohen est de 0,125. Le pourcentage de concordance est de 70,9%. Il existe un accord faible.

Sur les 31 échantillons, seulement 6 (2 hommes/4 femmes) avaient des résultats de MMA augmentés. Quatre avaient une valeur de B12 totale basse et les 2 autres avaient une valeur de B12 active basse. Ces patients étaient âgés de 23 à 91 ans et provenaient tous de services différents.

Tableau XII: Estimation du DFG selon CKD-EPI chez les patients avec un MMA augmenté

Patients	Créatinine sanguine ($\mu\text{mol/L}$)	DFG selon CKD-EPI (mL/min/1,73 m ²)
2	72	77
4	76	121
15	62	82
21	50	126
25	62	102
32	69	87

Sur les 6 patients présentant un MMA augmenté, en faveur d'une carence en vitamine B12, 3 présentaient un débit de filtration glomérulaire (DFG) normal (≥ 90 mL/min/1,73 m²) et 3 présentaient un DFG légèrement diminué (60 – 89 mL/min/1,73 m²) selon l'équation CKD-EPI (Chronic Kidney Disease EPIdemiology collaboration, Levey, 2009).

3. Etudes complémentaires

3.1 Etude complémentaire 1 – Femmes enceintes

Concernant les 11 patientes étudiées, l'âge moyen des patientes était de 28,8 ans ($\pm 4,8$). L'âge médian était de 28 ans. L'âge minimum était de 19 ans et l'âge maximum de 35 ans.

Les patientes étaient en moyenne à 34,8 semaines d'aménorrhée (SA) (les valeurs allant de 28 SA à 41 SA). Le ratio moyen de B12 active/B12 totale était de 0,46, ce qui suggère une élévation de la concentration en HoloTC par rapport à l'HoloHC (diminution de synthèse de l'HC pendant la grossesse).

Sur les 11 patientes, nous avons trouvé une seule patiente avec des valeurs discordantes (soit 9%) :

- Valeur de vitamine B12 totale : 117,6 pmol/L, valeur indiquant une carence en vitamine B12
- Valeur de vitamine B12 active : 86,04 pmol/L, soit une valeur normale

Cette patiente présentait également une concentration sanguine abaissée en folates (valeur : 6,51 nmol/L). Il s'agissait d'une patiente enceinte de 39 SA. Nous ne disposons pas de numération et formule sanguine. La patiente a accouché, sans complications, à 39 SA + 4 jours, d'un enfant eutrophe.

Pour 10 patientes, les valeurs de vitamine B12 totale mesurées étaient en accord avec les valeurs de vitamine B12 active mesurées. Nous avons 8 patientes non carencées en vitamine B12 totale et active et 2 patientes carencées en vitamine B12 totale et active. Sur ces patientes, 4 avaient des folates inférieurs à la valeur usuelle.

3.2 Etude complémentaire 2 – B12 totale > 500 pmol/L

L'âge moyen des patients était de 63,7 ans (± 15). L'âge médian était de 64 ans. L'âge minimum était de 37 ans et l'âge maximum de 83 ans. Notre population de 15 patients était composée de 9 femmes et 6 hommes.

Le VGM moyen était de 91,1 fL ($\pm 10,4$). Le VGM médian était de 90,3 fL. L'hémoglobine moyenne était de 10,6 g/dL ($\pm 2,4$) et l'Hb médiane était de 10,3 g/dL.

Le ratio moyen de B12 active/B12 totale était de 0,15 chez les patients présentant une néoplasie active et de 0,16 chez les patients indemnes de néoplasies, suggérant une modification de la concentration des protéines de liaison avec une élévation de l'HoloHC et une diminution relative de l'HoloTC.

Sur ces 15 patients dont 7 atteints d'une néoplasie active au moment du prélèvement, nous n'avons pas trouvé de valeurs discordantes.

IV. DISCUSSION

Le travail mené avait pour but d'évaluer les performances diagnostiques d'un nouveau test permettant le diagnostic biologique de la carence en vitamine B12 : le test Elecsys Active B12, Roche. Il s'agit du premier travail, à notre connaissance, comparant les trousse B12 active et B12 totale de ce fournisseur.

Dans notre étude, nous avons exclu les patients présentant une altération de la fonction rénale et la population pédiatrique (< 16 ans). Nos résultats ne sont donc pas extrapolables à ces populations (66).

Avant d'étudier les performances diagnostiques du test Elecsys Active B12, nous avons voulu vérifier ses performances analytiques. Nous obtenons des CV < 4% pour la répétabilité et < 3,5% pour la reproductibilité. Ces résultats sont en accord avec les recommandations du fournisseur Roche et celles de l'étude, très récemment publiée (Juin 2019) de Heil et al. (67), réalisée dans 3 laboratoires européens, impliquant des biologistes néerlandais, allemands et des collaborateurs de la société Roche. Ils préconisent un CV < 4% concernant la répétabilité et < 6% concernant la reproductibilité. Cette étude a permis de montrer également la faible variation lot à lot et inter-laboratoires (< 4%). La trousse répondant, dans notre laboratoire, aux spécifications en termes de performances analytiques, nous avons pu passer à la phase d'évaluation diagnostique.

Dans notre étude principale, 175 patients ont été sélectionnés et inclus pour leurs valeurs de vitamine B12 totale comprises entre < 50 et 300 pmol/L. Les indications du dosage de la vitamine B12 sont variées. Il n'existe actuellement pas de recommandations officielles concernant ces indications, contrairement à d'autres paramètres comme les vitamines C et D. L'indication a pu être retrouvée facilement pour au moins 50% de notre population, principalement des patients souffrants d'une anémie, macrocytaire ou non, suivis pour une chirurgie bariatrique, atteints d'un trouble du comportement alimentaire (TCA), présentant des troubles neuropsychiatriques ou des patients âgés (> 75 ans) à risques de carence.

Après leur sélection sur le résultat de la B12 totale, nous avons réalisé un dosage de vitamine B12 active chez ces patients. Nous n'observons pas de lien significatif entre l'âge ou le sexe et les classes de concentration de vitamine B12 totale ou active. L'âge est cependant

plus élevé dans le groupe B12 totale comprise entre 50 et 99 pmol/L (moyenne : 70,6 ans), sans significativité statistique. Ce résultat pourrait correspondre à un défaut d'absorption de la vitamine B12 ou à une diminution des apports nutritionnels chez les patients plus âgés avec des carences en cours d'installation.

Concernant les marqueurs hématologiques, hémoglobine et VGM, les résultats sont statistiquement différents selon les classes de vitamine B12 totale. Pour la vitamine B12 active, seule l'hémoglobine est statistiquement différente selon ces classes. L'absence de lien significatif entre les valeurs de VGM et les classes de vitamine B12 active pourrait être en rapport soit avec une moindre pertinence ou bien une plus grande précocité du marqueur vitamine B12 active concernant le dépistage d'une carence en B12. En effet, le VGM est décrit comme un marqueur biologique tardif de carence. Néanmoins, nos résultats ne peuvent valider la deuxième hypothèse qui devrait être testée avec une méthode dédiée.

