

Mémoire de Maîtrise en médecine

Déficit subclinique en vitamine B12 chez les nouveau-nés

Etudiant : Morgane Wild

Tuteur : Prof. Luisa Bonafé, Centre des Maladies Moléculaires, CHUV

Expert : PD Dr Olivier Braissant, Département de Biomédecine, CHUV

Lausanne, 15 décembre 2014

Abstract



Subclinical vitamin B12 deficiency in newborns

Background: In the past years, we diagnosed subclinical vitamin B12 deficiency in infants with hypotonia, motor delay and/or infant malaise. These infants had elevated methylmalonic acid (MMA) in plasma and urine and plasma B12 in the low normal range for adults. They all responded very well to cobalamin supplements, with resolution of symptoms and catching up motor milestones within a few weeks.

Hypothesis: subclinical vitamin B12 deficiency may be an unrecognized cause of delayed motor development in early infancy and may originate already in pregnancy.

Aim of this pilot study: knowing the incidence of subclinical B12 deficiency in newborns.

Methods: we measured MMA in one drop of blood collected on filter paper in the 4th day of life of 100 healthy newborns at term. For 26/100 infants, we also measured MMA in urine.

Results: 7 newborns had elevated MMA in blood spot; in all of them, as well as in their mothers, vitamin B12 deficiency was confirmed by further investigation. All infants were supplemented with vitamin B12 and normalized their MMA level within 4 to 8 weeks.

Conclusions:

- 1) Subclinical vitamin B12 deficiency is relatively frequent (7%) in healthy newborns and starts already in pregnancy;
- 2) B12 deficiency should be considered in differential diagnosis of motor delay and infant malaise, even in the absence of anemia;
- 3) Screening for B12 deficiency is possible at the pediatrician praxis by MMA measurement in dried blood spot, which seems to be more sensitive than urine analysis.

Outlook: in order to demonstrate the impact of B12 deficiency on development of symptoms, we plan a larger prospective, randomized, placebo-controlled interventional study using dried blood spot MMA as a marker of B12 deficiency and with a clinical follow-up to 24 months of life.

Tables des matières

1 Introduction	1
1.1 Sujet de l'étude.....	1
1.2 Etat des connaissances actuelles	1
1.3 Objectifs spécifiques	4
2 Méthodologie	5
2.1 Méthodologie de la partie rétrospective	5
2.2 Méthodologie de la partie prospective.....	5
3 Etude rétrospective.....	9
3.1 Présentations des cas	9
3.1.1 Le cas du patient 1 (P1).....	9
3.1.2 Le cas du patient 2 (P2).....	10
3.1.3 Le cas du patient 3 (P3).....	11
3.1.4 Le cas du patient 4 (P4).....	11
3.1.5 Le cas du patient 5 (P5).....	12
3.1.6 Le cas du patient 6 (P6).....	12
3.1.7 Le cas du patient 7 (P7).....	12
3.1.8 Le cas du patient 8 (P8).....	12
3.2 Tableau résumé des résultats de la partie rétrospective.....	13
4 Etude prospective	14
4.1 Présentation des résultats.....	14

4.2 Présentation des sujets avec MMA élevés.....	16
4.2.1 Le cas du sujet 1 (S1).....	16
4.2.2 Le cas du sujet 2 (S2).....	17
4.2.3 Le cas du sujet 3 (S3).....	17
4.2.4 Le cas du sujet 4 (S4).....	18
4.2.5 Le cas des sujets 5 (S5), 6 (S6), 7 (S7).....	19
4.3 Tableau récapitulatif des résultats de l'étude prospective.....	20
4.3 Traitement en vitamine B12 chez les sujets de l'étude prospective.....	21
5 Discussion	22
6 Conclusion.....	26
7 Remerciements	27
8 Sources bibliographiques	28
9 Annexes.....	29

1 Introduction

1.1 Sujet de l'étude

Ce travail de master porte sur les déficits subcliniques en vitamine B12 chez les nouveau-nés. Suite à nos observations sur des patients suivis en pédiatrie au CHUV, nous avons constaté plusieurs cas de retard de développement moteur avec hypotonie du nourrisson, sans signe neurologique spécifique, ni anémie macrocytaire, mais présentant un déficit dans leur statut en vitamine B12. Le retard de développement moteur étant un symptôme très aspécifique, néanmoins relativement fréquent en pédiatrie, nous nous sommes intéressés à étudier l'éventuelle importance du déficit en vitamine B12 comme une étiologie possible à ce problème.

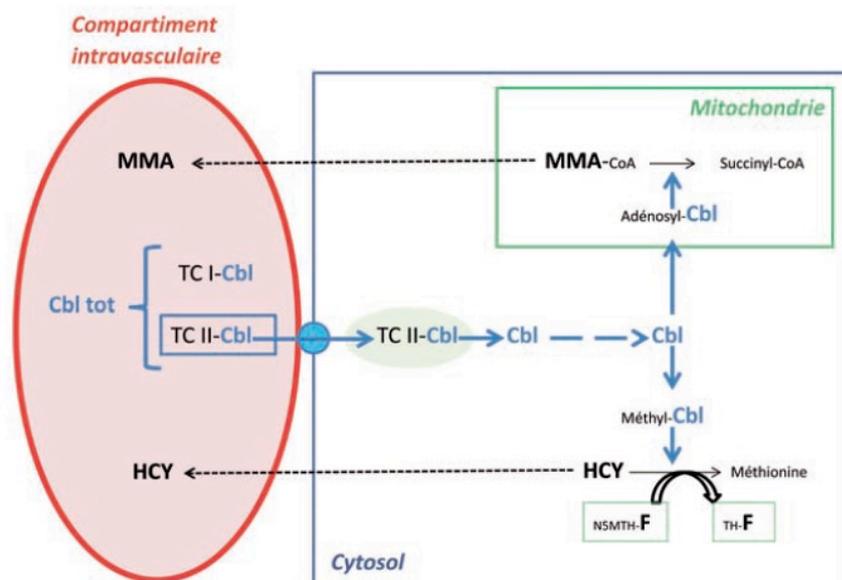
Chez les patients observés au service de pédiatrie du CHUV, cette carence en vitamine B12 était présente, dans un certain nombre de cas, malgré un apport nutritif en vitamine B12 théoriquement normal. Ceci nous amène à penser que le déficit en vitamine B12 chez ces nourrissons prendrait son origine dans la grossesse. En effet, un stock diminué de vitamine B12 maternel durant la grossesse pourrait alors provoquer des carences chez le nourrisson avec des conséquences sur le développement de l'enfant.

Dès lors, il nous a semblé pertinent d'étudier une population de 100 nouveau-nés sains à quatre jours de vie, afin de déterminer quelle est la proportion touchée par un déficit subclinique en vitamine B12. Le diagnostic précoce de ce déficit dans les premiers jours de vie pourrait avoir un impact sur la prévention non seulement des symptômes de déficience grave (avec séquelles neurologiques), mais aussi sur des retards moteurs / hypotonie du nourrisson dans les premières années de vie.

1.2 Etat des connaissances actuelles

La vitamine B12 (Cobalamine, Cbl) est synthétisée par des microorganismes. Elle provient de l'alimentation, en particulier des produits d'origine animale. La vitamine B12 sert de co-facteur à deux enzymes : méthionine synthétase et L-méthyl-malonyl-coenzyme A mutase. La méthionine synthétase produit de la méthionine (acide aminé) à partir de l'homocystéine (Hcy). La L-méthyl-malonyl-coenzyme A mutase produit du succinate depuis l'acide méthylmalonique (MMA), provenant du catabolisme des acides aminés : leucine, isoleucine, valine, méthionine, thréonine. Dès lors, une diminution de vitamine B12 résulte en une augmentation de ces deux métabolites, le MMA plasmatique et urinaire ainsi que l'Hcy plasmatique, qui sont donc des marqueurs fonctionnels de déficit en vitamine B12.

Figure 1 Métabolisme de la vitamine B12⁴



Légende : MMA (méthylmalonate) ; HCY (homocystéine) ;

TC I-Cbl (cyanocobalamine inactive) ; TC II-Cbl (cyanocobalamine active)

Une carence en vitamine B12 se manifeste classiquement chez l'adulte, par des changements hématologiques (anémie mégalo-blastique) et des symptômes neurologiques (paresthésie et altération des sens de position et de vibration)⁵. La prévalence d'un déficit en vitamine B12 est estimée entre 3% et 30% chez l'adulte⁶, et est plus élevée chez les personnes âgées et les femmes⁷. Les étiologies les plus communes sont une malabsorption de vitamine B12 (gastrite atrophique, maladie auto-immune, anciennement appelée anémie pernicieuse), ou un apport insuffisant en vitamine B12 (régime végétarien). Un traitement par supplément en vitamine B12 (par injection ou par voie orale ou intranasale) normalise le taux de vitamine B12 ainsi que les symptômes.

La carence en vitamine B12 chez les nouveau-nés est rapportée dans la littérature comme relativement fréquente, bien qu'une incidence spécifique ne soit pas connue⁸⁹. Chez le nouveau-né, les symptômes classiques de cette carence pour

⁴ Schéma extrait : O. Boulat, R. et al., *Marqueurs biologiques des statuts vitaminiques B12 et D: aspects analytiques d'importance clinique*. Revue médicale suisse, 2012. 8 : p. 2052-8

⁵ Stabler, *Vitamin B12 deficiency*. New England Journal, 2013. 368 : p.149-60

⁶ Herrmann and Obeid, *Utility and limitations of biochemical markers of vitamin B12 deficiency*. European Journal of Clinical Investigation, 2013. 43: p.231-237

⁷ Berg, S. et al., *Laboratory evaluation for Vitamin B12 deficiency: the case for Cascade Testing*. Clinical Medicine & Research, 2013. 11(1): p.7-15

