

**MÉMOIRE**  
**DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE**  
**BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le jury interrégional

Le 14 Septembre 2021

Par Justine Blin

**Conformément aux dispositions du Décret n°2012-172 du 3 février 2012**

**THÈSE**  
**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**DOSAGE DE L'HOMOCYSTÉINE : ANALYSE DES PRESCRIPTIONS  
AU CHU DE NANTES DE 2014 À 2020 ET EXAMEN CRITIQUE DES  
BONNES PRATIQUES CLINICO-BIOLOGIQUES**

Président du jury : Dr Edith Bigot-Corbel

Membres du jury :

Pr Damien Masson (directeur de thèse)

Dr Alice Kuster (co-encadrante)

Dr Thomas Dejoie

# TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	1
REMERCIEMENTS .....	4
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	5
LISTE DES FIGURES .....	7
LISTE DES TABLEAUX .....	8
INTRODUCTION.....	9
I. PARTIE I : REVUE DE LA LITTERATURE .....	10
I.1. L'homocystéine .....	10
I.1.1. Structure chimique de l'homocystéine.....	10
I.1.2. Métabolisme de l'homocystéine .....	10
I.1.2.1. Voie de la reméthylation de l'homocystéine .....	11
I.1.2.2. Voie de transsulfuration de l'homocystéine .....	12
I.1.2.3. Régulation de la synthèse de l'homocystéine .....	13
I.1.3. Les vitamines impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine.....	14
I.1.3.1. Les folates (vitamine B9).....	14
I.1.3.2. La vitamine B12.....	15
I.1.3.3. La vitamine B6.....	17
I.2. Dosage de l'homocystéine.....	18
I.2.1. Les différentes formes de l'homocystéine .....	18
I.2.2. Conditions pré-analytiques pour le dosage de l'homocystéine.....	20
I.2.3. Méthodes de dosage de l'homocystéine plasmatique .....	20
I.2.3.1. Dosage par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la spectrométrie de masse .....	20
I.2.3.2. Dosage par Immunonéphélométrie .....	21
I.2.3.3. Comparaison des différentes méthodes de dosages de l'homocystéine .....	22
I.2.3.4. Dosage de l'homocystéine au Laboratoire de biochimie du CHU de Nantes.....	22
I.2.4. Facteurs influençant la concentration en homocystéine totale .....	23
I.3. Hyperhomocystéinémies .....	25

I.3.1. Les altérations de la voie de la reméthylation.....	25
I.3.1.1. Défaut de synthèse de 5-méthyltétrahydrofolate .....	26
I.3.1.2. Défaut de synthèse de la méthylcobalamine .....	27
I.3.2. Les altérations de la voie de la transsulfuration.....	28
I.3.2.1. L’homocystinurie classique ou déficit en cystathionine $\beta$ -synthase (CBS).....	28
I.3.2.2. Déficit en Cystathionine $\gamma$ Lyase .....	32
I.3.2.3. Déficit en Vitamine B6 .....	32
I.3.3. Mécanismes physiopathologiques de l’hyperhomocystéinémie.....	33
I.4. Conséquences d’une élévation modérée de l’homocystéine .....	35
I.4.1. Hyperhomocystéinémie et facteurs de risque cardiovasculaire .....	35
1.4.1.2. Historique .....	35
I.4.1.2. Actuellement vers un consensus ? .....	38
I.4.2. Hyperhomocystéinémie modérée et grossesse.....	38
I.4.3. Hyperhomocystéinémie modérée et dépression.....	38
I.4.4. Hyperhomocystéinémie modérée et maladie de Parkinson .....	39
I.4.5. Hyperhomocystéinémie modérée et pathologies rénales .....	41
I.4.5. Recommandations en 2021 .....	42
I.5. Problématique.....	44
II. PARTIE II : ANALYSE DES PRESCRIPTIONS DU DOSAGE DE L’HOMOCYSTÉINE À NANTES ENTRE 2014 ET 2020 .....	45
II.1. Recueil de données.....	45
II.2. Analyse des résultats .....	45
II.2.1 Services prescripteurs .....	46
II.2.2. Indications de prescription du dosage de l’homocystéine .....	47
II.2.3. Informations sur les patients.....	49
II.2.4. Evolution des prescriptions entre 2014 et 2020.....	50
II.2.5. Répartition des valeurs de dosage d’homocystéine.....	50
II.2.5.1. Hyperhomocystéinémies sévères.....	51
II.2.5.2. Hyperhomocystéinémies intermédiaires.....	55

II.2.6. Prescription d'homocystéinémie dans le bilan de thrombose artérielle ou veineuse .....	56
III. PARTIE III : À PROPOS DE CAS D'HYPERHOMOCYSTÉINÉMIE .....	59
III.1. Cas clinique numéro 1 .....	59
III.2. Cas clinique numéro 2 .....	60
III.3. Cas clinique numéro 3 .....	62
IV. PARTIE IV : DISCUSSION .....	64
IV.1. Synthèse .....	64
IV.2. Proposition d'aide à la prescription et à l'interprétation du dosage de l'homocystéine .....	66
IV.2.1. Quand doser l'homocystéine totale ? .....	66
IV.2.1.1. Devant la suspicion de maladie héréditaire du métabolisme ....	66
IV.2.1.2. Dans l'exploration d'un déficit en vitamine B12 : anémie ou symptomatologie neurologique .....	67
IV.2.1.3. Dans l'évaluation et la prévention du risque cardiovasculaire .	68
IV.2.2. Comment interpréter le dosage de l'homocystéine plasmatique ? Proposition d'arbre décisionnel .....	69
CONCLUSION .....	72
ANNEXES.....	72
BIBLIOGRAPHIE.....	79
SERMENT DE GALIEN .....	87
SIGNATURES .....	88

## REMERCIEMENTS

**Au Docteur Edith Bigot-Corbel**, vous me faites l'honneur de présider le jury de ma thèse. Je vous remercie d'avoir accepté cette invitation et je vous remercie pour l'intérêt que vous portez à ce travail.

**Au Professeur Damien Masson**, directeur de thèse, merci de m'avoir proposé ce sujet et d'avoir encadré ce travail. Et plus généralement, merci de m'avoir accueillie dans le service de Biochimie, formée et orientée pendant toute la durée de mon internat en biochimie.

**Au Docteur Alice Kuster**, co-encadrante de ce travail de thèse, merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Merci pour votre relecture minutieuse, mais également pour votre disponibilité, vos conseils en métabolique et vos observations toujours pertinentes.

**Au Docteur Thomas Dejoie**, juge de cette thèse, merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Merci pour l'aide apportée pour le recueil de données.

**Au Service de Biochimie du CHU de Nantes**, merci de m'avoir accueillie parmi vous et donné le goût de la biochimie !

**Au Service de Maladie héréditaire du métabolisme du CHU de Lyon**, merci de m'avoir initiée aux MHM, spécialité complexe mais tellement intéressante ! Merci pour toutes les connaissances que vous m'avez transmises et pour votre accueil chaleureux.

**A mes Parents**, merci de m'avoir toujours encouragée à poursuivre mes études, de m'avoir soutenue et supportée tout au long de cette longue scolarité.

**A ma sœur Camille**, merci de me faire réfléchir sur d'autres sujets que l'homocystéine.

**A mes amis de toujours**, Adeline et Anouk, merci d'être là depuis de nombreuses années, de m'avoir soutenue, supportée, jamais jugée. Merci de m'avoir permis de grandir avec vous. Merci également à tous les Ignissois, Biévrais, Massicois, avec qui j'ai passé de très belles années.

**A mes amis de Pharma PXI**, Laurène évidemment, mon binôme ! Mais aussi Morane, Elodie, Anne, Geoffrey, Marion, Clémence merci pour ces cinq années de fac, riches en rencontres, découvertes, expériences, mais aussi en travail.

**A tous mes compagnons de route, internes de toutes spécialités, Nantais, Brestois, Lyonnais** mais pas que. Ces six dernières années ont été certainement les plus riches de ma vie. Merci pour tout, l'internat n'aurait pas eu le même goût sans vous. Une pensée particulière pour Maeva, Pierre, Constance, Apolline, Lucie, Martin, Antoine, Clémentine, Frédéric et Alizée.

Et enfin **aux Nantais**, merci d'être là, merci de ne pas être des médecins, et d'être toujours partants pour tout : surf, vélo, soirées, pique-niques, rando, trip et compagnie. Avec vous je ne suis pas prête de m'ennuyer, et les problèmes de l'hôpital restent à l'hôpital.

## **LISTE DES ABBREVIATIONS**

ACOG : The American College of Obstetricians and Gynecologists

AMM : Acide méthylmalonique

AVC : Accident vasculaire cérébral

BHMT : Bétaïne-homocystéine méthyltransférase

Cbl : Cobalamine

CBS : Cystathionine  $\beta$ -synthase

COMT : Catéchol-O-méthyl transférase

CRTH : Le Centre Régional de Traitement de l'Hémophilie

CV : Coefficient de variation

C $\gamma$ L : Cystathionine  $\gamma$ -lyase

DHF : Dihydrofolate

DHFR : Dihydrofolate réductase

EEG : Electro encéphalogramme

GC-MS : Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

HAS : Haute Autorité de Santé

HDJ : Hôpital de jour

IMC : Indice de masse corporelle

KO : Knock out

LDL : Low density lipoprotéine

LC-MS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

MAT : Méthionine adénosyl transférase

MHM : Maladies héréditaires du métabolisme

MS : Méthionine synthase

MTEV : Maladie thromboembolique veineuse

MTHFR : 5,10 Méthylène Tétrahydrofolate Réductase

NEJM : The New England Journal of Medicine

NOS : Oxyde nitrique synthase

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PLP : Pyridoxal phosphate et la pyridoxamine phosphate

PMA : Procréation médicalement assistée

PMI : Protection maternelle infantile

PNDS : Protocoles nationaux de diagnostic et de soins

QI : Quotient intellectuel

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

SAHH : S-adénosylhomocystéine hydrolase

SAC : S-adénosyl cystéine

SAH : S-adénosylhomocystéine

SAM : S-adénosyl méthionine

SFEIM : Société française pour l'étude des erreurs innées du métabolisme

SHU : Syndrome hémolytique et urémique

TC-Cbl : transcobalamine associé à l'hydroxycobalamine

THF : Tétrahydrofolate

## LISTE DES FIGURES

Figure 1- Structure chimique de l'Homocystéine .....	10
Figure 2 - Structures chimiques de la Méthionine, de l'Homocystéine et de la Cystéine .....	10
Figure 3 - Représentation synthétique du métabolisme de l'homocystéine .....	11
Figure 4 – Schéma de la voie de la reméthylation de l'homocystéine.....	12
Figure 5 – Schéma de la voie de transsulfuration de l'homocystéine.....	13
Figure 6 – Structure chimique de l'acide folique .....	14
Figure 7 - Métabolisme à un carbone, dépendant des folates selon Ebara (2017)(13) .....	15
Figure 8 - Structure chimique de la vitamine B12 ou Cobalamine .....	16
Figure 9 – Métabolisme intracellulaire de la vitamine B12, selon Lemoine (16).....	17
Figure 10 - Structure chimique des différentes formes de la vitamine B6 (19).....	17
Figure 11 - Représentation des différentes formes circulantes de l'homocystéine d'après Demuth (2000)(21).....	19
Figure 12 - Principe du dosage immunonéphélométrique par compétition de l'homocystéine totale .....	21
Figure 13 – Performances analytiques .....	23
Figure 14 - Orientation diagnostique selon le niveau de l'hyperhomocystéinémie, d'après Douillard (SFEIM 2017)(31) .....	25
Figure 15 - Représentation schématique des altérations de la voie de la reméthylation.....	26
Figure 16 - Représentation schématique des altérations de la voie de la transsulfuration .....	28
Figure 17 - Mécanismes hypothétiques de la pathogénicité de l'hyperhomocystéinémie, d'après Demuth (2000)(21).....	34
Figure 18 - Risque relatif de maladies cardiovasculaires chez les patients homozygotes TT versus CC pour le gène MTHFR d'après Clarke (2012)(67).....	37
Figure 19- Métabolisme de la L-DOPA .....	40
Figure 20 - Répartition des services prescripteurs de dosages d'homocystéine.....	46
Figure 21 - Indications des prescriptions de dosage d'homocystéine .....	49
Figure 22 - Age au moment du dosage, toutes indications confondues .....	49
Figure 23 - Evolution de la prescription du dosage de l'homocystéine entre 2014 et 2020.....	50
Figure 24 - Résultats des dosages de l'homocystéine.....	51
Figure 25 - Analyse des étiologies des hyperhomocystéinémies intermédiaires entre 50 et 100 $\mu\text{mol/L}$ .....	55
Figure 26 - Répartition des valeurs d'homocystéinémie pour l'indication "exploration de thrombose artérielle ou veineuse" .....	57

Figure 27 - Proposition d'arbre décisionnel pour aide à l'interprétation d'une hyperhomocystéinémie.....	71
--	----

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 – Contexte clinique des hyperhomocystéinémies sévères entre 2014 et 2020.....	54
Tableau 2 – Contexte clinique des hyperhomocystéinémies intermédiaires prescrites pour l'exploration de thrombose.....	58

# INTRODUCTION

L'homocystéine est un acide aminé soufré situé au carrefour de voies métaboliques essentielles. Elle sert d'intermédiaire dans le métabolisme de la méthionine. Son rôle dans la méthylation de nombreux substrats en fait un acteur essentiel du métabolisme cellulaire.

Le dosage de l'homocystéine est un paramètre de biochimie qui fût longtemps considéré comme un facteur de risque cardiovasculaire. Largement prescrit dans des situations cliniques variées, son augmentation peut résulter de diverses causes acquises ou génétiques. On définit trois situations selon la sévérité de cette augmentation : les hyperhomocystéinémies modérées (15 à 30 $\mu$ mol/L), les hyperhomocystéinémies intermédiaires (30 à 100 $\mu$ mol/L) et les hyperhomocystéinémies sévères (au-delà de 100 $\mu$ mol/L). Les hyperhomocystéinémies ont été largement étudiées et les recommandations concernant la prescription de ce dosage ont récemment évolué.

Dans ce travail de thèse, on analyse la prescription du dosage de l'homocystéine et les situations d'hyperhomocystéinémies afin de proposer, au regard des recommandations actuelles, un cadre pour la bonne prescription et la bonne interprétation de ce paramètre, au CHU de Nantes.

# I. PARTIE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE

## I.1. L'homocystéine

### I.1.1. Structure chimique de l'homocystéine

L'homocystéine est un acide aminé soufré découvert en 1933 par le chimiste Vincent Du Vigneaud. C'est un acide aminé non protéinogène, il n'entre pas dans la composition des protéines. En effet l'homocystéine n'est pas représentée au sein du code génétique (1). La structure de l'homocystéine est présentée en figure 1. L'homocystéine contient un groupement thiol formé par la déméthylation de la méthionine (2), une fonction amine et une fonction acide carboxylique.



Figure 1- Structure chimique de l'Homocystéine

### I.1.2. Métabolisme de l'homocystéine

L'homocystéine n'est pas apportée par l'alimentation et la seule source connue d'homocystéine dérive du métabolisme de la méthionine, acide aminé essentiel (2). L'homocystéine est synthétisée par toutes les cellules de l'organisme. Elle apparaît comme un intermédiaire de synthèse entre la méthionine et la cystéine, acides aminés avec lesquelles elle partage une structure chimique proche, comme le montre la figure 2.

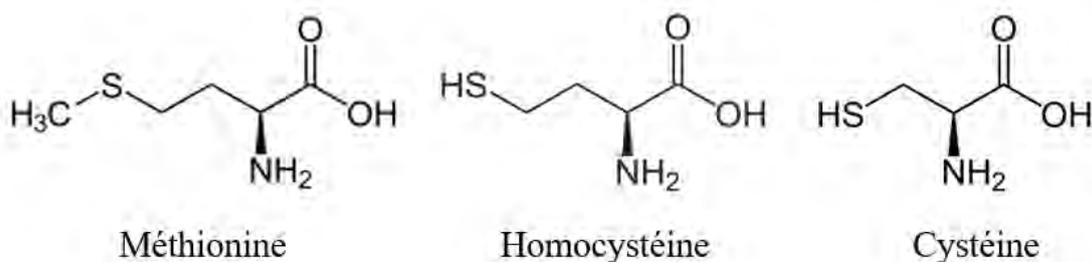


Figure 2 - Structures chimiques de la Méthionine, de l'Homocystéine et de la Cystéine

L'homocystéine se trouve à un carrefour métabolique car elle peut être métabolisée de deux façons, soit par reméthylation en méthionine, soit par transsulfuration en cystéine (Figure 3).

La S-adénosyl méthionine (SAM) est le premier métabolite intermédiaire entre la méthionine et l'homocystéine. Elle est obtenue par transfert d'un groupe adénosyl issu de l'ATP sur l'atome de soufre de la méthionine. Cette réaction est catalysée par la méthionine adénosyl transférase (MAT, EC 2.5.1.6). La SAM est le principal donneur de méthyle pour l'organisme, elle est indispensable au maintien de la méthylation cellulaire (ADN, ARN, protéines, lipides). Ce transfert de groupement méthyle est catalysé par des méthyltransférases et aboutit à la production de S-adénosylhomocystéine (SAH). La S-adénosylhomocystéine hydrolase (SAHH, E.C 3.3.1.1) catalyse la réaction de conversion de la SAH en homocystéine et adénosine, réaction réversible (3).

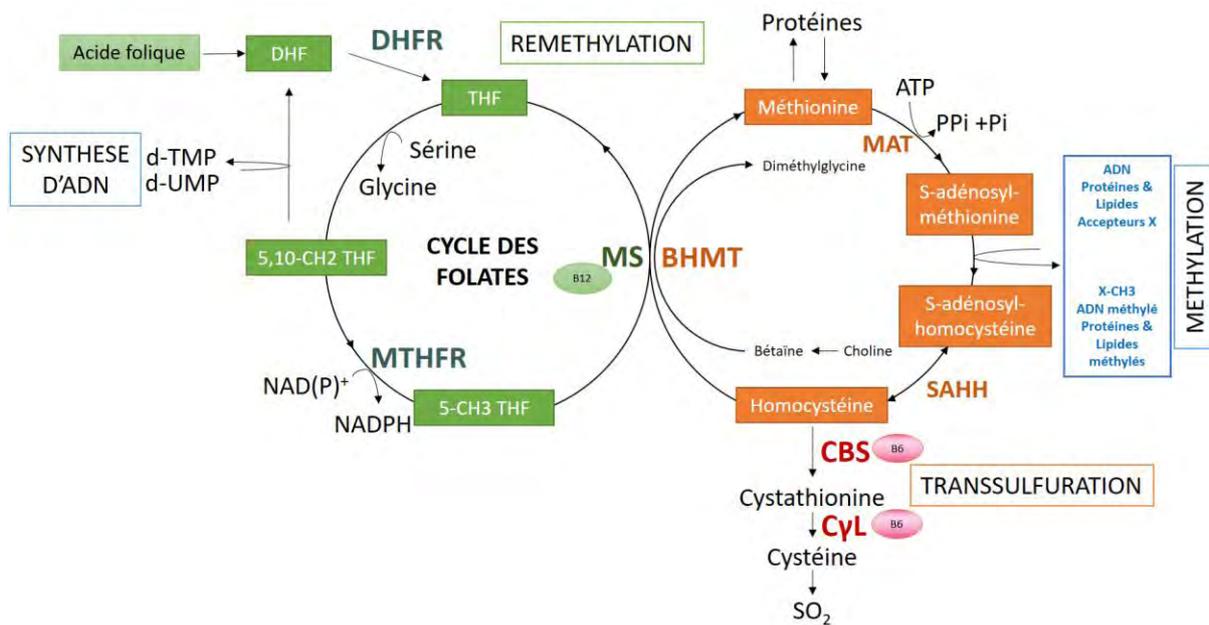


Figure 3 - Représentation synthétique du métabolisme de l'homocystéine

DHF : Dihydrofolate ; THF : Tétrahydrofolate ; DHFR : Dihydrofolate réductase ; MS : Méthionine synthase ; BHMT : Bétaïne-Homocystéine Méthyltransférase ; MTHFR : 5,10 Méthylène Tétrahydrofolate Réductase ; CBS : Cystathionine  $\beta$  Synthase ; C $\gamma$ L : Cystathionine  $\gamma$ -Lyase ; MAT : méthionine adénosyl transférase ; SAHH : S-adénosylhomocystéine hydrolase

### 1.1.2.1. Voie de la reméthylation de l'homocystéine

La voie de la reméthylation permet de maintenir le pool cellulaire de méthionine. Elle est favorisée en situation de restriction protéique car c'est une voie de recyclage de l'homocystéine en méthionine. Il existe deux voies de reméthylation, une voie ubiquitaire et une voie restreinte au foie.

La principale voie de reméthylation a lieu dans toutes les cellules et fait intervenir deux enzymes : la méthionine synthase (MS, EC 2.1.1.13) et la 5,10 méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR, EC 1.5.1.20). La MS permet le transfert d'un groupement méthyle depuis le 5-méthyl tétrahydrofolate vers l'homocystéine afin de former la méthionine. Pour cette

réaction, la MS nécessite un cofacteur essentiel, la méthylcobalamine. Afin de former la méthylcobalamine, la vitamine B12 reçoit temporairement le méthyle du 5-méthyl tétrahydrofolate avant de le transférer sur l'homocystéine, comme illustré sur la figure 4 (4). La MTHFR intervient dans le cycle des folates et permet de régénérer le 5-méthyltétrahydrofolate. C'est une oxydoréductase qui catalyse la transformation du 5, 10-méthylènetétrahydrofolate en 5-méthyltétrahydrofolate. Elle utilise le NADH ou le NADPH comme coenzyme d'oxydoréduction (5).

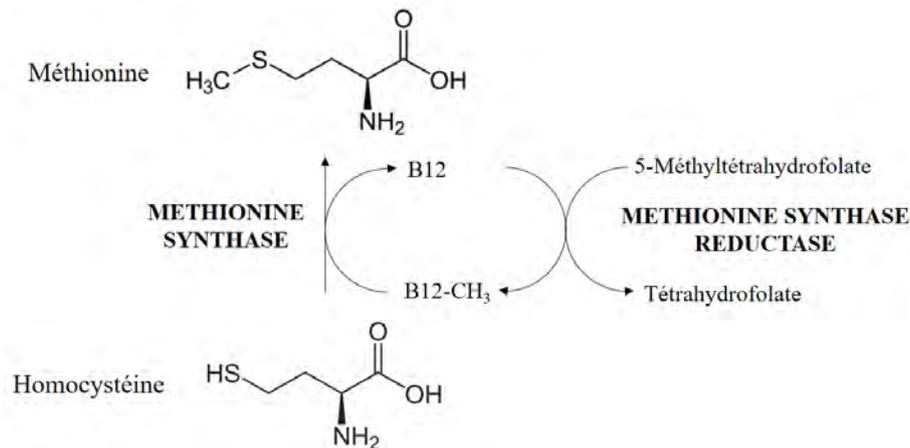


Figure 4 – Schéma de la voie de la reméthylation de l'homocystéine

La seconde voie de reméthylation fait intervenir la bêtaïne homocystéine méthyltransférase (BHMT, EC 2.1.1.5), métalloenzyme dépendante du zinc dont l'expression est limitée au foie et aux reins, qui sont les organes qui concentrent le stock de bêtaïne (6,7). La bêtaïne provient de l'alimentation et du catabolisme mitochondrial hépatique et rénal de la choline. La BHMT catalyse le transfert d'un groupement méthyle à partir de la bêtaïne, donneur de méthyle vers l'homocystéine pour produire la méthionine et le diméthylglycine.

#### 1.1.2.2. Voie de transsulfuration de l'homocystéine

En conditions physiologiques, la majorité de l'homocystéine n'est pas reméthylée mais catabolisée par la voie de la transsulfuration. Il s'agit d'une voie d'épuration de l'homocystéine, elle fait intervenir consécutivement la cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS, EC 4.2.1.22), et la cystathionine  $\gamma$ -lyase (C $\gamma$ L, EC 4.4.1.1). La CBS catalyse la condensation de l'homocystéine avec la sérine pour former la cystathionine. Elle a pour cofacteur obligatoire le phosphate de pyridoxal. Puis la cystathionine est transformée par la C $\gamma$ L en cystéine et  $\alpha$ -cétobutyrate (Figure 5). La C $\gamma$ L est également une enzyme nécessitant la vitamine B6 comme cofacteur. Contrairement à la voie de la reméthylation, la voie de la transsulfuration est irréversible. La cystéine n'est pas précurseur de la synthèse de méthionine (8).

La CBS est exprimée principalement dans le foie, le pancréas, les reins et le cerveau (8). La CBS possède un domaine qui lie la SAM, son régulateur allostérique.

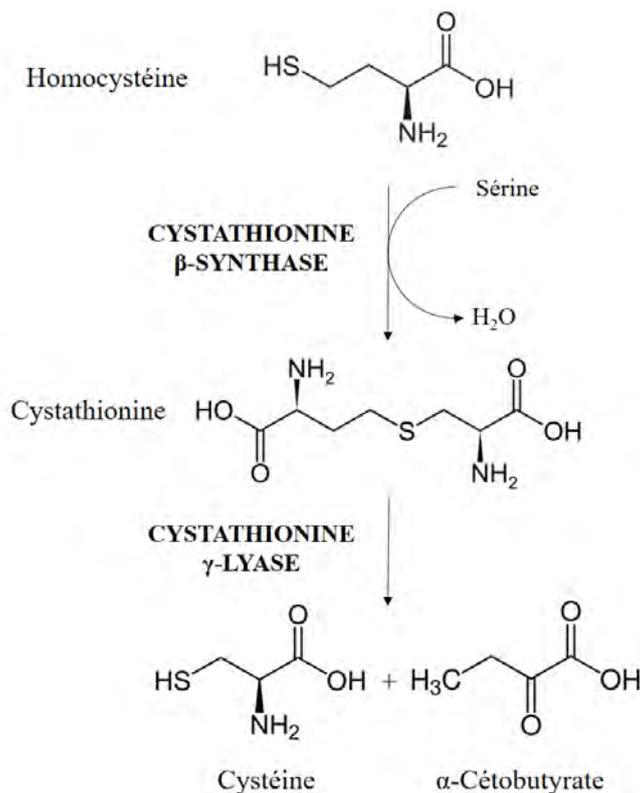


Figure 5 – Schéma de la voie de transsulfuration de l'homocystéine

### 1.1.2.3. Régulation de la synthèse de l'homocystéine

La coordination entre les voies de reméthylation et de transsulfuration est assurée par la SAM. En effet la SAM joue un rôle de modulateur allostérique de la MTHFR et de la CBS. En cas d'apport protéique excessif, la voie de la transsulfuration est favorisée par un rétrocontrôle positif de la SAM sur la CBS et par un rétrocontrôle négatif de la SAM sur la MTHFR (9,10). Dans ce cas, la cystéine formée à partir de l'homocystéine est incorporée dans le cycle du glutathion ou convertie en sulfates qui sont excrétés dans les urines. A l'inverse, en cas de déficit protéique, la voie de la reméthylation est favorisée et l'homocystéine est recyclée afin de maintenir un pool cellulaire suffisant de méthionine. Dans les deux cas, l'homocystéine est métabolisée dès sa formation et sa concentration intracellulaire demeure faible (de l'ordre de 5 nmol/g de tissu).

Dans les conditions physiologiques, l'homocystéinémie est également faible puisque l'homocystéine plasmatique dérive du métabolisme cellulaire. En revanche, tout déficit portant sur l'un des systèmes enzymatiques impliqués dans le métabolisme de l'homocystéine peut entraîner une augmentation de sa concentration cellulaire, plasmatique et urinaire.

Il existe également une régulation de la concentration intracellulaire en SAM grâce à différentes isoformes de la MAT. En effet il existe trois isoformes de la MAT ayant des affinités plus ou moins fortes pour la méthionine. L'expression des différents isoformes de la MAT est modulée par la concentration intracellulaire en SAM (11).

### I.1.3. Les vitamines impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine

#### I.1.3.1. Les folates (vitamine B9)

Les « folates », ou vitamine B9, est un terme générique comprenant différents composés chimiques appartenant à une même famille. Ils sont composés d'un cycle ptéridine qui peut être réduit ou oxydé, de l'acide p-aminobenzoïque et d'une chaîne polyglutamate plus ou moins longue (12) (Figure 6). La vitamine B9 est apportée par l'alimentation, on la retrouve dans de nombreux aliments comme les légumes verts, les légumineuses, certaines céréales, le foie, la levure alimentaire, ou encore dans le jaune d'œuf (13). L'acide folique est la forme monoglutamate oxydée, qui est rarement présente dans la nature. Dans les aliments on retrouve plutôt des formes polyglutamates.

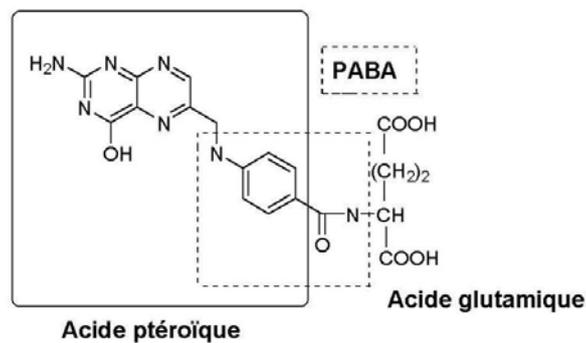


Figure 6 – Structure chimique de l'acide folique

L'absorption de la vitamine B9 se fait au niveau du duodénum et du jéjunum, après hydrolyse en monoglutamate. Il subit ensuite un cycle entéro-hépatique durant lequel il est retransformé en polyglutamate pour être distribué aux tissus périphériques (13).