La littérature décrit des interférences concernant le dosage de la vitamine B12 totale par des techniques d'immunoanalyses basées sur la liaison au facteur intrinsèque. Concernant la trousse Vitamin B12 II Elecsys 2010 Roche, utilisée au CHU, la société Roche affirme « le test Elecsys Vitamin B12 II est conçu pour éviter l'interférence avec les anticorps anti-facteur intrinsèque ». Chez 3 patients présentant des anticorps anti-FI dans leur sérum (résultats du laboratoire d'Immunologie du CHU de Rouen), les dosages de B12 totale étaient très diminués et concordants avec le dosage de B12 active, confirmant ainsi l'affirmation du fournisseur et confortant notre confiance dans cette trousse utilisée depuis quelques années.

L'étude de corrélation des 2 marqueurs B12 totale et B12 active, retrouve un coefficient de corrélation (Pearson) $r = 0,53$. Ce résultat semble cohérent avec ceux décrits dans les études précédentes (Tableau XIII), conduites avec diverses trousse. En effet, les valeurs des coefficients de corrélation variaient de $r = 0,42$ à $0,882$. Il existe une grande variation de ces coefficients selon les études. Celle-ci peut s'expliquer par l'utilisation de techniques de dosages différentes et l'inclusion de populations hétérogènes, par exemple seulement des patients âgés ou présentant une pathologie pouvant modifier le ratio (grossesse). Une très forte corrélation, sur un large éventail de valeurs, impliquerait que la vitamine B12 active et la vitamine B12 totale sont des marqueurs similaires. Cependant, la corrélation modérée observée ne signifie pas nécessairement que la B12 active soit un marqueur plus performant pour détecter une carence en vitamine B12.

Tableau XIII : Coefficient de corrélation B12T versus B12A, tiré de (55)

Reference	HoloTC versus B ₁₂ correlation coefficient (r)
Al Aisari et al. (2010)	0.765
Augoustides-Savvopoulou et al. (2007)	0.882
Bamonti et al. (2010)	0.42
Čabarkapa et al. (2007)	0.53
Chen et al. (2005)	0.45
Clarke et al. (2007)	0.61
Fragasso et al. (2012)	0.64
Goringe et al. (2006)	0.63 ($r^2 = 0.397$)
Herrmann et al. (2003a)	0.75
Herrmann and Obeid (2013)	0.577 (whole), 0.524 (low B ₁₂), 0.403 (high B ₁₂)
Hvas and Nexo (2005)	0.71
Lee et al. (2009)	0.6591
Lloyd-Wright et al. (2003)	0.75
Lobreglio et al. (2008)	0.495
Loikas et al. (2003)	0.80
Loikas (2007)	0.78
Nexo et al. (2002b)	0.45
Palacios et al. (2013)	0.65
Refsum et al. (2006)	0.65 (male), 0.61 (female)
Schrempf et al. (2011)	0.577–0.637
Scott et al. (2007)	0.5
Vanpoucke et al. (2007)	0.53 ($r^2 = 0.28$)

A propos du ratio B12 active/B12 totale chez nos patients, nous obtenons un ratio moyen égal à 0,365 dans la population principale. Celui-ci semble plus élevé en comparaison des rapports calculés dans la littérature (ratio moyen = 0,22 pour von Castel-Roberts et al. (68) ; 0,3 pour Nexo et al. (69)). Les populations étudiées étaient différentes dans ces études. Notre population d'étude principale était sélectionnée pour ses résultats de vitamine B12 totale comprise entre < 50 et 300 pmol/L et non une population générale. Les techniques de dosages utilisées différaient également. Un article très récemment paru, en Juin 2019 (67), comparant la B12 active Roche et la B12 active Abbott, montre un biais moyen de 9 pmol/L atteignant même jusqu'à 22 pmol/L dans les valeurs basses, pouvant expliquer en partie le ratio moyen plus élevé calculé avec la trousse Roche.

Dans l'étude principale, une patiente présentait un ratio B12 active/B12 totale > 1 , soit un dosage de vitamine B12 active supérieur à la valeur de la B12 totale (B12 active : 60,9 pmol/L et B12 totale : 57 pmol/L). Le dosage de MMA avait pour résultat 0,4 $\mu\text{mol/L}$, indiquant une absence de carence. Il s'agissait d'une patiente adolescente, suivie pour anorexie restrictive (peu de consommation de protéines d'origine animale) et présentant une anémie (Hb 11,2 g/dL) normocytaire. Après la transmission de cette valeur de vitamine B12 totale fortement diminuée, la patiente a bénéficié d'une supplémentation avec normalisation progressive du dosage de la vitamine B12 totale en quelques semaines. Cependant la patiente a eu de multiples explorations complémentaires : dosage des anticorps anti-FI et explorations par EOGD et coloscopie afin d'éliminer une maladie de Biermer et une MICI. Les résultats des explorations sont revenus négatifs. Nous suspectons fortement chez cette patiente, un déficit en haptocorrine. Celui-ci n'induit pas de manifestations cliniques de carence en vitamine B12. Seul le dosage de vitamine B12 totale est impacté avec une concentration sérique abaissée. Le déficit en haptocorrine n'est pas distinguable d'une réelle carence en vitamine B12. Sa prévalence en population générale n'est pas connue mais un travail de Carmel (70) a permis de trouver 0,6 % de déficits complets et 15 % de déficits modérés dans une étude systématique et prospective de 527 sérums de patients ayant une vitamine B12 totale diminuée mal expliquée. Deux mutations responsables d'un déficit complet en TCI/haptocorrine ont été identifiées et publiées en 2009 sur le gène *TCNI* (71). La recherche de mutation n'a pas été effectuée chez cette patiente car cette analyse génétique n'est pas couramment réalisée. Dans le cas particulier de cette patiente, un dosage d'HoloTC ou un dosage de vitamine B12 totale associé à un dosage de MMA en seconde ligne aurait sans doute permis d'éviter des investigations complémentaires invasives.

Concernant la comparaison des trousseaux B12 totale et B12 active dans l'étude principale, nous identifions 26,3% de patients avec une vitamine B12 totale basse (< 141 pmol/L) et 17,1% de patients avec une vitamine B12 active basse ($< 37,5$ pmol/L). Dans la littérature (annexe 3), les pourcentages retrouvés sont très variables : de 6,5% à 14,8% de valeurs de B12 totale basses et de 8,1% à 31,4% de valeurs de B12 active basses. Cette différence peut être due à notre population sélectionnée sur des valeurs de B12 totale < 300 pmol/L mais aussi à l'utilisation de techniques de dosage différentes et aux valeurs cut-off utilisées selon les études.