⁸ Bjorke mosen et al., *Determinants of Cobalamin Status in Newborns*. Pediatrics, 2001. 108 : p.624-9

l'adulte (notamment les changements hématologiques) ne sont pas en premier plan ; les petits enfants présentent des symptômes peu spécifiques, tels qu'un retard du développement et un retard staturo-pondéral. Cette carence à long terme peut engendrer des problèmes de développement du système nerveux central et de démyélinisation¹⁰, ainsi que des altérations neurologiques irréversibles¹¹. Ainsi, une détection précoce d'un tel déficit constituerait dès lors, le meilleur moyen de prévention de telles altérations. Le diagnostic de la carence de vitamine B12 présente quelques difficultés. En effet, la seule mesure de la vitamine B12 totale est insuffisante en cas de déficit subclinique¹². De plus, le taux sanguin de B12 ne reflète pas la concentration de vitamine active (TC II Cbl), car il mesure aussi la partie inactive (TC I Cbl) de cette vitamine¹³. Chez l'adulte, la TC II Cbl représente environ 20% de la vitamine B12 totale plasmatique, mais le pourcentage de cette forme chez les enfants en bas âge, qui ont d'ailleurs des besoins métaboliques supérieurs en raison de la croissance rapide, n'est pas connue. Par conséquent, les valeurs de référence pour la vitamine B12 plasmatique chez les adultes ne peuvent pas s'appliquer aux enfants. Certaines études posent la valeur seuil de carence en vitamine B12 à 150 pmol/l chez la femme enceinte¹⁴, alors que d'autres proposent de reviser ces valeurs de référence à la hausse¹⁵. Dans notre pratique clinique, nous considérons comme insuffisants des taux plasmatiques de vitamine B12 totale inférieurs à 300 pmol/l chez l'enfant de 0 à 3 ans. La relevance d'un taux entre 100 et 300 pmol/l est évaluée selon la positivité ou pas des marqueurs indirects fonctionnels. La performance diagnostique s'améliore si on couple le dosage de vitamine B12 au dosage de l'un de ses marqueurs fonctionnels indirects (Hcy ou MMA)¹⁶. Il a été démontré que l'augmentation du marqueur indirect MMA serait plus spécifique à une carence en vitamine B12 que l'augmentation de Hcy, car cette dernière est impliquée dans plusieurs autres situations (déficit en folate, par exemple)¹⁷. Récemment, il a été confirmé que le marqueur le plus robuste de déficit en vitamine B12 chez les nouveau-nés est le MMA, sanguin ou urinaire¹⁸. Certaines études ont tenté de mettre en place un algorithme diagnostique pour le déficit en

⁹ Hogeveen, van B., et al., *Methylmalonic acid values in healthy Dutch children*. European Journal Nutrition, 2007. 47 : p. 26-31

¹⁰ Stabler, *Vitamin B12 deficiency*. New England Journal, 2013. 368 : p.149-60

¹² O. Boulat, R. et al., *Marqueurs biologiques des statuts vitaminiques B12 et D: aspects analytiques d'importance clinique*. Revue médicale suisse, 2012. 8 : p. 2052-8

¹³ idem. Note n°12

¹⁴ Y. Jacquemyn et al., *Vitamin B12 and folic acid status of term pregnant women and newborns in the Antwerp region, Belgium*, Clin Exp Obstet Gynecol. 2014;41(2):141-3

¹⁵ E. Scolamiero et al., *Maternal vitamin B12 deficiency detected in expanded newborn screening*, Clin Biochem. 2014 Sep 7

¹⁶ O. Boulat, R. et al., *Marqueurs biologiques des statuts vitaminiques B12 et D: aspects analytiques d'importance clinique*. Revue médicale suisse, 2012. 8 : p. 2052-8

¹⁷ Bjorke mosen et al., *Determinants of Cobalamin Status in Newborns*. Pediatrics, 2001. 108 : p.624-9

¹⁸ Z. Kalay et al., *Reliable and powerful laboratory markers of cobalamin deficiency in the newborn: plasma and urinary methylmalonic acid*, J Matern Fetal Neonatal Med, 2014 Dec 5:1-4.

vitamine B12¹⁹. Plusieurs études se sont intéressées aux déterminants majeurs du statut en vitamine B12 chez les nouveau-nés. Ainsi, le statut vitaminique maternel se révèle être un des déterminants majeurs du statut vitaminique du nouveau-né. Un autre facteur influençant le taux de vitamine B12 chez le nouveau-né est le nombre de parités de la mère. On constate que plus la parité de la mère est élevée, plus la prévalence de carence en vitamine B12 chez le nouveau-né est élevée²⁰. Cependant, une étude plus récente a montré que la parité maternelle et la prise de complément vitaminique n'avaient aucune influence sur le déficit subclinique en vitamine B12 chez les femmes enceintes²¹.

1.3 Objectifs spécifiques

Les objectifs spécifiques de cette étude sont :

- Déterminer la fréquence d'un taux urinaire ou sanguin de MMA supérieur à la norme chez les nouveau-nés à terme comme marqueur de déficit subclinique en vitamine B12

Valeurs de référence

MMA urinaire : < 8mmol/mol de créat et MMA sanguin : < 0.28µmol/L^{22 23}

- Déterminer si le taux de MMA urinaire chez le nouveau-né reflète son taux de MMA plasmatique et donc la sensibilité du dosage urinaire seul du MMA pour le diagnostic de déficit en vitamine B12.
- Déterminer si l'apport en B12 par des compléments vitaminiques chez la mère durant la grossesse est un facteur protecteur contre un déficit en B12 chez le nouveau-né.

¹⁹ Berg, S. et al., *Laboratory evaluation for Vitamin B12 deficiency: the case for Cascade Testing*. Clinical Medicine & Research, 2013. 11(1): p.7-15

²⁰ Bjorke mosen et al., *Determinants of Cobalamin Status in Newborns*. Pediatrics, 2001. 108 : p.624-9

²¹ Y. Jacquemyn et al., *Vitamin B12 and folic acid status of term pregnant women and newborns in the Antwerp region, Belgium*, Clin Exp Obstet Gynecol. 2014;41(2):141-3

²² O. Boulat, M. gradwohl, V. Matos, *Organic acids in the second morning urine in a healthy swiss paediatric population*, Clin chem lab Med, 2003, 12(41), p. 1642-1658

²³ G. la Marca, S. Malvagia et al., *Rapid 2nd-Tier Test for Measurement of 3-OH-Propionic and Methylmalonic Acids on Dried Blood Spots: Reducing the False-Positive Rate for Propionylcarnitine during Expanded Newborn Screening by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry*, Clinical Chemistry, 2007, 53:7, p.1364–1369

2 Méthodologie



Ce travail de master s'articule en deux parties. Une partie sous forme d'étude rétrospective et une seconde partie sous forme d'étude prospective.

2.1 Méthodologie de la partie rétrospective

Etude rétrospective sur huit patients diagnostiqués avec un déficit en vitamine B12 dans les premières années de vie au Centre des Maladies Moléculaires.

2.2 Méthodologie de la partie prospective

Population :

La population étudiée dans la partie prospective de ce travail est composée de 100 nouveau-nés nés à la maternité du CHUV de Lausanne entre septembre 2013 et juillet 2014. La sélection des sujets s'est faite selon les critères d'inclusion et d'exclusion suivants :

Critères d'inclusion	Critères d'exclusion
<ul style="list-style-type: none">▪ Nouveau-nés à terme▪ Ne présentant aucun facteur de risque particulier	<ul style="list-style-type: none">▪ Maladie maternelle avérée (p. ex : diabète, éclampsie, infection)▪ Asphyxie néonatale à la naissance

Echantillons :

Le but était de récolter deux types d'échantillons (urine et sang) chez les nouveau-nés au quatrième jour de vie, afin d'y doser le taux de MMA reflétant ainsi le statut vitaminique en B12 chez les nouveau-nés.

Urines :

Après avoir commencé la récolte des échantillons d'urine à l'aide de sacs externes, nous avons par la suite opté pour une méthode de récolte au moyen de cotons de ouate dans les couches. En effet, compte tenu de la fréquence et du volume des mictions à l'âge moyen de notre collectif de patient (72h), la méthode des sacs externes s'était montrée que très peu concluante et contraignante pour les parents. La « méthode des cotons » a été vérifiée par les laboratoires du CHUV afin de s'assurer qu'elle n'engendrait aucune interférence dans le dosage du MMAu (urinaire).

Dans la vérification de la « méthode des cotons », il y avait deux points clés à contrôler :

- Savoir si la latence entre la miction et l'analyse des taux de MMA_u influençait le taux de MMA_u (probable dégradation du MMA ou production de métabolites intermédiaires créant des interférences avec le dosage du MMA).
- Savoir si les substances contenues dans les cotons de ouate engendraient des pics d'interférence dans la méthode d'analyse de MMA_u par spectrométrie de masse.

En collaboration avec l'équipe du laboratoire des acides organiques du CHUV, nous avons procédé à un contrôle de la « méthode des cotons » à l'aide d'une expérience où une urine d'un adulte a été récoltée puis imbibée par des cotons et placée dans un incubateur à 37degrés, reproduisant ainsi les conditions dans les couches des nouveau-nés. Le MMAu a été mesuré au T0, à T2h et à T4h, représentant ainsi le temps de latence maximum possible entre la miction et le moment où l'urine est prélevée, préparée et congelée. Une deuxième expérience avec de l'urine d'un patient présentant un MMAu élevé congénital (maladie métabolique) a été faite également. Cela a permis de montrer que le MMAu n'était pas dégradé avec le temps et ne produisait pas de métabolites interférant avec la mesure du MMAu. Quant aux composants des cotons de ouate, ils produisent en effet un pic d'éthylène glycol à la spectrométrie mais ne correspondant pas au pic produit par le MMAu. Ces expériences ont écarté nos craintes, nous permettant alors d'opter pour cette méthode plus simple, sans lésions à la peau des nouveau-nés, mais aussi moins coûteuse.

Sang :

Afin d'obtenir des échantillons de sang, nous avons prélevé deux gouttes de sang supplémentaires sur une carte de Guthrie séparée, lors de la ponction au talon réalisée dans le cadre du dépistage systématique du Guthrie. L'analyse du taux de MMA est réalisée selon la méthode de dosage « dried blood spot ».

« Dried blood spot » : La méthode d'analyse du dried blood spot consiste à doser le MMA contenu dans un extrait de sang récolté sur des cartes de Guthrie (papier buvard) par la spectrométrie de masse. Cette méthode a été développée par M. Hugues Henry PhD et M. René Nellen au sein des laboratoires de Biomédecine du CHUV, au cours de notre étude. Tout d'abord, les laboratoires du CHUV ont dû établir des courbes de calibration pour la spectrométrie de masse, en utilisant des échantillons de sang contenant des concentrations de MMA connues. Le problème technique rencontré ici était d'obtenir une matrice sang complet libre de MMA. Le MMA étant contenu dans le plasma (le plasma : composant liquide du sang), il fallait le remplacer par une solution. Pour se faire, ils ont centrifugé le sang, enlevé le surnageant et remplacé celui-ci par une solution iso-osmotique de protéines neutres à une concentration proche des protéines du plasma (de l'albumine de sérum bovin (BSA) à 60 g/L dans du tampon phosphate salin (PBS)). A cette matrice, des concentrations de MMA connues ont été ajoutées (0, 240, 480, 960, 1920, 3840 nmol/L de MMA). Ces matrices enrichies en MMA ont été déposées sur des cartes de Guthrie. Ensuite, le MMA des calibrateurs et des échantillons de patients a été extrait du papier par partition avec un solvant organique (méthanol). Enfin, le MMA est dosé grâce à la technique de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. La méthode développée permet de séparer le MMA de l'acide succinique qui est un composé isobare (même composition atomique) au MMA et qui interfère dans les méthodes de spectrométrie de masse.