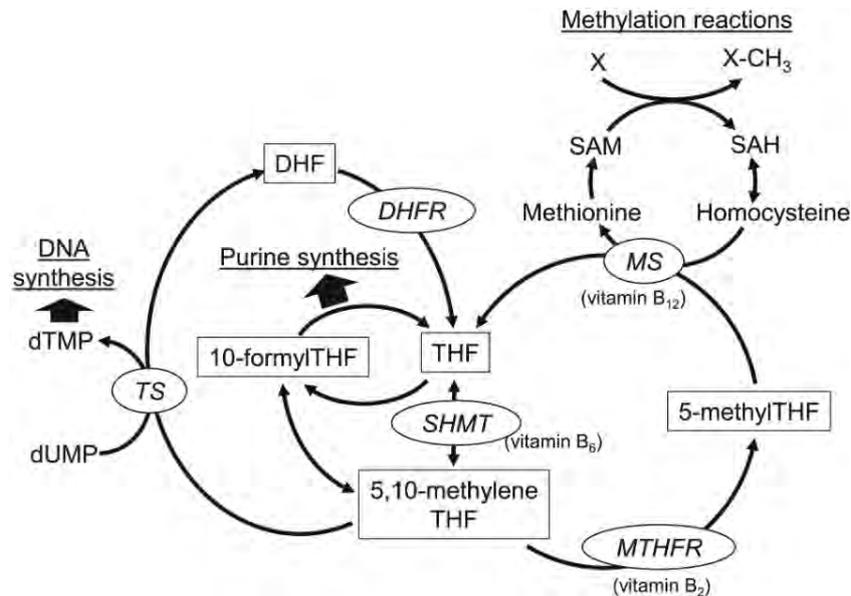


Figure 7 - Métabolisme à un carbone, dépendant des folates selon Ebara (2017)(13)

DHF, dihydrofolate ; DHFR, dihydrofolate réductase; MS, méthionine synthase; MTHFR, méthylène tétrahydrofolate réductase; SAH, S-adenosyl homocystéine; SAM, S-adenosyl méthionine; SHMT, sérine hydroxyméthyltransférase; THF, tétrahydrofolate; TS, thymidylate synthase; X, une variété de substrats pour la méthylation.

Les folates sont des accepteurs d'unités mono carbonées et fonctionnent comme co-enzymes impliqués dans la synthèse des purines et pyrimidines, ainsi que dans diverses réactions de méthylation, comme la synthèse de méthionine à partir de l'homocystéine par exemple. La forme active de l'acide folique est la forme réduite, le tétrahydrofolate (THF).

### 1.1.3.2. La vitamine B12

La vitamine B12 ou hydroxycobalamine (OHChl) est une vitamine hydrosoluble constituée d'un noyau tétrapyrol contenant un atome de Cobalt et sur lequel est fixée une queue ribonucléotidique qui fait liaison avec le cobalt (Figure 8). Elle existe sous plusieurs formes : cyanocobalamine, hydroxycobalamine (forme naturelle), méthylcobalamine et adénosylcobalamine, selon la composition de son radical R. La vitamine B12 est complètement absente du monde végétal, elle est présente dans les aliments d'origine animale et n'est synthétisée que par des certaines bactéries présentes dans la flore intestinale des ruminants. Certains non-ruminants (lapins, rongeurs, singes, éléphants) mangent des petites quantités de terre et leurs selles, ce qui leur permet de s'approvisionner en vitamine B12. La cyanocobalamine est une forme que l'on utilise dans les suppléments vitaminiques.

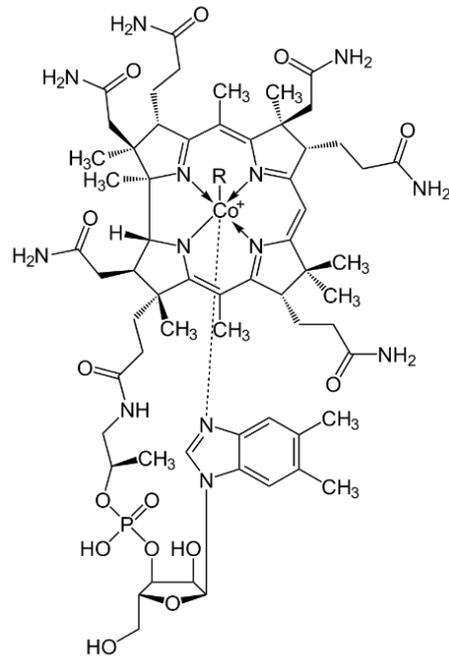


Figure 8 - Structure chimique de la vitamine B12 ou Cobalamine

Après ingestion, la vitamine B12 est libérée de ses protéines de transport par les enzymes digestives au niveau de l'estomac, elle est alors prise en charge par l'haptocorrine qui assure son transport jusqu'au duodénum et la protège de l'acidité gastrique. A ce niveau, les enzymes pancréatiques dégradent l'haptocorrine et la vitamine B12 se lie alors au facteur intrinsèque, synthétisé par les cellules pariétales gastriques. Le complexe Cobalamine-facteur intrinsèque est ensuite absorbé par les entérocytes via le récepteur cubilin, par un transport actif. Dans l'entérocyte, la cobalamine est libérée du facteur intrinsèque et se lie alors à la transcobalamine II (TC) puis est libérée dans la circulation sanguine. Le complexe TC-Cbl est capté par l'ensemble des tissus de l'organisme (14,15).

Le complexe TC-Cbl est absorbé par les cellules par transport actif via un récepteur spécifique (TCblR). Une fois internalisé, le complexe est digéré par le lysosome et l'hydroxycobalamine est libérée dans la cellule où elle est transformée par différentes enzymes, notamment la Cbl C et la Cbl D, pour former la méthylcobalamine (MeCbl) cofacteur de la méthionine synthase et l'adénosylcobalamine (AdoCbl) cofacteur de la méthylmalonyl-CoA mutase (Figure 9).

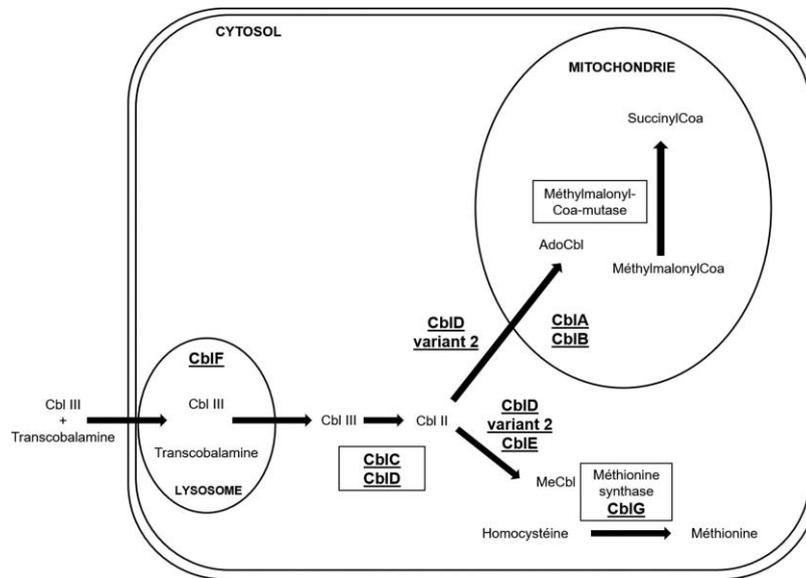


Figure 9 – Métabolisme intracellulaire de la vitamine B12, selon Lemoine (16)

AdoCbl, adénosylcobalamine ; CoA, coenzyme A; MeCbl, méthylcobalamine ; Cbl III, hydroxycobalamine

### 1.1.3.3. La vitamine B6

La vitamine B6 ou pyridoxine est une vitamine hydrosoluble présente dans de nombreux aliments comme les œufs, les céréales, les fruits et légumes, les viandes et poissons gras (17). Elle est présente dans la nature sous trois formes : la pyridoxine, le pyridoxal et la pyridoxamine (Figure 10). Les formes actives sont les formes phosphatées PLP (pyridoxal phosphate et la pyridoxamine phosphate) et la phosphorylation se fait par une kinase non spécifique.

Le PLP sert de coenzyme pour plus de 150 réactions, dont certaines sont cruciales notamment dans le métabolisme des acides aminés comme l'homocystéine, des protéines, des glucides et des lipides, ou encore dans la synthèse des neurotransmetteurs (18).

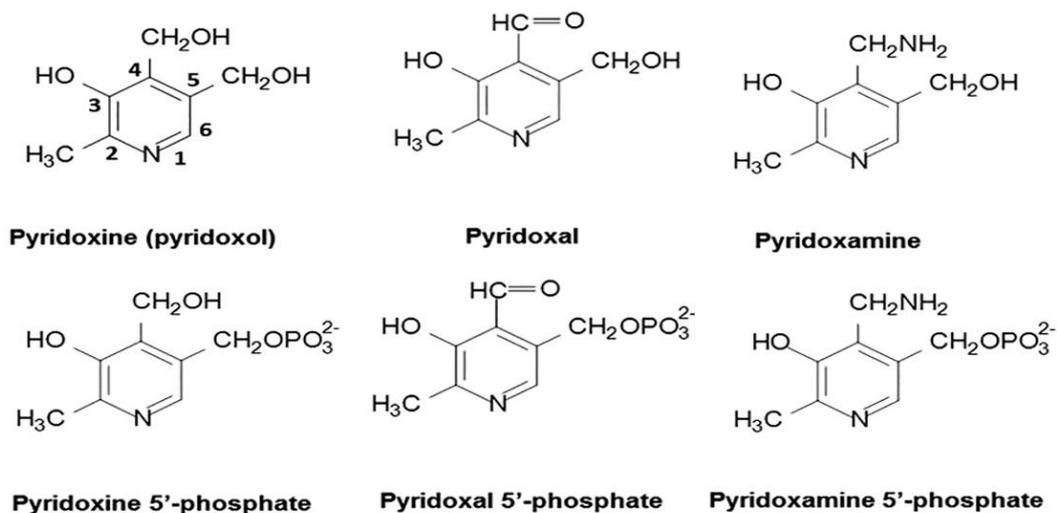


Figure 10 - Structure chimique des différentes formes de la vitamine B6 (19)

Ainsi, l'homocystéine se trouve à un carrefour métabolique essentiel. Elle sert à la conservation de la méthionine par la voie de la reméthylation, à la conversion de la méthionine en cystéine et ses dérivés via la voie de transsulfuration, au recyclage des folates et enfin au catabolisme de la choline. Son métabolisme fait intervenir de nombreuses enzymes ainsi que trois vitamines indispensables : les folates, la vitamine B12 et la vitamine B6. Le dosage de l'homocystéine totale permet d'appréhender l'intégrité des voies métaboliques impliquées.

## **I.2. Dosage de l'homocystéine**

### 1.2.1. Les différentes formes de l'homocystéine

On retrouve dans la circulation sanguine l'homocystéine sous forme libre ou sous forme liée aux protéines ainsi que des formes réduites et des formes oxydées. On entend par « homocystéine totale » l'ensemble de ces formes.

La forme libre et réduite constitue la L-homocystéine et n'est qu'une forme tout à fait minoritaire puisqu'elle représente seulement 1 à 2% de l'homocystéine totale (tHcy). Les formes oxydées d'homocystéine, dont une majorité sont liées aux protéines comme l'albumine ou l'hémoglobine, représentent habituellement 98 à 99% de l'homocystéine totale (20) (Figure 11). Parmi les formes oxydées de l'homocystéine, on retrouve la forme bisulfure, composée de deux molécules d'homocystéine regroupées par un pont disulfure, aussi appelée homocystine, ainsi que les formes disulfures mixtes comme le disulfure homocystéine-cystéine ou l'homocystéine thiolactone qui est un thioester cyclique. En situation physiologique, l'homocystine n'est présente qu'à l'état de traces, mais en situations d'hyperhomocystéinémie importante on peut retrouver de l'homocystine à la chromatographie des acides aminés plasmatiques et urinaires. Enfin, l'homocystéine peut être liée aux protéines par un pont disulfure ou par une liaison amide (1).

Au final, environ 80% de l'homocystéine est liée aux protéines et n'est donc pas filtrée par le rein. Les 20% restant est filtré par le rein, mais une majorité de l'homocystéine filtrée est catabolisée par les cellules tubulaires, ce qui explique que l'excrétion urinaire de l'homocystéine est très faible (3,5 à 10  $\mu\text{mol}/24\text{h}$ ) (21).

Lorsque l'on mesure la concentration en homocystéine totale plasmatique, on utilise un agent réducteur qui réduit tous les ponts disulfures et transforme ainsi toute l'homocystéine en forme

libre. Mais l'agent réducteur ne réduit pas la fonction thiolactone ni les ponts amides (N-Hcyprotéine). Le dosage de l'homocystéine n'inclut donc pas les formes thiolactones et liées aux protéines par liaison amide.

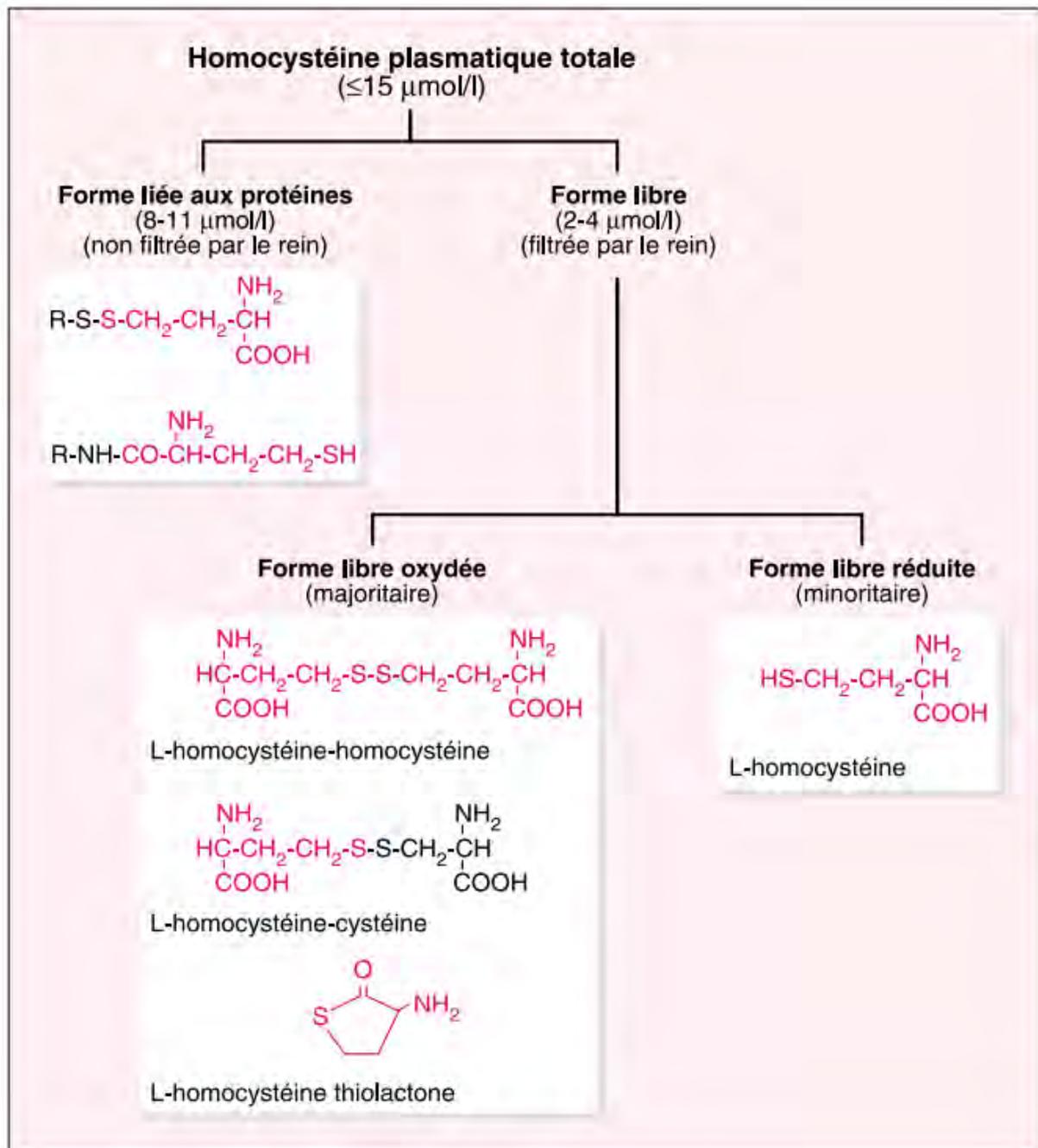


Figure 11 - Représentation des différentes formes circulantes de l'homocystéine d'après Demuth (2000)(21)

Les valeurs normales de l'homocystéine totale dans le plasma des adultes sains ont été déterminées dès 1993 par Ueland (22). La concentration physiologique est comprise entre 5 et 15  $\mu\text{mol/L}$ . On parle communément d'hyperhomocystéinémie modérée pour des valeurs d'homocystéine totale entre 15 et 30  $\mu\text{mol/L}$ , d'hyperhomocystéinémie intermédiaire pour des

valeurs allant de 30 à 100  $\mu\text{mol/L}$  et enfin d'hyperhomocystéinémie sévère quand l'homocystéine totale est supérieure à 100  $\mu\text{mol/L}$ .

### I.2.2. Conditions pré-analytiques pour le dosage de l'homocystéine

Les conditions pré-analytiques pour le dosage de l'homocystéine sont très importantes et leur non-respect peut entraîner des erreurs d'interprétation.

Le prélèvement doit être réalisé après un jeûne d'au moins 12h, en effet l'homocystéine totale est significativement diminuée après un repas (23). Le prélèvement doit être réalisé sur tube approprié selon les recommandations du laboratoire. Au laboratoire de biochimie du CHU de Nantes, l'analyse se fait sur tube EDTA. L'acheminement du prélèvement jusqu'au laboratoire doit être rapide, dans un délai inférieur à 1h et sur glace fondante.

Une fois arrivé au laboratoire, le prélèvement doit être rapidement centrifugé et décanté afin de séparer le plasma du culot globulaire car les hématies peuvent synthétiser et relarguer de l'homocystéine dans le plasma *in vitro*, ce qui risque d'augmenter artificiellement l'homocystéinémie. Une fois le plasma séparé du culot globulaire, la conservation de l'homocystéine est excellente, elle peut aller jusqu'à 4 jours à température ambiante, plusieurs semaines à 4°C et plusieurs années à -20°C (24).

### I.2.3. Méthodes de dosage de l'homocystéine plasmatique

Il existe une grande hétérogénéité dans les méthodes de dosages utilisées pour la détermination de l'homocystéine totale plasmatique. En effet, on retrouve à travers le territoire français des laboratoires utilisant des méthodes comme la chromatographie en phase gazeuse avec détection par spectrométrie de masse (GC-MS), la chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-SM), l'HPLC couplée à une détection par fluorimétrie, des méthodes immunoenzymatiques suivies d'une détection par polarisation de fluorescence (FPIA), l'immunonéphélométrie et enfin des méthodes enzymatiques en point final (25).

#### I.2.3.1. Dosage par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la spectrométrie de masse

Actuellement, la méthode de référence pour le dosage de l'homocystéine plasmatique est la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). La

spectrométrie de masse est une méthode d'identification des composés chimiques. Elle repose sur la détermination de la masse moléculaire des espèces chimiques présentes dans un échantillon. Elle est utilisée généralement en aval d'une technique séparative comme la chromatographie liquide (26).

Les avantages de la LC-MS résident dans la grande sensibilité et spécificité de cette méthode. Elle est utilisée dans de nombreux domaines d'application et est largement utilisée en biochimie métabolique. Cependant ce genre d'équipement est coûteux et leur disponibilité au sein des laboratoires n'est pas toujours compatible avec un rendu urgent de résultat. Comme toutes les techniques de dosage de l'homocystéine totale, une étape de réduction préalable est nécessaire afin de réduire les ponts disulfures.

### 1.2.3.2. Dosage par Immunonéphélémétrie

Le dosage de l'homocystéine par immunonéphélémétrie est un dosage par compétition. La méthode comprend une étape de réduction au dithiothreitol qui va permettre de réduire tous les ponts di-sulfure et libérer ainsi l'homocystéine. Ensuite l'homocystéine libre est convertie en présence d'adénosine et par l'action de la S-adénosyl-L-homocystéine hydrolase recombinante en SAH. La SAH entre en compétition avec la S-adénosyl cystéine (SAC) couplée pour se fixer sur des anticorps monoclonaux anti-SAH fixés à la surface de particules de polystyrène. Les particules de polystyrène ayant fixé la SAC conjuguée s'agrègent alors qu'en présence de SAH, les particules ne s'agrègent pas ou peu, comme illustré sur la figure 12.

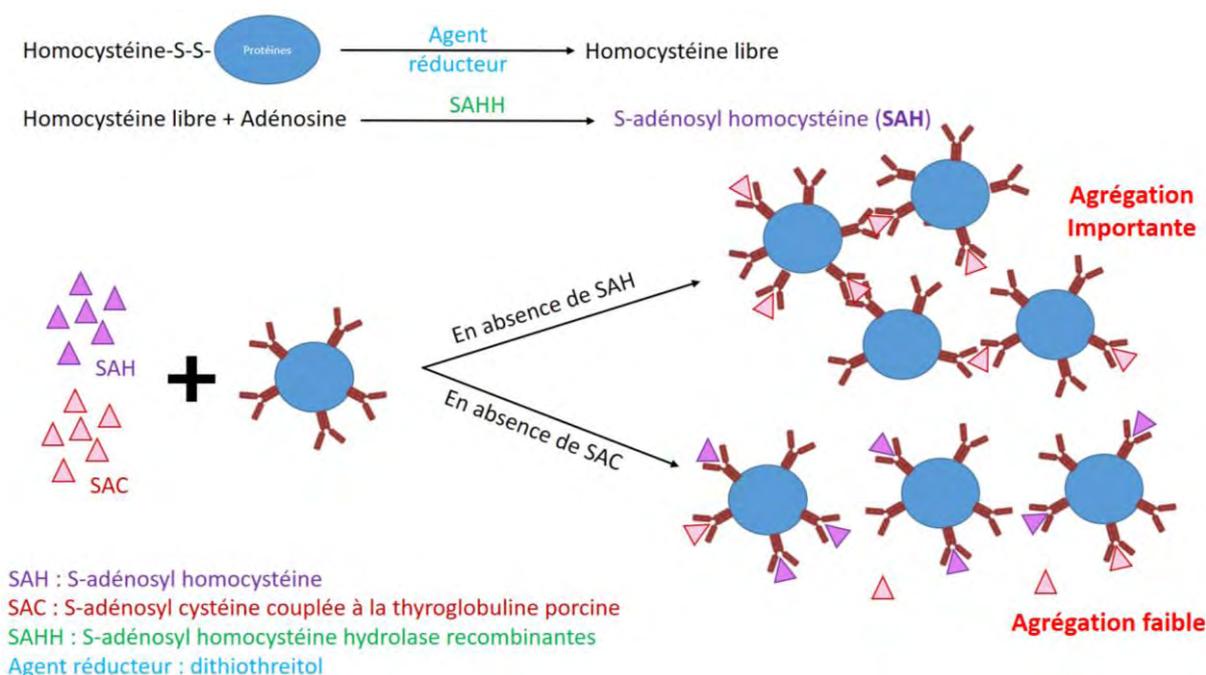


Figure 12 - Principe du dosage immunonéphélémétrique par compétition de l'homocystéine totale

Un faisceau lumineux, émis par une LED infrarouge haute performance traverse la cuve réactionnelle et la lumière diffusée à un angle de 13 à 24° est mesurée par un détecteur à photodiode. L'intensité lumineuse détectée est inversement proportionnelle à la concentration en SAH (et donc en homocystéine dans le plasma du patient). La concentration en homocystéine est obtenue à partir d'une courbe de calibration mettant en relation l'intensité du signal et la concentration en homocystéine totale.

Les paramètres pouvant interférer avec cette méthode de dosage sont la turbidité de l'échantillon, c'est pourquoi le dosage ne doit pas être réalisé sur les plasmas lipémiques, ainsi que la présence de facteurs rhumatoïdes ou d'anticorps hétérophiles, susceptibles d'entraîner des dosages faussement bas.

#### *1.2.3.3. Comparaison des différentes méthodes de dosages de l'homocystéine*

Devant cette grande diversité de méthodes de dosages, plusieurs études ont comparé les méthodes entre elles. En 2002, une étude publiée dans les annales de biologie clinique (25) répertoriait neuf laboratoires avec 6 méthodes de dosages différentes et mettait en évidence une bonne concordance entre les méthodes de dosage. En 2009, une équipe Clermontoise a comparé deux méthodes, une méthode immunonéphélométrique (automatisée sur l'automate BN Prospec, commercialisé par Siemens) et la méthode de référence par LC-MS (27). L'étude retrouve une très bonne concordance entre ces deux méthodes de dosage, cependant l'immunonéphélométrie sous-estimerait de 25% l'homocystéinémie. Les auteurs proposent donc d'adapter le seuil normal de 15  $\mu\text{M}$  à 12  $\mu\text{M}$  pour les dosages réalisés en immunonéphélométrie.

Sur le territoire français, il n'y a pas d'uniformité entre les différents CHU concernant la méthode de dosage de l'homocystéine. En effet, environ la moitié des laboratoires utilisent la méthode de référence avec la LC-MS, les autres utilisent des méthodes diverses.

#### *1.2.3.4. Dosage de l'homocystéine au Laboratoire de biochimie du CHU de Nantes*

Au sein de notre laboratoire, la méthode de dosage actuelle est l'immunonéphélométrie sur BNII (Siemens). Cette technique a été installée en 2015, et sa mise en place avait été précédée d'une étude comparative avec la méthode de référence (LC-MS). A ce moment-là, une autre méthode automatisée sur COBAS 8000 avait également été évaluée. Les résultats de cette étude montraient que la méthode Siemens avait une parfaite concordance avec la méthode de référence et une exactitude acceptable, alors que la méthode sur COBAS ne montrait pas une

exactitude suffisante, ce qui a poussé le laboratoire à choisir le BNII pour réaliser le dosage de l'homocystéine en routine. Lors de cette étude, nous n'avons pas mis en évidence de sous-estimation systématique de l'homocystéinémie comme évoqué précédemment. En effet, l'évaluation de l'exactitude montrait des résultats largement satisfaisants, avec un écart observé bien inférieur à l'écart toléré défini par les normes de la Société Française de Biologie Clinique.

Depuis cette date, les performances analytiques sont suivies par le passage de contrôle de qualité interne encadrant chaque série. Il existe deux niveaux de contrôle, fournis par Siemens, et les résultats sont présentés dans la figure 13.

	Moyenne (μmol/L)	Ecart-type (μmol/L)	CV cumulés (%)
Niveau 1	13,31	0,78	5,89
Niveau 2	26,36	1,35	5,14

*Figure 13 – Performances analytiques*

Les critères de qualités minimums, souhaitables et optimales sont définis par des sociétés savantes. On vérifie notamment le coefficient de variation (CV) cumulés, dont les recommandations fixent l'objectif < 8,3%, selon les critères RICOS. La technique de dosage de l'homocystéine sur BNII donne donc satisfaction.

La qualité est également assurée par le passage de contrôle de qualité externe, du laboratoire RIQAS, une fois par mois afin de nous comparer à nos paires.

#### I.2.4. Facteurs influençant la concentration en homocystéine totale

Plusieurs facteurs peuvent influencer la concentration en homocystéine totale. Les facteurs physiologiques comme l'âge, le sexe peuvent influencer l'homocystéinémie. En effet l'homocystéine totale augmente avec l'âge et est légèrement plus élevée chez les hommes que chez les femmes (28). La masse musculaire influence également légèrement l'homocystéinémie, ce qu'on peut expliquer en partie par le rôle quantitativement important du muscle dans le métabolisme des protéines.

Le mode de vie est également un facteur pouvant influencer l'homocystéine. En effet, les fumeurs ont une homocystéinémie supérieure en moyenne de 10 à 20%. L'alcool et le café auraient également tendance à augmenter l'homocystéinémie alors que l'activité physique aurait tendance à les diminuer (29).

Certains facteurs nutritionnels influencent également l'homocystéinémie et ceci s'explique en partie par la composition en vitamines B9, B12 et B6 des aliments, puisque ces vitamines sont indispensables au métabolisme de l'homocystéine.

Certaines situations cliniques comme l'insuffisance rénale, l'insuffisance hépatique, l'hypothyroïdie, les cancers, le diabète ont été rapportées comme pouvant augmenter les concentrations d'homocystéine. Exceptée l'insuffisance rénale, toutes ces pathologies n'entraînent qu'une élévation modérée de l'homocystéine (entre 15 et 30  $\mu\text{mol/L}$ ) (29). L'insuffisance rénale peut être responsable d'augmentation plus franche de l'homocystéine. En effet, l'homocystéine est inversement corrélée au débit de filtration glomérulaire (DFG) et pour des insuffisances rénales sévères, l'homocystéinémie peut dépasser 50  $\mu\text{mol/L}$  (30).

Enfin, certains facteurs génétiques peuvent expliquer une hyperhomocystéinémie comme les déficits enzymatiques impliquant une enzyme du métabolisme de l'homocystéine ou d'un des cofacteurs essentiels à son métabolisme. Ces différents facteurs génétiques sont étudiés dans le chapitre suivant.

### I.3. Hyperhomocystéinémies

Alors qu'une hyperhomocystéinémie modérée est fréquente et généralement secondaire à des causes acquises (nutritionnelles, environnementales, médicamenteuses), les hyperhomocystéinémies sévères sont des situations rares et sont liées à des erreurs innées du métabolisme. Entre les deux, les hyperhomocystéinémies intermédiaires peuvent de façon équivalente être de cause acquise ou génétique. La figure 14, issue d'une présentation de la Société française des erreurs innées du métabolisme en 2017 représente cette répartition, il est à noter que les seuils choisis diffèrent des seuils décrits dans la littérature qui fixe la limite entre hyperhomocystéinémie modérée et intermédiaire à 30  $\mu\text{mol/L}$  et non 50  $\mu\text{mol/L}$ .