Concernant le pourcentage de résultats discordants, notre étude met en évidence 18,3% de valeurs discordantes : 4,6% B12 totale normale/B12 active basse et 13,7% B12 totale basse/B12 active normale. En supposant que la B12 active est plus performante, car elle est théoriquement un reflet plus fidèle de la B12 biodisponible, cela veut dire que l'on a révélé 4,6% de faux négatifs de B12 totale et 13,7% de faux positifs de B12 totale. Ce résultat est surprenant concernant la B12 active, décrite par certains comme un marqueur plus sensible. D'après nos résultats, on augmenterait plus la spécificité que la sensibilité du dépistage des carences avec ce nouveau dosage. Ceci n'est pas inutile, cela permettrait d'éviter une supplémentation et des explorations non nécessaires. Il reste néanmoins à prouver que la B12 active est réellement plus performante. Une validation de la performance de ce marqueur par un marqueur indirect du métabolisme de la B12, le MMA, montre dans notre étude une concordance de 71% entre B12 active et MMA contre 29% entre B12 totale et MMA. Les variables B12 totale et MMA sont indépendantes alors que les variables B12 active et MMA ne le sont pas (Chi2 apparié). Toutefois, les 29% d'accord B12 totale et MMA (désaccord B12 active et MMA) montrent les limites du paramètre B12 active en termes de sensibilité et de spécificité. Il est possible qu'il existe des perturbateurs ou des mécanismes de variation encore mal connus pour ce marqueur peu prescrit et on ne peut négliger que le MMA, qui est le gold standard en recherche, soit lui-même pris en défaut. Une comparaison avec le dosage de l'homocystéine n'aurait probablement pas permis de faire mieux que le dosage de MMA car il existe de nombreuses interférences concernant ce marqueur. Il s'agit d'un examen non remboursé, dont le traitement préanalytique est délicat et dont les causes d'élévation sont multiples telles l'insuffisance rénale ou les carences en vitamine B6 et B9.

Le test de concordance du kappa de Cohen retrouve une concordance de 0,47, entre B12 totale et B12 active soit un accord modéré. Il n'existe pas de résultats discordants pour des valeurs de vitamine B12 totale < 50 pmol/L et ≥ 250 pmol/L. Il serait utile de réaliser une étude sur un effectif plus important de patients afin de définir plus précisément cette zone ne comportant pas de résultats discordants et l'adopter comme zone grise de B12 totale. Une autre façon de définir la zone grise de B12 totale du laboratoire serait de baser son estimation sur les dosages de MMA.

Nous nous sommes également intéressés à la fonction rénale des 6 patients présentant un MMA élevé afin de ne pas méconnaître une élévation due à un défaut d'élimination rénale.

Sur ces 6 patients, 3 présentaient une fonction rénale normale selon l'équation CKD-EPI et 3 présentaient un DFG légèrement diminué, a priori sans impact sur la clairance du MMA.

Dans notre étude, nous n'avons pas évalué la sensibilité et la spécificité des 2 méthodes de dosage d'une part du fait de l'absence de critères cliniques et biologiques robustes (la plupart des études se contentant toutefois du MMA) et d'autre part en raison des effectifs faibles. La mesure de la concentration en MMA a été choisie en tant que marqueur métabolique indirect, afin de départager les 2 dosages en cas de discordance mais elle n'a pas été dosée sur l'ensemble de nos patients, cela entraînant des coûts et une charge de travail trop importante pour le laboratoire destinataire.

Il n'existe pas de consensus international concernant les stratégies d'exploration et les seuils de décision clinique à appliquer aux dosages de B12 que ce soit pour la B12 totale ou la B12 active. Les valeurs de référence définies sur des populations bien portantes sont souvent jugées insuffisamment efficaces dans la littérature et l'adjonction d'une zone d'incertitude y est souvent proposée (17,37,62). Dans une étude, menée par Carmel (66), les auteurs évoquent une absence de gold standard en pratique pour diagnostiquer une carence certaine en vitamine B12 et insistent également sur les variations de cut-off qui entraînent des modifications importantes dans les conclusions diagnostiques (incertitudes diagnostiques).

Il est important de noter que la majorité des études réalisées à ce jour sur la B12 active ont été effectuées sur des automates AxSYM (Abbott) dans les années 2010, ainsi que l'élaboration des intervalles de référence et la définition des zones d'incertitude. Les trousse plus récentes, comme la trousse ARCHITECT Active B12 (Abbott) ou la trousse Elecsys Active B12 (Roche), aujourd'hui en phase pré-commerciale, n'ont pas encore bénéficié des mêmes évaluations. La seule publication disponible, datée de Juin 2019, concernant ces 2 trousse est une étude comparant les deux trousse de dosages de vitamine B12 active, sur cobas e411 (Roche) et ARCHITECT ci8200 (Abbott). Elle a montré l'existence d'une très bonne corrélation entre ces deux méthodes (67). Cependant, un biais faible d'environ 9 pmol/L a été retrouvé. Dans la zone d'incertitude de la trousse Abbott, 20-35 pmol/L, le biais est plus important et peut même atteindre 22 pmol/L. L'intervalle de référence est donc plus élevé chez Roche (37,5-188 pmol/L) par rapport à Abbott (25,1-165 pmol/L) et la zone d'incertitude reste à déterminer. Dans ces conditions, il n'y a pas de transférabilité entre ces 2 techniques (nécessité d'utiliser toujours la même trousse de dosage pour le suivi des patients).

Concernant la stratégie de dosage et l'approche multiparamétrique, Carmel (66) estime que l'approche la plus fiable pour confirmer le diagnostic de la carence en B12 serait l'association d'au moins 2 marqueurs biologiques (cobalamine, HoloTC, Hcy, MMA) anormaux, et de préférence, un marqueur quantitatif direct (cobalamine ou HoloTC) et un marqueur métabolique indirect (MMA ou Hcy). Dans la littérature, il est parfois proposé d'utiliser un marqueur composite (par exemple : B12 totale + HoloTC \pm MMA si doute ou dosage de l'HoloTC et/ou MMA si zone grise de B12 totale), mais cela générerait en population générale et en pratique un coût important et une multiplicité des dosages biologiques. Dans une étude menée par Fedosov (72), une approche plus mathématique est envisagée, avec la proposition d'un marqueur combiné regroupant les dosages de cobalamine, HoloTC, MMA et Hcy afin de dépister une carence en vitamine B12. Bien que ce marqueur combiné soit informatif, il semble excessif dans une pratique médicale courante. Une estimation du coût de ces 4 analyses, selon la NABM serait de : 10,26 + 149 (non remboursés) + 32,4 + 60 (non remboursés) = 251,66 euros dont 209 euros non remboursés. Il faut également noter qu'il existe un intérêt limité à cette multiplicité de dosage des marqueurs biologiques de carence en vitamine B12. En effet, en cas de forte suspicion de carence en B12 même si le résultat du dosage est en zone grise, le patient sera certainement supplémenté. La supplémentation en B12 comme traitement d'épreuve représente un coût moindre et une absence de risques majeurs encourus par le patient en cas d'absence de carence réelle. La réalisation d'une étude coût-efficacité sur une large population pourrait être réalisée afin d'estimer s'il existe un surcoût important engendré par la réalisation de plusieurs dosages de B12 afin d'éliminer certains patients faux positifs.