La limite de quantification (LOQ), limite inférieure où le dosage du MMA reste possible, est de 0.24 $\mu\text{mol/L}$ (équivalent à 240 nmol/L). A ce niveau l'exactitude est encore optimale mais en-dessous de cette valeur les résultats perdent toute cohérence. Cette LOQ est d'ailleurs inférieure aux autres LOQ publiées dans d'autres travaux sur le *dried blood spot*. Dans les maladies du métabolisme congénitales, les valeurs de MMA sont généralement beaucoup plus élevées et le dosage de MMA sanguin dans de tels cas ne demande pas une LOQ si basse. En nous basant sur les intervalles de référence des taux plasmatiques de MMA fixés comme inférieur à 0.28 $\mu\text{mol/L}$ ²⁴, nous avons posé une limite d'alerte du MMA sanguin de 0.28 $\mu\text{mol/L}$ pour suspecter un déficit en vitamine B12. Ainsi, la méthode de *dried blood spot* élaborée par les laboratoires du CHUV, offrant une excellente sensibilité analytique, semble idéale pour un dépistage d'un déficit en vitamine B12.

²⁴ G. la Marca, S. Malvagia et al., *Rapid 2nd-Tier Test for Measurement of 3-OH-Propionic and Methylmalonic Acids on Dried Blood Spots: Reducing the False-Positive Rate for Propionylcarnitine during Expanded Newborn Screening by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry*, *Clinical Chemistry*, 2007, 53:7, p.1364–1369

Nouveau-né avec élévation du MMA :

Les nouveau-nés présentant une élévation du taux de MMA urinaire ($>8\text{mmol/mol}$ créat) ou un taux sanguin de MMA ($>0.28\ \mu\text{mol/L}$) sont rappelés et bénéficient d'une prise en charge pédiatrique hors étude. On procède à une vérification sur prise de sang et/ou récolte d'urine des taux de MMA et vitamine B12 chez les nouveau-nés et leur maman. En cas de confirmation d'un déficit en vitamine B12, un traitement de supplément vitaminique est proposé.

Considération éthique :

L'étude a été soumise à la Commission Cantonale d'éthique sous le protocole numéro 305/13 et approuvée.

3 Etude rétrospective

La partie rétrospective de l'étude porte sur huit patients examinés au Centre des Maladies Moléculaires du CHUV chez qui un déficit en vitamine B12 a été mis en évidence. Ce déficit en vitamine B12 a été révélé dans différentes situations :

- Retard de développement moteur
- Dénutrition sévère
- Découverte fortuite lors d'un bilan métabolique

Ces différentes situations ont suscité notre intérêt et sont donc à l'origine du projet de l'étude B12. La partie qui suit a pour objectif l'étude approfondie de ces cas. La mise en perspective des mêmes éléments (valeurs de laboratoire, données cliniques, symptômes) pour chaque cas nous permettra une comparaison.

3.1 Présentations des cas

3.1.1 Le cas du patient 1 (P1)

Le premier exemple abordé dans la partie rétrospective de notre étude est celui qui démontre le mieux la corrélation entre un déficit en vitamine B12 et le retard de développement moteur. A l'âge de neuf mois, le P1 présente un développement correspondant à un nourrisson de six mois (se tient assis seul, se tourne du dos au ventre, passe un objet d'une main à l'autre). De plus, le nourrisson montre une légère hypotonie du tronc, avec un tiré-assis où la tête retombe encore légèrement en arrière et n'arrive pas à soutenir son poids debout. Il est connu pour des apnées nocturnes devenues récemment diurnes marquées par une fixité du regard et une rigidité du corps. Le status cardiologique et neurologique sont sans particularité.

Dans le cadre d'investigations menées pour ses apnées, qui peuvent être un signe d'appel d'une erreur innée du métabolisme, une analyse des acides organiques urinaires est effectuée et révèle un MMA urinaire élevé. On effectue un statut vitaminique en B12 dont tous les paramètres (MMA, HCY, vitamine B12) reviennent en dehors des normes. Les valeurs observées parlent pour un déficit en vitamine B12 bien qu'anamnestiquement les apports en B12 soient dans la norme. La piste d'une éventuelle *acidurie méthylmalonique*²⁵ est écartée en raison des valeurs de MMA_u et MMA_p bien inférieures aux valeurs observées dans le cas de ces maladies congénitales.

²⁵ *acidurie ou acidémie méthylmalonique* : déficit en 2-méthyl-malonyl-CoA mutase : engendre une acidose progressive avec hyperammoniémie

Un traitement de vitamine B12 est instauré chez le nourrisson. A la suite du traitement, on observe une normalisation rapide du statut vitaminique et une évolution du développement moteur très favorable déjà à trois semaines du traitement. Le petit enfant ayant maintenant rattrapé les étapes fondamentales du développement, celui-ci est dès lors estimé à un développement normal pour les 9-12 mois. A noter aussi que depuis l'introduction du traitement par hydroxycobalamine, les parents rapportent une agitation nocturne nouvelle, pouvant être mis sur le compte du rattrapage des étapes fondamentales du développement ou d'un éventuel effet secondaire du traitement. Cette agitation s'est résolue spontanément après quelques semaines.

Cet exemple est à l'origine de l'étude. L'excellente réponse du nourrisson au traitement vitaminique, par une amélioration rapide de son status moteur, semble démontrer la corrélation entre le retard du développement moteur, ayant motivé un bilan neurométabolique, et le déficit en vitamine B12, corrélation déjà abordée dans la littérature²⁶.

3.1.2 Le cas du patient 2 (P2)

Un autre exemple illustrant le lien entre le retard de développement moteur et le déficit de vitamine B12 nous est donné par ce cas, un nourrisson de 4 mois de vie connue pour un **retard de croissance intra-utérin**, un **retard de développement global**, une **stagnation pondérale** et une **hypotonie importante**. Lors du bilan métabolique complet pour suspicion d'une éventuelle maladie métabolique congénitale, on met en évidence un déficit en vitamine B12. La maman étant végétarienne et par la suite diagnostiquée pour une maladie de Biermer, l'origine la plus probable de la carence semble être alimentaire. Le nourrisson et la maman sont alors supplémentés en vitamine B12 par injection intramusculaire.

Suite au traitement et de manière rapide (en trois jours), il prend 70g, augmente ses apports alimentaires (de 150ml). Une nette amélioration du tonus axial et du port de tête est observé. Deux autres injections d'hydroxycobalamine (vitamine B12) sont faites chez le nourrisson, avec à chaque injection une amélioration du tonus, du port de tête et de la prise alimentaire. La maman est également suppléée oralement par complément vitaminique.

Par la suite, le jeune enfant présente, à l'âge de deux ans et demi, un retard de développement inhomogène (surtout moteur) avec des signes dysmorphiques mineurs. (+ épisodes de fixité du regard et hypotonie) ouvrant la piste à d'autres causes du retard de développement moteur que celle de la carence en vitamine B12,

²⁶ Stabler, *Vitamin B12 deficiency*. New England Journal, 2013. 368 : p.149-60

le dosage celle-ci étant alors dans la norme. Néanmoins, l'évolution très favorable de son status locomoteur, une augmentation de son tonus et la correction de sa stagnation pondérale suite au traitement par vitamine B12 à l'âge de 4 mois sont des bénéfices indéniables du traitement.

3.1.3 Le cas du patient 3 (P3)

Le troisième exemple nous permet d'observer une fois de plus l'action de la vitamine B12 sur le développement moteur et en particulier sur la force et le tonus musculaire.

P3 est un petit enfant de 17 mois originaire du Kosovo venu en Suisse pour une « leucémie ». A l'entrée, il souffre de dénutrition sévère, de déshydratation et d'anémie. Le jeune enfant est hospitalisé en urgence pour un état de choc et dans le cadre de cette hospitalisation, un bilan métabolique complet est demandé dont l'examen des acides aminés urinaires présente une homocystinurie (HCY) franche²⁷ ainsi que l'augmentation de l'excrétion urinaire de nombreux acides aminés (tubulopathie rénale). Une carence en folate est mise en évidence. En outre, une acidurie méthylmalonique est retrouvée. Les valeurs de MMA_u et HCY très augmentées, reflètent un déficit en vitamine B12. Pour ces différentes raisons, il bénéficie entre autres d'un traitement par vitamine B12 intra-musculaire (hydroxycobalamine) et un changement d'alimentation est préconisé (Pregomin → Beba HA).

Par la suite, le jeune enfant va beaucoup mieux, recommence à s'alimenter correctement. Au niveau neurologique, on observe une amélioration de tout le status neurologique en particulier au niveau de la force : il se tient debout. Son statut vitaminique s'est lui aussi normalisé.

Dans le cas exposé, caractérisé par une malnutrition sévère, invoquer comme étiologie unique aux anormalités du status moteur la carence en vitamine B12 ne semble pas justifié. Cependant, il est intéressant de constater une nette amélioration de la force de l'enfant comme bénéfice du traitement par vitamine B12.

3.1.4 Le cas du patient 4 (P4)

Dans les cinq cas suivants utilisés dans la partie rétrospective de cette étude, nous avons sélectionné des patients chez qui une découverte fortuite d'un déficit en vitamine B12 a été faite lors d'un bilan métabolique (effectué dans le cadre de différentes situations). L'exposition des ces cas a pour but de démontrer l'existence possible d'une déficit en vitamine B12 sans manifestation clinique chez le jeune enfant, ce qu'on appellera un *déficit subclinique en vitamine B12*. Ainsi, aucun de ces cinq patients ne présentent de retard du développement moteur/hypotonie ni d'anémie, les deux principales manifestations d'un déficit en B12 chez le nourrisson,

²⁷ excrétion urinaire d'homocystéine

mais leur statut vitaminique en B12 révèle des anomalies. Dans le cas du patient 4, un nouveau-né de 20 jours de vie, on fait la découverte fortuite d'un MMA_u élevé lors d'un dépistage urinaire de l'*acidurie pyroglutamique* (en raison d'une *acidurie pyroglutamique* connue chez sa sœur aînée). On conclut donc à un déficit subclinique en vitamine B12 car le nourrisson ne présente aucun symptôme, mais l'excrétion urinaire augmentée de MMA est le marqueur indirect d'un déficit en vitamine B12. La vitamine B12 est également dosée chez la maman et revient à la limite inférieure de la norme, soutenant ainsi l'hypothèse que l'origine de la carence serait maternelle. On instaure chez la maman un traitement par hydroxycobalamine, par spray intranasal, (car elle allaite) ainsi qu'un changement de diète.