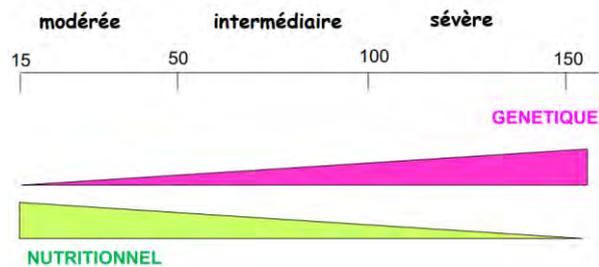


Figure 14 - Orientation diagnostique selon le niveau de l'hyperhomocystéinémie, d'après Douillard (SFEIM 2017)(31)

#### I.3.1. Les altérations de la voie de la reméthylation

La voie de la reméthylation faisant intervenir de nombreuses enzymes, toute diminution de l'activité de l'une d'entre elles ou tout déficit en co-enzyme peut entraîner un défaut de reméthylation de l'homocystéine en méthionine et donc une hyperhomocystéinémie. Dans les altérations de la reméthylation on retrouve une homocystéine augmentée associée à une diminution de la méthionine (Figure 15).

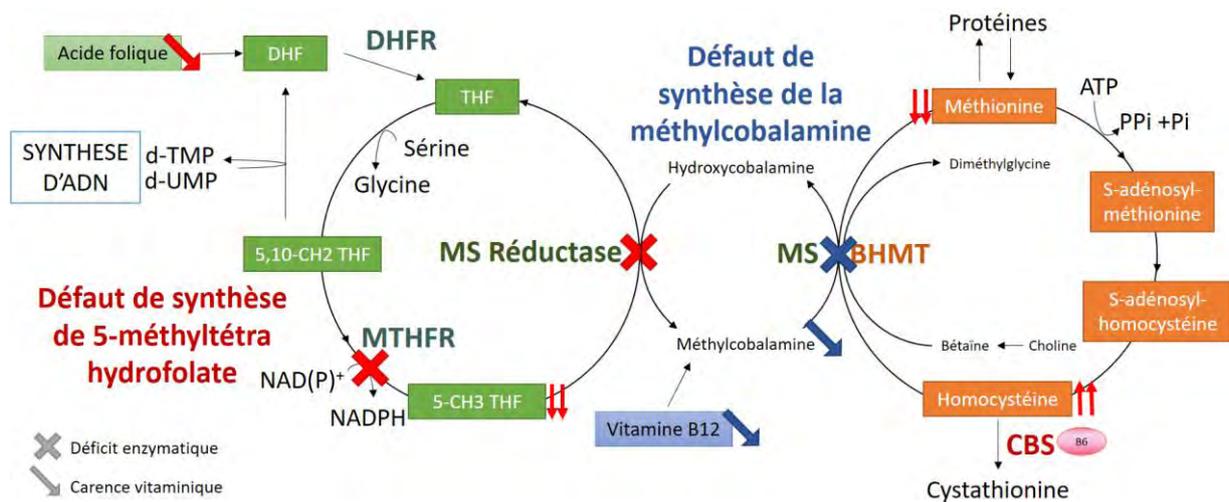


Figure 15 - Représentation schématique des altérations de la voie de la reméthylation

### 1.3.1.1. Déficit de synthèse de 5-méthyltétrahydrofolate

La méthionine synthase réductase nécessite le recyclage permanent du tétrahydrofolate en 5-méthyl tétrahydrofolate. Toute carence en folate ou diminution de l'activité de la MTHFR peut entraîner une diminution de la disponibilité du 5-méthyltétrahydrofolate et donc un défaut d'activité de la méthionine synthase réductase.

Les carences en folates par défaut d'apport sont rares car la vitamine B9 est présente dans de nombreux aliments, cependant elles peuvent être observées dans des situations d'augmentation des besoins physiologiques (grossesse, allaitement), pathologiques (cancer), de malabsorption secondaire à l'alcoolisme, à une chirurgie bariatrique, ou à la prise de certains médicaments (methotrexate, phénytoïne, phénobarbital) (32).

Le défaut de synthèse du 5-méthyltétrahydrofolate peut être secondaire à une diminution de l'activité de la MTHFR. On distingue le déficit enzymatique en MTHFR qui retrouve une activité MTHFR < 20%, du polymorphisme de ce gène (33) qui lui est associé à une diminution modérée de l'activité enzymatique. Le déficit sévère en MTHFR est rare, il est associé à une clinique bruyante retrouvant une encéphalopathie, une microcéphalie et une détresse neurologique dans les premières années de vie. Il existe quelques cas décrits d'apparition plus tardive avec des troubles psychiatriques et une neuropathie dans l'adolescence ou chez les adultes (34). Le déficit en MTHFR est associé à une élévation majeure de l'homocystéinémie, généralement supérieure à 100µmol/L (35).

La mise en évidence d'un variant du gène MTHFR est à interpréter avec prudence car ce gène présente un nombre important de polymorphismes. En effet, le gène MTHFR présente plusieurs variants dans la population générale dont le rôle pathogène est controversé. C'est le cas pour le variant thermolabile c.677C>T qui correspond à une mutation ponctuelle engendrant une

diminution modérée de l'activité de l'enzyme. Ce variant est assez fréquent et serait présent chez 9 à 17% de la population générale à l'état homozygote. Le rôle de ce variant dans l'hyperhomocystéinémie est discuté mais serait tout de même associé à des hyperhomocystéinémies modérées ( $< 50 \mu\text{mol/L}$ ) en cas de carence en folates associée (36).

### 1.3.1.2. Déficit de synthèse de la méthylcobalamine

La biodisponibilité de la méthylcobalamine, cofacteur de la méthionine synthase dépend du métabolisme de la vitamine B12. Comme nous l'avons vu précédemment, l'absorption et le métabolisme de la vitamine B12 sont complexes et font intervenir de nombreuses enzymes et transporteurs, rendant nombreuses les situations de déficit de synthèse de méthylcobalamine.

Les carences en vitamine B12 peuvent s'observer en cas de régime strictement végétalien, ou secondairement à une chirurgie bariatrique. Les anomalies de l'absorption de la vitamine B12 retrouvent :

- la maladie de Biermer, maladie auto-immune entraînant une gastrite chronique atrophique et un déficit d'absorption de vitamine B12 ;
- le déficit héréditaire en facteur intrinsèque, aussi appelé Biermer congénital ;
- le syndrome d'Imerslund-Gräsbeck lié à un déficit de transport de la cobalamine dans les entérocytes, causé par une anomalie du gène *CUBN*, codant pour la cubiline ;
- le déficit en haptocorrine ;
- le déficit en transcobalamine ;
- le déficit en récepteur de la transcobalamine.

Ensuite, toutes anomalies des enzymes impliquées dans le métabolisme intracellulaire de la cobalamine peuvent entraîner des défauts de synthèse de méthylcobalamine (Cobalamine F, J, C, X, D) (Figure 9).

Ces différents déficits qu'ils soient liés à un déficit d'absorption ou de transformation de la vitamine B12, entraînent un déficit des formes actives méthylcobalamine et adénosylcobalamine responsable respectivement du dysfonctionnement de la méthionine synthase et de la méthylmalonyl-CoA mutase (Figure 9). Ils ont donc pour conséquences à la fois un blocage de la reméthylation de l'homocystéine et un blocage de la transformation de l'acide méthylmalonique (AMM). On les désigne « acidémie méthylmalonique avec homocystinurie » car ces déficits associent une hyperhomocystéinémie majeure ( $>100 \mu\text{mol/L}$ ) avec une forte augmentation de l'AMM. Il s'agit de maladies d'intoxication se manifestant entre autre par un retard de croissance staturo-pondérale, une détérioration neurologique

importante, un déficit intellectuel, une léthargie, une épilepsie, une microcéphalie, une rétinopathie poivre et sel et des signes d'anémie mégaloblastique (pâleur, fatigue, anorexie) (37). Parmi ces déficits, le déficit en Cbl C est le plus fréquent avec plus de 500 cas décrits (16).

Le déficit en Cbl C peut également se manifester par l'apparition d'un syndrome hémolytique et urémique (SHU)(38). On parle de SHU secondaire à une anomalie héréditaire du métabolisme de la vitamine B12. La micro-angiopathie rénale serait liée à une atteinte de l'endothélium glomérulaire causée par l'hyperhomocystéinémie (39).

Les anomalies de la Cobalamine E et G entraînent un défaut de synthèse de la méthylcobalamine spécifiquement, avec une hyperhomocystéinémie sans augmentation de l'AMM.

### I.3.2. Les altérations de la voie de la transsulfuration

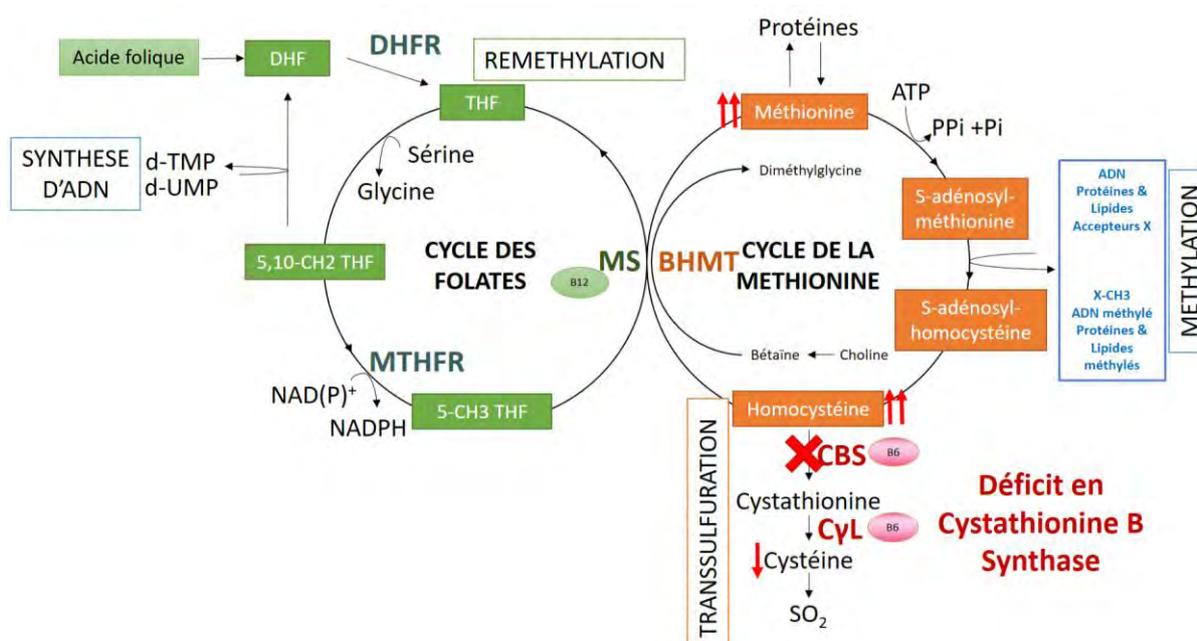


Figure 16 - Représentation schématique des altérations de la voie de la transsulfuration

Les altérations de la voie de la transsulfuration sont présentées sur la figure 16, elles sont essentiellement liées au déficit en CBS. Le déficit en CyL est exceptionnel et les carences en vitamine B6 également.

#### I.3.2.1. L'homocystinurie classique ou déficit en cystathionine β-synthase (CBS)

L'homocystinurie classique (OMIM 236200) est une maladie héréditaire du métabolisme causée par un déficit en CBS, entraînant une accumulation d'homocystéine totale dans le sang

et les urines (40). Le terme d'homocystinurie est réservé au déficit en CBS alors que le terme d'hyperhomocystéinémie est utilisé pour toutes les autres situations retrouvant une augmentation de l'homocystéine totale (facteurs génétiques, environnementaux ou nutritionnels).

La maladie est caractérisée par une atteinte ophtalmologique, squelettique, vasculaire et intellectuelle. Ces quatre atteintes peuvent être de sévérités variables (41). On distingue deux formes d'homocystinurie, une forme sensible à la vitamine B6 et une forme non sensible. La sévérité du tableau semble liée à la forme d'homocystinurie. En effet, la forme sensible à la vitamine B6 est généralement moins sévère que la forme non sensible. Ainsi, on retrouve des formes à révélation précoce, dans l'enfance où le déficit est insensible ou peu sensible à la vitamine B6, alors que les formes se révélant à l'âge adulte correspondent généralement à des déficits sensibles à la vitamine B6 (42). L'incidence de l'homocystinurie est estimée à environ 1 à 9 pour 100 000 naissances (43).

Les enfants naissent sans aucun signe clinique et la maladie est progressive. Les manifestations cliniques sont variées. L'atteinte ophtalmologique avec une ectopie du cristallin pouvant être précédée par une myopie sévère rapidement progressive, n'est pas pathognomonique mais très évocatrice d'une homocystinurie (44). Pour la majorité des patients atteints de forme sévère, l'ectopie du cristallin survient avant l'âge de 8 ans (41). Les anomalies squelettiques peuvent se caractériser par une cyphose, une scoliose ainsi que par des lésions d'ostéoporose. Les individus atteints sont souvent grands et minces avec une allure proche du syndrome de Marfan, retrouvant une longueur excessive des membres. Les thromboses artérielles et veineuses sont la principale cause de décès (45). Elles peuvent atteindre tous types de vaisseaux. Chez les individus non traités, les accidents vasculaires cérébraux sont rapportés chez les jeunes enfants (46). Le risque de complications vasculaires augmente avec l'âge. Dans les formes à révélation pédiatrique elles sont moins fréquentes que l'atteinte ophtalmologique, alors que chez les adultes, les thromboses sont la forme de révélation la plus fréquente. L'homocystinurie entraîne un déficit intellectuel et un retard dans les acquisitions. Ces séquelles peuvent être prévenues par une prise en charge précoce et adaptée. En effet, une étude parue en 2001, s'intéressant à 23 malades dont 19 avait été diagnostiqués par dépistage néonatal et donc rapidement pris en charge et 6 non dépistés et donc pris en charge plus tardivement, montre que les quotients intellectuels (QI) des enfants dépistés (moyenne à 105.8) n'étaient pas significativement différents de leurs contrôles appariés (frère et sœurs sains) alors que les enfants non dépistés avaient un QI significativement plus bas (moyenne à 80.8) que leurs frères et sœurs (47). Selon une étude récente, 53% des patients présentent des troubles neuro-développementaux (44).

Les formes sensibles à la vitamine B6 se révèlent généralement plus tardivement, à l'adolescence ou l'âge adulte. Elles se révèlent par une atteinte vasculaire avec des thromboses profondes, une embolie pulmonaire ou encore un accident vasculaire cérébral (44).

La CBS est codée par un gène situé sur le chromosome 21 (locus 21q22.3) composé de 23 exons et mesurant 25-30kb. Il existe plus de 164 variants pathogènes identifiés, et 67% des patients souffrant d'homocystinurie présentent des variants faux-sens. Les deux variants pathogènes du gène *CBS* les plus fréquents se trouvent dans l'exon 8, il s'agit des variants c.833T>C (p.Ile278Thr) et de c.919G>A (p.Gly307Ser) (48). Le variant p.Ile278Thr est pan ethnique et représente 25% de tous les variants pathogènes. Le variant pGly307Ser est fréquemment détecté chez les sujets d'origine celtique, on le retrouve surtout en Irlande, Ecosse, Angleterre, France et Portugal. Enfin le variant c.1006C>T (p.Arg336Cys) est présent chez 93% des sujets malades au Qatar (49).

Des recommandations ont été publiées en Europe en 2017 afin de guider les praticiens dans le diagnostic et la prise en charge du déficit en CBS (45). Un protocole national de diagnostic et de soins (PNDS) concernant l'homocystinurie est actuellement en cours de rédaction. Pour le diagnostic, il est recommandé de réaliser un dosage d'homocystéine totale accompagné d'une chromatographie des acides aminés plasmatiques. Dans un déficit en CBS on retrouve une homocystéine totale > 100µmol/L accompagnée d'une concentration en méthionine élevée. Le déficit en CBS doit être confirmé par une étude moléculaire chez le patient index ainsi que chez ses deux parents. La mise en évidence d'un variant pathogène permet de confirmer le diagnostic mais aussi de proposer un dépistage prénatal aux familles qui souhaiteraient avoir un autre enfant.

Devant le nombre important de variants, il est difficile de faire une corrélation entre variants pathogènes et phénotype, cependant certaines mutations ont été décrites comme sensibles à la vitamine B6 et montrent une bonne concordance. Par exemple, le variant c.833T>C (p.Ile278Thr) induit une forme plutôt modérée, sensible à la vitamine B6 alors que les variants c.919G>A (p.Gly307Ser) et c.1006C>T (p.Arg336Cys) sont associés à des formes sévères non sensibles à la vitamine B6 (50).

La mesure de l'activité enzymatique de la CBS sur fibroblastes peut être utile dans certaines situations où l'étude génétique n'est pas concluante ou afin d'aider à l'interprétation de variants de signification inconnue.

Tout diagnostic d'homocystinurie doit être complété par un test de sensibilité à la pyridoxine afin d'orienter la prise en charge. Pour cela, il est recommandé d'administrer la pyridoxine à

10 mg/kg/jour pendant 6 semaines, en dehors de tout régime alimentaire particulier. La réponse à la vitamine B6 est évaluée par mesure de l'homocystéinémie et à l'issue de ce test, on différencie (45) :

- les patients sensibles à la pyridoxine, lorsque l'homocystéinémie est  $< 50\mu\text{mol/L}$ ,
- les patients partiellement sensibles, lorsque l'homocystéinémie diminue d'au moins 20% par rapport à la valeur moyenne avant traitement mais sans être  $< 50\mu\text{mol/L}$ ,
- les patients non sensibles, lorsque l'homocystéinémie totale diminue de moins de 20%.

La prise en charge de l'homocystinurie consiste à contrôler la concentration plasmatique d'homocystéine afin de réduire les complications et prévenir les épisodes de thrombose. Pour limiter l'homocystéinémie, le clinicien a dans son arsenal thérapeutique : la supplémentation en vitamine B6, la supplémentation en vitamine B9 et en vitamine B12, le traitement par bétaine et enfin le régime diététique restreint en méthionine. L'ensemble de ces traitements est à poursuivre à vie par le patient.

La vitamine B6 ne peut être utilisée que chez les patients sensibles ou partiellement sensibles à la vitamine B6. On définit la dose minimale de pyridoxine permettant de maintenir une homocystéinémie  $< 50\mu\text{mol/L}$ .

Chez les patients non sensibles à la vitamine B6, les besoins en folates peuvent augmenter et une supplémentation en vitamine B9 et B12 est généralement incluse dans leur régime alimentaire. Un régime alimentaire restreint en méthionine est instauré chez les patients ne répondant pas à la vitamine B6, ou partiellement. Il est utilisé seul ou en association avec une supplémentation en B6, et/ou en bétaine. C'est un régime lourd et difficile à mettre en place, surtout lorsque le diagnostic est tardif et que le malade a eu un régime alimentaire classique auparavant. Il consiste en un apport très faible en protéines naturelles (toutes les protéines d'origine animale sont exclues de même que certains aliments trop riches en protéines végétales tels que légumes secs, la farine, les fruits oléagineux), associé à une prise d'aliments hypoprotidiques afin de couvrir les besoins énergétiques et une supplémentation par un mélange d'acides aminés sans méthionine (45). La supplémentation en bétaine est utilisée chez les patients avec une forme non sensible à la pyridoxine, en complément du régime limité en méthionine. La bétaine sert de donneur de méthyl dans la voie hépatique de reméthylation de l'homocystéine faisant intervenir la bétaine homocystéine méthyltransférase (BHMT).

Actuellement, de nouveaux traitements sont à l'étude pour améliorer la prise en charge de l'homocystinurie avec notamment des molécules chaperonnes qui visent à restaurer la fonction

de la CBS. D'autres essais visent à augmenter l'élimination du métabolite homocystéine thiolactone, suspecté d'avoir un rôle dans la survenue d'épisodes thrombotiques. Et enfin, certaines études cherchent à prévenir le stress oxydatif induit par l'hyperhomocystéinémie (40). En parallèle, des études précliniques récentes testent des enzymothérapies substitutives sur des modèles animaux. La CBS est une enzyme avec des propriétés structurales et fonctionnelles complexes rendant difficile le développement de telles thérapies. Les essais de l'enzymothérapie OT-58 sur souris KO pour le gène *CBS*, montrent des résultats encourageants avec une normalisation de la concentration en homocystéine dans les organes et une nette diminution dans le plasma (51). Cette thérapie est en cours d'étude de tolérance chez les primates.

Dans certains pays comme les Etats-Unis, le Qatar, ou encore l'Italie, l'homocystinurie fait partie des maladies dépistées à l'occasion du dépistage néonatal. La stratégie de dépistage repose sur le dosage de méthionine sur le carton de Guthrie, puis l'utilisation du ratio méthionine/phénylalanine permet d'améliorer la sensibilité. Enfin le dosage de l'homocystéine en deuxième ligne, c'est-à-dire pour les prélèvements ayant une valeur de méthionine supérieure au seuil, permet de diminuer le nombre de faux positifs. En France, en janvier 2020, la haute autorité de santé (HAS) a rendu un avis favorable à l'extension du dépistage néonatal à sept nouvelles maladies dont l'homocystinurie. Elle prévoit l'utilisation de la méthionine et du rapport méthionine/phénylalanine comme marqueur de première intention ainsi que le dosage de l'homocystéine totale comme test de deuxième intention. L'intérêt d'un tel dépistage est de pouvoir prendre en charge les malades avant qu'un événement thrombotique ne survienne et de prévenir les retards mentaux. De plus la mise en place d'un régime spécial très contraignant dès les premiers jours de vie améliore l'acceptabilité.

#### 1.3.2.2. Déficit en Cystathionine $\gamma$ Lyase

Le déficit en CyL est extrêmement rare. Une étude portant sur six individus avec une élévation importante de cystathionine dans le plasma et les urines, rapporte diverses mutations sur le gène codant pour la CyL (52). Ce déficit peut s'accompagner d'une augmentation modérée de la concentration plasmatique en homocystéine totale. Cependant aucune étude n'a pour le moment fournit de preuve convaincante pour affirmer que ce déficit soit associé à une symptomatologie clinique particulière.

#### 1.3.2.3. Déficit en Vitamine B6

La vitamine B6 ou pyridoxine est présente dans une grande variété d'aliments d'origine animale comme végétale. Les carences isolées en vitamine B6 sont donc exceptionnelles, et sont plutôt associées à des carences vitaminiques multiples.

### I.3.3. Mécanismes physiopathologiques de l'hyperhomocystéinémie

Bien que le lien entre hyperhomocystéinémie modérée et facteur de risque cardiovasculaire soit un sujet très discuté et fait l'objet de la partie suivante de cette thèse, le rôle de l'homocystéine dans le développement de lésions vasculaires chez les patients souffrant d'hyperhomocystéinémie sévère est clairement établi. Le mécanisme des lésions vasculaires est probablement multifactoriel, et non complètement élucidé.

L'hyperhomocystéinémie est à l'origine d'une dysfonction endothéliale favorisant la survenue d'évènements thrombo-emboliques. Ainsi l'autopsie de patients atteints d'homocystinurie a permis de mettre en évidence une atteinte des vaisseaux de tous calibres. Ces lésions vasculaires retrouvaient une perte de cellules endothéliales, un épaissement de la média et de l'intima ainsi qu'une diminution de la lumière artérielle (53). Contrairement aux lésions d'athérosclérose observées dans l'hypercholestérolémie, l'accumulation intracellulaire et extracellulaire de lipides semble secondaire à la dysfonction endothéliale et non causale.

L'origine de ces lésions semble multifactorielle et implique une dysfonction endothéliale entraînant une desquamation de l'endothélium vasculaire, l'adhérence et l'agrégation des plaquettes sur le sous endothélium ainsi exposé, la prolifération des cellules musculaires lisses ainsi que l'accumulation de lipides (54).

Il existe plusieurs hypothèses quant au rôle de l'homocystéine sur cette dysfonction endothéliale. L'hyperhomocystéinémie pourrait avoir un effet toxique sur les cellules endothéliales via la génération d'un stress oxydant. En effet la condensation de deux molécules d'homocystéine en homocystine libère des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (55). Ces ROS pourraient d'une part induire des lésions endothéliales et d'autre part entraîner l'oxydation des LDL (56). La peroxydation lipidique est décrite comme étant la première étape de la formation des plaques d'athérome, en formant des stries graisseuses au niveau de l'endothélium des grandes artères (57) et pourrait être ici impliquée dans l'atteinte vasculaire. Une autre hypothèse serait que l'hyperhomocystéinémie entraînerait un déséquilibre de l'état de phosphorylation et de déphosphorylation des lipides et des protéines kinases, ce qui

provoquerait la modulation de l'oxyde nitrique synthase (eNOS) et serait à l'origine de la dysfonction endothéliale et du défaut de vasodilatation (58).

Ensuite, il a été prouvé *in vitro* que l'homocystéine altère la fonction d'inhibition de l'agrégation plaquettaire et de la coagulation en diminuant l'expression membranaire des protéoglycanes de type héparan sulfates par les cellules endothéliales (59). L'homocystéine aurait également un effet pro-coagulant en potentialisant l'activation des facteurs V et XII, ainsi qu'en induisant l'expression du facteur tissulaire (60). L'homocystéine aurait aussi un rôle dans la dérégulation du tonus vasculaire diminuant la production de médiateurs endothéliaux comme les prostacyclines, le monoxyde d'azote ou encore l'endothéline-1 (61).

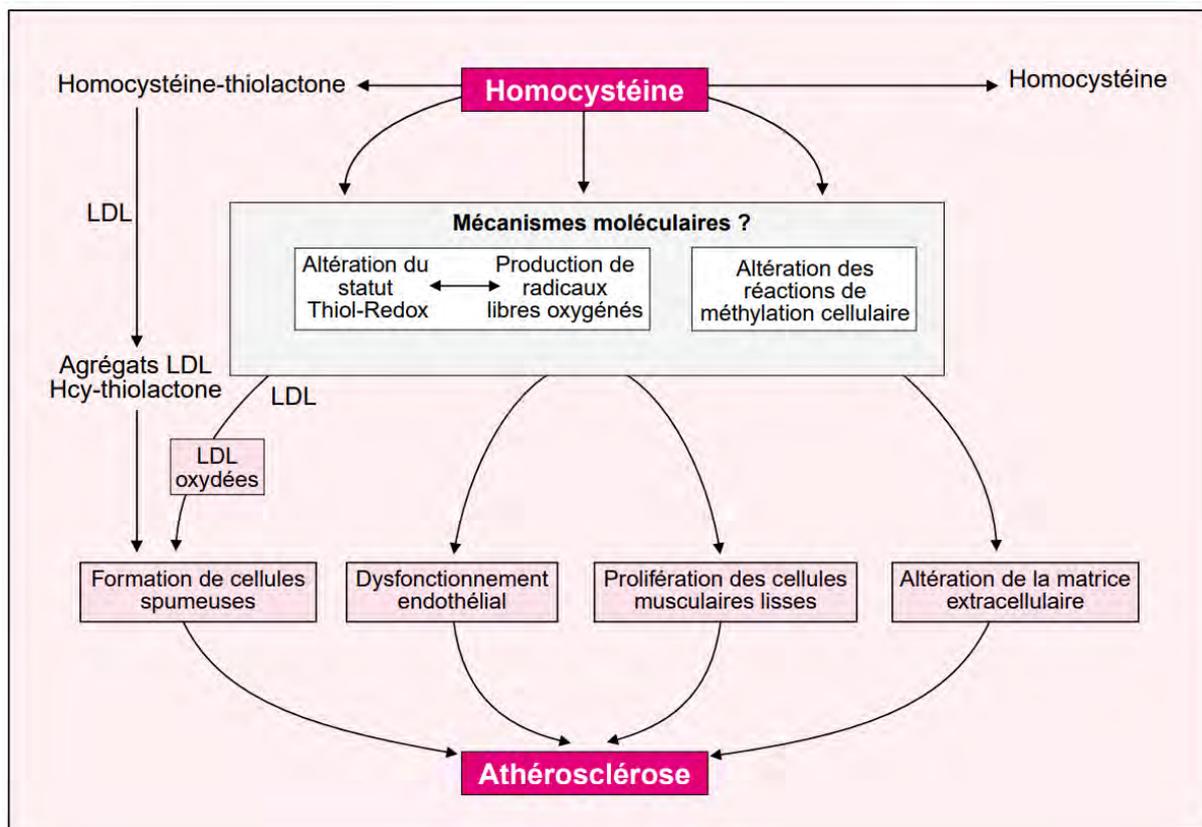


Figure 17 - Mécanismes hypothétiques de la pathogénicité de l'hyperhomocystéinémie, d'après Demuth, 2000 (21).

Au final, l'homocystéine entraîne une agression des cellules endothéliales, à l'origine de perturbations de l'homéostasie vasculaire et induit la prolifération de cellules musculaires lisses, responsables d'une hyperplasie pariétale et d'une modification de la matrice extra cellulaire qui aboutit à une altération des propriétés mécaniques de la paroi artérielle (Figure 18). La modification du métabolisme des LDL, qui favorise le développement de cellules spumeuses, majore les effets de l'homocystéine sur l'endothélium. Enfin, l'altération des phénomènes de coagulation et d'inhibition de la coagulation dans un contexte pro-thrombotique favoriserait les évènements thrombo-emboliques observés chez les malades.

## I.4. Conséquences d'une élévation modérée de l'homocystéine

### I.4.1. Hyperhomocystéinémie et facteurs de risque cardiovasculaire

#### I.4.1.2. Historique

En 1969, Mc Cully fait pour la première fois un lien entre homocystéine et athérosclérose (53). Il observe des anomalies vasculaires semblables chez des patients décédés secondairement à une homocystinurie, une cystathioninurie, et une acidurie méthylmalonique. Ces maladies étant toutes associées à une hyperhomocystéinémie majeure, il émet l'hypothèse d'un rôle de l'homocystéine dans la pathogénèse de cette athérosclérose.