Concernant la notion de zone grise décrite dans de nombreuses publications, elle n'est pas utilisée aujourd'hui dans la pratique clinico-biologique, qui repose principalement sur la vitamine B12 totale (le dosage le plus courant et représenté). Les laboratoires commentent les résultats inférieurs à la limite des valeurs usuelles de leur trousse mais pas ceux en zone grise, dans les comptes-rendus d'analyses. Actuellement, les examens de seconde ligne sont proposés et réalisés lorsqu'un clinicien ou un collègue hémato biologiste nous contacte pour exprimer un doute sur un résultat de B12 totale. Il serait souhaitable de faire évoluer notre pratique en faisant apparaître cette zone d'incertitude dans nos comptes-rendus, sous la forme d'un commentaire informatif, en ayant au préalable défini notre propre zone grise. Sur la base de notre étude, nous pouvons estimer cette zone en fonction des valeurs de vitamine B12

totale et active. En dessous d'une vitamine B12 totale < 50 pmol/L, aucun patient n'a été obtenu discordant. Notre étude met en évidence 3 patients entre 50 et 100 pmol/L avec des valeurs discordantes (B12 totale basse et B12 active normale). Un de ces patients avait un MMA à 0,7 $\mu\text{mol/L}$ et était probablement réellement carencé. Les 2 patients autres sont considérés comme faux positifs et ont reçu une supplémentation inutile en vitamine B12 (mais peu coûteuse et non toxique). Entre 200 et 250 pmol/L, un seul patient obtient des valeurs discordantes (B12 totale normale, B12 active basse et MMA limite), considéré comme faux négatif. Au-delà d'une vitamine B12 totale > 250 pmol/L, aucun patient n'a été obtenu discordant. Nous pouvons donc définir une ébauche de zone grise entre 100 et 250 pmol/L. Celle-ci nécessite d'être affinée et confirmée avec un plus grand nombre de valeurs. Elle pourrait alors être notifiée sur les comptes-rendus des patients ayant des valeurs de vitamine B12 totale comprises dans cet intervalle ce qui permettrait de suggérer des explorations complémentaires, de seconde ligne, en cas de clinique évocatrice par exemple. Sur les 5 dernières années, cela représente environ 28% des dosages réalisés au CHU (environ 3500 dosages par an) (annexe 4).

Dans l'idéal, dans le cadre d'un dépistage d'une carence en vitamine B12, un test de première ligne devrait être effectué (B12 totale ou HoloTC), puis en cas de valeurs dans la zone grise, un dosage de seconde ligne pourrait être proposé (MMA ou Hcy) afin d'améliorer la spécificité. En effet, le MMA et l'Hcy sont utiles pour déterminer un déficit biologique en B12 lorsque la probabilité clinique de carence est élevée avec un résultat de test de 1^{ère} ligne en zone grise ou lorsqu'il existe une discordance clinico-biologique.

En parallèle de ce travail, nous avons réalisé 2 études complémentaires concernaient d'une part les femmes enceintes au 3^{ème} trimestre de grossesse et d'autre part les patients avec une hypervitaminémie B12 > 500 pmol/L. Les femmes enceintes appartiennent à une population particulière, plus à risque de carence avec des conséquences pouvant être graves pour la mère et le fœtus. Nous savons que lors de la grossesse, il existe une diminution de synthèse de l'haptocorrine. La littérature tend à montrer un intérêt à l'utilisation en première intention de la vitamine B12 active chez les femmes enceintes et particulièrement à partir du second trimestre de grossesse (11,12).

Nos résultats concernant ces 2 populations complémentaires n'ont pas permis de démontrer une efficacité supérieure de l'une ou l'autre technique de dosage devant la quasi-absence de résultats discordants. Cependant, ces études ont été réalisées sur de très faibles

effectifs et nécessitent d'être réévaluées sur un plus grand nombre de patients avant de pouvoir conclure. Les femmes enceintes appartiennent à une population particulière, plus à risque de carence avec des conséquences pouvant être graves pour la mère et le fœtus.

V. CONCLUSION

L'étude, réalisée entre Novembre 2018 et Mars 2019, est à notre connaissance, la première étude indépendante de la société Roche ayant permis de vérifier les performances diagnostiques de la trousse Elecsys Active B12 Roche en comparaison avec la B12 totale Roche.

La B12 active n'a pas montré de supériorité par rapport à la B12 totale chez les femmes enceintes et chez les patients dont la B12 totale était > 500 pmol/L. Cependant, ces sous-études mériteraient d'être poursuivies pour augmenter l'effectif et pouvoir conclure.

Sur une population de 175 patients adultes ayant une valeur de vitamine B12 totale comprise dans l'intervalle < 50 à 300 pmol/L, la B12 active était modérément corrélée à la B12 totale. Nous avons mis en évidence un pourcentage plus élevé de B12 totale basse dans la population que de B12 active basse. La comparaison des 2 dosages montrait quelques résultats discordants.

Le dosage de MMA réalisé afin de départager les dosages discordants entre B12 totale et B12 active a permis de mettre en évidence un gain de performance modéré en faveur de la B12 active, plus sur le versant de la spécificité que celui de la sensibilité. Le test B12 active présente une spécificité et une sensibilité insuffisantes pour se suffire à lui-même. La littérature propose d'ailleurs de définir une zone d'incertitude pour l'interprétation de ses résultats.

L'utilisation de la B12 active en tant que test de 1^{ère} ligne au laboratoire nécessite de préciser la zone d'incertitude du marqueur et de réaliser une étude médico-économique évaluant les flux d'externalisation, l'efficacité, le service rendu au patient et au prescripteur ainsi que les coûts engendrés de différentes stratégies d'exploration envisageables.

ANNEXE 1

Données issues de la fiche technique fournie par Abbott pour le paramètre suivant : ARCHITECT Active-B12 (Holotranscobalamin) :

Il s'agit d'un dosage immunologique microparticulaire par chimiluminescence (CMIA) pour la détermination quantitative de l'holotranscobalamine dans le sérum humain sur l'ARCHITECT iSystem.

Principe :

L'échantillon et les microparticules paramagnétiques recouvertes d'anticorps anti-transcobalamine sont mis en présence. L'HoloTC présente dans l'échantillon se lie aux microparticules recouvertes d'anticorps anti-HoloTC. Après lavage, le conjugué d'anticorps anti-transcobalamine marqué à l'acridium est ajouté pour créer un mélange réactionnel. Après un autre cycle de lavage, les solutions de préactivation et d'activation sont ajoutées au mélange réactionnel. La réaction chimiluminescente résultante est mesurée en unités relatives de lumière (URL). Il existe une relation directe entre la quantité d'HoloTC présente dans l'échantillon et les URL détectées par le système optique ARCHITECT iSystem.

Interférences :

Il existe des interférences possibles et décrites : triglycérides > 8,5 g/L, protéines totales > 100 g/L, facteur rhumatoïde > 70 UI/mL, présence d'anticorps dirigés contre des anticorps de souris (HAMA Human Anti Mouse Antibody), anticorps hétérophiles pouvant interagir avec les immunoglobulines des réactifs.

Valeurs attendues :

Dans le cadre d'une étude représentative, des échantillons sériques de 181 donneurs apparemment sains ont été analysés à l'aide du dosage ARCHITECT Active-B12 (Holotranscobalamin). Sur les 181 échantillons, 83 ont été prélevés sur des hommes (âge : 18 à 69 ans) et 98 sur des femmes (âge : 18 à 65 ans). La concentration moyenne en HoloTC (dérivée des données log transformées afin de normaliser la population) était de 71,9 pmol/l avec une plage comprise entre 20,6 et 196,7 pmol/l. L'intervalle de confiance à 95 % de la population a défini les limites attendues de 25,1 à 165,0 pmol/l.