3.1.5 Le cas du patient 5 (P5)

C'est un nourrisson de 2 mois de vie chez qui lors d'un bilan métabolique complet dans le cadre d'une hospitalisation pour malaise du nourrisson, on met en évidence une augmentation de l'excrétion du MMA_u. Le reste des paramètres du statut vitaminique en B12 sont anormaux, signant donc un déficit en B12. On substitue donc le nourrisson en vitamine B12, (cyanocobalamine) per os.

3.1.6 Le cas du patient 6 (P6)

C'est un nourrisson de 2 mois chez qui on met en évidence un déficit en vitamine B12 lors d'un bilan métabolique pour investigation d'une acidose lactique iatrogène (perfusion excessive de Ringer-Lactate chez la mère) à 12h de vie avec évolution favorable. Il reçoit un traitement de vitamine B12, (cyanocobalamine).

3.1.7 Le cas du patient 7 (P7)

C'est un nouveau-né de 20 jours de vie chez qui un *déficit en biotinidase* a été mis en évidence par le Guthrie²⁸. Lors de son bilan métabolique, qui inclut les acides organiques urinaires, on observe une augmentation de l'excrétion urinaire de MMA (qui n'a pas de relation avec le déficit en biotinidase). Raison pour laquelle, on substitue la mère du nouveau-né en vitamine B12, hydroxycobalamine en spray intranasal.

3.1.8 Le cas du patient 8 (P8)

C'est un nouveau-né de 8 jours de vie chez qui on dépiste un *déficit en MCAD* lors du test du Guthrie. Lors de son bilan métabolique, qui inclut une analyse des acides organiques urinaires, on met en évidence un MMA augmenté (sans relation avec le déficit en MCAD) secondaire à un déficit en vitamine B12. Il reçoit la cyanocobalamine per os .

²⁸ test de dépistage néonatal systématique (réalisé à J3-4)

3.2 Tableau résumé des résultats de la partie rétrospective

Dans le tableau ci-dessous, on retrouve les données cliniques des enfants, les valeurs de leur statut vitaminiq, et leurs symptômes en s'ils en présentaient.

Données cliniques	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7	Patient 8
Age	9 mois	4 mois	17 mois	20 jours	2 mois	2 mois	20 jours	8 jours
Poids	P90-97	P<3	-	-	P25-50	P50	P25-50	P50-75
Taille	P90	P<3	-	-	P50-75	P25-50	P25-50	P10-25
Périmètre crânien (PC)	P10-25	P<3	-	-	P25-50	P90-97	P25-50	P25-50
Age gestationnel	36+1	Terme	-	Terme	Terme	Terme	Terme	Terme
Gestation et parité	4G3P	3G1P	4G4P	3G3P	1G1P	1G1P	2G2P	1G1P
Avant traitement								
Vitamine B12 [pmol/l]	345	49	48	294	218	128	152	192
MMA _o [mmol/mol de créat]	22	2337	1346	52	21	168	32	52
MMA _p [umol/l]	1.34	-	7	8	0.51	11	3.28	4
HCY [umol/l]	10.4	123.2	93.7	11	-	8.9	-	9.6
Après traitement								
Vitamine B12 [pmol/l]	789	>1107	428	463	613	386	230	362
MMA _o [mmol/mol de créat]	2	7	3	24	2	-	6	9
MMA _p [umol/l]	0.17	-	0.25	2.76	0.58	0.21	0.73	2
HCY [umol/l]	6.6	3.4	9.9	-	-	-	-	-
Symptômes								
Hypotonie	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non	Non	Non
Statut neuro.	Sp	Retard, hypotonie head-lag inappétence stagnation pondérale		Sp	Sp	Sp	Sp	Sp
Anémies	Non	Non (limite inf.)	Hb:63 g/L	Non	Non	Non	-	-
Autres	Après	Non	Dénutrition	Non	Malaise	Acidose lactique néonat. latrogène	Déficit en biotidase	Déficit en MCAD

Valeurs de référence			
Vitamine B12 [pmol/l]	>300 (enfant)	133-675 (adulte)	
MMA _o [mmol/mol de créat]	<8 (<30 jours)	<52.6 (1-6mois)	<7.1 (6-12mois)
MMA _p [umol/l]	0.28		<4.6 (2-3ans)
HCY [umol/l]	5 - 15		
Hb [g/l]	130-180 (J21)	100-130 (3mois)	110-140 (6mois)
			110-150 (1année)

4 Etude prospective



4.1 Présentation des résultats

Comme expliqué précédemment, entre septembre 2013 et juillet 2014, 100 nouveau-nés nés à terme ont été sélectionnés à la maternité du CHUV afin d'évaluer leur statut vitaminique en B12. Des échantillons d'urine et de sang ont été récoltés afin d'y doser le MMA (métabolite reflétant le taux de vitamine B12).

Chez 26 patients nés entre septembre et novembre 2013, un échantillon d'urine (via la *méthode des cotons*) et un échantillon de sang (via les *cartes de Guthrie*) ont été récoltés. Collectif qu'on dénommera dans la suite du travail : **Patient U + S**

Chez 74 patients nés entre mars et juillet 2014 (le reste du collectif de patient) seul un échantillon de sang (via les *cartes de Guthrie*) a été récolté. Ceci suite aux difficultés rencontrées afin d'obtenir un échantillon d'urine chez des nouveau-nés de 72h de vie. En effet, la quantité et fréquence des mictions est très restreintes chez cette population en l'absence de la montée de lait chez la maman à ce moment, et/ou les mictions sont mélangées aux selles, rendant le dosage du MMA impossible. On dénommera ce collectif dans la suite du travail : **Patient S**

Les valeurs de référence de MMA chez les nouveau-nés sont : ^{1 2}

MMA _u (urinaire) : normes	MMA _s (sanguin): normes
< 8mmol/mol de créatinine	< 0.28 µmol/L

Ainsi sur notre collectif de patient, **sept nouveau-nés** sont revenus avec des taux de MMA anormalement élevés, traduisant un déficit en vitamine B12. Sur ces sept patients, **deux** se trouvent parmi le collectif de **Patients U + S** et **cinq** dans le collectif de **Patients S**.

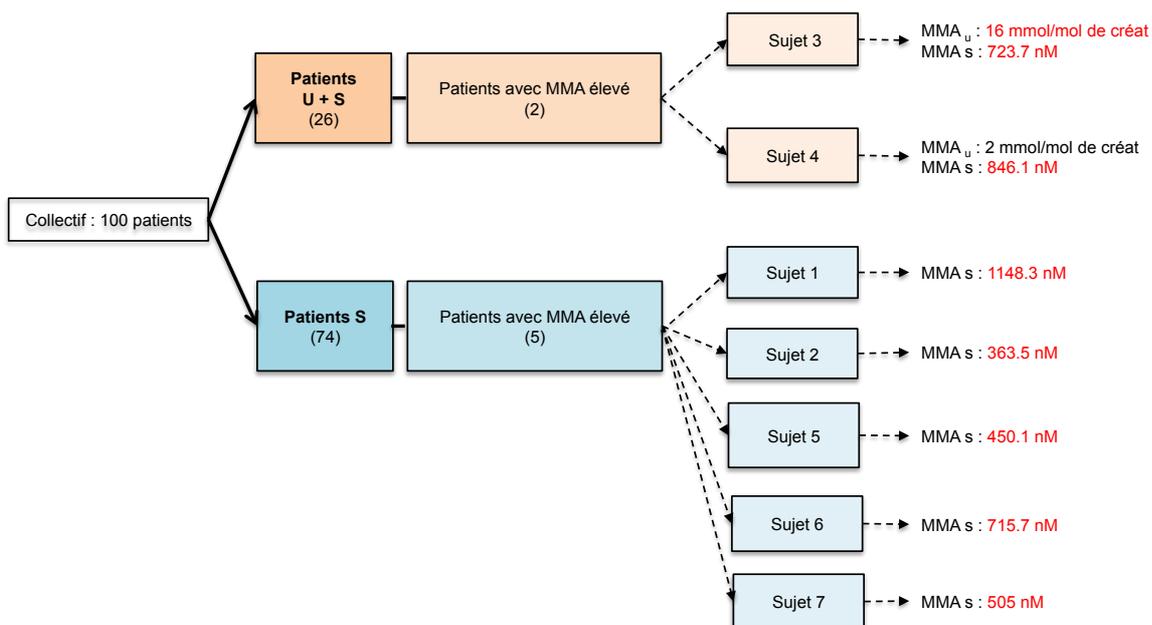
¹ O. Boulat, M. gradwohl, V. Matos, *Organic acids in the second morning urine in a healthy swiss paediatric population*, Clin chem lab Med, 2003, 12(41), p. 1642-1658

² G. la Marca, S. Malvagia et al., *Rapid 2nd-Tier Test for Measurement of 3-OH-Propionic and Methylmalonic Acids on Dried Blood Spots: Reducing the False-Positive Rate for Propionylcarnitine during Expanded Newborn Screening by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry*, Clinical Chemistry, 2007, 53:7, p.1364–1369

Ainsi sur notre collectif de patient, **sept nouveau-nés** sont revenus avec des taux de MMA anormalement élevés, traduisant un déficit en vitamine B12. Sur ces sept patients, **deux** se trouvent parmi le collectif de **Patients U + S** et **cinq** dans le collectif de **Patients S**.

- Patients avec MMA élevé du collectif de Patients U + S : Le MMA sanguin est élevé chez les deux patients mais **seul l'un d'eux a également un MMA urinaire élevé**.
- Patients avec MMA élevé du collectif de Patients S : cinq patients avec des MMA sanguins élevés.