Un an plus tard, il publie une étude dans laquelle il montre que l'administration répétée d'homocystéine à des lapins permettait d'induire des lésions d'athérosclérose comparables à celles observées chez les patients atteints d'homocystinurie (62). Il montre ensuite que la culture cellulaire issue de cellules de peau d'individus souffrant d'homocystinurie produisait une substance granuleuse anormale composée de protéoglycane anormalement sulfaté (63). On retrouve cette substance lorsque l'on traite des cellules contrôles par de fortes doses d'homocystéine. Les mécanismes moléculaires expliquant le lien entre hyperhomocystéinémie majeure et athérosclérose ne sont alors pas connus mais le lien causal est fortement suspecté. L'homocystéine étant le produit de déméthylation de la méthionine, acide aminé présent en grande quantité dans l'alimentation carnée, Mc Cully émet alors l'hypothèse plus générale que l'alimentation riche en méthionine pourrait être un facteur de risque cardiovasculaire entraînant une hyperhomocystéinémie modérée.

Par la suite, de très nombreuses études se sont intéressées au lien entre hyperhomocystéinémie modérée (homocystéinémie comprise entre 15 et 30  $\mu\text{mol/L}$ ) et athérosclérose. En 1998, The New England Journal of Medicine (NEJM) publie un article de Loscalzo (64), répertoriant une vingtaine d'études avec plus de 2000 patients afin d'évaluer l'hypothèse de Mc Cully. Dans leur revue de la littérature, les auteurs concluent qu'une élévation modérée de l'homocystéine serait un facteur de risque cardiovasculaire indépendant. Ils expliquent également que dans la plupart des cas, une supplémentation en vitamine B12 et en folate permet de normaliser les augmentations modérées d'homocystéine. Pour confirmer le lien de causalité entre hyperhomocystéinémie modérée et athérosclérose, il faudrait donc une étude prospective avec une population supplémentée comparée à une population contrôle, afin de voir si une correction de l'homocystéinémie ( $<15\mu\text{mol/L}$ ) dans la population générale, permet de diminuer l'incidence des évènements thrombotiques.

Une méta-analyse publiée en 2002, s'appuyant sur une cohorte d'études observationnelles prospectives conclut qu'une réduction de 25% de la concentration sérique d'homocystéine est associée à une diminution du risque de cardiopathie ischémique de 11% et d'une diminution du risque d'accident vasculaire cérébral de 19% (65).

En 2006, Loscalzo publie de nouveau dans la revue NEJM afin d'éclaircir la question, suite à la publication d'une quantité d'articles s'intéressant à l'homocystéine (66). Il recense les résultats de plusieurs grandes études prospectives qui évaluaient l'effet de la réduction de l'homocystéine plasmatique totale dans la prévention des maladies cardiovasculaires (infarctus du myocarde et accidents vasculaires cérébraux principalement). Après un suivi prospectif de plusieurs milliers de patients sur plus de 5 ans, les auteurs concluent que la supplémentation en acide folique et en vitamine B12 permet une réduction significative de l'homocystéine totale plasmatique, mais celle-ci n'est pas associée à une diminution significative du risque du critère principal (infarctus du myocarde, d'accident vasculaire cérébral ou de décès d'origine cardiovasculaire).

Ces articles ont entraîné une remise en question de l'hypothèse initiale selon laquelle l'hyperhomocystéinémie modérée serait un facteur de risque cardiovasculaire. Mais alors, comment expliquer les résultats précédents (notamment la méta-analyse de 2002) ?

Pour répondre à cette question, en évitant les biais de publication, une étude internationale a réalisé une méta-analyse à partir de données publiées et non publiées (67). Les auteurs se sont intéressés au variant thermolabile *MTHFR* C677T, variant qui entraîne une diminution modérée de l'activité de la MTHFR. Les individus ayant le variant à l'état homozygote (homozygote TT) ont en moyenne une homocystéinémie 25% plus élevée que les homozygotes CC. Étant donné que le polymorphisme génétique est hérité au hasard, il n'est pas sujet à confusion ou biais. Afin de s'affranchir du biais de publication, les chercheurs ont inclus l'ensemble des données non publiées qui ont analysé ce polymorphisme au cours d'autres études génétiques.

Les chercheurs ont obtenu 19 ensembles de données non publiées contenant des données sur le polymorphisme *MTHFR* C677T chez des milliers de personnes avec et sans maladies cardiovasculaires. La méta-analyse de ces ensembles de données est résumée sur la figure 19 et indique qu'il n'y a pas d'excès de risque de maladie coronarienne chez les homozygotes TT par rapport aux homozygotes CC, puisque l'odds ratio est de 1.02.

**19 unpublished datasets  
(48175 cases, 67961 controls)**

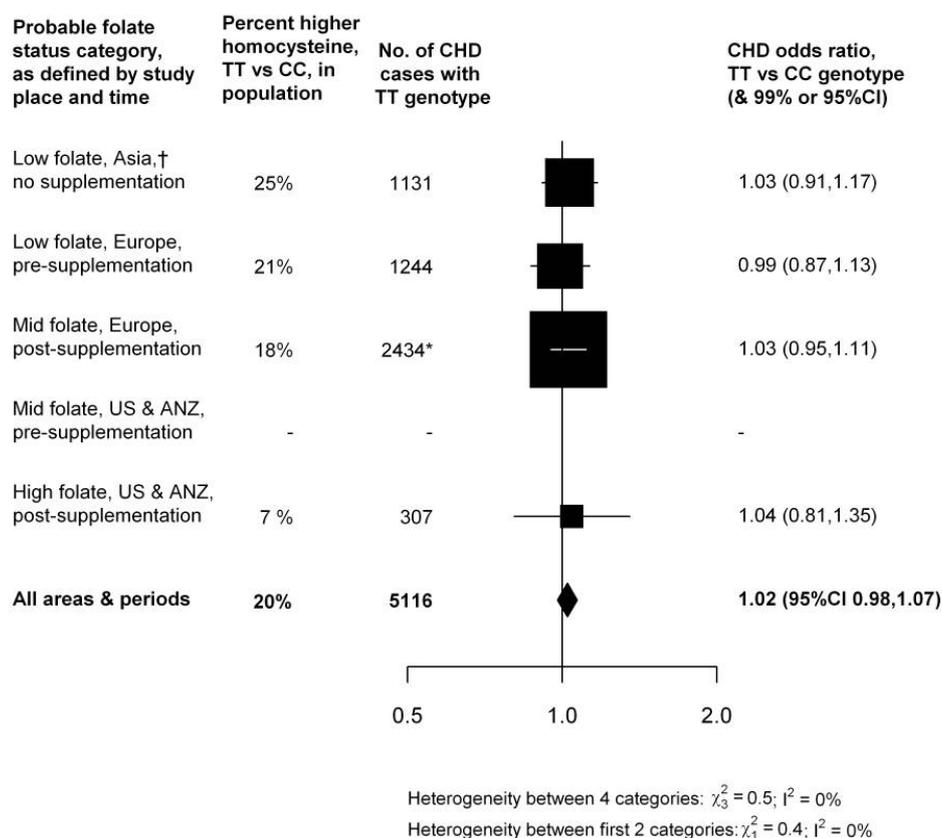


Figure 18 - Risque relatif de maladies cardiovasculaires chez les patients homozygotes TT versus CC pour le gène MTHFR d'après Clarke (2012)(67)

Enfin, bien que l'hyperhomocystéinémie sévère (homocystéine >100µmol/L), soit incontestablement responsable d'une atteinte vasculaire, l'hyperhomocystéinémie modérée (homocystéine totale entre 15 et 30 µmol/L) ne semble pas être un facteur de risque cardiovasculaire.

Le seuil d'homocystéinémie à partir duquel il existe un risque cardiovasculaire est un sujet très discuté. En effet, lorsqu'on s'intéresse aux recommandations pour la prise en charge des patients souffrant d'homocystinurie (45) on peut voir que dans l'homocystinurie classique, non sensible à la vitamine B6, les recommandations sont de maintenir une homocystéinémie inférieure à 100µmol/L. D'après certaines études, il n'y aurait pas de risque thrombotique en dessous de 120µmol/L (68,69). Cependant ces observations restent à confirmer par des études prospectives plus importantes. En pratique, on cherche à maintenir une homocystéinémie la plus basse possible, idéalement <50µmol/L, mais ces objectifs sont difficiles à atteindre et le seuil de 100µmol/L est donc plus un seuil « réalisable » que « souhaitable ».

#### I.4.1.2. Actuellement vers un consensus ?

A travers cet historique des études concernant l'homocystéine, on peut voir que le lien entre homocystéine et facteur de risque cardiovasculaire fut un concept très séduisant dans les années 1980-2000. L'hyperhomocystéinémie lorsqu'elle est majeure, est certes associée à une anomalie de la paroi artérielle et veineuse et représente un risque important de maladie vasculaire. Mais lorsqu'elle est modérée, elle n'augmente pas le risque cardiovasculaire dans la population générale.

#### I.4.2. Hyperhomocystéinémie modérée et grossesse

L'association entre l'élévation modérée de l'homocystéinémie et l'augmentation du risque de maladies liées au vieillissement, telles que les troubles athérosclérotiques, thromboemboliques et neurodégénératifs a été très étudiée durant les dernières décennies. De nombreuses études étudiant l'association entre hyperhomocystéinémie modérée et trouble de la fertilité ou conséquences obstétricales ont été publiées (70–73). Ainsi, il a été décrit que l'hyperhomocystéinémie modérée pendant la grossesse était associée à des complications telles que la prééclampsie, les fausses couches précoces, le décollement placentaire, le retard de croissance intra-utérin ou encore la thrombose veineuse (71,74–76).

Le mécanisme physiopathologique suspecté à l'origine de ces observations serait comme pour les anomalies thrombotiques, lié à un effet toxique de l'homocystéine sur l'intima des vaisseaux placentaires, associé à une agrégation plaquettaire favorisée, et une stimulation de la prolifération des cellules musculaires lisses (77).

Cependant, tout comme le lien entre hyperhomocystéinémie modérée et facteur de risque cardiovasculaire, les revues systématiques et les méta-analyses fournissent des données contradictoires. A ce jour, aucune étude ne prouve un intérêt à diminuer l'homocystéinémie pour prévenir ces complications, et le dosage de l'homocystéine ne fait plus partie des recommandations dans l'exploration des fausses couches à répétition (78).

#### I.4.3. Hyperhomocystéinémie modérée et dépression

La dépression est définie par l'OMS comme une pathologie associant une tristesse, une faible estime de soi, une faible concentration ainsi qu'une fatigue et des troubles du sommeil. La dépression touche environ 300 millions de personnes, avec une fréquence plus importante chez les femmes. De nombreux facteurs de risque peuvent entraîner des troubles dépressifs, comme le sexe ou l'âge. L'augmentation de certains composés chimiques qui perturbent les

neurotransmetteurs a été mise en relation avec la survenue de syndromes dépressifs et l'hyperhomocystéinémie en fait partie.

En effet, des études rapportent une association entre hyperhomocystéinémie modérée et syndrome dépressif (79). Les hypothèses pour expliquer cette association sont variées. L'hyperhomocystéinémie pourraient d'une part entraîner un déficit en neurotransmetteurs tels que la dopamine ou la sérotonine. Ces neurotransmetteurs sont connus pour influencer l'humeur et leur déficit est associé à la dépression. D'autre part, l'hyperhomocystéinémie entrainerait une surproduction de neurotransmetteurs excitateurs (glutamate et acides aminés excitateurs : acide homocystéique et acide cystéine sulfonique) activant le récepteur du glutamate NMDA. Cette activation est responsable d'une augmentation transitoire de la concentration neuronale de calcium et d'une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ayant pour conséquence une neuro-toxicité (80).

L'hypothèse selon laquelle l'homocystéine pourrait interférer avec les fonctions neurologiques a été étudiée par de nombreuses équipes (246 articles publiés sur les 10 dernières années associant homocystéine et dépression). L'association entre hyperhomocystéinémie et dépression est toutefois remise en cause récemment. Une méta-analyse publiée en 2021 montre que sur les 49 articles inclus, on retrouve bien un dosage plasmatique d'homocystéine supérieur chez les sujets souffrant de dépression que chez les témoins sains et une susceptibilité accrue de développer une dépression chez les sujets présentant une élévation de l'homocystéine. Cependant, la méta-analyse met en avant un certain nombre de facteurs de confusion comme la consommation de tabac ou d'alcool, l'IMC, l'activité physique ou les apports alimentaires, qui pourraient biaiser les résultats (79).

A l'heure actuelle aucune étude ne permet d'établir un lien causal entre hyperhomocystéinémie modérée et dépression.

#### I.4.4. Hyperhomocystéinémie modérée et maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est la deuxième maladie neurodégénérative en termes de fréquence. Elle est caractérisée par une atteinte motrice, causée par une diminution de la neurotransmission dopaminergique dans le striatum. La diminution de la transmission dopaminergique est liée à une perte de neurones dopaminergiques dans la substance noire (81). Le traitement de référence de la maladie de Parkinson vise à rétablir une concentration normale de dopamine dans le cerveau, par administration de son précurseur la lévodopa ou L-DOPA.

Il a été montré que le traitement prolongé par L-DOPA était associé à une augmentation de l'homocystéinémie chez les patients parkinsoniens comme chez les modèles animaux de maladie de Parkinson (82,83). Cette augmentation de l'homocystéine est également retrouvée dans le liquide céphalo rachidien et dans les tissus cérébraux (84). L'origine de cette hyperhomocystéinémie serait liée à la méthylation du L-DOPA par la catéchol-O-méthyltransferase (COMT), qui nécessite le SAM comme co-facteur et produit du SAH qui sera ensuite transformé en homocystéine comme le montre la figure 19. Les conséquences de cette hyperhomocystéinémie restent controversées (85).

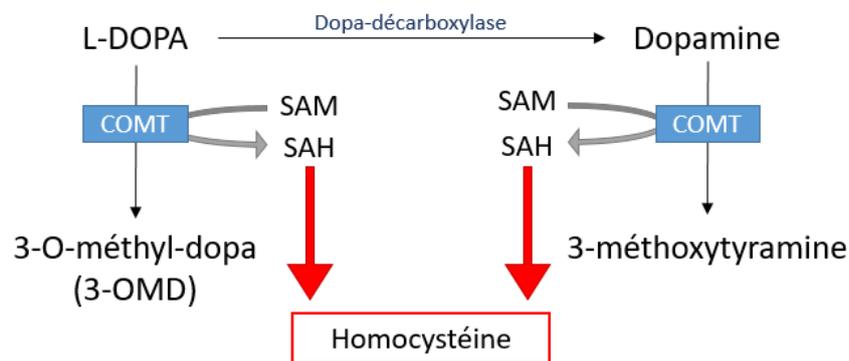


Figure 19- Métabolisme de la L-DOPA

Le traitement par L-DOPA a permis une nette amélioration de la prise en charge de la maladie de Parkinson. Toutefois, celle-ci reste une maladie progressive dont les mécanismes physiopathologiques restent incompris. De plus en plus d'études suggèrent qu'une élévation de l'homocystéinémie, résultant d'un traitement prolongé par L-DOPA, pourrait être impliquée dans les anomalies comportementales et motrices observées dans l'évolution de la maladie (85).

Des études sur des cultures cellulaires ainsi que sur des modèles animaux ont montré une cytotoxicité directe et spécifique de l'homocystéine sur les neurones dopaminergiques, suggérant que le stress oxydatif et l'excito-toxicité provoqués par l'augmentation de l'homocystéine plasmatique participent à la neurodégénérescence dopaminergique (86–88). Il a également été rapporté que l'hyperhomocystéinémie observée chez les patients traités par L-DOPA était associée à des polyneuropathies périphériques ainsi qu'à des dyskinésies (89,90).

La supplémentation des patients traités par L-DOPA par les vitamines co-facteurs du métabolisme de l'homocystéine (vitamines B6, B9 et B12) permet de réduire significativement l'homocystéinémie (91). Cependant, actuellement aucune étude ne prouve qu'une diminution de l'homocystéinémie par supplémentation vitaminique permette de limiter la progression de la maladie.

Enfin, le traitement de la maladie de Parkinson par Levodopa/Carbidopa administré par sonde duodénale permettant une administration continue du médicament semble plus fréquemment associé à des polyneuropathies axonales (92,93). Le rapport de plusieurs cas de polyneuropathies axonales associées à une faible concentration plasmatique en vitamine B12 et une hyperhomocystéinémie justifie selon Uncini et al. de surveiller le dosage plasmatique d'homocystéine chez les patients traités par sonde duodénale et de supplémenter ces patients en cas d'élévation de l'homocystéine.

#### I.4.5. Hyperhomocystéinémie modérée et pathologies rénales

La greffe rénale est un traitement de choix dans la prise en charge de l'insuffisance rénale terminale et permet d'améliorer la survie et la qualité de vie des patients (94). D'après le National Institutes of Health (NIH 2007), les maladies cardiovasculaires sont la cause principale de décès et de perte de greffon chez les greffés rénaux. L'hyperhomocystéinémie modérée ayant été décrite dans la population générale comme un facteur de risque cardiovasculaire indépendant, a naturellement intéressé les néphrologues. Dans une étude sur des patients greffés rénaux, Ducloux et al. estiment qu'une augmentation de 1 $\mu$ mol/L d'homocystéine totale est associée à une augmentation du risque de développer une maladie cardio vasculaire de 6% (95). La prévention du risque cardiovasculaire par une supplémentation vitaminique visant à diminuer l'homocystéine plasmatique totale semblait être prometteuse et plusieurs études prospectives ont étudié son efficacité. Dans une méta analyse de 2015, aucune diminution du risque cardiovasculaire n'a été observée suite à la diminution de l'homocystéinémie et les auteurs concluent qu'il n'y a pas de preuve qui soutienne l'utilisation de la thérapie de diminution de l'homocystéinémie dans la prévention des maladies cardiovasculaires dans la population greffée rénale (94).

L'hypothèse a été sensiblement la même dans la prise en charge de la maladie rénale chronique. En effet, la maladie rénale chronique est une affection rénale associée à une anomalie dans la structure et dans la fonction rénale (96). La maladie rénale chronique est associée à une forte prévalence des complications cardiovasculaires et on retrouve également une augmentation de l'homocystéinémie en lien avec une insuffisance rénale chez ces patients. Cependant, encore une fois, la diminution de l'homocystéinémie par supplémentation en acide folique ne réduit pas le risque cardiovasculaire chez les patients souffrant de maladie rénale (97).

#### I.4.5. Recommandations en 2021

A la suite d'une thrombose, les recommandations encadrant la prise en charge des patients dépendent du type de thrombose. On différencie les thromboses artérielles des thromboses veineuses. Les thromboses veineuses se développent le plus souvent dans les veines des membres inférieurs et sont favorisées par la stase sanguine, les lésions pariétales endothéliales, et l'hypercoagulabilité sanguine. Les thromboses artérielles se déclenchent principalement par une lésion pariétale, secondaire à la rupture d'une plaque athéroscléreuse instable.

En ce qui concerne les thromboses veineuses, terme regroupant souvent les thromboses veineuses profondes et les embolies pulmonaires, il existe plusieurs sources de recommandations qui s'accordent à ne plus doser l'homocystéine plasmatique totale de manière systématique. Dans les recommandations de la société savante de thrombophilie, datant de 2009, le dosage de l'homocystéine totale n'est pas recommandé en systématique. Cependant, il peut être « envisagé dans les formes graves de maladie thromboembolique veineuse (MTEV) chez l'enfant et l'adulte jeune, en particulier lorsque celle-ci s'accompagne d'un tableau neurologique » (98). Ces recommandations sont actuellement en cours de réécriture.

Des recommandations plus récentes de « bonne pratique pour la prise en charge de la maladie veineuse thromboembolique chez l'adulte », par un groupe de travail français en pneumologie, ne citent plus l'homocystéine dans le bilan étiologique de MTEV en 2019 (99). Ils restreignent l'exploration biologique de la thrombose à la recherche d'un syndrome des anti phospholipides et au dosage de l'antithrombine. Dans un article paru dans le journal The New England Journal of Medicine en 2017, Connors a également retiré l'homocystéine du bilan de thrombophilie (100).

Enfin, les recommandations par l'American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee (ACOG), concernant le bilan de thrombophilie en gynécologie, ont changé et ne recommandent plus le dosage de l'homocystéine ou la recherche de variant *MTHFR* depuis 2018 (78).

En ce qui concerne les thromboses artérielles, les recommandations pour la prévention secondaire des AVC publiées par la HAS en 2018 indiquent que « la supplémentation en vitamine B9 et B12 est non recommandée en dehors d'une hyperhomocystéinémie documentée » (101). Le dosage de l'homocystéine semble donc toujours recommandé mais les conditions encadrant ce dosage ne sont pas explicitées. En 2014, il était indiqué dans le journal The Lancet que la réduction de l'homocystéine plasmatique totale par supplémentation en acide folique, vitamine B6 et vitamine B12 ne prévenait pas les accidents vasculaires cérébraux

récurrences ni aucun accident vasculaire cérébral (102). En 2018, un article paru également dans ce journal fait le point sur les effets de la prévention secondaire des AVC, et ne mentionne pas l'homocystéine.

Finalement, l'homocystéine est un paramètre de biochimie métabolique qui ne semble plus avoir sa place dans l'exploration des facteurs de risque cardiovasculaire puisque la bibliographie semble désormais s'accorder sur le fait que l'hyperhomocystéinémie modérée n'est pas un facteur de risque cardiovasculaire. Dans le cadre du bilan de thromboses veineuses, le dosage de l'homocystéine devrait être limité aux pathologies thrombotiques précoces associées à des anomalies dysmorphiques ou autres tableaux évocateurs (anomalies ophtalmologiques, neurologiques). Dans le cadre du bilan de thromboses artérielles, le dosage de l'homocystéine plasmatique reste une pratique courante pour l'exploration de l'AVC du sujet jeune, afin de ne pas méconnaître une homocystinurie qui se révélerait par un épisode thrombotique.

Ainsi, en se basant sur une bibliographie riche sur l'hyperhomocystéinémie modérée, les différentes sociétés savantes se sont accordées pour retirer le dosage de l'homocystéine du bilan de thrombose veineuse. Les avis divergent concernant la place du dosage de l'homocystéine dans l'exploration de l'AVC du sujet jeune. En effet, la question n'est pas de mettre en évidence une légère augmentation de l'homocystéine qui pourrait constituer un facteur de risque cardiovasculaire mais de dépister les (très) rares cas d'hyperhomocystinémies majeures, où l'homocystéine joue un rôle dans la survenue de l'épisode thrombotique et pourrait être une cause de récurrence.

## **I.5. Problématique**

Durant les dix dernières années, l'état des connaissances sur l'homocystéine a beaucoup évolué, avec de nombreuses études centrées principalement sur l'impact d'une hyperhomocystéinémie modérée sur la prévalence des maladies thromboemboliques. Les conclusions de ces études ont entraîné une modification progressive des recommandations et des pratiques.

Les hyperhomocystéinémies intermédiaires et sévères, beaucoup plus rares, sont beaucoup moins documentées. Il n'existe pas de consensus sur leur exploration et leur prise en charge. Cependant, des groupes de travail, comme les praticiens de la SFEIM, ont proposé des arbres décisionnels pour aider les praticiens dans la prise en charge de ces situations.

Dans ce travail de thèse, on réalise une évaluation des pratiques nantaises sur six ans, entre 2014 et 2020 afin d'évaluer la juste prescription ainsi que la bonne interprétation et prise en compte des résultats de ce dosage. Pour ce faire, une extraction des prescriptions du dosage de l'homocystéine entre 2014 et 2020 a été réalisée. On réalise une étude de la distribution des services prescripteurs ainsi que des indications de ce dosage. Enfin, une analyse des dossiers cliniques des patients est réalisée afin d'évaluer la prise en compte du résultat de ce dosage dans la prise en charge des patients.

## **II. PARTIE II : ANALYSE DES PRESCRIPTIONS DU DOSAGE DE L'HOMOCYSTÉINE À NANTES ENTRE 2014 ET 2020**

### **II.1. Recueil de données**

Dans cette étude, nous sommes partis d'une extraction informatique à partir du logiciel laboratoire DxLab. Nous avons fait une requête entre le 1<sup>er</sup> janvier 2014 et le 31 décembre 2020, afin de répertorier toutes les demandes de dosages d'homocystéine enregistrées dans cet intervalle de temps. Les données extraites comprenaient :

- le numéro de demande laboratoire (numéro d'enregistrement de l'analyse),
- le numéro d'IPP,
- l'identité du patient (nom et prénom),
- sa date de naissance,
- son sexe,
- le code UF du service prescripteur,
- la date du prélèvement,
- la valeur du dosage de l'homocystéine.

Afin de compléter cette étude, l'indication de la prescription a été recherchée systématiquement pour tous les dosages entre le 1<sup>er</sup> décembre 2018 et le 31 décembre 2020, soit pour 1035 demandes. Ces informations ont été obtenues grâce au logiciel de soin du CHU de Nantes, PowerChart. Pour les demandes de dosage provenant de sites extérieurs (CH de Saint-Nazaire, centre de prélèvement), les indications n'ont pas pu être recueillies. Toutes les analyses prenant en compte l'indication du dosage portent donc sur ces  $n = 1035$  dosages d'homocystéine et non sur l'ensemble des données. Ces 1035 dosages ont été prescrits pour 902 patients différents.

### **II.2. Analyse des résultats**

Entre janvier 2014 et décembre 2020, on comptabilise 4752 dosages d'homocystéine réalisés au CHU de Nantes pour 3902 patients différents.

## II.2.1 Services prescripteurs

Après avoir exclu les dossiers extérieurs au CHU de Nantes, l'analyse des services prescripteurs du dosage de l'homocystéine fait ressortir deux principaux prescripteurs : la neurologie (43% des prescriptions) et la pédiatrie (28%).

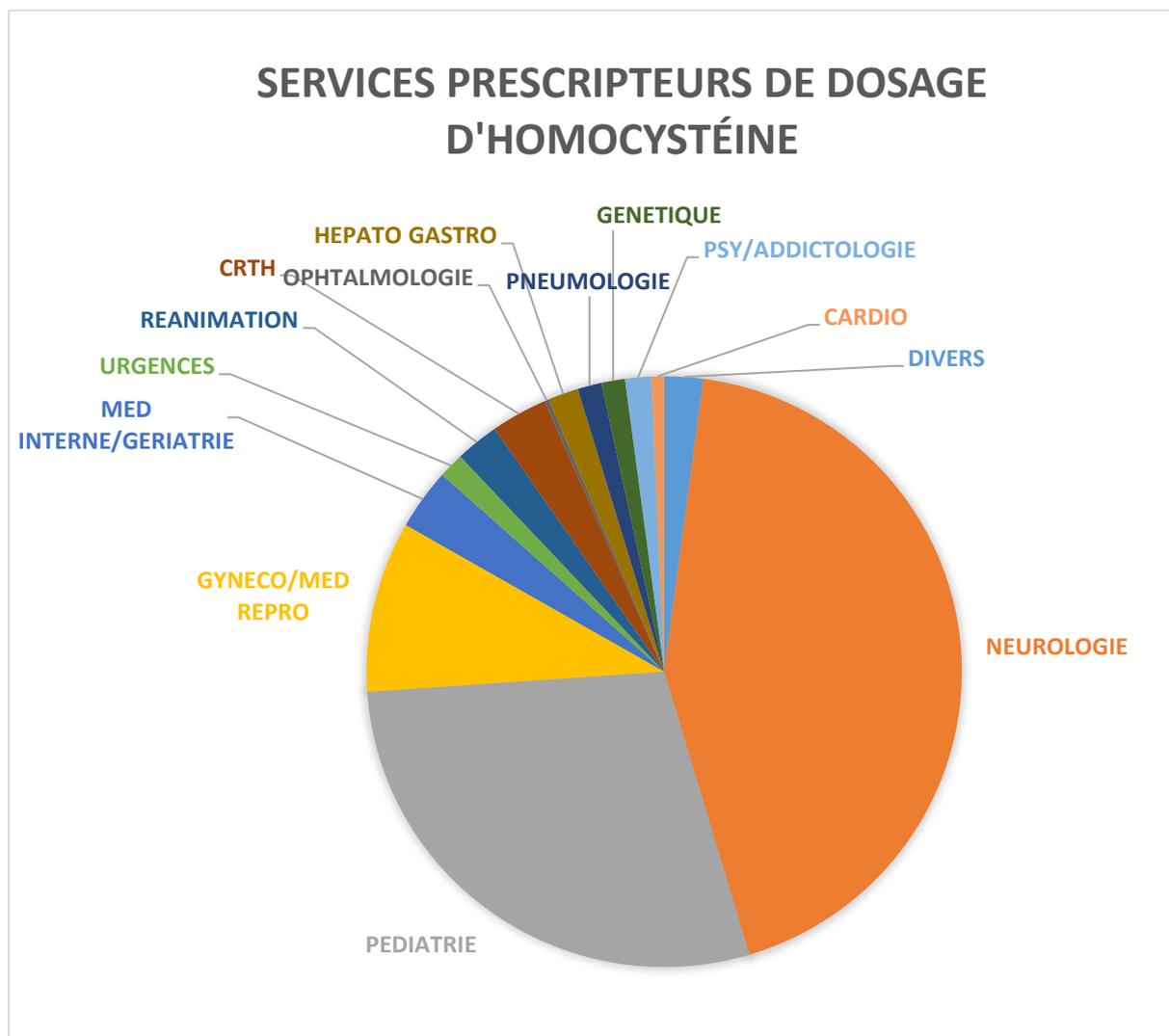


Figure 20 - Répartition des services prescripteurs de dosages d'homocystéine

Les services de neurologie regroupent les services d'hospitalisation et de consultation en neurologie, ainsi que les unités de neurovasculaire et de neurochirurgie. Les prescriptions de dosage d'homocystéine y sont quasi exclusivement liées à l'exploration d'un risque thrombotique suite à la survenue d'un AVC.

Ensuite, les services de pédiatrie regroupent l'hospitalisation, l'hôpital de jour (HDJ), la néphropédiatrie, la consultation en pédiatrie mais également la réanimation pédiatrique, les urgences pédiatriques et la néonatalogie.