ANNEXE 2

Données issues de la fiche technique fournie par Roche pour le paramètre suivant :
Elecsys active B12 :

Il s'agit d'un test immunologique pour la détermination quantitative in vitro de la vitamine B12 active (holotranscobalamine) dans le sérum humain.

Ce test par électrochimiluminescence « ECLIA » s'utilise sur le système d'immunoanalyse cobas.

Principe :

Méthode « sandwich ». Durée totale du cycle analytique : 18 minutes

-1ère incubation : 18 microL d'échantillon, un anticorps monoclonal anti-holotranscobalamine marqué à la biotine et un anticorps monoclonal anti-transcobalamine marqué au ruthénium réagissent pour former un « sandwich ».

-2ème incubation : les microparticules tapissées de streptavidine sont ajoutées dans la cuvette réactionnelle. Le complexe immunitaire est fixé à la phase solide par une liaison streptavidine-biotine.

Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage de ProCell II M. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.

Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Celle-ci est générée, pour l'analyseur utilisé, par une calibration en 2 points et une courbe de référence fournie via cobas link.

Prélèvement et préparation des échantillons :

Sérum recueilli sur tubes de prélèvements standard ou contenant un gel séparateur.

Stabilité : 5 jours entre 15 et 25°C, 14 jours entre 2 et 8°C, 6 mois à -20°C (± 5°C).

Les échantillons peuvent être congelés 5 fois.

Les échantillons qui contiennent un précipité doivent être centrifugés avant l'analyse.

Limites d'utilisation – interférences :

L'influence des substances endogènes et médicamenteuses suivantes sur les performances analytiques du test a été recherchée. Les interférences ont été testées jusqu'aux concentrations indiquées. Aucune influence sur les résultats n'a été observée.

Substances endogènes :

Substance	Concentration testée
Bilirubine	$\leq 1129 \mu\text{mol/L}$ ou $\leq 66 \text{ mg/dL}$
Hémoglobine	$\leq 0.621 \text{ mmol/L}$ ou $\leq 1000 \text{ mg/dL}$
Intralipid	$\leq 2000 \text{ mg/dL}$
Biotine	$\leq 164 \text{ nmol/L}$ ou $\leq 40 \text{ ng/mL}$
Facteur rhumatoïde	$\leq 1200 \text{ UI/mL}$
Sérumalbumine humaine	$\leq 7 \text{ g/dL}$

Substances pharmaceutiques :

L'influence de 16 médicaments fréquemment administrés a été recherchée in vitro. Aucune interférence n'a été observée.

Dans de rares cas, des titres élevés d'anticorps dirigés contre des anticorps spécifiques de l'analyte, des anticorps anti-streptavidine ou anti-ruthénium peuvent conduire à des interférences. Ces effets sont minimisés dans le test par un procédé approprié.

Les mutations ou les polymorphismes génétiques apparentés, périphériques ou même non apparentés au métabolisme de la vitamine B12 peuvent avoir une influence sur les résultats du test. En particulier, des cas rapportés récemment ont montré que des modifications génétiques du gène de la transcobalamine (*TCN2*) peuvent avoir une influence sur les résultats de tests d'HoloTC et donner des taux d'HoloTC faussement bas.

Limites et intervalles:**Domaine de mesure:**

3,0-150 pmol/L (défini par la Limite de Détection et le maximum de la courbe de référence). Les taux situés au-dessous de la Limite de Détection sont exprimés de la manière suivante : < 3,0 pmol/L. Les taux situés au-dessus du domaine de mesure sont exprimés de la manière suivante : > 150 pmol/L.

Valeurs de référence :

Les valeurs indiquées ci-dessous ont été déterminées à l'aide du test Elecsys Active B12 sur des échantillons provenant d'une population apparemment en bonne santé. Le calcul est basé sur 214 échantillons de sérum (99 hommes, 115 femmes). Les sujets étaient âgés de 20 à 79 ans. Les échantillons de femmes enceintes ont été exclus. La population de référence a été sélectionnée avec des taux d'homocystéine normaux.

n	Médiane	Intervalle de concentrations (2,5 ^{ème} – 97,5 ^{ème} percentile)
	pmol/L	pmol/L
214	77,0	37,5-188

ANNEXE 3

Etudes comparatives, modifié à partir de Heil et al. (48)								
Etudes	Obeid and Herrmann	Schremph	Woo	Bamonti	Valente	Heil	Remacha	Sobczynska-Malefora
Année	2007	2010	2010	2010	2011	2012	2014	2014
Effectif	1018	851	184	250	700 * (63-97 ans)	360	179	4175
Automate B12 active	AxSYM; Abbott	AxSYM; Abbott	AxSYM; Abbott	AxSYM; Abbott	AxSYM; Abbott	AxSYM; Abbott	AxSYM; Abbott	AxSYM; Abbott
Cut-off B12 totale (pmol/L)	≤ 156	207	150	139	123	180	≤ 200	NA
Cut-off B12 active (pmol/L)	≤ 35	42	35	40	20	32	33,5	35
Résultats	6,5% B12T basse 31,4% HoLoTC basse	14,8% B12T basse	13% B12T basse/HoloTC normale	13% B12T basse/HoloTC normale/HoloTC basse	8% B12T basse 8,1% HoLoTC basse	18% B12T basse/HoloTC normale 18% B12T normale/HoloTC basse	71% B12T basse/HoloTC basse 29% B12T basse/HoloTC normale	5% HoLoTC < 25 pmol/L 24% HoLoTC entre 25 et 50 pmol/L
Conclusion	HoLoTC > B12T	HoLoTC = B12T	HoLoTC > B12T	Cut-off HoLoTC = 40 pmol/L	HoLoTC > B12T	HoLoTC > B12T	Faible concordance HoLoTC et MMA/Hcy	Zone grise HoLoTC mauvais prédicteur des valeurs de MMA

ANNEXE 4

Le tableau suivant correspond au nombre de demandes de dosage de vitamine B12 sur les cinq dernières années (2014-2018) au CHU de Rouen avec un calcul du nombre de valeurs retrouvées dans des zones grises d'interprétation.

Nombre de demandes de dosage de vitamine B12 sur les 5 dernières années :

	Nb total de demandes de vit B12 totale	Nb de résultats entre 100 et 300 pmol/L	Nb de résultats entre 100 et 250 pmol/L	Nb de résultats entre 100 et 200 pmol/L
Année 2018	12 868	5 274 (41%)	3 485 (27,1%)	1 743 (13,5%)
Année 2017	12 765	5 217 (40,9%)	3 569 (28%)	1 843 (14,4%)
Année 2016	11 850	5 110 (43,1%)	3 441 (29%)	1 801 (15,2%)
Année 2015	10 172	4 427 (43,5%)	2 991 (29,4%)	1 495 (14,7%)
Année 2014	9 582	3 832 (40%)	2 479 (25,9%)	1 208 (12,6%)

Nous estimons donc à environ 42% le nombre de résultats de dosages de vitamine B12 dans l'intervalle 100 à 300 pmol/L par an, tous services confondus, sur ces 5 dernières années. Pour les intervalles entre 100 et 250 pmol/L, nous obtenons environ 28% de dosages et pour l'intervalle allant de 100 à 200 pmol/L, environ 14 %.