Tableau 1: Résultats



4.2 Présentation des sujets avec MMA élevés

Dans cette partie, le suivi pédiatrique des sept patients présentant un taux de MMA urinaire et/ou sanguin élevé est exposé. Les différentes valeurs de laboratoire, les données cliniques ainsi que le type d'alimentation sont présentés pour chaque patient de manière systématique afin qu'une comparaison puisse être faite. Enfin, les traitements en vitamine instaurés chez les sujets de l'étude chez qui un déficit en B12 a été mis en évidence sont traités à la fin du chapitre.

Le collectif des sept patients de la partie prospective illustre le *déficit subclinique en vitamine B12*. En effet, aucun des patients chez qui des valeurs anormales de MMA sanguin ou urinaire mis en évidence lors du dépistage mené dans notre étude ne présentait de symptômes type retard de développement moteur/hypotonie ou autres symptômes. Néanmoins, tous présentaient un taux de vitamine B12 inférieur aux normes adaptées à leur âge, à la consultation de rappel suite aux résultats du dépistage effectué pour notre étude. Chez un sujet de ce collectif (S1), un déficit en vitamine B12 n'a pas pu être confirmé à la consultation de contrôle et chez un deuxième sujet (S2), le taux de vitamine B12 était inférieur à la norme, mais borderline pour diagnostiquer une réelle carence en B12. A noter cependant, que chez ces sujets, la consultation de contrôle s'est faite à distance du prélèvement sanguin ou urinaire (8 mois plus tard pour le sujet S1 et 10 mois plus tard pour le S2) et donc après la diversification alimentaire, raison pour laquelle on ne peut exclure un déficit en vitamine B12 au moment du prélèvement (à quatre jours de vie) qui aurait été corrigé grâce aux changements dans l'alimentation du nourrisson.

4.2.1 Le cas du sujet 1 (S1)

S1, premier cas abordé de l'étude prospective est l'unique sujet du collectif chez qui un déficit en vitamine B12 n'a pu être confirmé lors de la consultation de rappel. Le sujet S1 a été rappelé pour un suivi pédiatrique hors étude, en raison de valeur de MMA_s en dehors des normes dans le cadre de l'étude B12. C'est un nourrisson de 8 mois de vie en bonne santé habituelle, né à terme dont les paramètres staturo-pondéraux au moment de la naissance étaient dans les normes. S1 est issu d'une deuxième grossesse harmonieuse. La maman n'a suivi aucun régime alimentaire végétarien pendant sa grossesse. Depuis la naissance, l'alimentation s'est fait par lait maternel puis diversification dès quatre mois de vie, viande/poisson à six mois.

Au status, le nourrisson se tient assis, babille et se tourne. Le reste du status neurologique et locomoteur ne présente aucune anormalité. Seul le dosage de MMA urinaire est effectué en raison du refus de la prise de sang par les parents. Il revient dans les normes et aucun autre examen complémentaire n'est demandé chez le nourrisson, ni aucun traitement instauré. Ainsi, dans ce cas aucun déficit en vitamine B12 n'est mis en évidence lors de la consultation. Mais il est à prendre en

considération que le nourrisson est rappelé en consultation de contrôle à distance du dépistage effectué dans le cadre de notre étude (âgé alors de 8 mois). En effet, comme expliqué précédemment la méthode de dosage du MMA depuis les Guthries (*méthode dried blood spot*) n'a été mise en place qu'après le commencement de notre étude. Les valeurs de MMA_u reflétant les stocks de B12 de notre sujet sont très probablement rentrées dans l'ordre grâce à la diversification des aliments déjà commencée au moment de la consultation de contrôle.

4.2.2 Le cas du sujet 2 (S2)

Le nourrisson fait parti des trois nourrissons dont l'analyse de l'échantillon de sang s'est effectuée à distance du prélèvement, nous informant d'un taux de MMA sanguin anormal que bien après la date de prélèvement. Ces nourrissons sont revus en consultation de rappel quelques mois plus tard. Ainsi, le nourrisson se présente à la consultation de contrôle, âgée de 10,5 mois. Au moment de la consultation, la diversification alimentaire a déjà eu lieu faisant suite à un allaitement exclusif au lait maternel pendant les quatre premiers mois de vie. Fait intéressant, malgré l'introduction des protéines animales, on retrouve à la prise de sang, une légère anémie et des valeurs de vitamine B12 borderline, illustrant ainsi, que le changement de régime alimentaire ne semble pas suffisant pour corriger le déficit en B12. De plus, on met en évidence à la formule (FSS), un statut ferrique inférieur à la norme. FSS : Fer **7.1** (10.7-21.4 umol/L), Transferrine 35 (24.7-44.4 umol/L), Coefficient de saturation **0.10** (0.15-0.35), Ferritine 25 (15-120ug/l)

Au status le sujet S2 va bien et présente une motricité sans particularité. Aucun retard du développement ou hypotonie ne sont relevés. La mère du nourrisson, 2G2P, rapporte une grossesse sans prise de supplément vitaminique, mais sans régime végétarien. La seule particularité relevée à l'anamnèse est la gastrite atrophique de la grand-mère maternelle.

Au vu de la légère anémie et des taux de B12 bas, un traitement par vitamine B12 est instauré avec correction après traitement de l'hémoglobine, chez un enfant toujours asymptomatique.

4.2.3 Le cas du sujet 3 (S3)

Le sujet S3, est le premier sujet chez qui le MMA urinaire et sanguin reviennent en dehors des normes. La consultation de rappel suivant de quelques semaines le prélèvement (S3 est alors âgé de neuf semaines) permet de confirmer le déficit en B12 chez un nourrisson asymptomatique. Au status, le sujet 3 bouge les quatre membres. La force et le tonus sont normaux et symétriques.

S3 est un nouveau-né né à terme issu d'une première grossesse harmonieuse. Lors de la grossesse, la mère a pris des compléments vitaminiques *Elevit* (3µg de

cyanocobalamine/jour) pendant les trois premiers mois uniquement. Dès la naissance, Le sujet S3 est alimenté au lait maternel, puis par la suite complété par du lait artificiel en raison d'une mauvaise prise pondérale. Ainsi, par cet exemple, on constate que la maman de S3 ne présente, a priori, aucun facteur déterminant pour une carence en B12 chez son nouveau-né.

Le nourrisson présentant des taux de vitamine B12 largement inférieurs aux normes pour son âge et sa mère ayant des taux de vitamine B12 aux limites inférieures, les deux bénéficient d'un traitement vitaminique, qui, après une modification de voie d'administration permet de corriger le statut en vitamine B12.

4.2.4 Le cas du sujet 4 (S4)

Dans le cadre de l'étude B12, un échantillon de sang et d'urine sont récoltés chez S4. L'analyse d'urine (MMA_u) revient dans les normes. Suite à la mise en place de la méthode *dried blood spot* par les laboratoires du CHUV, l'échantillon de sang récolté via le Guthrie est analysé et révèle une valeur de MMA_s trop élevée. Au vu du taux de MMA_s , le nourrisson, alors âgé de 9 mois est rappelé, donc à distance du prélèvement. A ce moment, le nourrisson présente encore des valeurs de vitamine B12 inférieures aux normes pour son âge. Ainsi, ce quatrième exemple nous permet de soulever la question de la sensibilité des marqueurs indirects des stocks de vitamine B12. Chez les nouveau-nés, le marqueur urinaire (MMA_u), semble être moins sensible que le marqueur sanguin (MMA_s), en raison d'une immaturité du système rénal et ainsi d'une incompétence des reins à concentrer les urines, diluant dès lors les échantillons urinaires engendrant de faux-négatifs.

S4 est un nourrisson né à terme avec des paramètres staturo-pondéraux dans les normes. La grossesse fut harmonieuse chez une mère 5G4P avec prise de vitamines, dont nom inconnu. On note que la mère ne mange pas de viande sauf du poulet occasionnellement.

A propos de l'alimentation du nourrisson, elle a été exclusivement alimentée au lait maternel jusqu'à quatre mois puis diversifiée. Au moment de la consultation de rappel, S4 est encore allaitée mais mange maintenant de la viande depuis deux semaines ainsi que du lait de vache.

Lors de la consultation, le nourrisson, alors âgée de 9 mois se porte bien et ne présente aucun retard au niveau du développement psycho-moteur au status.

Au vu d'un taux en vitamine B12 inférieur au taux cible à cet âge-là et d'un MMA plasmatique élevé mais urinaire normal, un traitement de substitution est instauré.

4.2.5 Le cas des sujets 5 (S5), 6 (S6), 7 (S7)

Les trois derniers cas abordés dans cette étude sont les cas de trois nourrissons présentant le même profil. Tous les trois sont nés à terme et sont le premier enfant de la famille. Ils présentent des valeurs de MMA_s supérieures à la norme pour leur âge, lors du dosage effectué pour l'étude B12, avec une confirmation du déficit en vitamine B12 lors de la consultation de rappel. Leurs mères respectives ne suivent pas de régime végétarien. L'une d'elles a bénéficié d'une substitution vitaminique pendant la grossesse, avec un apport de 8µg de cyanocobalamine/jour. La deuxième maman a pris du *Floradix*, (1.25µg de cyanocobalamine/jour) mais uniquement sur la fin de sa grossesse. Enfin la dernière a pris uniquement de la vitamine D, fer et magnésium sans aucun apport en B12. Les trois nourrissons sont nourris au lait maternel. Chez les deux premiers nourrissons, un traitement vitaminique leur a permis de corriger leur taux de vitamine B12. Le dernier nourrisson est encore sous traitement au moment de la rédaction de ce travail.

Ainsi, ces trois derniers exemples illustrent parfaitement le but de notre étude. D'une part, ils font partis d'un collectif de patients chez qui un déficit en vitamine B12 a été prouvé en l'absence de symptôme. Collectif dont le nombre s'avère plus important que ce que nous avons envisagé au départ. D'autre part, leurs mères respectives ne présentent, a priori, pas de facteurs de risque, tels un régime végétarien ou un nombre de parité élevé. En effet, les trois mamans sont primipares, ne soutenant pas dès lors l'association entre parité et déficit en B12 décrite dans la littérature²⁹. Ainsi, ces trois exemples montrent que la possibilité d'un déficit en vitamine B12 semble être plus courante qu'on ne le pense. De plus, ces nourrissons ne présentaient aucune anomalie du status locomoteur au moment de la consultation de rappel, répondant ainsi parfaitement à la définition d'un *déficit subclinique en vitamine B12*. Dès lors, la question se pose de savoir si ces nourrissons auraient, en l'absence de substitution vitaminique, développé ou non une éventuelle hypotonie ou anomalie du développement moteur. Cette interrogation est reprise dans la conclusion du travail.