L'étude des services prescripteurs de dosages d'homocystéine montre également qu'environ un quart des demandes proviennent de services divers comme la gynécologie ou la médecine de la reproduction, pour 9,5% des demandes. La médecine interne associée à la gériatrie représente 3,4% des demandes. Le centre de référence de traitement de l'hémophilie (CRTH) représente 3,1% des demandes. Le CRTH ne reçoit pas que des patients hémophiles mais s'intéresse à tous les troubles de l'hémostase et de la coagulation. Ils réalisent régulièrement des bilans de thrombophilie et le dosage de l'homocystéine peut parfois faire partie de ce bilan. Les services de réanimation et d'urgences adulte représentent respectivement 2,4 et 1,4% des prescriptions. Il s'agit pour la plupart du temps de recherches de facteurs de risques thrombotiques chez un patient chez qui le dosage d'homocystéine n'aurait pas été déjà documenté ou parfois de bilan assez large de suspicion de maladie métabolique. Très souvent dans les suspicions de maladie métabolique on ne retrouve pas de clinique faisant évoquer une homocystinurie, mais le dosage d'homocystéine est réalisé de manière systématique au même titre qu'une chromatographie des acides aminés plasmatiques. Les services d'hospitalisation psychiatrique représentent 1,4% des prescriptions et il s'agit le plus souvent d'exploration de syndrome dépressif, schizophrénie ou psychose. Enfin, on retrouve également les services d'hépto-gastro-entérologie avec 1,6%, la génétique médicale avec 1,4% et la pneumologie avec 1,3%.

La prescription de dosage d'homocystéine par l'ophtalmologie est anecdotique avec 0,2% des prescriptions. Il s'agit quasi exclusivement de prescription pour exploration d'une luxation du cristallin, symptôme interpellant l'ophtalmologiste sur la possibilité d'une homocystinurie classique.

### II.2.2. Indications de prescription du dosage de l'homocystéine

L'analyse de l'indication des prescriptions a été réalisée sur les dosages réalisés entre le 1<sup>er</sup> décembre 2018 et le 30 décembre 2020, soit 1035 demandes. La première indication est l'exploration de thromboses qui représente 56,7% des prescriptions et est représentée en gris sur la figure 21. Sur cette figure, on ne distingue pas les thromboses veineuses des thromboses artérielles. Depuis 2018, le dosage de l'homocystéine ne fait plus partie du bilan de thrombose dans la maladie thromboembolique veineuse. Les sociétés savantes ont retiré ce dosage des recommandations suite à la publication de nombreuses études montrant que l'hyperhomocystéinémie modérée n'était finalement pas un facteur de risque cardiovasculaire indépendant et que sa diminution ne réduisait pas l'incidence des maladies cardiovasculaires. Les recommandations concernant le dosage de l'homocystéine dans l'exploration des AVC ne

sont pas aussi explicites. En effet, la HAS ne cite pas le dosage de l'homocystéine dans ses recommandations de 2018 mais indiquent que les hyperhomocystéinémies documentées doivent être supplémentées (101). Au CHU de Nantes, l'homocystéine fait partie du bilan étiologique systématiquement réalisé pour l'AVC du sujet jeune, c'est-à-dire avant 55 ans.

En deuxième position, on retrouve le suivi annuel des greffés rénaux, avec 14,7% des prescriptions. Ces bilans sont réalisés uniquement en néphropédiatrie. Il n'existe pas de recommandations nationales pour la réalisation d'un tel dosage dans le suivi annuel du greffé rénal.

La troisième indication est l'exploration de maladies métaboliques avec 12,4% des prescriptions. Dans cette indication, on regroupe le diagnostic et le suivi des maladies héréditaires du métabolisme. Les tableaux cliniques associés à une exploration métabolique et un dosage de l'homocystéine sont assez variés. On retrouve le bilan de convulsions néonatales, l'exploration d'anomalies de la substance blanche (leucodystrophie), l'exploration d'anomalies développementales, comportementales ou encore l'exploration de troubles neurologiques. On retrouve également des enquêtes familiales suite au diagnostic d'un enfant.

En cinquième position, on retrouve des prescriptions provenant de la gynécologie ou de la médecine de la reproduction. Bien que les recommandations aient changé depuis 2017, on retrouve encore quelques dosages d'homocystéine par ces services. Il s'agit alors fréquemment d'une exploration suite à une mort fœtale *in utero*, des difficultés d'implantation embryonnaire, ou encore des demandes de patientes qui font une démarche de procréation médicalement assistée (PMA) en Espagne, car ces dosages leur sont demandés. Ces indications ne représentent plus que 5,7% des prescriptions.

Enfin, on retrouve de rares cas de prescription de l'homocystéine dans l'exploration d'anémie. Cette indication est anecdotique mais tout à fait justifiée, puisque l'homocystéine est un marqueur sensible et spécifique de carence intracellulaire en vitamine B12 ; son augmentation peut donc être informative dans un contexte d'anémie macrocytaire à vitamine B9 et B12 plasmatique normales (cf. Partie IV).

Il est à noter qu'il y a également quelques prescriptions dans le cadre du suivi des patients Parkinsoniens traités par Duodopa<sup>®</sup> par sonde duodénale. Ces patients sont relativement rares (7 à 8 suivis) car ce système d'administration est assez lourd, contraignant et cher.

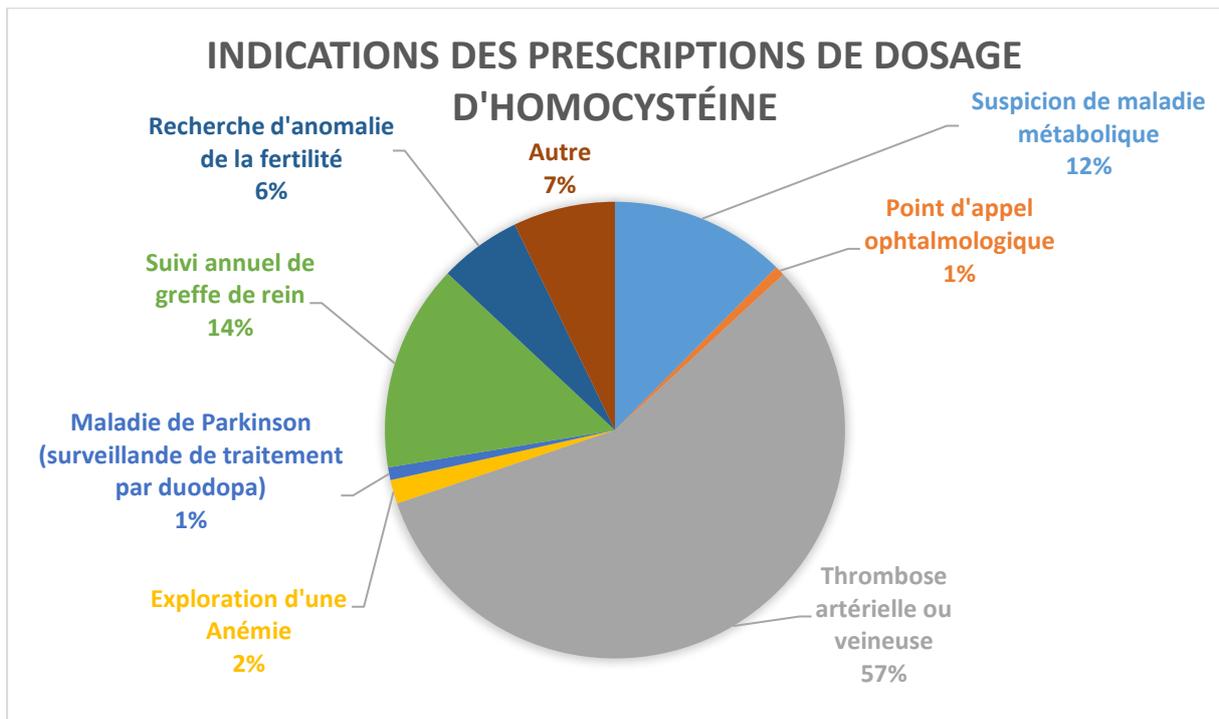


Figure 21 - Indications des prescriptions de dosage d'homocystéine

### II.2.3. Informations sur les patients

L'étude a porté sur 4752 dosages, l'âge moyen des patients est de 36.1 ans, et le sexe ratio est équilibré avec 51,1% d'hommes et 48,9% de femmes. L'âge des patients au moment de la prescription est représenté sur la figure 22, et montre deux sous-populations : une population pédiatrique avec la recherche d'anomalies métaboliques et une population adulte avec surtout l'exploration de thromboses.

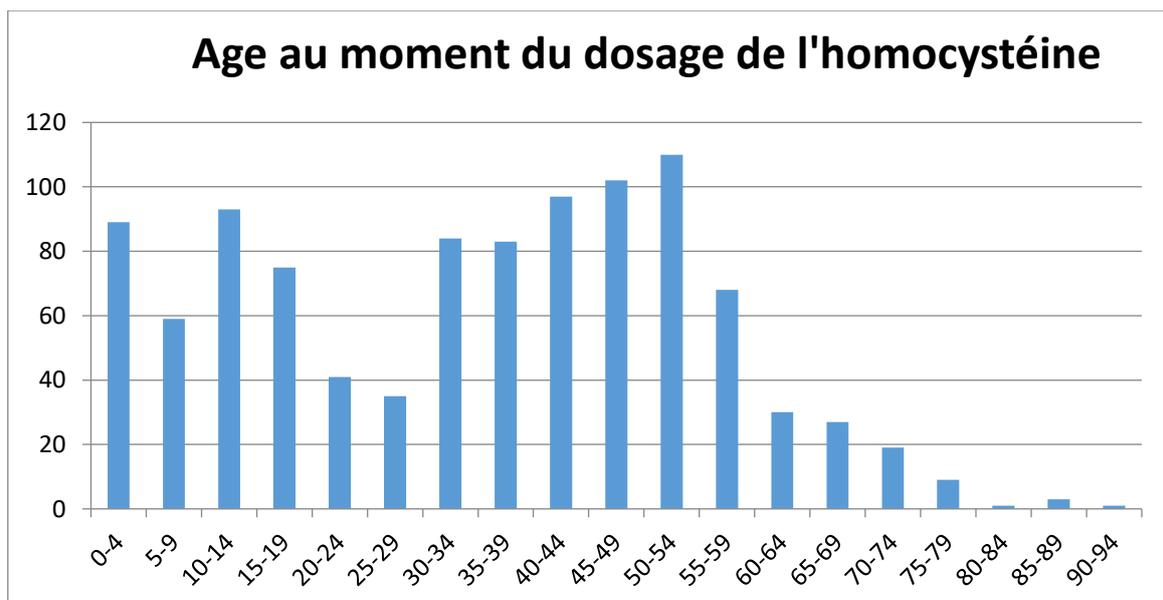


Figure 22 - Age au moment du dosage, toutes indications confondues

## II.2.4. Evolution des prescriptions entre 2014 et 2020

Lorsque l'on s'intéresse à l'évolution de la prescription du dosage de l'homocystéine sur les sept dernières années, on peut voir que le nombre de dosages est en constante diminution passant de 831 prescriptions en 2015 à 516 en 2020. Alors que les prescriptions des services de neurologie et de pédiatrie sont assez stables au cours du temps, les prescriptions des services extérieurs au CHU de Nantes et de la gynécologie ont considérablement diminué. Pour les demandes extérieures, cette diminution s'explique par l'internalisation de ce paramètre par le CH de Saint-Nazaire en novembre 2018, qui réalise désormais 150 dosages par an sur Architect i1000. Concernant les dosages réalisés pour la gynécologie, on peut expliquer la diminution de la prescription par l'évolution des recommandations.

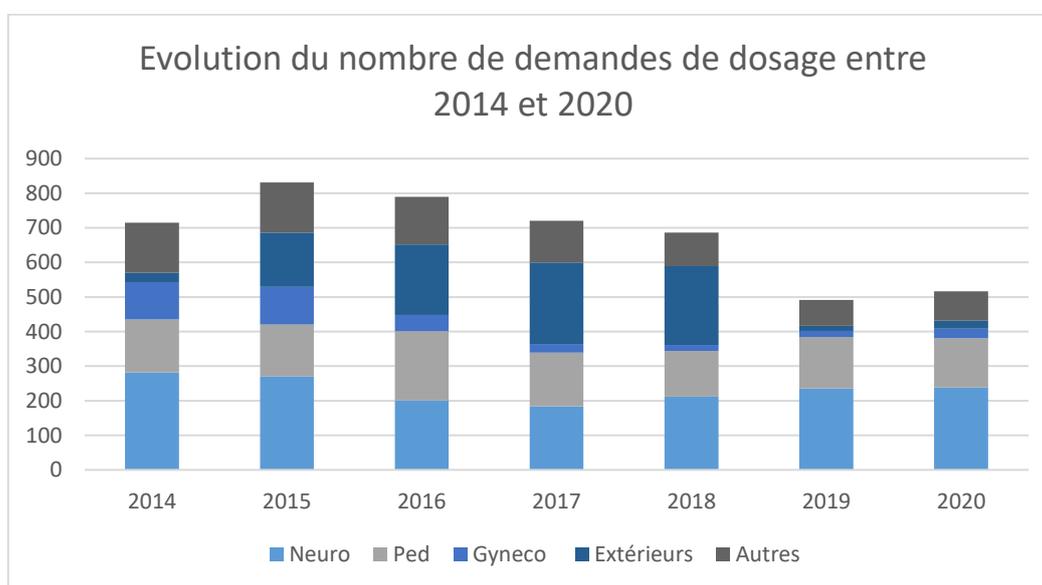


Figure 23 - Evolution de la prescription du dosage de l'homocystéine entre 2014 et 2020

## II.2.5. Répartition des valeurs de dosage d'homocystéine

Sur les 4752 dosages analysés, 83,9% sont normaux (homocystéine < 15  $\mu\text{mol/L}$ ), 8,4% sont modérément augmentés (homocystéine entre 15 et 30  $\mu\text{mol/L}$ ), 3,4% présentent une hyperhomocystéinémie intermédiaire (homocystéine entre 30 et 100  $\mu\text{mol/L}$ ) et enfin 0,4% sont sévèrement augmentés (homocystéine supérieure à 100  $\mu\text{mol/L}$ ), soit 19 dosages (Figure 24). Les dosages non conformes représentent tout de même 4% des dosages. Ils sont le plus souvent liés à un problème d'acheminement (non-respect de délai et de la température d'acheminement), ou plus rarement liés à une quantité insuffisante.

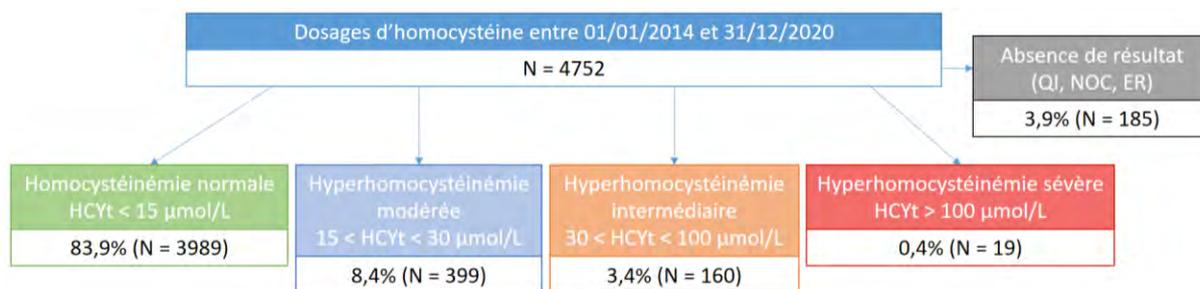


Figure 24 - Résultats des dosages de l'homocystéine

### II.2.5.1. Hyperhomocystéinémies sévères

Sur les 19 résultats d'hyperhomocystéinémie sévère, 7 ont été réalisés pour le suivi d'une même patiente (patiente 1 dans le tableau 1), atteinte d'une homocystinurie classique par déficit en CBS (dont l'histoire est rapportée dans la partie III.3.). Deux autres ont été réalisés dans le cadre de bilan métabolique et ont permis le diagnostic de déficit en Cbl C. Il s'agissait pour le patient 2 d'un diagnostic chez un nouveau-né présentant une hypotonie axiale associée à une mauvaise prise de poids et une absence de contact oculaire à un mois de vie. Son hyperhomocystéinémie s'élevait à 170 µmol/L au moment du diagnostic. Pour le patient 3, le diagnostic a été beaucoup plus tardif. En effet, le patient était suivi depuis des années pour un syndrome psychotique. Son déficit en Cbl C a été diagnostiqué en 2014, à l'âge de 30 ans devant une aggravation de sa psychose associée à l'apparition secondaire nouvelle d'un trouble de la marche et de l'équilibre en lien avec une myélopathie. A ce moment-là, l'homocystéinémie est retrouvée à 290 µmol/L.

Pour ces deux erreurs innées du métabolisme (déficit en CBS et Cbl C), l'augmentation majeure de l'homocystéine permet d'orienter rapidement les cliniciens vers une anomalie génétique, avant l'obtention des résultats de chromatographie des acides aminés plasmatiques et chromatographie des acides organiques urinaires externalisés au CHU de Lyon. La nature du trouble métabolique ne pourra cependant être déterminée qu'une fois le bilan métabolique complet, avec notamment la quantification de la méthionine dans la chromatographie des acides aminés plasmatiques.

Le dosage du patient 4 a également été réalisé dans le cadre d'une exploration de maladie héréditaire du métabolisme, il s'agit d'un nouveau-né qui a présenté à 10 jours de vie une hypotonie associée à une mauvaise prise alimentaire et un ictère néonatal. Au cours de son hospitalisation, l'enfant contracte une bronchiolite nosocomiale à VRS et son état s'aggrave avec une défaillance respiratoire à 2 mois dans un contexte de pancytopenie avec hypotonie et hydrocéphalie. Devant la pancytopenie, un myélogramme est réalisé montrant des signes de carence en vitamine B12. Un bilan métabolique est alors réalisé et retrouve une

hyperhomocystéinémie sévère, à 148  $\mu\text{mol/L}$ , associée à une méthionine basse faisant suspecter un déficit en Cbl C. La supplémentation en vitamine B12, acide folinique et L-carnitine permet une diminution de l'homocystéinémie. L'exploration génétique ne retrouve pas de variant et l'exploration étiologique est toujours en cours.

Ensuite, les patients 5, 6, et 7 sont des nouveau-nés pour lesquels on a mis en évidence un déficit profond en vitamine B12, sur régression psychomotrice ou anomalie du comportement. L'exploration de ces carences a permis de mettre en évidence une maladie de Biermer chez les mamans de deux enfants (patient 5 et 7) et une maladie d'Imerslund-Gräsbeck chez la maman du patient 6. Dans ces situations cliniques aussi, l'augmentation majeure de l'homocystéine (respectivement 148,8  $\mu\text{mol/L}$ , 124  $\mu\text{mol/L}$  et 102  $\mu\text{mol/L}$  pour les patients 5, 6 et 7) permet d'orienter rapidement les cliniciens sur une anomalie métabolique, dans l'attente des résultats du reste du bilan métabolique.

Enfin, les patients 8 à 12 sont des adultes ayant présenté un épisode de thrombose veineuse ou artérielle. La patiente 8 est une femme de 42 ans ayant pour antécédent une maladie de Crohn et une hypertension artérielle. Elle présente un AVC sylvien droit traité par fibrinolyse et thrombectomie. Suite à cet épisode de thrombose artérielle, un bilan étiologique est réalisé avec notamment un dosage de l'homocystéine, retrouvant une hyperhomocystéinémie intermédiaire à 70  $\mu\text{mol/L}$ , puis contrôlé à 138  $\mu\text{mol/L}$ , associée à une carence en vitamine B12 à 169  $\text{pg/ml}$  (valeurs de référence : 200 – 900  $\text{pg/ml}$ ) et des folates sériques à 3,2  $\text{ng/ml}$  (valeurs de référence : 3,0 – 17,0  $\text{ng/ml}$ ). Il a été réalisé une étude de génétique moléculaire de tous les exons du gène *MTHFR* retrouvant les variants c.677C>T et c.1305C>T à l'état hétérozygote composite. Il a également été retrouvé un anticoagulant circulant. La patiente a été supplémentée en vitamines B9 et B12 et une chromatographie des acides organiques urinaire a été réalisée et ne retrouve aucune anomalie. Le contrôle de l'homocystéine plasmatique après supplémentation retrouve une homocystéinémie à 15  $\mu\text{mol/L}$ . Chez cette patiente, l'hyperhomocystéinémie sévère pourrait être secondaire d'une part, à la carence en vitamine B12 en lien avec une diminution de l'absorption intestinale du fait de sa maladie de Crohn et, d'autre part, d'une diminution modérée de l'activité MTHFR.

La patiente 9 est une femme de 42 ans, hospitalisée à Saint-Nazaire. Le dosage a été prescrit dans le cadre de l'exploration étiologique d'une embolie pulmonaire et retrouve une hyperhomocystéinémie à 106  $\mu\text{mol/L}$ . Le bilan de la patiente a révélé une carence en vitamine B12 dans un contexte d'alcoolisme chronique.

La patiente 10 est une femme de 49 ans présentant un AVC sylvien gauche traité par fibrinolyse à La Roche-sur-Yon puis transférée au CHU de Nantes pour thrombectomie. La patiente a pour antécédents une embolie pulmonaire bilatérale, une hypercholestérolémie, un tabagisme actif et un alcoolisme chronique. Le bilan étiologique de l'AVC retrouve une hyperhomocystéinémie sévère à 103  $\mu\text{mol/L}$  associée à une anémie macrocytaire sur carence profonde en vitamines B9 (1,2 ng/mL) et B12 (<100 pg/mL). La suite de l'exploration a été réalisée à La Roche-sur-Yon.

Le patient 11 est un homme de 40 ans qui présente un AVC sylvien malin droit traité par craniectomie décompressive. Il a pour antécédent une polyaddiction alcool, tabac, cannabis. L'exploration étiologique retrouve une hyperhomocystéinémie sévère à 137  $\mu\text{mol/L}$  associée à une carence profonde en vitamine B9 (indosable). L'homocystéinémie plasmatique se normalise après supplémentation en vitamine B9 et aucune autre exploration n'est réalisée.

Le patient 12 est un homme de 28 ans se présentant aux urgences pour dyspnée, secondaire à une embolie pulmonaire bilatérale sans étiologie retrouvée. A l'occasion du bilan étiologique, on retrouve une hyperhomocystéinémie sévère à 120  $\mu\text{mol/L}$  en lien avec un déficit profond en folates. Le patient est supplémenté en vitamine B9 avec consignes de contrôler l'homocystéine afin de vérifier sa normalisation et ne pas méconnaître une anomalie métabolique mais aucun dosage n'a été réalisé et le patient n'a pas été revu au CHU depuis.

Tableau 1 - Contexte clinique des hyperhomocystéinémies sévères entre 2014 et 2020

Patient	Date de naissance	Age	Sexe	Service prescripteur	Date de l'analyse	Dosage de l'homocystéine Totale (µmol/L)	Contexte clinique
1	10/12/2002	11	F	PEDIATRIE GENERALE	29/10/2014	117	Suivi d'un déficit en CBS
		12	F	PEDIATRIE GENERALE	17/02/2015	133	
		13	F	PEDIATRIE GENERALE	13/07/2016	144	
		15	F	CENTRE DE PRELEVEMENT	03/05/2018	177	
		15	F	PEDIATRIE GENERALE	02/07/2018	161	
		15	F	PEDIATRIE GENERALE	20/06/2018	127	
		17	F	GENETIQUE CLINIQUE	20/07/2020	185	
2	09/04/2016	0	M	PEDIATRIE GENERALE	12/05/2016	170	Diagnostic d'un déficit en Cbl C, sur hypotonie axiale, anomalie neurologique et nystagmus.
		0	M	GENETIQUE CLINIQUE	13/06/2016	125	
3	09/10/1983	31	M	NEUROLOGIE HC 4EST	10/11/2014	290	Découverte d'un déficit en Cbl C sur aggravation de psychose, troubles de la marche et de l'équilibre, paraparésie spastique.
4	29/12/2019	0	M	REA PEDIAT 4E	14/02/2020	148	Probable trouble du métabolisme intra-cellulaire de la vitamine B12, en cours d'exploration génétique. Initialement un déficit en Cbl C était suspecté devant une pancytopenie avec hypotonie, hydrocéphalie et défaillance ventilatoire. Mais l'étude génétique n'a pas mis en évidence d'anomalie du gène Cbl C.
5	31/10/2017	0	F	PEDIATRIE GENERALE	09/07/2018	148,8	Découverte d'un déficit profond en Vitamine B12 sur regression psychomotrice lié à un allaitement maternel exclusif, avec découverte de maladie de Biermer chez la maman
6	18/04/2019	0	M	PEDIATRIE GENERALE	02/10/2019	124	Découverte d'une maladie d'Imerslund-Gräsbeck avec déficit profond en Vitamine B12 sur regression psychomotrice et mouvement anormaux.
7	03/10/2018	0	F	ONCO PEDIAT	15/12/2018	102	Exploration d'une bicytopenie chez un nouveau-né hospitalisé pour mauvaise prise de poids, avec allaitement exclusivement maternel et découverte d'une maladie de Biermer chez la maman.
8	18/11/1971	43	F	CTRE TRAIT HEMOPHILIE	30/01/2015	138	AVC ischémique sylvien droit, mise en évidence d'un déficit en vitamine B12 et B9 d'un variant hétérozygote composite du gène <i>MTHFR</i>
9	26/11/1972	42	F	CH ST NAZAIRE	17/04/2015	106	Embolie pulmonaire
10	26/04/1967	49	F	UNITE NEUROVASC AIGUE	12/05/2016	103	AVC sylvien droit, anémie macrocytaire sur carence en vitmaine B12 (<100 pg/mL) et B9 (1,2 ng/mL)
11	30/06/1978	40	M	REA CHIRURGICALE HGRL	05/11/2018	137	AVC sylvien malin, anémie avec déficit profond en vitamine B9 (<0,6 ng/mL) et vitamine B12 normale.
12	13/08/1990	28	M	PNEUMO 3SUD HGRL	13/11/2018	120	Thrombose veineuse profonde (embolie pulmonaire bilatérale), déficit profond en vitamine B9 (0,8 ng/mL) et vitamine B12 normale

### II.2.5.2. Hyperhomocystéinémies intermédiaires

L'analyse des dosages d'homocystéine réalisés entre 2014 et 2020 retrouve 160 hyperhomocystéinémies intermédiaires. On s'est intéressé plus particulièrement aux dosages entre 50 et 100  $\mu\text{mol/L}$ , car le seuil de 50  $\mu\text{mol/L}$  est celui proposé par la SFEIM comme limite des hyperhomocystéinémies à explorer (Figure 25). On comptabilise 62 dosages entre 50 et 100  $\mu\text{mol/L}$ . Parmi eux, 34 sont des dosages effectués dans le cadre de suivi ou de suspicion de maladies héréditaires du métabolisme (principalement des suivis de patients atteints de déficit en Cbl C). 15 ont été réalisés dans le cadre de bilan d'AVC, 7 pour le bilan de thromboses veineuses. Une demande a été réalisée pour un patient traité par Duodopa<sup>®</sup>. Une demande a été réalisée pour un bilan de paresthésies. En enfin, 2 demandes sont extérieures au CHU et donc sans informations cliniques.

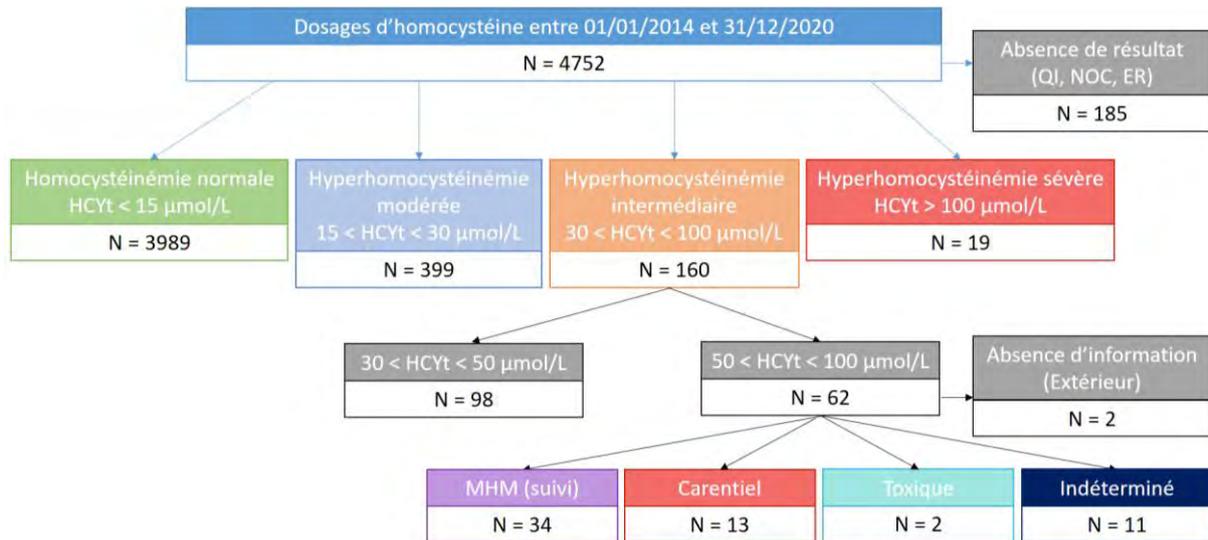


Figure 25 - Analyse des étiologies des hyperhomocystéinémies intermédiaires entre 50 et 100  $\mu\text{mol/L}$

L'analyse des dossiers cliniques de ces différentes situations d'hyperhomocystéinémie montre qu'en dehors des suivis des patients suivis pour une maladie héréditaire du métabolisme (MHM), l'exploration de l'hyperhomocystéinémie n'est pas toujours réalisée. On retrouve 13 hyperhomocystéinémies d'origine carentielle, avec 5 déficits profonds en vitamine B9, 4 déficits profonds en vitamine B12 et 4 déficits mixtes. On note également deux causes toxiques avec un cas d'intoxication chronique au protoxyde d'azote (l'histoire clinique de ce patient est rapportée en partie III.1) et un cas secondaire à un traitement par Duodopa<sup>®</sup>. Enfin, 11 hyperhomocystéinémies sont de cause indéterminée, avec 2 situations pour lesquelles le dosage était une demande extérieure au CHU, et 9 situations où les dosages vitaminiques n'ont pas été

réalisés au CHU, et l'hyperhomocystéinémie n'est peu ou pas signalée dans les comptes rendus d'hospitalisation.