BIBLIOGRAPHIE

1. Guéant J, Coelho D, Nicolas J-P. Vitamin B12 and related genetic disorders. *Bull Acad Natl Med.* juin 2014;198(6):1141-56.
2. Rizzo G, Laganà AS, Rapisarda AMC, La Ferrera GMG, Buscema M, Rossetti P, et al. Vitamin B12 among Vegetarians: Status, Assessment and Supplementation. *Nutrients.* 29 nov 2016;8(12).
3. Herrmann W, Schorr H, Obeid R, Geisel J. Vitamin B-12 status, particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations, and hyperhomocysteinemia in vegetarians. *Am J Clin Nutr.* juill 2003;78(1):131-6.
4. Rufenacht P, Mach-Pascual S, Iten A. Vitamin B12 deficiency: a challenging diagnosis and treatment. *Rev Med Suisse.* 15 oct 2008;4(175):2212-4, 2216-7.
5. Andrès E, Loukili NH, Noel E, Kaltenbach G, Abdelgheni MB, Perrin AE, et al. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *Can Med Assoc J.* 3 août 2004;171(3):251-9.
6. Loup-Leuciuc A, Loup P-J, Lombardi T, Samson J. Carence en vitamine B12 (1re partie) : mise au point. *Médecine Buccale Chir Buccale.* 1 août 2011;17(3):211-24.
7. Hematocell : Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers [Internet]. Disponible sur: <http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire>
8. Arendt JFH, Farkas DK, Pedersen L, Nexø E, Sørensen HT. Elevated plasma vitamin B12 levels and cancer prognosis: A population-based cohort study. *Cancer Epidemiol.* févr 2016;40:158-65.
9. Chiche L, Jean R, Romain F, Roux F, Thomas G, Canavese S, et al. Implications cliniques de la découverte d'une hypervitaminémie B12 en médecine interne. *Rev Médecine Interne.* 1 mars 2008;29(3):187-94.
10. Solé-Navais P, Salat-Batlle J, Cavallé-Busquets P, Fernandez-Ballart J, Ueland PM, Ballesteros M, et al. Early pregnancy folate-cobalamin interactions and their effects on

cobalamin status and hematologic variables throughout pregnancy. *Am J Clin Nutr.* 01 2018;107(2):173-82.

11. Greibe E, Andreasen BH, Lildballe DL, Morkbak AL, Hvas A-M, Nexø E. Uptake of cobalamin and markers of cobalamin status: a longitudinal study of healthy pregnant women. *Clin Chem Lab Med.* nov 2011;49(11):1877-82.

12. Morkbak AL, Hvas A-M, Milman N, Nexø E. Holotranscobalamin remains unchanged during pregnancy. Longitudinal changes of cobalamins and their binding proteins during pregnancy and postpartum. *Haematologica.* déc 2007;92(12):1711-2.

13. Murphy MM, Molloy AM, Ueland PM, Fernandez-Ballart JD, Schneede J, Arija V, et al. Longitudinal study of the effect of pregnancy on maternal and fetal cobalamin status in healthy women and their offspring. *J Nutr.* août 2007;137(8):1863-7.

14. Urbanski G, Villoteau A, Valarché G, Derieppe A, Beucher AB, Belizna C, et al. Prévalence de la carence en vitamine B12 dans un service de médecine interne. *Rev Médecine Interne.* 1 déc 2015;36:A74.

15. Bailey RL, Carmel R, Green R, Pfeiffer CM, Cogswell ME, Osterloh JD, et al. Monitoring of vitamin B-12 nutritional status in the United States by using plasma methylmalonic acid and serum vitamin B-12. *Am J Clin Nutr.* août 2011;94(2):552-61.

16. Mézière A, Audureau E, Vairelles S, Krypciak S, Dicko M, Monié M, et al. B12 deficiency increases with age in hospitalized patients: a study on 14,904 samples. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* déc 2014;69(12):1576-85.

17. Devalia V, Hamilton MS, Molloy AM, British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and treatment of cobalamin and folate disorders. *Br J Haematol.* août 2014;166(4):496-513.

18. Kwon Y, Kim HJ, Lo Menzo E, Park S, Szomstein S, Rosenthal RJ. Anemia, iron and vitamin B12 deficiencies after sleeve gastrectomy compared to Roux-en-Y gastric bypass: a meta-analysis. *Surg Obes Relat Dis.* août 2014;10(4):589-97.

19. Aroda VR, Edelstein SL, Goldberg RB, Knowler WC, Marcovina SM, Orchard TJ, et al. Long-term Metformin Use and Vitamin B12 Deficiency in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(4):1754-61.

20. Wilhelm SM, Rjater RG, Kale-Pradhan PB. Perils and pitfalls of long-term effects of proton pump inhibitors. *Expert Rev Clin Pharmacol*. juill 2013;6(4):443-51.
21. Andrès E, Serraj K, Vogel T. Carence en vitamine B12 : comment l'explorer ? *Médecine Thérapeutique*. 1 janv 2014;20(1):23-8.
22. Andrès E, Noel E, Kaltenbach G. Usefulness of oral vitamin B12 therapy in vitamin B12 deficiency related to food-cobalamin malabsorption: Short and long-term outcome. *Eur J Intern Med*. juin 2005;16(3):218.
23. Serraj K, Vogel T, Federici L, Ciobanu E, Mecili M, Kaltenbach G, et al. Syndrome de non-dissociation de la vitamine B12 de ses protéines porteuses ou de maldigestion des cobalamines alimentaires. *Presse Médicale*. 1 janv 2009;38(1):55-62.
24. Ting RZ-W, Szeto CC, Chan MH-M, Ma KK, Chow KM. Risk factors of vitamin B(12) deficiency in patients receiving metformin. *Arch Intern Med*. 9 oct 2006;166(18):1975-9.
25. Bauman WA, Shaw S, Jayatilleke E, Spungen AM, Herbert V. Increased intake of calcium reverses vitamin B12 malabsorption induced by metformin. *Diabetes Care*. sept 2000;23(9):1227-31.
26. Lahner E, Norman GL, Severi C, Encabo S, Shums Z, Vannella L, et al. Reassessment of intrinsic factor and parietal cell autoantibodies in atrophic gastritis with respect to cobalamin deficiency. *Am J Gastroenterol*. août 2009;104(8):2071-9.
27. Carmel R, Melnyk S, James SJ. Cobalamin deficiency with and without neurologic abnormalities: differences in homocysteine and methionine metabolism: Presented in preliminary form at the 44th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Philadelphia, PA, December 7, 2002. *Blood*. 15 avr 2003;101(8):3302-8.
28. Serraj K, Mecili M, Andrès E. Signes et symptômes de la carence en vitamine B12 : revue critique de la littérature. *Médecine Thérapeutique*. 1 janv 2010;16(1):13-20.
29. Wolffenbuttel BHR, Wouters HJCM, Heiner-Fokkema MR, van der Klauw MM. The Many Faces of Cobalamin (Vitamin B12) Deficiency. *Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes*. 27 mai 2019;3(2):200-14.
30. Green R, Allen LH, Bjørke-Monsen A-L, Brito A, Guéant J-L, Miller JW, et al. Vitamin B12 deficiency. *Nat Rev Dis Primer*. 29 juin 2017;3:17040.

31. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification. *Am J Clin Nutr.* janv 2007;85(1):193-200.
32. Braillard O, Casini A, Samii K, Rufenacht P, Junod PN. Vitamin B12 deficiency: what's new? *Rev Med Suisse.* 26 sept 2012;8(355):1805-10.
33. Mazouri S. Déficit en vitamine B12. Département de médecine communautaire, de Premier recours et des urgences – Hôpitaux Universitaires Genève; 2017.
34. Frémont S, Bieber S, Dauendorffer J, Sarem F, Boisson F, Chango A, et al. Évaluation du dosage immunoenzymatique par compétition de la vitamine B12 par la technique Cedia Boehringer sur un Hitachi 911. *Immuno-Anal Biol Spéc.* 1 janv 1998;13(1):43-8.
35. Karmi O, Zayed A, Baragethi S, Qadi M, Ghanem R. Measurement of vitamin B12 concentration: a review on available methods. *Inst Integr Omics Appl Biotechnol J.* 10 janv 2011;Vol. 2(Issue 2):23-32.
36. Schilling KA, Wiesgigl M. The Elecsys® Vitamin B12 assay is not affected by anti-intrinsic factor antibodies. *Clin Chem Lab Med.* 29 juin 2013;51(11):e251-252.
37. Aparicio-Ugarriza R, Palacios G, Alder M, González-Gross M. A review of the cut-off points for the diagnosis of vitamin B12 deficiency in the general population. *Clin Chem Lab Med.* juill 2015;53(8):1149-59.
38. Douillard C, Redonnet-Vernhet I. L'homocystéine plasmatique : quand et pourquoi la mesurer ? *Corresp En Métabolismes Horm Diabète Nutr.* Décembre 2018;(N° 9-10).
39. Sadki TE, Badiou S, Boubal M, Baleine J, Sieso V, Vallat C, et al. Acidémie méthylmalonique résistante à la vitamine B12 : à propos d'un cas. *Ann Biol Clin (Paris).* 1 juill 2016;74(4):472-6.
40. İspir E, Serdar MA, Ozgurtas T, Gulbahar O, Akin KO, Yesildal F, et al. Comparison of four automated serum vitamin B12 assays. *Clin Chem Lab Med.* juill 2015;53(8):1205-13.

41. Clarke R, Refsum H, Birks J, Evans JG, Johnston C, Sherliker P, et al. Screening for vitamin B-12 and folate deficiency in older persons. *Am J Clin Nutr.* mai 2003;77(5):1241-7.
42. Boulat O, Rey F, Mooser V. Biological markers for the status of vitamins B12 and D: the importance of some analytical aspects in relation to clinical interpretation of results. *Rev Med Suisse.* 31 oct 2012;8(360):2052-4, 2056-8.
43. Nexo E, Hoffmann-Lücke E. Holotranscobalamin, a marker of vitamin B-12 status: analytical aspects and clinical utility. *Am J Clin Nutr.* juill 2011;94(1):359S-365S.
44. Velkova A, Diaz JEL, Pangilinan F, Molloy AM, Mills JL, Shane B, et al. The FUT2 secretor variant p.Trp154Ter influences serum vitamin B12 concentration via holo-haptocorrin, but not holo-transcobalamin, and is associated with haptocorrin glycosylation. *Hum Mol Genet.* 15 déc 2017;26(24):4975-88.
45. Greibe E, Mahalle N, Bhide V, Heegaard CW, Naik S, Nexo E. Increase in circulating holotranscobalamin after oral administration of cyanocobalamin or hydroxocobalamin in healthy adults with low and normal cobalamin status. *Eur J Nutr.* déc 2018;57(8):2847-55.
46. Hunt A, Harrington D, Robinson S. Vitamin B12 deficiency. *BMJ.* 4 sept 2014;349:g5226.
47. Valente E, Scott JM, Ueland P-M, Cunningham C, Casey M, Molloy AM. Diagnostic accuracy of holotranscobalamin, methylmalonic acid, serum cobalamin, and other indicators of tissue vitamin B₁₂ status in the elderly. *Clin Chem.* juin 2011;57(6):856-63.
48. Heil SG, de Jonge R, de Rotte MCFJ, van Wijnen M, Heiner-Fokkema RMR, Kobold ACM, et al. Screening for metabolic vitamin B12 deficiency by holotranscobalamin in patients suspected of vitamin B12 deficiency: a multicentre study. *Ann Clin Biochem.* mars 2012;49(Pt 2):184-9.
49. Serraj K, Mecili M, Housni I, Andrès E. Hypervitaminemia B12 (high level of cobalamin): physiopathology, role and interest in clinical practice. *Presse Medicale Paris Fr* 1983. déc 2011;40(12 Pt 1):1120-7.
50. Remacha AF, Sardà MP, Canals C, Queraltó JM, Zapico E, Remacha J, et al. Role of serum holotranscobalamin (holoTC) in the diagnosis of patients with low serum

cobalamin. Comparison with methylmalonic acid and homocysteine. *Ann Hematol.* avr 2014;93(4):565-9.

51. Sobczyńska-Malefora A, Pangilinan F, Plant GT, Velkova A, Harrington DJ, Molloy AM, et al. Association of a transcobalamin II genetic variant with falsely low results for the holotranscobalamin immunoassay. *Eur J Clin Invest.* mai 2016;46(5):434-9.

52. Active B12 assay for diagnosing vitamin B12 deficiency (Advice, NICE) [Internet]. 2015. Disponible sur: <https://www.nice.org.uk/advice/mib40>

53. Al Aisari F, Al-Hashmi H, Mula-Abed W-A. Comparison between Serum Holotranscobalamin and Total Vitamin B12 as Indicators of Vitamin B12 Status. *Oman Med J.* janv 2010;25(1):9-12.

54. Miller JW, Garrod MG, Rockwood AL, Kushnir MM, Allen LH, Haan MN, et al. Measurement of total vitamin B12 and holotranscobalamin, singly and in combination, in screening for metabolic vitamin B12 deficiency. *Clin Chem.* févr 2006;52(2):278-85.

55. Golding PH. Holotranscobalamin (HoloTC, Active-B12) and Herbert's model for the development of vitamin B12 deficiency: a review and alternative hypothesis. *SpringerPlus.* 2016;5(1):668.

56. Oddeze C, Lombard E, Portugal H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. *Clin Biochem.* avr 2012;45(6):464-9.

57. Hvas A-M, Ellegaard J, Nexø E. Diagnosis of vitamin B12 deficiency-time for reflection. *Ugeskr Laeger.* 5 mai 2003;165(19):1971-6.