²⁹ Bjorke mosen et al., *Determinants of Cobalamin Status in Newborns*. Pediatrics, 2001. 108 : p.624-9

4.3 Tableau récapitulatif des résultats de l'étude prospective

Données cliniques	Sujet 1	Sujet 2	Sujet 3	Sujet 4	Sujet 5	Sujet 6	Sujet 7
	Age	8mois	10.5mois	9semaines	9mois	2.5mois	2m. 3sem.
Poids	P75-90	P10	-	P10	P90	P10-25	P10-25
Taille	P90	P25-50	-	P10-25	P75	P10	P25
Périmètre crânien (PC)	P90-97	P50	-	P25-50	P50	P10-25	P25-50
Age gestationnel	Terme	Terme	Terme	Terme	Terme	Terme	Terme
Gestation/parité de la mère (GP)	2G2P	2G2P	1G1P	5G4P	1G1P	1G1P	1G1P
Valeurs étude B12							
MMA _u [nmol/mol de créat]	-	-	16	2	-	-	-
MMA _{s (sano)} [nM]	1150	360	720	840	450	700	505
Avant traitement							
Vitamine B12 [pmol/l]		258	163	161	123	160	166
MMA _o [umol/l]		0.78	168 (mère)	135 (mère)	267 (mère)	234 (mère)	277 (mère)
MMA _u [nmol/mol de créat]	2	4	275	4	7	77	12
Après traitement							
Vitamine B12 [pmol/l]	-	>300	400	304	364	526	Traitement B12 en cours
MMA _o [umol/l]	-	-	3	0.38	0.3	<1	
MMA _u [nmol/mol de créat]	-	-	12	5	-	-	
Alimentation chez la maman et bébé							
Vitamine grossesse	Non	Non	3 Premiers mois	Oui	Oui	Non (Fe, Mg, vit. D)	Fin de grossesse
Régime végétarien	Non	Non	Non	Oui	Non	Non	Non
Lait maternel/artificiel (LM/LA)	LM	LM	LM + LA	LM	LM	LM	LM + LA
Diversification alimentaire	Oui dès 4mois	Oui dès 4mois	Non	Oui dès 4mois	Non	Non	Non

Valeurs de référence

Vitamine B12 [pmol/l]	>300 (enfant)	133-675 (adulte)				
MMA _u [nmol/mol de créat]	<8 (<30 jours)	<52.6 (1-6mois)		<7.1 (6-12mois)		<4.6 (2-3ans)
MMA _o [umol/l]	0.28					
HCY [umol/l]	5 - 15					
Hb [g/l]	130-180 (J21)	100-130 (3mois)	110-140 (6mois)	110-150 (1année)		

4.3 Traitement en vitamine B12 chez les sujets de l'étude prospective

Dans cette partie, les traitements en vitamine B12 que les sujets de l'étude prospective ont reçus sont exposés afin de mettre en évidence un éventuel bénéfice d'une prise en charge d'un déficit en B12 par rapport à une autre.

Protocole de traitement du déficit subclinique en vitamine B12 au Centre des Maladies Moléculaires du CHUV :

Lorsque un déficit subclinique est détecté chez l'enfant ($MMA_p > 0.28 \mu\text{mol/l}$ et vitamine B12 $< 300 \text{ pmol/l}$), les patients sont traités de manière suivante :

- Nouveau-né allaité complètement au sein : un traitement par hydroxycobalamine en spray nasal $500 \mu\text{g}$ 1-2x/semaine est administré à la mère pendant 1 à 3 mois ; ce traitement corrige d'habitude rapidement le statut vitaminique chez la mère et l'enfant.
- Nouveau-né allaité artificiellement (ou seulement partiellement au sein) ou enfant jusqu'à 3 ans : un traitement de cyanocobalamine $500 \mu\text{g}$ 2x/semaine per os est administré à l'enfant et $500 \mu\text{g}$ 3x/semaine à la mère pendant 1 à 3 mois ; en cas de compliance difficile (les bébés recrachent le produit) le spray nasal d'hydroxycobalamine $500 \mu\text{g}$ 1 x/semaine est proposé.
- Après correction du statut vitaminique (vitamine B12 $> 300 \text{ pmol/l}$ et $MMA < 1 \mu\text{mol/l}$), un traitement d'entretien est proposé (multivitaminique contenant $0.4 \mu\text{g/jour}$ de vitamine B12 per os) si les apports diététiques sont calculés comme insuffisants.

Les patients de l'étude prospective ont été traités comme suit :

Sujet 2 : cyanocobalamine per os $0.4 \mu\text{g/j}$; suite à une mauvaise compliance, la substitution a été remplacée par hydroxycobalamine spray nasal $500 \mu\text{g}$ 1x/semaine pendant 4 semaines.

Sujet 3 : cyanocobalamine per os, $500 \mu\text{g}$ 2x/semaine durant 2 semaines puis $0.4 \mu\text{g/jour}$ pendant 2 mois.

Sujet 4 : cyanocobalamine per os $1000 \mu\text{g}$, 1X/semaine pour 4 semaines.

Sujet 5 et 6 : cyanocobalamine per os, $500 \mu\text{g}$ 2x/semaine durant 2 semaines, suivi de hydroxycobalamine spray nasal $500 \mu\text{g}$ 1x/semaine pendant 3 semaines.

Sujet 7 : cyanocobalamine per os, $500 \mu\text{g}$ 2x/semaine durant 4 semaines.

La cyanocobalamine per os s'est révélée efficace dans la correction des paramètres du statut vitaminique B12 mais de manière plus lente par rapport à l'hydroxycobalamine en spray nasal.

5 Discussion

Dans le cadre de notre étude, sept bébés sur 100 ont présenté des valeurs de MMA au-dessus des normes pour leur âge au moment du dépistage néonatal (4^{ème} journée de vie). Sur les sept patients revus en consultation de rappel, chez six patients, le dosage du statut vitaminique en B12 a confirmé le déficit en B12 révélé par le MMA sanguin et/ou urinaire trop élevé. Dans un cas, le dosage du statut vitaminique est revenu dans les normes, ne permettant pas de conclure à un déficit en vitamine B12 chez le nourrisson. Cependant, une remise en doute de la sensibilité/spécificité des marqueurs indirects des stocks de B12 (MMA urinaire et sanguin) ne semble pas justifiée. En effet, dans le cas de ce patient, le contrôle de la vitamine B12 s'est faite à distance de plusieurs mois du dépistage pour notre étude. De plus, le dosage s'est effectué après que la diversification alimentaire (à l'âge de quatre mois) ait été instaurée chez ce nourrisson, laissant penser qu'un éventuel déficit en vitamine en B12 puisse avoir été corrigé par ce changement alimentaire. Les résultats de notre étude confirment la présence d'un déficit en vitamine B12 révélé via les marqueurs indirects MMA_{s/u} chez six patients sur sept, nous permettant ainsi de confirmer la fiabilité de ces marqueurs. Aucun patient avec erreur innée du métabolisme n'a été diagnostiqué par ce moyen (incidence estimée 1 :100'000)

Chez 26 patients, un échantillon d'urine et de sang ont été prélevés pour le dépistage d'un déficit en vitamine B12. Dans ce collectif dénommé collectif U + S, deux bébés ont présenté des valeurs de MMA anormales. Seul un des deux sujets (S3) a montré des valeurs de MMA trop élevé dans le sang **ainsi que** dans l'urine. Dans le cas du deuxième patient (S4), le dosage du MMA dans l'urine est revenu dans les normes alors que l'analyse du MMA sanguin a montré des valeurs de MMA anormales. Chez le patient S4, le déficit en vitamine B12 a été confirmé lors de la consultation de contrôle. Bien que sur un collectif restreint, ces résultats nous permettent de poser l'hypothèse que le dosage du MMA sanguin semble plus sensible pour dépister un déficit en B12 chez les nouveau-nés. L'explication pourrait résider entre autres, dans l'immaturation du système rénal des nouveau-nés et sa capacité limitée à concentrer les urines engendrant une dilution des urines et ainsi la possibilité de faux-négatif.

Tableau 2 Sensibilité / Spécificité MMAs/u

MMA sanguin	Déficit en B12	Absence de déficit en B12	MMA urinaire	Déficit en B12	Absence en B12
Test positif	6	1	Test positif	1	0
Test négatif	0	93	Test négatif	1	24

Par l'observation des tableaux ci-dessus, on constate que le dosage de MMA à partir d'échantillon de sang n'engendre aucun faux-négatif. Au contraire du dosage de MMA à partir d'un échantillon d'urine, dans lequel on retrouve un cas de faux-négatif. Ainsi, la sensibilité, selon la formule de sensibilité (vrai-positif (VP))/(VP + faux-négatif (FN)) du dosage de MMA sanguin est de 100% et celui de MMA urinaire est de 50%. Évidemment, il est nécessaire de pondérer ces chiffres au vu d'un collectif de patient très restreint. Mais il est intéressant de noter qu'il existe néanmoins une différence de sensibilité entre les marqueurs.

La spécificité, selon la formule (vrai-négatif (VN))/(VN+ faux-positif (FP)) des marqueurs indirects du déficit en B12 sont de 100% pour le MMA urinaire. Celle de MMA sanguin est de 98%. Cette baisse de la spécificité du MMA sanguin par rapport au MMA urinaire s'explique par la présence d'un cas de faux-positif dans le collectif de patient avec dosage du MMA sanguin. Cela dit, ce cas de faux-positif ne peut être entièrement validé, compte tenu des limitations de l'étude exposées ultérieurement (recontrôle du taux de vitamine B12 à distance du prélèvement pour l'étude et après diversification alimentaire). Ainsi, cela nous permet de conclure que le MMA urinaire et sanguin sont de bons marqueurs indirects d'un déficit en B12 avec une meilleure sensibilité pour le MMA sanguin.

Par l'étude des marqueurs indirects MMA plasmatique ou urinaire, nous avons pu observer qu'il n'y avait pas d'association directe entre le taux de MMA_p ou _u et le taux de vitamine B12 lors d'un déficit en vitamine. Ainsi, une relation de régression entre les taux de MMA et le taux de vitamine B12 ne peut pas être établie. Chez deux des sujets de l'étude rétrospective qui souffraient de dénutrition sévère, des taux extrêmement hauts de MMAurinaire, supérieurs à 1000 (N : <8 mmol/mol selon l'âge) ont été retrouvés ; ces deux patients avaient aussi des taux particulièrement bas de vitamine B12, inférieurs à 100 pmol/l. Pour le reste du collectif de sujets, il est intéressant de constater que pour les enfants avec un taux de vitamine entre 150-300 pmol/l (déficit subclinique en B12), les valeurs de MMAurinaire sont contenues entre 10 et 80 (N : <8 mmol/mol selon l'âge)³⁰ et les valeurs de MMAplasmatique entre 0.5 et 7 (N : <0.28 μmol/l)³¹. La présence de ces métabolites à ces taux de vitamine B12, ainsi que leur correction rapide après traitement de B12, soutiennent l'hypothèse d'un déficit subclinique.