Parmi les hyperhomocystéinémies pour lesquelles l'origine est carencielle ou indéterminée (soit 24 dossiers), 14 présentent une exploration insuffisante voire aucune exploration dans le dossier du patient. En effet, devant une hyperhomocystéinémie  $> 50 \mu\text{mol/L}$ , il est justifié de réaliser au minimum le dosage des vitamines B9 et B12 afin d'explorer la première cause d'élévation intermédiaire de l'homocystéine. Si une carence vitaminique pouvant expliquer l'élévation de l'homocystéine est mise en évidence, il convient de supplémenter le patient et de contrôler la décroissance de l'homocystéinémie, après 1 à 3 mois de supplémentation. Cependant un bilan étiologique plus complet est souhaitable, car la carence vitaminique n'exclut pas une cause génétique et la supplémentation peut momentanément normaliser l'homocystéinémie.

Ici, 14 dossiers ne présentent pas de contrôle de l'homocystéine, et parfois l'hyperhomocystéinémie n'est même pas mentionnée dans le dossier médical du patient.

#### II.2.6. Prescription d'homocystéinémie dans le bilan de thrombose artérielle ou veineuse

Lorsque l'on s'intéresse aux résultats des dosages réalisés dans le cadre de l'exploration d'une thrombose, qu'elle soit artérielle ou veineuse, on peut voir que la très grande majorité des patients présente une homocystéinémie normale (87,7% des patients) (Figure 26). Sur une période de deux ans et un mois, sur 1035 dosages dont 592 prescrits dans l'exploration de thrombose pour 549 patients différents, on ne retrouve qu'une seule situation d'hyperhomocystéinémie sévère, il s'agit du patient 12 (tableau 1) et 2,5% d'hyperhomocystéinémies intermédiaires, c'est-à-dire 15 patients.

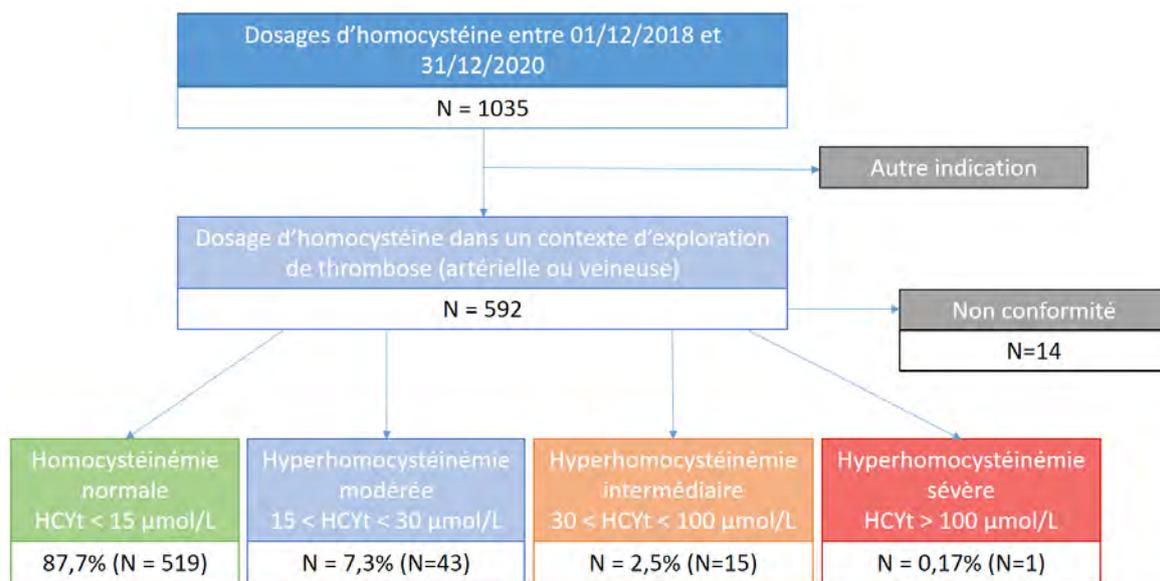


Figure 26 - Répartition des valeurs d'homocystéinémie pour l'indication "exploration de thrombose artérielle ou veineuse"

Concernant les hyperhomocystéinémies intermédiaires découvertes dans un contexte de thrombose, le contexte clinique des 13 patients (15 dosages) est détaillé dans le tableau 2. Hormis le patient 13 et les patients pour lesquels l'information est manquante, l'origine semble à priori toujours carencielle (valeurs de référence pour la vitamine B9 : 3,0 – 17,0 ng/ml et pour la vitamine B12 : 200 – 900 pg/ml). On retrouve une majorité de carences en vitamine B9 (6 cas), ainsi que 2 situations de carences mixtes et une situation de carence en vitamine B12. Cependant, aucune exploration métabolique et aucune analyse génétique n'ont été réalisées pour ces patients, ce qui ne permet pas d'exclure une cause génétique à ces hyperhomocystéinémies.

Au sein des 592 dosages pour exploration de thrombose réalisés chez 549 patients différents, 122 patients avaient 55 ans ou plus soit 20,6% des demandes.

Tableau 2 – Contexte clinique des hyperhomocystéinémies intermédiaires prescrites pour l'exploration de thrombose.

N° Patient	Age	Sexe	Date du dosage	Homocystéine totale (µmol/L)	Contexte clinique	Dosages vitaminiques		Prise en compte de l'HCY dans le dossier médical	Facteurs de risques cardiovasculaires identifiés
						B12 (pg/ml)	B9 (ng/ml)		
13	52	F	01/07/2019	32,7	AVC d'origine athéromateuse	214	3,5	Homocystéine non évoquée dans le dossier	HTA, dyslipidémie, Tabac
14	78	F	11/07/2020	33,2	Thrombose veineuse cérébrale compliquée d'une hémorragie sous-arachnoïdienne et d'un infarctus veineux	NR	NR	Homocystéine évoquée dans le dossier, dosages vitaminiques probablement prescrits et réalisés en ville	Sans facteur déclenchant retrouvé et sans thrombophilie mise en évidence
15	42	M	30/08/2019	35,3	Coronaropathie	353	NR	Pris en compte de l'hyperhomocystéinémie et mise en place d'une vitaminothérapie (B9 et B12), puis contrôle de l'homocystéine qui ressort à 5,4µmol/L après supplémentation	HTA, hérédité, tabagisme sevré
	42	M	18/07/2019	41,5		187	3,4		
	42	M	08/07/2019	52		187	3,4		
16	36	M	06/08/2020	37,2	AVC ischémique occipital gauche, cause cardio-embolique très probable sur une insuffisance mitrale	908	1,8	Homocystéine non évoquée dans le dossier, pas de supplémentation et pas de contrôle	
17	56	M	27/08/2020	38	AVC ischémique profond droit, Origine retenue : lacunaire, avec découverte d'une microangiopathie hypertensive à l'IRM	220	1,6	Homocystéine non évoquée dans le dossier, mais carence en Vit B9 évoquée, découverte après la sortie et non contrôlée	Tabac, OH chronique, pas d'HTA, pas de dyslipidémie, pas de DT2
18	38	M	17/12/2020	40,9	AVC sylvien profond droit, origine cryptogénique suspectée	381*	1,3*	Homocystéine évoquée dans le dossier, dosages vitaminiques réalisés à l'extérieur, retrouvent une carence profonde en folates. Homocystéine contrôlée, en diminution mais pas normalisée	Obésité stade I, HTA non traitée
19	24	M	22/05/2020	41,6	AVC ischémique frontal droit sur foramen ovale perméable + récurrence	219	1,7	Homocystéine prise en compte dans le dossier, normalisée après supplémentation (dosages réalisés en ville)	
20	42	M	30/10/2020	43,9	AVC ischémique jonctionnel gauche en deux temps (lésions d'âge différent) sur occlusion de la carotide interne gauche	333	1,3	Homocystéine évoquée dans le dossier comme probablement secondaire à la carence en folate	HTA, Tabac
21	34	F	25/11/2019	49,4	AVC sylvien droit	176	<0,6	Homocystéine évoquée, en lien avec carence en folates.	Tabac, obésité
22	51	M	08/08/2019	52,2	AVC ischémique sylvien gauche, sur occlusion de la carotide interne gauche, origine thrombo-embolique probable	138	1,4	HCY non évoquée mais les carences en folates et en vitamines B12 sont évoquées, mise en place d'une supplémentation et contrôle	HTA, dyslipidémie
23	22	M	09/01/2019	52,2	Thrombophlébite cérébrale sans facteur favorisante	NR	NR	Homocystéine prise en compte dans le dossier, supplémentation en B12 et folates et contrôle à 3 mois	
24	46	F	19/03/2020	56,6	Embolie pulmonaire bilatérale proximale	392	2,5	Homocystéine non évoquée dans le dossier	Contexte néoplasique (adénocarcinome de l'ovaire)
25	51	M	19/12/2018	58,5	AVC ischémique	NR	NR	Dans le dossier l'homocystéine est marquée comme "normale"	Tabac

\* dosages réalisés à l'extérieur du CHU et scannés dans le dossier patient

# III. PARTIE III : À PROPOS DE CAS D'HYPERHOMOCYSTÉINÉMIE

## III.1. Cas clinique numéro 1

Il s'agit d'un jeune homme de 19 ans, sans antécédent particulier hormis de nombreux passages aux urgences dans l'adolescence suite à des « bagarres ». Il consulte son médecin traitant devant l'apparition de paresthésie et hypoesthésie des membres inférieurs. Le médecin lui prescrit un bilan biologique avec ionogramme, formule sanguine, sérologies virales, bilan hépatique et dosages vitaminiques puis l'oriente en consultation de neurologie au CHU de Nantes pour exploration de ce déficit sensoriel. Lors de la consultation, le patient présente un déficit sensitivomoteur des quatre membres, entraînant des troubles de l'équilibre et une difficulté à marcher. Le patient se plaint également de troubles psychiques avec une amnésie antérograde et une impression de dépersonnalisation, ainsi que des troubles urinaires (sphinctériens) et digestifs (constipation). Les réflexes ostéo-tendineux sont faiblement perçus mais symétriques. L'interrogatoire du patient met en évidence une consommation de cannabis depuis l'âge de 13 ans, et une inhalation importante de protoxyde d'azote 10 jours auparavant. Le bilan biologique réalisé avant la consultation ne retrouve aucune anomalie notable.

Le patient est alors hospitalisé en neurologie afin de réaliser une IRM cérébrale, une ponction lombaire ainsi qu'une mesure de la vitesse des conduction motrice et sensitive. Cette dernière est normale et permet d'écarter un syndrome de Guillain-Barré, première hypothèse par argument de fréquence devant ce patient de 19 ans ataxique. La ponction lombaire ne retrouve aucune anomalie, et exclut la suspicion de méningite. Enfin, l'IRM cérébrale met en évidence une myélite extensive et un hyper signal T2.

Durant l'hospitalisation, on note une persistance de la démarche ataxique et une majoration du déficit sensitif avec des paresthésies qui remontent progressivement jusqu'à un enraidissement des mains. Les réflexes ostéo-tendineux sont alors abolis. Une sclérose combinée de la moelle avec neuropathie par intoxication au protoxyde d'azote est suspectée et un dosage en urgence de la vitamine B12 est demandé, malgré un résultat normal sur le bilan biologique réalisé en ville. Une supplémentation par vitamine B12 est instaurée avec 1000 µg par jour pendant cinq jours puis une prise par semaine pendant un mois.

Le dosage de vitamine B12 est normal, à 262 pg/mL (valeurs normales entre 200 et 900 pg/mL). Le dosage de l'homocystéine réalisé quelques jours plus tard retrouve une

hyperhomocystéinémie intermédiaire avec une valeur de 53,3  $\mu\text{mol/L}$ . Le résultat du dosage de l'AMM ne sera disponible qu'à l'issue de l'hospitalisation et montre une élévation de l'AMM à 3.0  $\mu\text{mol/L}$  pour une valeur normale  $< 0,5 \mu\text{mol/L}$ .

Devant ce bilan biologique, le diagnostic de déficit en vitamine B12 secondaire à une action toxique du protoxyde d'azote est confirmé. Le protoxyde d'azote induit un déficit fonctionnel en vitamine B12 en oxydant l'atome de cobalt du noyau tétrapyrrol (cf. Annexe 1). Dans cette situation le dosage normal de vitamine B12 est peu informatif, et l'augmentation de l'homocystéine et de l'AMM témoignent d'un déficit fonctionnel en vitamine B12. La supplémentation en vitamine B12 par voie parentérale puis par voie orale est continuée. Après une hospitalisation de 18 jours dans le service de neurologie, le patient est orienté vers le service de médecine physique et réadaptation pour rééducation. Le patient présente alors des troubles de l'équilibre importants, un périmètre de la marche très diminué et nécessite une canne pour se déplacer. Il restera environ 1 mois en MPR. A l'issue de son hospitalisation, le patient peut se déplacer sans canne mais montre tout de même une fatigabilité limitant ses déplacements.

Les déficits secondaires à une toxicité du protoxyde d'azote sont des situations rares mais en constante augmentation ces dernières années suite à l'explosion de la consommation de protoxyde d'azote pour un usage récréatif chez les jeunes adultes. En cas de clinique évocatrice d'un déficit en vitamine B12 associée à une suspicion de consommation de protoxyde d'azote, le dosage de l'homocystéine doit être réalisé avec le dosage de la vitamine B12, avant toute supplémentation. Un article pour la Revue Francophone des Laboratoire a été réalisé en collaboration avec le centre d'addictovigilance des Pays de la Loire et sera publié en Septembre 2021 (Annexe 1).

### **III.2. Cas clinique numéro 2**

Il s'agit d'un enfant de 5 mois, amené aux urgences pédiatriques par sa maman devant l'apparition de mouvements anormaux du membre supérieur droit, associé à une fixité du regard pendant 2 à 3 minutes. La maman décrit deux autres épisodes similaires dans la semaine. L'enfant est né à terme, à 40 semaines d'aménorrhées + 6 jours, et pesait à la naissance 3,425 kg. Il a montré une bonne adaptation à la vie extra-utérine et une bonne croissance sous allaitement maternel.

Il présente une régression des acquis depuis une semaine avec une diminution des sourires, une diminution du tonus axial et une majoration du temps de sommeil. L'examen clinique aux urgences confirme l'hypotonie axiale avec un enfant qui ne tient pas sa tête au tiré assis, ne relève pas sa tête sur le ventre. Il n'attrape pas les objets. Il n'y a pas de contact, ni de poursuite oculaire.

Devant cette régression psychomotrice chez un enfant de 5 mois, associée à des mouvements anormaux, on réalise un TDM cérébrale, un EEG et un bilan biologique. Le bilan biologique avec ionogramme et formule sanguine est normal. Le TDM met en évidence un élargissement des espaces péri-cérébraux, un décollement sous-dural hémisphérique gauche qui sera confirmé à l'IRM cérébral. L'EEG retrouve un tracé anormal, pauvre, ralenti et désorganisé.

Ces anomalies sont en faveur d'une pathologie constitutionnelle génétique ou métabolique et un bilan de biochimie métabolique complet est alors demandé avec chromatographie des acides aminés plasmatiques, chromatographie des acides organiques urinaires, dosage de la vitamine B12 et dosage de l'homocystéine. Au cours de l'hospitalisation l'état clinique est stable, avec une hypotonie axiale franche et une absence de contact oculaire.

La vitamine B12 est nettement abaissée à 85 pg/mL. Sur avis des métaboliciens, l'enfant est supplémenté en vitamine B12 par hydroxocobalamine 1mg/j par voie intra-musculaire pendant 7 jours et un bilan est également réalisé chez la maman. On supplémente également l'enfant en vitamine B1, B6, biotine, L-Carnitine.

Suite à l'introduction de la supplémentation vitaminique, on note une amélioration rapide avec un retour des sourires dès 24h-48h de traitement.

Le dosage de l'homocystéine met en évidence une hyperhomocystéinémie sévère à 124,0  $\mu\text{mol/L}$ . La chromatographie des acides aminés plasmatique retrouve une élévation franche de l'homocystéine libre et du disulfure homocystéine-cystéine, associée à une nette diminution de la méthionine. Cette hyperhomocystéinémie associée à une méthionine basse est en faveur d'un défaut de reméthylation de l'homocystéine. Par ailleurs, la chromatographie des acides organiques urinaires retrouve une excrétion importante d'AMM qui permet d'évoquer une anomalie du métabolisme ou de l'absorption ou une carence sévère en vitamine B12.

Devant ces résultats biologiques, la supplémentation en vitamine B12 est continuée, les vitamines B1, B6 et la biotine sont arrêtées et un nouveau bilan métabolique est prélevé une semaine après le début de la supplémentation. L'enfant présente plusieurs crises convulsives qui nécessitent la mise en place d'un traitement par Keppra et Rivotril.

Une semaine après supplémentation, l'homocystéine est mesurée à 15  $\mu\text{mol/L}$ , la vitamine B12 est supérieure à la limite de détection et on observe une normalisation complète de l'excrétion urinaire d'AMM ainsi que de la chromatographie d'acides aminés plasmatiques.

L'exploration de la maman a permis d'identifier une carence maternelle en vitamine B12 probablement en lien avec un syndrome d'Imerslund-Grasbeck. En effet, la biologie moléculaire a mis en évidence la présence de deux variants faux-sens pour le gène *CUBN* pouvant expliquer la carence maternelle en vitamine B12 ainsi que la carence de l'enfant suite à un allaitement maternel exclusif.

L'évolution de l'enfant après supplémentation vitamine est favorable avec une acquisition de la marche à 15 mois avec toutefois un léger retard dans l'acquisition du langage.

### **III.3. Cas clinique numéro 3**

Il s'agit d'une petite fille de 4 ans, chez qui une myopie forte associée à une luxation bilatérale des cristallins est détectée à l'occasion d'une consultation de PMI avant l'entrée en maternelle. Devant cette anomalie ophtalmologique fortement associée à la maladie de Marfan, l'enfant est orientée en consultation de génétique au CHU de Nantes.

A la consultation, l'examen clinique ne retrouve pas d'argument en faveur de la maladie de Marfan, il n'existe pas de dysmorphie, ni d'anomalie squelettique. On lui prescrit une chromatographie des acides aminés urinaires afin d'exclure une homocystinurie qui est une pathologie à évoquer devant une luxation du cristallin. L'enfant est adressée vers un chirurgien ophtalmologue pour une chirurgie des cristallins, car la correction optique ne permet pas d'obtenir une vision satisfaisante.

La chromatographie des acides aminés urinaires révèle une homocystinurie à 274 mmol/mol de créatinine pour une valeur normale  $< 1$  mmol/mol de créatinine. Ce résultat est fortement évocateur d'une homocystinurie par déficit en CBS. Le dosage d'homocystéine plasmatique retrouve une hyperhomocystéinémie sévère à 267,0  $\mu\text{mol/L}$ . Il sera ensuite réalisé une chromatographie des acides aminés plasmatiques retrouvant une nette augmentation de l'homocystine et du disulfure mixte, ainsi qu'une légère augmentation de la méthionine en faveur d'un déficit en CBS. Le diagnostic sera ensuite confirmé par une étude génétique révélant un variant hétérozygote composite du gène *CBS* avec un variant pathogène sur l'exon

5 (pIle214Ser) d'origine maternelle et un variant pathogène sur l'exon 7 (pThr257Met) d'origine paternelle.

Suite au diagnostic, un traitement par vitamine B6 a été introduit, initialement à 50 mg 2 fois par jour puis progressivement augmenté jusqu'à 375 mg 2 fois par jour. Malheureusement ce traitement n'a pas permis de diminuer l'homocystéinémie de l'enfant, faisant conclure à une forme résistante à la vitamine B6. Un régime alimentaire hypoprotidique strict limité en méthionine est alors instauré afin de prévenir le risque thrombotique associé à la pathologie. Le régime associe des produits hypoprotidiques avec des mixtures d'acides aminés dépourvus de méthionine et des parts de fruits et légumes pesées afin de mesurer la prise de méthionine. Le suivi du régime est très difficile et les valeurs d'homocystéine varient initialement autour de 200  $\mu\text{mol/L}$ . Un traitement par Bétaine, Aspégic et Spéciafoldine est également instauré.

Par la suite, une amélioration de l'observance du régime permet une amélioration de l'homocystéinémie. Par ailleurs, l'examen clinique et la croissance staturo-pondérale de l'enfant sont normaux.

Le suivi de cette jeune fille est marqué par des difficultés à suivre le régime strict, mais elle ne présente pas d'évènement indésirable grave en lien avec sa maladie, hormis une scoliose. Elle suit une scolarité normale.

## IV. PARTIE IV : DISCUSSION

### IV.1. Synthèse

L'homocystéine est un acide aminé, se trouvant à un carrefour métabolique. Elle joue le rôle d'intermédiaire de synthèse entre la méthionine et la cystéine et dépend de deux voies métaboliques. La voie de la reméthylation de l'homocystéine permet un recyclage de la méthionine et la voie de la transsulfuration permet une élimination de l'homocystéine sous forme de cystéine puis de sulfates. Ces différentes voies métaboliques impliquent de nombreuses enzymes et nécessitent trois vitamines essentielles qui sont les vitamines B6, B9 et B12.

Les dosages biologiques de la méthionine, de l'homocystéine ainsi que de l'acide méthylmalonique permettent d'appréhender l'intégrité de ces différentes voies métaboliques ainsi que la disponibilité suffisante en substrats et vitamines.

Plusieurs situations peuvent être à l'origine d'une hyperhomocystéinémie. Celle-ci peut être modérée, intermédiaire ou sévère. Alors que les hyperhomocystéinémies modérées et intermédiaires sont majoritairement d'origine acquise, secondaires à une insuffisance rénale ou une carence vitaminique, les hyperhomocystéinémies sévères sont principalement d'origine héréditaire. On retrouve les anomalies de la voie de la reméthylation liée à un défaut de transformation de l'homocystéine en méthionine. Le déficit peut être lié à un défaut d'activité d'une enzyme de la voie de la reméthylation, du cycle des folates ou du métabolisme de la vitamine B12. Les situations de carences profondes en vitamines B9 et/ou B12 peuvent également entraîner un défaut de reméthylation de l'homocystéine. Par ailleurs, les altérations de la voie de transsulfuration entraînent également des hyperhomocystéinémies sévères. Celles-ci sont principalement dues au déficit en CBS, enzyme clé de la voie de transsulfuration. On appelle ce déficit l'homocystinurie classique. Sa clinique associe des anomalies ophtalmologiques, squelettique, vasculaire et intellectuelle. Alors que les formes à révélation pédiatrique se manifestent le plus souvent par une atteinte ophtalmologique, les formes à révélation plus tardive peuvent être diagnostiquées à la suite d'un ou plusieurs épisodes de thrombose veineuse ou artérielle. L'homocystinurie est une maladie traitable, son diagnostic est donc essentiel afin de prévenir les récurrences de thromboses.

Il a été montré que l'hyperhomocystéinémie sévère était à l'origine de lésions endothéliales par des mécanismes impliquant la génération de ROS, la peroxydation lipidique, l'agrégation

plaquettaire et l'altération de la matrice extra-cellulaire. L'hyperhomocystéinémie sévère constitue donc un risque majeur de maladies cardiovasculaires. A contrario, les dernières méta-analyses confirment que l'hyperhomocystéinémie lorsqu'elle est modérée ne constitue pas un facteur de risque cardiovasculaire. Ainsi les recommandations encadrant la prescription de ce dosage ont évolué. En gynécologie, il n'est plus recommandé pour le bilan de fausses couches à répétition (78). En pneumologie, il ne fait plus partie du bilan de thrombose suite à un épisode d'embolie pulmonaire. Et la société savante de thrombophilie l'a retirée du bilan de thrombose (98–100).

Le dosage de l'homocystéine reste d'usage dans l'exploration des AVC du sujet jeune et doit également être prescrit dans toutes les situations de thromboses précoces ou récidivantes associées ou non à des anomalies dysmorphiques ou autres tableaux évocateurs (la dysmorphie pouvant être modérée).

Une étude française parue cette année souligne que l'étude sûrement excessive et finalement décevante de l'association entre hyperhomocystéinémie modérée et facteur de risque cardiovasculaire, a brouillé le tableau en délaissant l'étude des hyperhomocystéinémies intermédiaires et majeures (103). En effet, en retirant le dosage de l'homocystéine du bilan de thrombose, le risque est de méconnaître une cause traitable de thrombose, que ce soit une homocystinurie à révélation tardive et/ou une carence vitaminique profonde, ce qui représente une perte de chance pour les patients.

Dans notre étude, nous avons répertorié 4752 dosages d'homocystéine pour 3902 patients sur une période de 6 ans. Le premier service prescripteur est la neurologie, suivie de la pédiatrie avec respectivement 43% et 28% des demandes. Alors que les indications de prescription en neurologie sont quasi exclusivement l'exploration d'AVC, les indications en pédiatrie sont plus variées. On retrouve notamment beaucoup de prescriptions dans le cadre du bilan annuel des greffés rénaux. Cette indication n'est pas justifiée (94,95). L'insuffisance rénale entraîne une hyperhomocystéinémie modérée qui n'est pas un facteur de risque cardiovasculaire indépendant et la surveillance de ce dosage n'est pas recommandée.

L'étude des hyperhomocystéinémies sévères a permis de mettre en évidence un cas d'homocystinurie classique par déficit en CBS, deux cas de déficit en Cbl C, trois situations de déficit profond en vitamine B12 chez des nouveau-nés, une situation pédiatrique dont l'étiologie n'est pas encore déterminée, ainsi que cinq patients ayant présenté une thrombose artérielle (trois cas) ou veineuse (deux cas). Ces patients sont âgés de 28 à 49 ans, tous ont une hyperhomocystéinémie sévère en lien avec une carence profonde en vitamines B9 et/ou B12.

L'hyperhomocystéinémie dans ces situations n'est pas le seul facteur de risque cardiovasculaire, mais c'est un facteur traitable. L'étude de ces dossiers cliniques a permis de mettre en évidence une carence dans l'exploration et la prise en charge des hyperhomocystéinémies sévères. En effet, un bilan étiologique complet est nécessaire afin de ne pas méconnaître une cause génétique à cette hyperhomocystéinémie qui pourrait être momentanément corrigée par une supplémentation vitaminique (la supplémentation vitaminique étant la base du traitement de certaines MHM).

Lorsque l'on s'intéresse aux hyperhomocystéinémies intermédiaires, cette observation est encore plus flagrante car 17% des hyperhomocystéinémies entre 50 et 100  $\mu\text{mol/L}$  ne sont pas explorées. Cette proportion augmente même à 58% lorsqu'on se concentre sur les dosages prescrits dans l'exploration de thromboses. Alors que les différentes études précédemment mentionnées s'accordent à dire qu'une hyperhomocystéinémie modérée n'est pas un facteur de risque indépendant, le seuil à partir duquel une hyperhomocystéinémie (intermédiaire ou sévère) entraîne un risque d'atteinte vasculaire n'est pas clairement établi. L'exploration et la prise en charge de ces hyperhomocystéinémies est donc indispensable, et cette étude montre qu'elle n'est actuellement pas suffisamment codifiée.

Afin de mieux guider les cliniciens dans l'interprétation et la prise en charge d'une hyperhomocystéinémie intermédiaire ou sévère, les commentaires biologiques accompagnant un résultat d'hyperhomocystéinémie intermédiaire ou sévère devraient être mis à jour en rappelant les principales explorations biologiques à réaliser.

Nous proposons dans cette dernière partie de rappeler les situations où le dosage de l'homocystéine est justifié et nous proposons un arbre décisionnel pour la prise en charge des hyperhomocystéinémies.

## **IV.2. Proposition d'aide à la prescription et à l'interprétation du dosage de l'homocystéine**

### IV.2.1. Quand doser l'homocystéine totale ?

#### IV.2.1.1. *Devant la suspicion de maladie héréditaire du métabolisme*

Le dosage de l'homocystéine totale fait partie du bilan d'exploration en première intention dans la suspicion de maladie métabolique. Il doit être prescrit devant tout tableau clinique évocateur

d'une homocystinurie classique comme le morphotype marfanoïde, l'épilepsie, le retard mental ou encore devant des anomalies ophtalmologiques comme la myopie sévère ou la luxation du cristallin. Dans ce contexte, l'anémie macrocytaire est également un paramètre qui peut orienter et motiver un dosage d'homocystéine. Les anomalies du métabolisme de l'homocystéine, comme le déficit en CBS, étant des maladies traitables, il est très important de diagnostiquer tôt ces pathologies afin de prévenir l'apparition de complications irréversibles.

Plus généralement, le dosage de l'homocystéine totale est à réaliser devant toute suspicion de maladie héréditaire du métabolisme devant une clinique variée pouvant retrouver une atteinte neurologique, une épilepsie, des troubles de développement, une microcéphalie, une paraplégie ainsi que des symptômes psychiatriques, comme la schizophrénie.

Le dosage de l'homocystéine totale est également recommandé dans l'exploration du SHU en cas de signes neurologiques associés ou lorsque l'enquête étiologique classique s'avère négative (104), puisqu'il permet de dépister les SHU secondaires à une anomalie héréditaire du métabolisme de la vitamine B12.

#### IV.2.1.2. Dans l'exploration d'un déficit en vitamine B12 : anémie ou symptomatologie neurologique

Le diagnostic et la prise en charge adaptés des déficits en vitamine B12 sont absolument primordiaux car le déficit en vitamine B12 est une cause réversible d'anémie et de démyélinisation de la substance blanche. Les déficits profonds en vitamine B12 qu'ils soient fonctionnels (comme l'intoxication au protoxyde d'azote) ou quantitatifs (comme l'anémie pernicieuse) peuvent entraîner des tableaux cliniques variés selon la profondeur du déficit et la rapidité de son installation. Ainsi, on retrouve aussi bien des anémies mégaloblastiques sévères sans autre symptômes que l'asthénie et la pâleur, que des tableaux neurologiques bruyants avec troubles proprioceptifs et syndrome pyramidal déficitaire (105).