58. Bosco C, Favrat B, Cheseaux M. Vitamin B12 and iron deficiencies: from diagnostic to follow-up. *Rev Med Suisse.* 20 juin 2012;8(346):1348-51.

59. Risch M, Meier DW, Sakem B, Medina Escobar P, Risch C, Nydegger U, et al. Vitamin B12 and folate levels in healthy Swiss senior citizens: a prospective study evaluating reference intervals and decision limits. *BMC Geriatr.* 11 juill 2015;15:82.

60. Lloyd-Wright Z, Hvas A-M, Møller J, Sanders TAB, Nexø E. Holotranscobalamin as an indicator of dietary vitamin B12 deficiency. *Clin Chem.* déc 2003;49(12):2076-8.

61. Obeid R, Herrmann W. Holotranscobalamin in laboratory diagnosis of cobalamin deficiency compared to total cobalamin and methylmalonic acid. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45(12):1746-50.
62. Herrmann W, Obeid R. Utility and limitations of biochemical markers of vitamin B12 deficiency. *Eur J Clin Invest.* mars 2013;43(3):231-7.
63. Palacios G, Sola R, Barrios L, Pietrzik K, Castillo MJ, González-Gross M. Algorithm for the early diagnosis of vitamin B12 deficiency in elderly people. *Nutr Hosp.* oct 2013;28(5):1447-52.
64. Chen X, Remacha AF, Sardà MP, Carmel R. Influence of cobalamin deficiency compared with that of cobalamin absorption on serum holo-transcobalamin II. *Am J Clin Nutr.* janv 2005;81(1):110-4.
65. Hannibal L, Lysne V, Bjørke-Monsen A-L, Behringer S, Grünert SC, Spiekerkoetter U, et al. Biomarkers and Algorithms for the Diagnosis of Vitamin B12 Deficiency. *Front Mol Biosci.* 2016;3:27.
66. Carmel R. Biomarkers of cobalamin (vitamin B-12) status in the epidemiologic setting: a critical overview of context, applications, and performance characteristics of cobalamin, methylmalonic acid, and holotranscobalamin II. *Am J Clin Nutr.* juill 2011;94(1):348S-358S.
67. Heil SG, Bodenburg P, Findeisen P, Luebcke S, Sun Y, de Rijke YB. Multicentre evaluation of the Roche Elecsys® Active B12 (holotranscobalamin) electrochemiluminescence immunoassay. *Ann Clin Biochem.* 16 juill 2019;4563219863818.
68. Von Castel-Roberts KM, Morkbak AL, Nexo E, Edgemon CA, Maneval DR, Shuster JJ, et al. Holo-transcobalamin is an indicator of vitamin B-12 absorption in healthy adults with adequate vitamin B-12 status. *Am J Clin Nutr.* 1 avr 2007;85(4):1057-61.
69. Nexo E, Christensen A-L, Hvas A-M, Petersen TE, Fedosov SN. Quantification of Holo-Transcobalamin, a Marker of Vitamin B12 Deficiency. *Clin Chem.* 1 mars 2002;48(3):561-2.
70. Carmel R. Mild transcobalamin I (haptocorrin) deficiency and low serum cobalamin concentrations. *Clin Chem.* août 2003;49(8):1367-74.

71. Carmel R, Parker J, Kelman Z. Genomic mutations associated with mild and severe deficiencies of transcobalamin I (haptocorrin) that cause mildly and severely low serum cobalamin levels. *Br J Haematol.* nov 2009;147(3):386-91.

72. Fedosov SN, Brito A, Miller JW, Green R, Allen LH. Combined indicator of vitamin B12 status: modification for missing biomarkers and folate status and recommendations for revised cut-points. *Clin Chem Lab Med.* juill 2015;53(8):1215-25.

Résumé

La prévalence des carences en vitamine B12 est importante dans certaines populations, notamment les personnes âgées, les végétariens, ou les patients souffrant d'une atteinte digestive. Les conséquences sont principalement hématologiques et neurologiques, ces dernières pouvant être irréversibles. Il existe différents biomarqueurs permettant de documenter une carence en vitamine B12 : d'une part les marqueurs directs, de première intention, tels que la B12 totale (B12T), ou récemment l'holotranscobalamine (HoloTC), forme biologiquement active de la B12, et d'autre part les marqueurs indirects, de seconde ligne, tels que l'acide méthylmalonique (MMA) ou l'homocystéine (Hcy).

La B12 totale est d'interprétation délicate : les valeurs usuelles présentent un consensus approximatif et manquent d'identifier certains diagnostics prouvés cliniquement ou par l'élévation des marqueurs indirects MMA ou Hcy. Ce constat a fait émerger la notion de zone d'incertitude pour ce dosage, notion omniprésente dans la littérature, avec des intervalles variables, mais peu traduite dans les laboratoires de biologie médicale. Le dosage de l'HoloTC, aussi appelée B12 active, désormais proposé en méthode d'immunodosage automatisé, posséderait une meilleure sensibilité diagnostique que la B12 totale selon certaines études.

L'objectif de notre étude prospective réalisée de Novembre 2018 à Mars 2019, a été d'évaluer, au CHU de Rouen, et pour la première fois, les performances diagnostiques de la trousse Elecsys Active B12 Roche, en les comparant à celles de la vitamine B12 totale (Vitamin B12 II, Elecsys), et au dosage d'un marqueur indirect, le MMA. Dans notre population présentant une vitamine B12T comprise entre <50 et 300 pmol/L, soit 175 patients (64,6% femmes/35,4% hommes), les deux méthodes B12T et HoloTC se sont révélées corrélées positivement ($r=0,53$). Une valeur basse d'HoloTC était significativement plus présente chez les patients présentant une vitamine B12T basse ($p=0,008$). Il existait un lien significatif entre un VGM élevé ($p=0,047$), une hémoglobine diminuée ($p<0,001$) et une vitamine B12T basse. Il existait un lien significatif entre une hémoglobine basse et une HoloTC basse ($p<0,001$) mais pas de lien avec le VGM ($p=0,183$). Nous avons observé 18,3% de discordance entre les deux méthodes (32/175) ; 13,7% des patients (24/32) avaient une B12T basse et une HoloTC normale et 4,6% (8/32) avaient une B12T normale et une HoloTC basse. Trente et un dosages de MMA ont été effectués : 71% (22/31) étaient concordants entre MMA et HoloTC, contre 29% (9/31) concordants entre MMA et B12T. Seulement 6 patients sur 31 avaient un MMA augmenté, en faveur d'une carence : 4 présentaient une B12T basse et 2 présentaient une HoloTC basse.

Au total, les performances diagnostiques de la trousse Elecsys Active B12 Roche semblent légèrement supérieures à celles de la B12T mais le test présente une spécificité et une sensibilité insuffisantes pour se suffire à lui-même. La littérature propose d'ailleurs de définir une zone d'incertitude pour l'interprétation de ses résultats. Son utilisation en tant que test de première ligne au laboratoire nécessite de préciser la zone d'incertitude pour ce marqueur et de réaliser une étude médico-économique comparative.

Mots-clés : vitamine B12 - cobalamine - carence vitaminique – holotranscobalamine - vitamine B12 active