Après nous être intéressés aux marqueurs indirects MMA et à leur fiabilité notamment, l'objectif principal de notre étude était d'établir la fréquence de déficit en vitamine B12 chez une population de nouveau-nés sains. Sur les 100 bébés, 7 sont revenus avec des valeurs de MMA trop élevées, avec confirmation du diagnostic de déficit en B12 à la consultation de rappel chez 6 bébés. Si on pose l'hypothèse que nos marqueurs peuvent être considérés comme fiables et que l'unique cas de faux-

³⁰ Tableau 3 MMAu et vitamine B12 dans les annexes

³¹ Tableau MMAp et vitamine B12 dans les annexes

positif est « douteux », cela fait une fréquence de 7%. La fréquence de nouveau-nés présentant un déficit en vitamine B12 n'avait jusqu'à alors pas été évaluée de manière précise. On retrouve dans la littérature que la fréquence est probablement élevée sans qu'une incidence précise ne soit établie^{32, 33}. La fréquence est plus élevée que ce que l'on avait pu imaginer. Cela est d'autant plus étonnant que les mères ne présentent, à priori, aucun facteur déterminant connu pour un éventuel déficit en B12 chez le nouveau-né. (exemple : parité élevée, régime végétarien). En effet, aucune corrélation entre une parité élevée et un taux de vitamine B12 chez le nouveau-né n'est observée dans notre étude, à l'inverse de ce qui se retrouve dans la littérature.³⁴

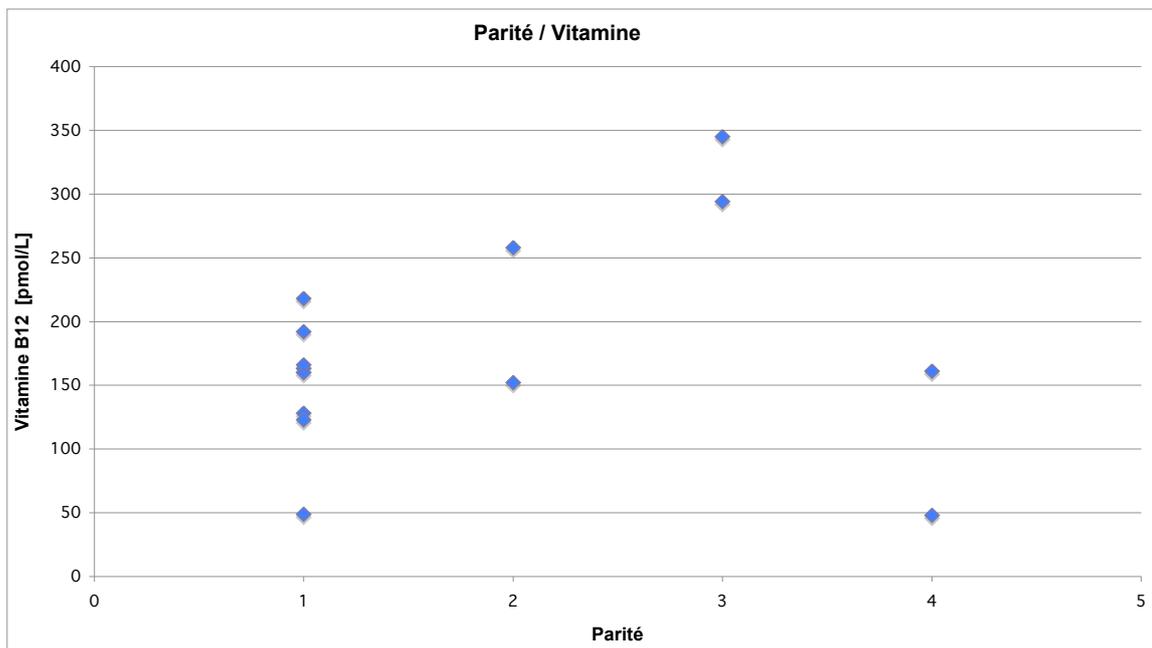


Figure 2 Association parité et vitamine B12 sanguine

De plus, une seule maman sur sept suit un régime végétarien. Ainsi, avoir une alimentation avec protéine animale ne semble pas non plus toujours protéger d'un éventuel déficit en B12.

Concernant un autre facteur déterminant d'un déficit en B12, il est intéressant de constater que seules deux mamans sur sept ont pris des vitamines de manière régulière pendant la grossesse. On observe que sur les cinq mamans restantes,

³² Bjorke mosen et al., *Determinants of Cobalamin Status in Newborns*. Pediatrics, 2001. 108 : p.624-9

³³ Hogeveen, van B., et al., *Methylmalonic acide values in healthy Dutch children*. European Journal Nutrition, 2007. 47 : p. 26-31

³⁴ Bjorke mosen et al., *Determinants of Cobalamin Status in Newborns*. Pediatrics, 2001. 108 : p.624-9

trois ont décidé de ne pas prendre de substitution vitaminique lors de la grossesse et deux les ont prises, mais sur une période de temps restreinte (début ou fin de grossesse). Ainsi, cela semble montrer l'importance d'une prise continue et tout au long de la grossesse de complément vitaminique avec apport en vitamine B12 pour écarter le risque de développer un tel déficit chez le nouveau-né, bien que ce paramètre n'ait pas été évalué chez les mères des nouveau-nés sans augmentation de MMA.

Le dernier point abordé dans cette discussion est celui de la relation entre l'hypotonie/retard de développement moteur et la vitamine B12. Ainsi, dans la partie rétrospective, nous observons une corrélation entre un tel déficit et un problème moteur. L'amélioration rapide, grâce à un traitement de vitamine B12, du status moteur ainsi que du tonus de deux des patients de la partie rétrospective chez qui un déficit avait été diagnostiqué, est très parlant.

La partie prospective met en avant des bébés chez qui une carence en B12 a été diagnostiquée suite au dépistage effectué pour l'étude. Chez ces sept nourrissons de la partie prospective revus en consultation de rappel, tous se portent bien. Ils ne présentent aucun déficit moteur ou hypotonie et ont un examen clinique parfaitement dans les normes. Six de ces bébés sont supplémentés en vitamines B12 et remontent tout leur stock vitaminique en corrigeant le MMA plasmatique. Ainsi, ces bébés sont pris en charge avant d'avoir développé des manifestations de leur déficit, comme prévu dans le protocole de recherche et cela pour des raisons éthiques. La question qui se pose dès lors est de savoir si en l'absence de traitement, ils auraient développé un retard du développement moteur ou non. A cela s'ajoute la question de savoir, si un tel déficit dépisté chez des nouveau-nés de trois jours se corrige naturellement par la suite, grâce à la diversification alimentaire, généralement débutée à l'âge de quatre mois. Le changement de régime alimentaire peut selon toute vraisemblance corriger le statut en B12. Chez trois de nos patients, au moment de la consultation de recontrôle, les nourrissons sont déjà diversifiés. Pourtant, fait relevant, chez deux des patients, le statut vitaminique en B12 revient en dessous de la norme pour leur âge, malgré l'introduction de protéine animale.

Ainsi, à l'issue de notre étude, nous observons une fréquence élevée de déficit en vitamine B12 chez les nouveau-nés. Le diagnostic peut être fait via des marqueurs indirects ($\text{MMA}_{S/U}$), avec une meilleure sensibilité pour le MMA urinaire. A noter aussi qu'un tel déficit ne se corrige pas forcément spontanément avec la diversification alimentaire et l'introduction de protéine animale. Malgré une association entre retard de développement et déficit en B12 exposée dans la partie rétrospective, nous n'avons pas d'argument pour affirmer que les sujets de l'étude prospective auraient développé un retard de développement moteur s'ils n'avaient pas reçu de supplément vitaminique.

6 Conclusion

En terme de conclusion, il nous paraît relevant de proposer quelques recommandations aux domaines concernés par notre étude. Comme discuté auparavant, il semble difficile d'élire de véritables facteurs déterminants dans un éventuel déficit en vitamine B12 chez le nouveau-né. De plus, une prise de vitamine durant la grossesse de manière irrégulière se retrouve dans cinq cas sur sept de la l'étude prospective. Dès lors, nous soulignons l'importance de la prise de vitamine contenant de la vitamine B12 tout au long de la grossesse. En outre, la surveillance du statut en vitamine B12, au même titre que la surveillance du Fer, devrait être introduite comme contrôle de routine chez les femmes enceintes par les gynécologues.

Le manque de suivi sans traitement ne nous permet pas d'affirmer qu'un déficit subclinique en B12 se manifeste toujours par un retard de développement moteur ; par conséquent, nous ne pouvons pas inciter à un screening systématique du statut vitaminique en B12 chez le nouveau-né. Pourtant, les observations rétrospectives nous amènent à proposer que le contrôle du statut en vitamine B12 fasse partie intégrante des causes recherchées lors d'un retard de développement / hypotonie chez les nourrissons dans les premières années de vie. Le dépistage d'une carence en B12 peut se faire, comme l'a montré notre étude, par la *méthode du dried blood spot* développée récemment par le CHUV, au moyen d'une simple ponction capillaire sur une carte de Guthrie. Dès lors, cette méthode offre l'avantage d'être simple, peu invasive et praticable au cabinet du pédiatre. Ainsi, si un tel déficit est mis en évidence, un traitement de vitamine B12, efficace et peu coûteux, peut être ajouté aux mesures habituelles comme la physiothérapie Bobath.