Pour mettre en évidence un déficit en vitamine B12, le premier examen réalisé est en général le dosage de la vitamine B12 plasmatique. Des niveaux extrêmement bas (<100 pg/ml) sont généralement associés à des tableaux cliniques évocateurs, mais restent assez rares. En effet, le dosage plasmatique de la vitamine B12 manque de spécificité. Avec un seuil bas à 200 pg/ml, la sensibilité et la spécificité pour le diagnostic de carence en vitamine B12 ne serait que d'environ 50% (106). Le manque de spécificité de ce dosage pourrait être lié au fait que seulement 20% de la vitamine B12 dosée est biologiquement active (forme liée à la transcobalamine, protéine qui permet son entrée dans les cellules). Le reste est lié à

l'haptocorrine, une protéine dont la fonction n'est pas clairement connue. Le dosage de l'holotranscobalamine, afin de mesurer la saturation en vitamine B12 de la transcobalamine, permettrait d'améliorer la spécificité mais ces dosages ne sont pas encore disponibles en routine.

Devant ce manque de sensibilité et de spécificité, un dosage normal, ne devrait pas exclure une carence en vitamine B12. Les cliniciens peuvent également utiliser le dosage de l'acide méthylmalonique et de l'homocystéine totale qui renseignent sur le statut en vitamine B12 intracellulaire. En effet, ces marqueurs associés auraient une sensibilité de 98% d'après l'étude de Stabler et al (106). Les auteurs recommandent donc de les doser pour explorer une suspicion de déficit en vitamine B12. Les concentrations plasmatiques d'acide méthylmalonique et d'homocystéine diminuent rapidement après supplémentation vitaminique ce qui en fait également de bons marqueurs de suivi.

Dans le déficit fonctionnel en vitamine B12, dans l'intoxication au protoxyde d'azote par exemple, le dosage de la vitamine B12 n'est pas toujours informatif, car il dose la vitamine B12 quel que soit son état fonctionnel. Dans cette situation, le dosage de l'homocystéine totale ou de l'acide méthylmalonique est également recommandé (cf. Annexe).

Le dosage de l'acide méthylmalonique est considéré comme le paramètre le plus sensible et spécifique (107). Cependant, son dosage nécessite une technique par spectrométrie de masse et n'est réalisé que dans certains laboratoires spécialisés. Le dosage de l'homocystéine totale est un paramètre facile à doser. Il est moins spécifique que l'acide méthylmalonique car il augmente également dans les déficits en vitamine B9, mais il garde toute sa place dans la prise en charge diagnostique d'une suspicion de déficit en vitamine B12. Dans une étude rétrospective sur un grand nombre de patients, les performances de l'homocystéine totale dans le diagnostic des déficits en vitamine B12, les auteurs indiquent qu'un seuil  $>16,4 \mu\text{mol/L}$  permet d'obtenir une sensibilité de 87,9% et une spécificité de 80,9% (107).

#### IV.2.1.3. Dans l'évaluation et la prévention du risque cardiovasculaire

Le dosage de l'homocystéine totale dans la prévention secondaire du risque cardiovasculaire n'est plus recommandé en première ligne par les sociétés savantes françaises et internationales sauf si l'épisode thrombotique est associé à un tableau clinique évocateur ou chez les enfants et les jeunes adultes (98). Le dosage de l'homocystéine reste également intéressant pour explorer certaines situations de thromboses récidivantes, lorsqu'aucune étiologie n'est identifiée. Mais

ce dosage ne doit plus être prescrit de manière systématique chez les populations à risque cardiovasculaire élevé.

En ce qui concerne les AVC, le dosage de l'homocystéine est toujours d'usage chez les sujets jeunes (avant 55 ans). Dans ces situations, le dosage de l'homocystéine ne vise pas à mettre en évidence une hyperhomocystéinémie modérée qui pourrait être un facteur de risque cardiovasculaire, mais vise à ne pas méconnaître une hyperhomocystéinémie sévère, comme une homocystinurie à révélation tardive.

Certes, la prévalence de l'homocystinurie est extrêmement faible, et sur les 4752 dosages (pour 3902 patients) réalisés sur 6 ans, dont 1624 pour les services de neurologie, aucune homocystinurie à révélation tardive n'a été mise en évidence. Mais il existe des exemples de découverte d'homocystinurie sur épisode d'AVC (108). La non-détection d'une cause traitable et facilement identifiable d'une étiologie d'AVC, dont la prise en charge permettra d'éviter les récurrences, n'est pas satisfaisante et la réalisation du dosage de l'homocystéine dans la prise en charge de l'AVC du sujet jeune est justifiée.

#### IV.2.2. Comment interpréter le dosage de l'homocystéine plasmatique ?

##### Proposition d'arbre décisionnel

Un dosage d'homocystéine normal ( $<15\mu\text{mol/L}$ ), prescrit dans l'exploration de thrombose ou devant la suspicion d'une maladie héréditaire du métabolisme de l'homocystéine, permet d'exclure définitivement l'hypothèse de l'homocystinurie par déficit en CBS. Ce dosage n'a pas besoin d'être répété.

Un dosage d'homocystéine compris entre 15 et  $30\mu\text{mol/L}$  met en évidence une hyperhomocystéinémie modérée. Cette légère augmentation de l'homocystéine totale plasmatique est généralement de cause acquise. Elle peut être secondaire à une insuffisance rénale, un mauvais traitement pré-analytique, la consommation de tabac, de café ou encore d'alcool. Après avoir écarté ces différentes causes d'augmentation, on peut suspecter une légère carence en vitamine B9 et/ou B12. Idéalement, la supplémentation en vitamine B9 et/ou B12 suivie d'un contrôle de l'homocystéinémie à 1 mois afin de vérifier sa normalisation permet de conclure sur l'origine de cette hyperhomocystéinémie modérée. L'hyperhomocystéinémie modérée n'est pas un facteur de risque cardiovasculaire, sa mise en évidence ne doit pas être considérée comme étiologie possible d'un événement thrombotique.

Un dosage d'homocystéine compris entre 30 et 100  $\mu\text{mol/L}$  témoigne d'une hyperhomocystéinémie intermédiaire, qui doit être explorée. Dans un premier temps, un bilan complémentaire comprenant à minima le dosage des vitamines B9 et B12, une numération sanguine, la clairance de la créatinine ainsi que l'AMM plasmatique permet d'explorer les principales causes acquises d'hyperhomocystéinémie. Si un déficit vitaminique est mis en évidence, la supplémentation doit permettre de normaliser l'homocystéinémie en quelques semaines de traitement. Afin de ne pas méconnaître une cause métabolique à cette hyperhomocystéinémie la réalisation d'une chromatographie des acides aminés plasmatiques et des acides organiques urinaires est souhaitable. Ces explorations permettront également d'investiguer les causes de carences vitaminiques (acquises ou héréditaires).

La mise en évidence d'une hyperhomocystéinémie secondaire à une insuffisance rénale ne justifie pas un suivi régulier de l'homocystéine plasmatique.

Une hyperhomocystéinémie supérieure à 100  $\mu\text{mol/L}$  témoigne d'une hyperhomocystéinémie sévère, elle doit être explorée. Les hyperhomocystéinémies sévères sont majoritairement d'origine métabolique. Un bilan complet avec AMM, vitamine B9, B12, numération, clairance de la créatinine, chromatographie des acides aminés plasmatiques et des acides organiques urinaires doit être réalisé. L'analyse des différents paramètres, notamment la valeur de l'AMM et de la méthionine, permettra de cibler l'origine de cette augmentation. L'orientation du patient vers un clinicien métabolicien permettra une prise en charge et un suivi adaptés.

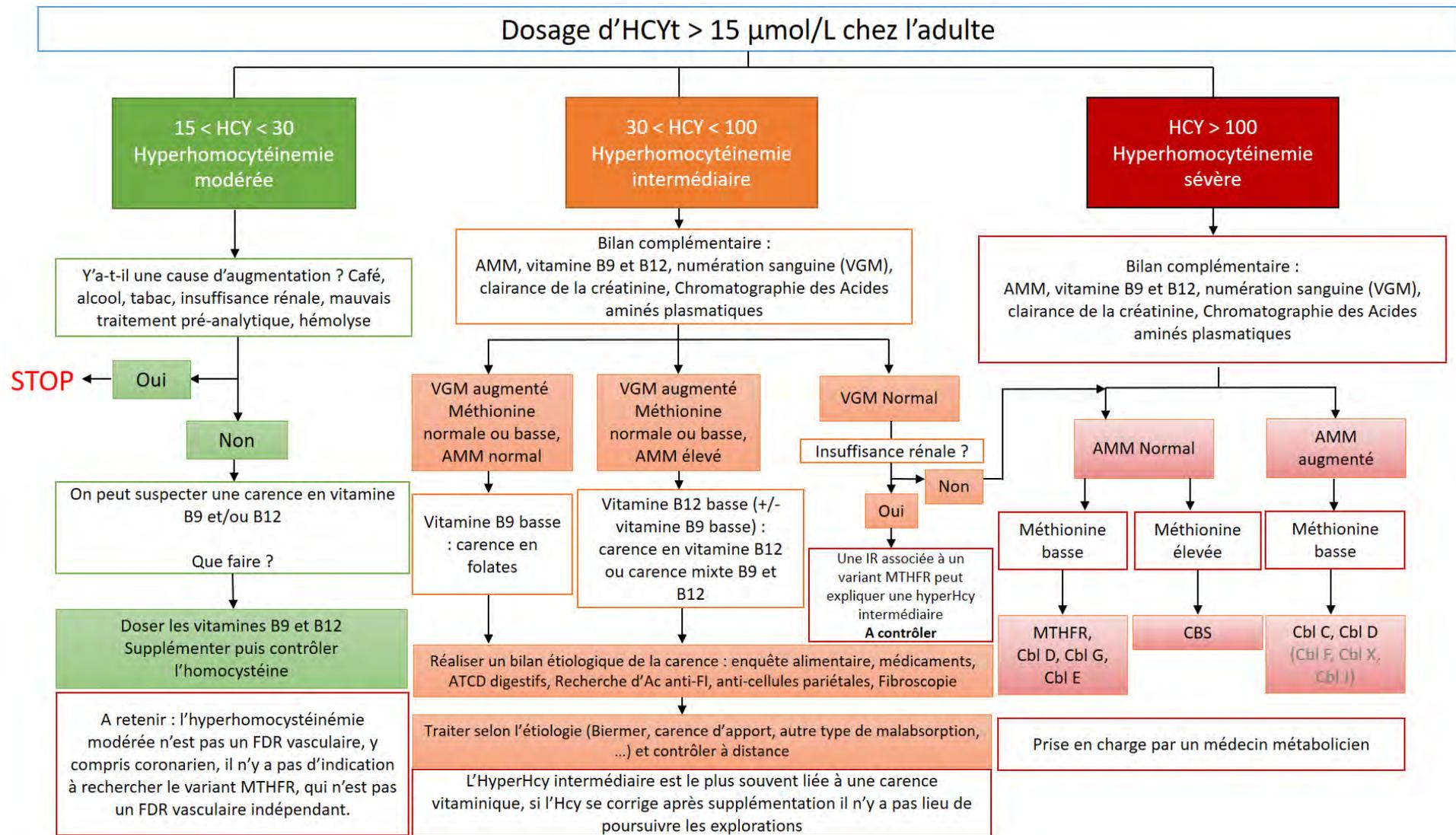


Figure 27 - Proposition d'arbre décisionnel pour aide à l'interprétation d'une hyperhomocystéinémie

## **CONCLUSION**

Le dosage de l'homocystéine est un paramètre de biochimie intéressant pour des situations cliniques variées telles que la suspicion de MHM, l'exploration d'un déficit en vitamine B12, mais aussi dans le bilan étiologique de l'AVC du sujet jeune, ainsi que dans toutes les situations de thromboses associées à un tableau clinique neurologique. L'étude de la prescription de ce dosage sur une période de six ans au CHU de Nantes, a permis de mettre en évidence des situations inadaptées de prescription comme le dosage systématique de l'homocystéine dans le bilan de greffe rénal en néphropédiatrie ou l'exploration d'AVC de sujets de plus de 55 ans. Cette étude a également permis d'identifier des situations de prise en charge insuffisante suite à la découverte d'hyperhomocystéinémies intermédiaires ou sévères.

Toute découverte d'hyperhomocystéinémie intermédiaire doit être explorée avec au minimum une numération sanguine, une clairance de la créatinine, un dosage des vitamines B9, B12 et de l'AMM. La découverte d'une hyperhomocystéinémie sévère ne doit pas s'arrêter à la simple exploration de déficit vitaminiq, qui n'élimine pas un déficit génétique sous-jacent : une exploration métabolique est nécessaire avec notamment une chromatographie des acides aminés plasmatiques et des acides organiques urinaires.

## **ANNEXES**

Article soumis et accepté par la Revue Francophone des Laboratoires, sera publié dans le journal n°535 de septembre – octobre 2021.

## La toxicologie du protoxyde d'azote

Justine Blin<sup>a,b</sup>, Marylène Guerlais<sup>c</sup>, Damien Masson<sup>a,b</sup>, Aurore Catteau<sup>a,b</sup>, Sylvie Deheul<sup>d,\*</sup>, Caroline Victorri-Vigneau<sup>b,c</sup>

**a** Laboratoire de biochimie, Institut de biologie, CHU de Nantes, 9 quai Moncoussu, 44093 Nantes cedex 1, France

**b** Université de Nantes, 1 quai de Tourville, BP 13522 44035 Nantes cedex 1, France

**c** Centre d'addictovigilance des Pays de la Loire, service de pharmacologie clinique, Institut de biologie, CHU de Nantes, 9 quai Moncoussu, 44093 Nantes cedex 1, France

**d** Centre d'addictovigilance des Hauts-de-France, service de pharmacologie, faculté de médecine, pôle recherche, CHU de Lille, 1 place Verdun 59037, Lille cedex, France

\*Auteur correspondant.

Adresse e-mail : sylvie.deheul@chru-lille.fr (S. Deheul).

### RÉSUMÉ

Le protoxyde d'azote, découvert au XVIII<sup>e</sup> siècle, est un gaz utilisé pur pour une utilisation dans deux contextes radicalement différents : un usage médical pour ses propriétés anesthésiques et antalgiques, réservé à l'usage hospitalier et inscrit sur liste I des substances vénéneuses, et un usage non médical, notamment comme gaz propulseur dans les cartouches pour siphons à crème chantilly, disponible en vente libre. Depuis 2018, le mésusage des cartouches avec une consommation dans un cadre récréatif est en nette augmentation chez les adolescents et les jeunes adultes. Une hausse importante des conséquences sanitaires, parfois graves, liée à cette consommation est constatée, en particulier les conséquences neurologiques. L'utilisation de ce gaz peut entraîner un déficit en vitamine B12 responsable notamment d'une démyélinisation des nerfs périphériques et entraînant une symptomatologie neurologique débutant généralement par des paresthésies des extrémités. Des cas graves, avec des conséquences parfois irréversibles, ont été rapportés. Les dosages biologiques (vitamine B12, homocystéine, acide méthylmalonique) participent au diagnostic et permettent une prise en charge rapide et adaptée des patients, indispensable pour éviter les séquelles irréversibles. Les agences sanitaires ont alerté à plusieurs reprises sur la dangerosité de tels mésusages et une loi visant à protéger les mineurs et limiter la quantité vendue aux particuliers a été votée au printemps 2021. En parallèle, l'information du personnel médical confronté à ces situations est indispensable.

### ABSTRACT

#### Nitrous oxide toxicity

Nitrous oxide, discovered in the 18th century, is a gas used pure for use in two radically different contexts: a medical use for its anesthetic and analgesic properties, reserved for hospital use and listed on list I of poisonous substances, and a non-medical use, in particular as a propellant gas in cartridges for whipped cream siphons, available over the counter. Since 2018, misuse of cartridges with recreational use has been on a net increase among adolescents and young adults. A significant increase in health consequences, sometimes serious, related to this consumption is noted, especially neurological consequences. The use of this gas can lead to a vitamin B12 deficiency responsible in particular for a demyelination of the peripheral nerves and leading to a neurological symptomatology generally beginning with paresthesias of the extremities. Serious cases, sometimes with irreversible consequences, have been reported. Biological assays (vitamin B12, homocysteine, methylmalonic acid) help in the diagnosis and allow rapid and appropriate management of patients, essential to avoid irreversible sequelae. Health agencies have repeatedly warned of the danger of such misuse and a law aimed at protecting minors and limiting the amount sold to individuals was voted in spring 2021. At the same time, information for medical personnel faced with these situations is essential.

#### MOTS CLÉS

- ▮ anesthésique
- ▮ gaz hilarant
- ▮ mésusage
- ▮ protoxyde d'azote
- ▮ vitamine B12

#### KEYWORDS

- ▮ anesthetic
- ▮ laughing gas
- ▮ misuse
- ▮ nitrous oxide
- ▮ vitamin B12

© 2021 – Elsevier Masson SAS  
Tous droits réservés.



## Dossier scientifique

### Tendances actuelles en toxicologie

#### ► Protoxyde d'azote : alerte !

##### Historique

Le protoxyde d'azote (N<sub>2</sub>O) fut découvert en 1776 par Joseph Priestley puis expérimenté par le chimiste britannique Humphry Davy en 1800 qui en décrit les effets euphorisants et d'hilarité. C'est en 1844 qu'Horace Wells, un dentiste américain, observe dans une foire, une démonstration de l'effet anesthésiant du protoxyde d'azote alors utilisé comme « gaz hilarant ». Le sujet à la fin de la démonstration se lève en titubant et chute en descendant de l'estrade ; un clou qui dépassait se plante dans son mollet mais il ne semble pas ressentir de douleur. Horace Wells pense immédiatement à l'utilisation du protoxyde d'azote lors des soins dentaires. Il fut un pionnier dans l'utilisation des techniques d'anesthésie. Notons qu'il s'est suicidé en prison après avoir abusé de plusieurs substances psychoactives, dont la première était le protoxyde d'azote.

##### Utilisation du protoxyde d'azote

Le protoxyde d'azote pur est disponible en France pour une utilisation dans deux contextes radicalement différents :

- utilisation médicale en anesthésie : il s'agit d'un médicament inscrit sur la liste I des substances vénéneuses et réservé à l'usage hospitalier. Il doit être administré par inhalation, en mélange avec l'oxygène, à des concentrations comprises entre 50 et 70 %. Le protoxyde d'azote est également disponible en mélange équimolaire avec l'oxygène, le mélange équimolaire oxygène protoxyde d'azote (Meopa), médicament inscrit sur la liste I, sortie de la réserve hospitalière, et qui suit une partie de la réglementation des stupéfiants ;
- utilisation non médicale : il s'agit d'un gaz utilisé comme additif alimentaire dans les cartouches pour siphon à chantilly ou comme gaz propulseur. Il est en vente libre dans les commerces ou sur Internet. Il est également utilisé dans l'industrie,

##### Une surveillance d'addictovigilance rapprochée

Les centres d'addictovigilance, au sein desquels travaillent des pharmacologues médicaux, ont des missions coordonnées par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Leur principale mission est de recueillir les cas et d'évaluer le potentiel d'abus et de dépendance des substances,

afin de prévenir le risque en santé publique. Depuis les années 2000, ils effectuent un suivi du risque de dépendance, d'abus et de mésusage du protoxyde d'azote, médical et non médical. Depuis plusieurs années, ils alertent sur l'aggravation et l'accélération du détournement du protoxyde d'azote non médical ainsi que sur les conséquences sanitaires graves liées à ces consommations.

##### Un usage récréatif inquiétant du gaz culinaire

L'inhalation du gaz contenu dans les cartouches, et plus récemment à partir de bonbonnes, est une pratique en vogue chez les jeunes. Au début, le protoxyde d'azote était cantonné à l'espace festif et aujourd'hui on observe des consommations répétées voire quotidiennes de très grandes quantités qui sortent totalement du milieu festif. Les effets recherchés par les usagers de ce gaz sont principalement l'euphorie, mais aussi la distorsion des perceptions auditives ou visuelles, les sensations de dissociation, de désinhibition, de « flottement » et également des recherches de sensations de bien-être. La durée de ces effets est très courte. Elle ne dépasse pas quelques minutes. Ce qui peut conduire à des prises répétées du produit.

Certains sujets  
consomment  
jusqu'à plusieurs  
centaines  
de cartouches  
par jour

##### ► Des risques sur la santé

Cette évolution des consommations a été accompagnée d'une augmentation du nombre de signalements d'effets sanitaires graves. Le premier risque est l'asphyxie par manque d'oxygène. Sont aussi décrites notamment des brûlures par le froid du gaz lorsqu'il est expulsé de la cartouche, des pertes de connaissance, des vertiges, un risque de chute important, de désorientation et d'accidentologie. Tous ces effets apparaissent juste après l'inhalation.

Il existe des cas de troubles de l'usage et de dépendance. Les fréquences et les quantités consommées demeurent variables mais aujourd'hui certains sujets consomment jusqu'à plusieurs centaines de cartouches par jour. Avec des cas de plus en plus fréquents de consommation quotidienne.

En cas d'utilisations, notamment si elles sont répétées ou lors de prises de fortes doses, des atteintes neurologiques qui débutent généralement par des paresthésies des extrémités des membres peuvent survenir [1]. Des cas graves avec atteintes centrales – syndromes médullaires (scléroses combinées de la moelle et myélopathies) et périphériques (neuropathies) – pouvant

entraîner des conséquences irréversibles, ont été rapportés au réseau d'addictovigilance et dans la littérature [2-5]. D'autres symptômes neurologiques sont rapportés, le plus souvent des paresthésies des extrémités, des difficultés à marcher avec perte d'équilibre et faiblesse. Ces anomalies neurologiques peuvent s'expliquer par la démyélinisation des nerfs périphériques secondaire au déficit en vitamine B12. L'arrêt des consommations et un diagnostic immédiat avec une prise en charge thérapeutique en neurologie, peuvent limiter les risques. Tout signe neurologique survenant dans le cadre d'une consommation de protoxyde d'azote et persistant après l'arrêt des consommations doit conduire à une consultation la plus rapide possible. D'autres conséquences cliniques, notamment psychiatriques et cardiaques, ont été rapportées suite à des consommations de protoxyde d'azote [6].

### ► Mécanisme d'action du protoxyde d'azote

Le mécanisme d'action du protoxyde d'azote n'est pas encore clairement élucidé [7].

Les effets analgésique et anxiolytique seraient en rapport avec :

- le système opioïde  $\mu$  : cette hypothèse est confortée par la clinique, la réversibilité partielle de l'effet du protoxyde par la naloxone ayant été démontrée ;
- le système noradrénergique, au niveau des voies inhibitrices descendantes ;

- le système glutamatergique par une action inhibitrice sur le récepteur acide N-méthyl-D-aspartique – NMDA – impliqué dans la transmission du message nociceptif et dans l'hyperalgésie ;

- les neurones dopaminergiques par une stimulation de la libération de dopamine ;

- le système GABAergique : activation du récepteur GABA-A, directement ou indirectement, par l'intermédiaire du site de liaison des benzodiazépines.

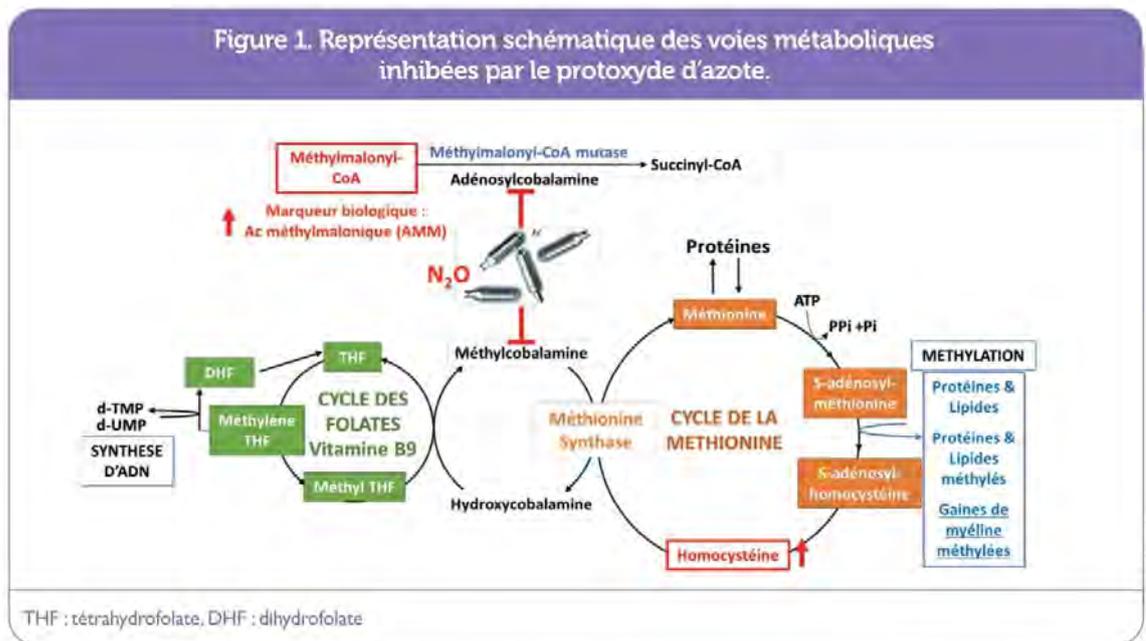
D'autres mécanismes sont suggérés par des travaux chez l'animal impliquant notamment la met-enképhaline et certains canaux ioniques voltages dépendants. Des interactions avec le système sérotoninergique sont aussi décrites.

### ► Pharmacocinétique du protoxyde d'azote

Le protoxyde d'azote présente une grande diffusibilité et une faible solubilité expliquant son délai d'action court. Il n'est pas métabolisé et est éliminé rapidement par voie pulmonaire dès lors que l'on arrête son administration.

### ► Mécanisme de la toxicité du protoxyde d'azote

La toxicité du protoxyde d'azote (figure 1) a été rapportée pour la première fois, en 1956, dans un article





décrivant une dépression médullaire sévère après une anesthésie prolongée au protoxyde d'azote [8]. Cette toxicité s'explique par l'inactivation de la vitamine B12. En effet, la vitamine B12 est une molécule complexe, composée d'un noyau corrinoïde, comprenant un atome de cobalt. Après inhalation, le protoxyde d'azote est responsable de l'oxydation de l'atome de Cobalt I ( $\text{Co}^+$ ) en Cobalt III ( $\text{Co}^{3+}$ ) de la vitamine B12, la rendant irréversiblement inactive [9]. La vitamine B12 est le cofacteur de deux enzymes essentielles du métabolisme et existe sous plusieurs formes. Sous forme de méthylcobalamine, la vitamine B12 est le cofacteur de la méthionine synthase qui catalyse la reméthylation de l'homocystéine en méthionine. Cette réaction permet de renouveler la S-adenosyl méthionine (SAM), donneur de méthyl pour de nombreuses réactions de méthylation dont celles intervenant dans la synthèse des composants de la myéline. Par ce biais, le protoxyde d'azote est donc responsable d'une démyélinisation des nerfs périphériques [10, 11]. Sous forme d'adénylcobalamine, la vitamine B12 est le cofacteur de la méthylmalonyl-CoA mutase. Cette enzyme intervient dans le métabolisme des acides gras et des acides aminés ramifiés en convertissant le méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA. Le déficit en adénylcobalamine provoqué par la consommation de protoxyde d'azote entraîne une accumulation d'acide méthylmalonique (AMM) et d'acide propionique.

La vitamine B12, par son rôle dans la transformation du méthyl-tétrahydrofolate en tétrahydrofolate, est indispensable dans la synthèse des acides nucléiques. Une anomalie du métabolisme de la vitamine B12 est ainsi responsable d'anomalies hématologiques telles qu'une anémie macrocytaire, une leucopénie voire une pancytopénie.

### ► Exploration biologique d'une intoxication au protoxyde d'azote

Le protoxyde d'azote n'étant pas identifiable actuellement par les laboratoires de toxicologie de routine, son dosage et sa mise en évidence dans les fluides biologiques n'est pour le moment pas réalisable. L'exploration biologique d'une intoxication ou exposition prolongées ou chroniques au protoxyde d'azote repose donc sur la mise en évidence des anomalies secondaires à une telle exposition.

Les principales anomalies biologiques pouvant être retrouvées dans une exposition chronique au protoxyde d'azote sont la diminution de la vitamine B12 associée à l'élévation du niveau plasmatique de l'acide méthylmalonique (AMM) et de l'homocystéine du fait de l'inhibition de la méthionine synthase et de l'AMM-CoA mutase. Des anomalies de l'héмограмme (anémie macrocytaire) sont également souvent retrouvées [3].

Le dosage de la vitamine B12 plasmatique n'est pas toujours informatif car il ne permet pas de faire la différence entre la vitamine B12 active et sa forme oxydée inactive. Par conséquent, le dosage de la vitamine B12 peut être normal lors d'un déficit fonctionnel. Une revue systématique de 2016 a analysé quatre-vingt-onze cas rapportés d'intoxication

au protoxyde d'azote et rapporte soixante-treize patients avec des anomalies neurologiques [6]. Parmi ces patients, trente-trois présentaient un dosage plasmatique de vitamine B12 diminué et douze présentaient un dosage dans la limite basse. Dans les cas d'exposition chronique au protoxyde d'azote dans un cadre récréatif, la vitamine B12 est donc majoritairement basse ou normale basse (62 %) mais chez certains consommateurs, le dosage de vitamine B12 n'est pas diminué du fait d'un déficit uniquement fonctionnel. Ce paramètre est donc à interpréter avec prudence, des valeurs normales n'excluant pas le diagnostic d'exposition chronique au protoxyde d'azote.

Cependant, les troubles neurologiques surviennent d'autant plus rapidement qu'il existe préalablement une carence ou une diminution du stock de vitamine B12. En effet, les cas de carence en vitamine B12 hors intoxication au protoxyde d'azote ne sont pas rares. Cette dernière pourrait aggraver une carence débutante ou ancienne. Il est d'ailleurs décrit l'intérêt de réaliser un dosage de vitamine B12 et de substituer le patient en cas de carence avant une intervention médicale au cours de laquelle le protoxyde d'azote serait utilisé. Pour ces différentes raisons, le dosage de la vitamine B12 dans la suspicion d'une exposition chronique au protoxyde d'azote reste un dosage indispensable [1].