Arrivant au terme de ce travail, il est maintenant essentiel d'en exposer les limitations. Ainsi, la première limitation est évidemment le collectif restreint de sujets. En effet, un collectif plus important de sujets apporterait plus de crédibilité à l'étude. De plus, les difficultés rencontrées pour la récolte d'urine des nouveaux-nés, nous a obligé à dépister un déficit en B12 uniquement à partir d'échantillons de sang récoltés via les cartes de Guthrie. Cependant, la méthode d'analyse du MMA sanguin depuis les Guthries (*dried blood spot*) n'étant pas, à ce moment-là, complètement prête, cela a entraîné le rappel de patient à distance du prélèvement, ne permettant plus, dans le cas d'un sujet, de mettre en évidence son déficit en B12, engendrant ainsi un faux-positif « douteux ». En outre, du fait du développement récent de la méthode *dried blood spot* par les laboratoires du CHUV, aucun cut-off de référence pour un déficit en vitamine B12 chez le nouveau-né pour des valeurs de MMA sanguin n'existe. Nous nous sommes donc basés sur les valeurs de référence pour un MMA plasmatique. Cependant, 93 nouveau-nés sur 100 avaient des taux sanguins de MMA inférieurs à la limite de détection de la méthode (240 nmol/l), ce

qui amène à conclure que la valeur de référence est probablement autour de cette limite, au vu que pratiquement tous les « outliers », ainsi que leurs mamans, avaient un déficit en vitamine B12. Pour finir, comme tous les sujets de l'étude ont été traités pour des raisons éthiques, il nous est impossible de suivre ces sujets afin d'observer s'ils développent un trouble moteur ou alors s'ils corrigent naturellement leur déficit. De plus, le manque d'homogénéité dans le traitement reçu des sujets de l'étude prospective, ne nous permet pas d'établir de protocole de prise en charge pour un tel déficit.

A la suite de ces quelques recommandations et limitations, nous concluons en précisant que cette étude est une étude pilote dont des résultats pertinents ouvrent la possibilité à une poursuite de l'étude. Il serait intéressant d'investiguer si, en l'absence d'un traitement du déficit en vitamine B12, les nourrissons développent des problèmes moteurs par la suite. La méthode de dépistage d'un déficit en vitamine B12 (par le prélèvement de sang lors du Guthrie puis dosage du MMA par la méthode du dried blood spot) semble suffisamment simple pour réunir un collectif de 200 nouveau-nés sains. Ainsi, parmi ce collectif, ceux présentant un déficit en B12 pourraient être séparés en deux groupes, « traitement » et « placebo », nous permettant dès lors d'observer au long-terme l'évolution du status psychomoteur du petit enfant et d'évaluer les bénéfices d'un traitement vitaminique. En outre, une telle étude nous permettrait aussi de récolter les données de toutes les mères sur leur prise de vitamines durant la grossesse et ainsi appuyer notre position sur l'importance de ces compléments pour protéger le nouveau-né d'un déficit en B12 et ses répercussions.

7 Remerciements

////////////////////////////////////
Cette étude a été réalisée grâce à la collaboration du Prof. Patrick Hohlfeld, chef du Département de Gynécologie et Obstétrique, ainsi que les sages femmes de la Maternité du CHUV, que nous remercions chaleureusement.

L'équipe Innovation et Développement du laboratoire de Biomédecine du CHUV, particulièrement le Dr Hugues Henry et Dr René Nellen, a mis au point, pour cette étude, la méthode de dosage du MMA sanguin sur dried blood spot. Nous sommes très reconnaissants pour leur disponibilité, leur temps et leurs compétences précieuses mises à service de notre étude. Nous remercions également le Dr Olivier Boulat du Service de Biomédecine et le Dr Braissant, expert de ce travail de Master et les Dresses Garcia-Segarra et Diana Balhausen pour le suivi des enfants détectés dans l'étude prospective. A titre personnel, je remercie vivement M. Christophe Compondu pour son aide dans la mise en page de ce travail. Enfin, les derniers remerciements vont à la Professeur Luisa Bonafé pour ses conseils avisés et son temps mis à disposition.

8 Sources bibliographiques



1. Karademir, S., et al., *Vitamin B12, folate, homocysteine and urinary MMA levels in infants*. Journal of medical Research, 2007. 35(3): p.384-8
2. Hussein, A., et al., *Serum vit. B12 concentrations among mothers and newborns and follow-up study to assess implication on the growth velocity and the urinary MMA excretion*. International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 2009. 79(5-6): p.297-307
3. O. Boulat, R. et al., *Marqueurs biologiques des statuts vitaminiques B12 et D: aspects analytiques d'importance clinique*. Revue médicale suisse, 2012. 8 : p. 2052-8
4. Stabler, *Vitamin B12 deficiency*. New England Journal, 2013. 368 : p.149-60
5. Herrmann and Obeid, *Utility and limitations of biochemical markers of vitamin B12 deficiency*. European Journal of Clinical Investigation, 2013. 43: p.231-237
6. Berg, S. et al., *Laboratory evaluation for Vitamin B12 deficiency: the case for Cascade Testing*. Clinical Medicine & Research, 2013. 11(1): p.7-15
7. Bjorke mosen et al., *Determinants of Cobalamin Status in Newborns*. Pediatrics, 2001. 108 : p.624-9
8. Hogeveen, van B., et al., *Methylmalonic acid values in healthy Dutch children*. European Journal Nutrition, 2007. 47 : p. 26-31
9. O. Boulat et al., *Pediatrics organic acids reference values*. Clinical Chemistry and laboratory Medicine, 2003. 41(12): 1642-1658
10. G. Lamarca et al., *Rapid 2nd-Tier Test for Measurement of 3-OH-Propionic and Methylmalonic Acids on Dried Blood Spots*. Clinical chemistry, 2007. 53 :7: p.1364-1369
11. Y. Jacquemyn et al., *Vitamin B12 and folic acid status of term pregnant women and newborns in the Antwerp region, Belgium*, Clin Exp Obstet Gynecol. 2014;41(2):141-3
12. E. Scolamiero et al., *Maternal vitamin B12 deficiency detected in expanded newborn screening*, Clin Biochem. 2014 Sep 7
13. Z. Kalay et al., *Reliable and powerful laboratory markers of cobalamin deficiency in the newborn: plasma and urinary methylmalonic acid*, J Matern Fetal Neonatal Med, 2014 Dec 5:1-4.

9 Annexes

Tableau 3 MMAu et vitamine B12 sanguine

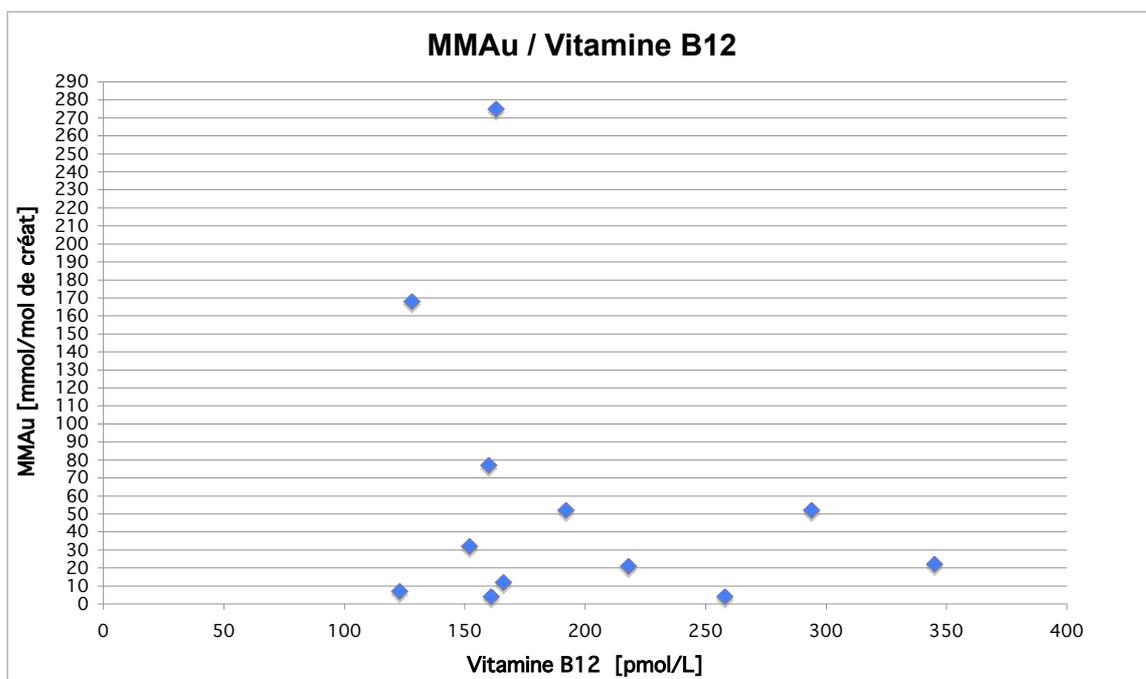


Tableau 4 MMAp et vitamine B12 sanguine

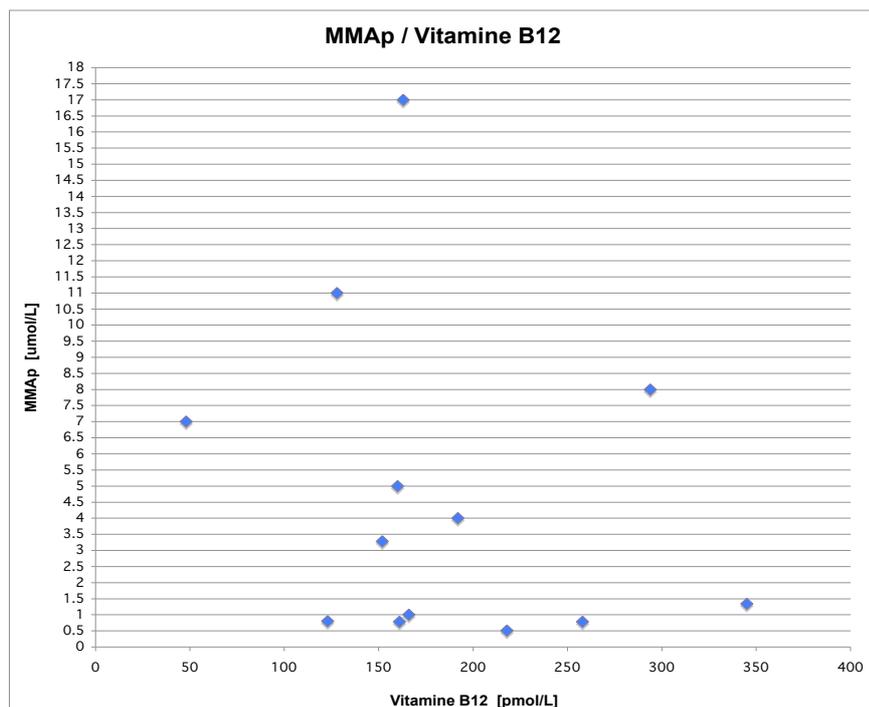


Tableau 5 Parité et statut vitaminique