Les deux paramètres de choix pour l'exploration d'une exposition chronique au protoxyde d'azote sont les dosages plasmatiques de l'homocystéine et de l'AMM, qui présentent des sensibilités proches [3]. Toutefois, l'augmentation de ces paramètres n'est pas spécifique à l'intoxication au protoxyde d'azote, mais témoigne d'un déficit en vitamine B12 qui peut être lié à un défaut d'apport, d'absorption ou de métabolisme.

La toxicité neurologique du protoxyde d'azote s'explique par l'inactivation de la vitamine B12

Le dosage de l'AMM est considéré comme le paramètre le plus spécifique du déficit en vitamine B12 [12]. En dehors des déficits en vitamine B12, l'AMM n'est augmenté que dans de très rares maladies héréditaires du métabolisme. L'homocystéine est un paramètre moins spécifique car il augmente également dans les déficits en vitamine B9 et B6, l'insuffisance rénale, de très rares maladies héréditaires du métabolisme et il peut être également influencé par certains paramètres diététiques (alcool, café). Le dosage de l'AMM nécessite une technique par spectrométrie de masse et n'est réalisé que dans certains laboratoires spécialisés alors que le dosage de l'homocystéine est beaucoup plus répandu et son délai de rendu des résultats plus court. L'accessibilité de ce dernier paramètre le rend plus intéressant que l'AMM dans la prise en charge des situations nécessitant une prise en charge rapide. Après supplémentation par vitamine B12, l'AMM et l'homocystéine sont rapidement corrigés (quelques jours), alors que les anomalies hématologiques peuvent mettre plusieurs semaines avant de se normaliser, et des séquelles des troubles neurologiques peuvent persister, voire être irréversibles [13,14].

Il a été rapporté des cas de mésusage du protoxyde d'azote où le consommateur initie une automédication par supplémentation en vitamine B12 [6,15,16], pouvant induire en erreur l'équipe médicale devant des taux de vitamine B12 normaux ou élevés. Dans ces situations, si la supplémentation a été débutée quelques jours avant l'investigation biologique,

l'AMM et l'homocystéine peuvent également s'être normalisés.

Pour conclure, devant une clinique évocatrice d'un déficit en vitamine B12 (symptomatologie neurologique compatible avec une atteinte liée au protoxyde d'azote) associée à une suspicion de consommation de protoxyde d'azote, le dosage de la vitamine B12 doit être réalisé. Une valeur basse de vitamine B12 sera en faveur d'une carence quantitative et une valeur normale ou élevée devra être associée au dosage de l'homocystéine (et/ou AMM) afin de mettre en évidence un possible déficit fonctionnel.

Le dosage de l'AMM est considéré comme le paramètre le plus spécifique du déficit en vitamine B12

## Conclusion

Une loi visant notamment à protéger les mineurs et limiter la quantité de protoxyde d'azote vendue aux particuliers a été adoptée en seconde lecture par le Sénat le 25 mai 2021 et est parue au *Journal officiel* de la République Française le 2 juin 2021 [17]. La quantité maximale autorisée à la vente aux particuliers serait fixée prochainement par arrêté d'application. En parallèle de ces mesures réglementaires, il est important de sensibiliser tous les professionnels de santé concernés par ce phénomène ainsi que les associations d'utilisateurs afin d'optimiser l'information, la prévention, le repérage et la prise en charge des sujets. ■■

Déclaration de liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

## Points à retenir

- ▀ Le protoxyde d'azote est disponible en France pour une utilisation dans deux contextes différents : en anesthésie, réservé à l'usage hospitalier et, en usage non médical, comme additif alimentaire dans les cartouches pour siphon à chantilly.
- ▀ Le protoxyde d'azote n'est pas identifiable actuellement en routine par les laboratoires de toxicologie.
- ▀ L'exposition chronique au protoxyde d'azote est souvent associée à une diminution de la vitamine B12. Son dosage reste un dosage indispensable en cas de suspicion d'intoxication.
- ▀ La diminution de la vitamine B12 est associée à l'élévation plasmatique de l'acide méthylmalonique (AMM) et de l'homocystéine. Le dosage de l'homocystéine étant plus répandu et son délai de rendu des résultats plus court, il devient un marqueur plus intéressant dans la prise en charge rapide.
- ▀ Dans le cadre de consommations notamment répétées ou lors de prises de fortes doses, des atteintes neurologiques peuvent survenir, parfois graves (atteintes centrales et périphériques), avec des conséquences qui peuvent être irréversibles.



### Références

- [1] Cohen Aubart F, Sedel F, Vicart S et al. Troubles neurologiques par carence en vitamine B12 déclenchés par le protoxyde d'azote. *Rev Neurol. (Paris)* 2007;163(3):362-4.
- [2] Thompson AG, Leite MI, Lunn MP, Bennett DLH. Whippits, nitrous oxide and the dangers of legal highs. *Pract Neurol.* 2015;15(3):207-9.
- [3] Oussalah A, Julien M, Levy J et al. Global Burden Related to Nitrous Oxide Exposure in Medical and Recreational Settings: A Systematic Review and Individual Patient Data Meta-Analysis. *J Clin Med.* 2019;8(4).
- [4] Stabler SP. Clinical practice. Vitamin B12 deficiency. *N Engl J Med.* 2013;368(2):149-60.
- [5] Synthèse du rapport d'expertise - Bilan d'addictovigilance protoxyde d'azote 2018-2019. <https://ansm.sante.fr/uploads/2021/01/15/20200708-rapport-addictovigilance-protoxyde-azote-2018-2019.pdf>
- [6] Garakani A, Jaffe RJ, Savla D et al. Neurologic, psychiatric, and other medical manifestations of nitrous oxide abuse: A systematic review of the case literature. *Am J Addict* 2016;25(5):358-69.
- [7] Sanders RD, Weimann J, Maze M et al. Biologic Effects of Nitrous Oxide: A Mechanistic and Toxicologic Review. *Anesthesiology.* 2008;109(4):707-22.
- [8] Lassen HC, Henriksen E, Neukirch F, Kristensen HS. Treatment of tetanus; severe bone-marrow depression after prolonged nitrous-oxide anaesthesia. *Lancet Lond Engl.* 1956;270(6922):527-30.
- [9] Zheng R, Wang Q, Li M et al. Reversible Neuropsychiatric Disturbances Caused by Nitrous Oxide Toxicity: Clinical, Imaging and Electrophysiological Profiles of 21 Patients with 6-12 Months Follow-up. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2020;16:2817-25.
- [10] Pema PJ, Horak HA, Wyatt RH. Myelopathy caused by nitrous oxide toxicity. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1998;19(5):894-6.
- [11] Marotta DA, Kesserwani H. Nitrous Oxide Induced Posterior Cord Myelopathy: Beware of the Methyl Folate Trap. *Cureus [Internet].* [cité 1 juin 2021];12(7). Disponible sur: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7444745/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7444745/)
- [12] Jarquin Campos A, Risch L, Nydegger U et al. Diagnostic Accuracy of Holotranscobalamin, Vitamin B12, Methylmalonic Acid, and Homocysteine in Detecting B12 Deficiency in a Large, Mixed Patient Population. *Dis Markers* 2020:7468506.
- [13] Allen RH, Stabler SP, Savage DG, Lindenbaum J. Diagnosis of cobalamin deficiency I: usefulness of serum methylmalonic acid and total homocysteine concentrations. *Am J Hematol.* 1990;34(2):90-8.
- [14] Carmel R. How I treat cobalamin (vitamin B12) deficiency. *Blood.* 2008;112(6):2214-21.
- [15] Keddie S, Adams A, Kelso ARC et al. No laughing matter: subacute degeneration of the spinal cord due to nitrous oxide inhalation. *J Neurol.* 2018;265(5):1089-95.
- [16] Shen Q, Lu H, Wang H, Xu Y. Acute cognitive disorder as the initial manifestation of nitrous oxide abusing: a case report. *Neurol Sci.* 2021;42(2):755-6.
- [17] Loi n° 2021-695 du 1er juin 2021 tendant à prévenir les usages dangereux du protoxyde d'azote : [www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000043575111](http://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000043575111)

## BIBLIOGRAPHIE

1. Jakubowski H. Homocysteine Editing, Thioester Chemistry, Coenzyme A, and the Origin of Coded Peptide Synthesis †. *Life (Basel)*. 9 févr 2017;7(1).
2. Jakubowski H. Homocysteine Modification in Protein Structure/Function and Human Disease. *Physiol Rev*. 1 janv 2019;99(1):555-604.
3. Mato J, Alvarez L, Ortiz P, Pajares MA. S-adenosylmethionine synthesis: Molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacology & Therapeutics*. 1 janv 1997;73(3):265-80.
4. Banerjee RV, Matthews RG. Cobalamin-dependent methionine synthase. *FASEB J*. mars 1990;4(5):1450-9.
5. Wohlfarth G, Geerligs G, Diekert G. Purification and properties of a NADH-dependent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase from *Peptostreptococcus productus*. *Eur J Biochem*. 11 sept 1990;192(2):411-7.
6. Pérez-Miguelsanz J, Vallecillo N, Garrido F, Reytor E, Pérez-Sala D, Pajares MA. Betaine homocysteine S-methyltransferase emerges as a new player of the nuclear methionine cycle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1 juill 2017;1864(7):1165-82.
7. Pajares MA, Pérez-Sala D. Betaine homocysteine S-methyltransferase: just a regulator of homocysteine metabolism? *Cell Mol Life Sci*. déc 2006;63(23):2792-803.
8. Zuhra K, Augsburger F, Majtan T, Szabo C. Cystathionine- $\beta$ -synthase: Molecular Regulation and Pharmacological Inhibition. *Biomolecules*. mai 2020;10(5):697.
9. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr*. avr 1998;157 Suppl 2:S40-44.
10. Krebs HA, Hems R, Tyler B. The regulation of folate and methionine metabolism. *Biochem J*. 15 août 1976;158(2):341-53.
11. Avila MA, García-Trevijano ER, Martínez-Chantar ML, Latasa MU, Pérez-Mato I, Martínez-Cruz LA, et al. S-Adenosylmethionine revisited: its essential role in the regulation of liver function. *Alcohol*. juill 2002;27(3):163-7.
12. Ducker GS, Rabinowitz JD. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metabolism*. 10 janv 2017;25(1):27-42.
13. Ebara S. Nutritional role of folate. *Congenital Anomalies*. 2017;57(5):138-41.
14. Allen RH. The plasma transport of vitamin B12. *Br J Haematol*. juin 1976;33(2):161-71.
15. Hall CA. Transcobalamins I and II as natural transport proteins of vitamin B12. *J Clin Invest*. nov 1975;56(5):1125-31.
16. Lemoine M, Grangé S, Guerrot D. Atteintes rénales au cours du déficit en cobalamine C. *Néphrologie & Thérapeutique*. 1 juill 2019;15(4):201-14.

17. Abosamak NER, Gupta V. Vitamin B6 (Pyridoxine). In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [cité 25 mars 2021]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557436/>
18. Percudani R, Peracchi A. The B6 database: a tool for the description and classification of vitamin B6-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families. *BMC Bioinformatics*. 1 sept 2009;10:273.
19. Wilson MP, Plecko B, Mills PB, Clayton PT. Disorders affecting vitamin B6 metabolism. *J Inherit Metab Dis*. juill 2019;42(4):629-46.
20. Mudd SH, Finkelstein JD, Refsum H, Ueland PM, Malinow MR, Lentz SR, et al. Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested consensus terminology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. juill 2000;20(7):1704-6.
21. Demuth K, Drunat S, Paul JL, Moatti N. Hyperhomocystéinémie et athérosclérose. Hyperhomocysteinemia and atherosclerosis [Internet]. 2000 [cité 29 juin 2021]; Disponible sur: <https://www.ipubli.inserm.fr/handle/10608/1529>
22. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem*. sept 1993;39(9):1764-79.
23. Ubbink JB, Vermaak WJ, van der Merwe A, Becker PJ. The effect of blood sample aging and food consumption on plasma total homocysteine levels. *Clin Chim Acta*. 30 avr 1992;207(1-2):119-28.
24. Ducros V, Candito M, Caussé E, Couderc R, Demuth K, Diop ME, et al. Dosage de l'homocystéine plasmatique : étude des facteurs de variation préanalytiques sur la concentration en homocystéine plasmatique totale. *Annales de Biologie Clinique*. 7 févr 2001;59(1):33-9.
25. Ducros V, Candito M, Caussé E, Couderc R, Demuth K, Diop M-E, et al. Comparaison du dosage de l'homocystéine plasmatique totale dans neuf laboratoires par six techniques différentes. *Annales de Biologie Clinique*. 30 juill 2002;60(4):421-8.
26. Menet M-C. Principes de la spectrométrie de masse. *Revue Francophone des Laboratoires*. 1 déc 2011;2011(437):41-53.
27. Lebreton A, Bonneau C, Bouvier D, Albert A, Ughetto S, Mulliez A, et al. Dosage de l'homocystéine plasmatique, comparaison de deux méthodes : CLHP versus immunonéphélométrie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*. 1 juin 2009;24(3):155-9.
28. Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, Fowler B, Geisel J, Dierkes J, et al. DACH-LIGA homocystein (german, austrian and swiss homocysteine society): consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations. *Clin Chem Lab Med*. nov 2003;41(11):1392-403.
29. Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J, et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem*. janv 2004;50(1):3-32.

30. Arnadottir M, Hultberg B, Nilsson-Ehle P, Thysell H. The effect of reduced glomerular filtration rate on plasma total homocysteine concentration. *Scand J Clin Lab Invest.* févr 1996;56(1):41-6.
31. SFEIM Bordeaux 12-14 Juin 2017 - SFEIM, société française pour l'étude des erreurs innées du métabolisme [Internet]. [cité 22 juill 2021]. Disponible sur: <http://www.sfeim.org/contenu/centre-documentaire/diaporamas-journees-sfeim/article/sfeim-bordeaux-12-14-juin-2017>
32. Causes of Vitamin B12 and Folate Deficiency - Lindsay H. Allen, 2008 [Internet]. [cité 18 mars 2021]. Disponible sur: [https://journals-sagepub-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/10.1177/15648265080292S105?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://journals-sagepub-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/10.1177/15648265080292S105?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed)
33. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* mai 1995;10(1):111-3.
34. Burda P, Schäfer A, Suormala T, Rummel T, Bürer C, Heuberger D, et al. Insights into severe 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency: molecular genetic and enzymatic characterization of 76 patients. *Hum Mutat.* juin 2015;36(6):611-21.
35. Cohen Aubart F, Sedel F, Papo T. [Cystathionine betasyntase and MTHFR deficiencies in adults]. *Rev Neurol (Paris).* oct 2007;163(10):904-10.
36. Deloughery TG, Evans A, Sadeghi A, McWilliams J, Henner WD, Taylor LM, et al. Common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Correlation with homocysteine metabolism and late-onset vascular disease. *Circulation.* 15 déc 1996;94(12):3074-8.
37. Huemer M, Diodato D, Schwahn B, Schiff M, Bandeira A, Benoist J-F, et al. Guidelines for diagnosis and management of the cobalamin-related remethylation disorders cblC, cblD, cblE, cblF, cblG, cblJ and MTHFR deficiency. *J Inherit Metab Dis.* janv 2017;40(1):21-48.
38. Topaloglu R, İnözü M, Gülhan B, Gürbüz B, Talim B, Coşkun T. Do not Miss Rare and Treatable Cause of Early-Onset Hemolytic Uremic Syndrome: Cobalamin C Deficiency. *Nephron.* 2019;142(3):258-63.
39. Adrovic A, Canpolat N, Caliskan S, Sever L, Kıyıkım E, Agbas A, et al. Cobalamin C defect-hemolytic uremic syndrome caused by new mutation in MMACHC. *Pediatr Int.* août 2016;58(8):763-5.
40. Kumar T, Sharma GS, Singh LR. Homocystinuria: Therapeutic approach. *Clin Chim Acta.* 1 juill 2016;458:55-62.
41. Sacharow SJ, Picker JD, Levy HL. Homocystinuria Caused by Cystathionine Beta-Synthase Deficiency. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Mirzaa G, et al., éditeurs. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cité 1 févr 2021]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1524/>

42. Gaustadnes M, Wilcken B, Oliveriusova J, McGill J, Fletcher J, Kraus JP, et al. The molecular basis of cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency in Australian patients: Genotype–phenotype correlations and response to treatment. *Human Mutation*. 2002;20(2):117-26.
43. RESERVES IU--TD. Orphanet: Homocystinurie classique [Internet]. [cité 16 mars 2021]. Disponible sur: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?lng=fr&Expert=394](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=fr&Expert=394)
44. Kožich V, Sokolová J, Morris AAM, Pavlíková M, Gleich F, Kölker S, et al. Cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency in the E-HOD registry-part I: pyridoxine responsiveness as a determinant of biochemical and clinical phenotype at diagnosis. *J Inherit Metab Dis*. mai 2021;44(3):677-92.
45. Morris AAM, Kožich V, Santra S, Andria G, Ben-Omran TIM, Chakrapani AB, et al. Guidelines for the diagnosis and management of cystathionine beta-synthase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2017;40(1):49-74.
46. Karaca M, Hismi B, Ozgul RK, Karaca S, Yilmaz DY, Coskun T, et al. High prevalence of cerebral venous sinus thrombosis (CVST) as presentation of cystathionine beta-synthase deficiency in childhood: molecular and clinical findings of Turkish probands. *Gene*. 25 janv 2014;534(2):197-203.
47. Yap S, Rushe H, Howard PM, Naughten ER. The intellectual abilities of early-treated individuals with pyridoxine-nonresponsive homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. août 2001;24(4):437-47.
48. Moat SJ, Bao L, Fowler B, Bonham JR, Walter JH, Kraus JP. The molecular basis of cystathionine beta-synthase (CBS) deficiency in UK and US patients with homocystinuria. *Hum Mutat*. févr 2004;23(2):206.
49. Gan-Schreier H, Kebbewar M, Fang-Hoffmann J, Wilrich J, Abdoh G, Ben-Omran T, et al. Newborn Population Screening for Classic Homocystinuria by Determination of Total Homocysteine from Guthrie Cards. *The Journal of Pediatrics*. 1 mars 2010;156(3):427-32.
50. Skovby F, Gaustadnes M, Mudd SH. A revisit to the natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Mol Genet Metab*. janv 2010;99(1):1-3.
51. Bublil EM, Majtan T. Classical homocystinuria: From cystathionine beta-synthase deficiency to novel enzyme therapies. *Biochimie*. 1 juin 2020;173:48-56.
52. Kraus JP, Hasek J, Kozich V, Collard R, Venezia S, Janosíková B, et al. Cystathionine gamma-lyase: Clinical, metabolic, genetic, and structural studies. *Mol Genet Metab*. août 2009;97(4):250-9.
53. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol*. juill 1969;56(1):111-28.
54. Harker LA, Ross R, Slichter SJ, Scott CR. Homocystine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest*. sept 1976;58(3):731-41.
55. Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest*. avr 1986;77(4):1370-6.

56. Demuth K, Drunat S, Girerd X, Moatti N, Paul J-L, Safar M, et al. Homocysteine is the only plasma thiol associated with carotid artery remodeling. *Atherosclerosis*. 1 nov 2002;165(1):167-74.
57. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: The Road Ahead. *Cell*. 23 févr 2001;104(4):503-16.
58. Jamwal S, Sharma S. Vascular endothelium dysfunction: a conservative target in metabolic disorders. *Inflamm Res*. 1 mai 2018;67(5):391-405.
59. Wang J, Dudman NP, Wilcken DE. Effects of homocysteine and related compounds on prostacyclin production by cultured human vascular endothelial cells. *Thromb Haemost*. 20 déc 1993;70(6):1047-52.
60. Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, Fitzgerald LA, Rodgers GM. Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb*. sept 1993;13(9):1327-33.
61. Drunat S, Moatti N, Demuth K. Homocysteine decreases endothelin-1 expression by interfering with the AP-1 signaling pathway. *Free Radic Biol Med*. 1 sept 2002;33(5):659-68.
62. McCully KS, Ragsdale BD. Production of arteriosclerosis by homocysteinemia. *Am J Pathol*. oct 1970;61(1):1-11.
63. McCully KS. Macromolecular basis for homocystein-induced changes in proteoglycan structure in growth and arteriosclerosis. *Am J Pathol*. janv 1972;66(1):83-96.
64. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med*. 9 avr 1998;338(15):1042-50.
65. Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and Risk of Ischemic Heart Disease and Stroke A Meta-analysis. *JAMA*. 23 oct 2002;288(16):2015-22.
66. Loscalzo J. Homocysteine trials--clear outcomes for complex reasons. *N Engl J Med*. 13 avr 2006;354(15):1629-32.
67. Clarke R, Bennett DA, Parish S, Verhoef P, Dötsch-Klerk M, Lathrop M, et al. Homocysteine and coronary heart disease: meta-analysis of MTHFR case-control studies, avoiding publication bias. *PLoS Med*. févr 2012;9(2):e1001177.
68. Yap S, Naughten E. Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in Ireland: 25 years' experience of a newborn screened and treated population with reference to clinical outcome and biochemical control. *J Inherit Metab Dis*. oct 1998;21(7):738-47.
69. Yap S, Naughten ER, Wilcken B, Wilcken DE, Boers GH. Vascular complications of severe hyperhomocysteinemia in patients with homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency: effects of homocysteine-lowering therapy. *Semin Thromb Hemost*. 2000;26(3):335-40.
70. Steegers-Theunissen RP, Van Iersel CA, Peer PG, Nelen WL, Steegers EA. Hyperhomocysteinemia, pregnancy complications, and the timing of investigation. *Obstet Gynecol*. août 2004;104(2):336-43.

71. Eskes TK. Homocysteine and human reproduction. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2000;27(3-4):157-67.
72. Nelen WL. Hyperhomocysteinaemia and human reproduction. *Clin Chem Lab Med.* août 2001;39(8):758-63.
73. Folate and human reproduction | The American Journal of Clinical Nutrition | Oxford Academic [Internet]. [cité 23 févr 2021]. Disponible sur: <https://academic-oup-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/ajcn/article/83/5/993/4649748>
74. Picciano MF. Is homocysteine a biomarker for identifying women at risk of complications and adverse pregnancy outcomes? *American Journal of Clinical Nutrition.* 2000;71(4):857-8.
75. Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, Emblem BM, Tverdal A, Gjessing HK, et al. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: The Hordaland Homocysteine Study. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2000;71(4):962-8.
76. Patrick TE, Powers RW, Daftary AR, Ness RB, Roberts JM. Homocysteine and folic acid are inversely related in black women with preeclampsia. *Hypertension.* 2004;43(6):1279-82.
77. Gaiday AN, Tussupkaliyev AB, Bermagambetova SK, Zhumagulova SS, Sarsembayeva LK, Dossimbetova MB, et al. Effect of homocysteine on pregnancy: A systematic review. *Chemico-Biological Interactions.* 25 sept 2018;293:70-6.
78. American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Practice Bulletins—Obstetrics. ACOG Practice Bulletin No. 197: Inherited Thrombophilias in Pregnancy. *Obstet Gynecol.* juill 2018;132(1):e18-34.
79. Moradi F, Lotfi K, Armin M, Clark CCT, Askari G, Rouhani MH. The association between serum homocysteine and depression: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Eur J Clin Invest.* 10 janv 2021;e13486.
80. Bhatia P, Singh N. Homocysteine excess: delineating the possible mechanism of neurotoxicity and depression. *Fundamental & Clinical Pharmacology.* 2015;29(6):522-8.
81. Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease. *The Lancet.* 29 août 2015;386(9996):896-912.
82. Zoccollella S, Lamberti P, Armenise E, de Mari M, Lamberti SV, Mastronardi R, et al. Plasma homocysteine levels in Parkinson's disease: role of antiparkinsonian medications. *Parkinsonism Relat Disord.* mars 2005;11(2):131-3.
83. Shin JY, Ahn Y-H, Paik M-J, Park HJ, Sohn YH, Lee PH. Elevated homocysteine by levodopa is detrimental to neurogenesis in parkinsonian model. *PLoS One.* 2012;7(11):e50496.
84. Bhattacharjee N, Mazumder MK, Paul R, Choudhury A, Choudhury S, Borah A. L-DOPA treatment in MPTP-mouse model of Parkinson's disease potentiates homocysteine accumulation in substantia nigra. *Neurosci Lett.* 15 août 2016;628:225-9.
85. Paul R, Borah A. L-DOPA-induced hyperhomocysteinemia in Parkinson's disease: Elephant in the room. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 1 sept 2016;1860(9):1989-97.

86. Linnebank M, Lutz H, Jarre E, Vielhaber S, Noelker C, Struys E, et al. Binding of copper is a mechanism of homocysteine toxicity leading to COX deficiency and apoptosis in primary neurons, PC12 and SHSY-5Y cells. *Neurobiol Dis.* sept 2006;23(3):725-30.
87. Duan W, Ladenheim B, Cutler RG, Kruman II, Cadet JL, Mattson MP. Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurochem.* janv 2002;80(1):101-10.
88. Imamura K, Takeshima T, Nakaso K, Nakashima K. Homocysteine is toxic for dopaminergic neurons in primary mesencephalic culture. *NeuroReport.* août 2007;18(13):1319–1322.
89. Müller T, Laar T van, Cornblath DR, Odin P, Klostermann F, Grandas FJ, et al. Peripheral neuropathy in Parkinson's disease: Levodopa exposure and implications for duodenal delivery. *Parkinsonism & Related Disorders.* 1 mai 2013;19(5):501-7.
90. Zoccollella S, Lamberti P, Iliceto G, Dell'Aquila C, Diroma C, Fraddosio A, et al. Elevated plasma homocysteine levels in L-dopa-treated Parkinson's disease patients with dyskinesias. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM).* 1 juill 2006;44(7):863-6.
91. Murakami K, Miyake Y, Sasaki S, Tanaka K, Fukushima W, Kiyohara C, et al. Dietary intake of folate, vitamin B6, vitamin B12 and riboflavin and risk of Parkinson's disease: a case-control study in Japan. *Br J Nutr.* sept 2010;104(5):757-64.
92. Rispoli V, Simioni V, Capone JG, Golfre Andreasi N, Preda F, Sette E, et al. Peripheral neuropathy in 30 duodopa patients with vitamins B supplementation. *Acta Neurol Scand.* déc 2017;136(6):660-7.
93. Uncini A, Eleopra R, Onofrij M. Polyneuropathy associated with duodenal infusion of levodopa in Parkinson's disease: features, pathogenesis and management. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* mai 2015;86(5):490-5.
94. Kang A, Nigwekar SU, Perkovic V, Kulshrestha S, Zoungas S, Navaneethan SD, et al. Interventions for lowering plasma homocysteine levels in kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev.* 4 mai 2015;(5):CD007910.
95. Ducloux D, Motte G, Challier B, Gibey R, Chalopin JM. Serum total homocysteine and cardiovascular disease occurrence in chronic, stable renal transplant recipients: a prospective study. *J Am Soc Nephrol.* janv 2000;11(1):134-7.
96. Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *The Lancet.* 14 janv 2012;379(9811):165-80.
97. Jardine MJ, Kang A, Zoungas S, Navaneethan SD, Ninomiya T, Nigwekar SU, et al. The effect of folic acid based homocysteine lowering on cardiovascular events in people with kidney disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 13 juin 2012;344:e3533.
98. Pernod G, Biron-Andreani C, Morange PE, Boehlen F, Constans J, Couturaud F, et al. Recommandations pour la recherche de facteurs biologiques de risque dans le cadre de la maladie thromboembolique veineuse : applications cliniques. *Sang Thrombose Vaisseaux.* 1 oct 2009;21(2):5-11.
99. Masson E. Recommandations de bonne pratique pour la prise en charge de la maladie veineuse thromboembolique chez l'adulte. Version courte [Internet]. EM-Consulte. [cité 30

mars 2021]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/1280868/recommandations-de-bonne-pratique-pour-la-prise-en>

100. Connors JM. Thrombophilia Testing and Venous Thrombosis. *N Engl J Med*. 21 sept 2017;377(12):1177-87.
101. Prévention vasculaire après un infarctus cérébral ou un accident ischémique transitoire [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 2 avr 2021]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/jcms/c\\_1252051/fr/prevention-vasculaire-apres-un-infarctus-cerebral-ou-un-accident-ischemique-transitoire](https://www.has-sante.fr/jcms/c_1252051/fr/prevention-vasculaire-apres-un-infarctus-cerebral-ou-un-accident-ischemique-transitoire)
102. Hankey GJ. Secondary stroke prevention. *The Lancet Neurology*. 1 févr 2014;13(2):178-94.
103. Levy J, Rodriguez-Guéant R-M, Oussalah A, Jeannesson E, Wahl D, Ziuly S, et al. Cardiovascular manifestations of intermediate and major hyperhomocysteinemia due to vitamin B12 and folate deficiency and/or inherited disorders of one-carbon metabolism: a 3.5-year retrospective cross-sectional study of consecutive patients. *Am J Clin Nutr*. 8 mai 2021;113(5):1157-67.
104. Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU) [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 11 août 2021]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/jcms/p\\_3236879/fr/syndrome-hemolytique-et-uremique-shu](https://www.has-sante.fr/jcms/p_3236879/fr/syndrome-hemolytique-et-uremique-shu)
105. Cohen Aubart F, Sedel F, Vicart S, Lyon-Caen O, Fontaine B. Troubles neurologiques par carence en vitamine B12 déclenchés par le protoxyde d'azote. *Revue Neurologique*. 1 mars 2007;163(3):362-4.
106. Stabler SP. Clinical practice. Vitamin B12 deficiency. *N Engl J Med*. 10 janv 2013;368(2):149-60.
107. Jarquin Campos A, Risch L, Nydegger U, Wiesner J, Vazquez Van Dyck M, Renz H, et al. Diagnostic Accuracy of Holotranscobalamin, Vitamin B12, Methylmalonic Acid, and Homocysteine in Detecting B12 Deficiency in a Large, Mixed Patient Population. *Dis Markers*. 2020;2020:7468506.
108. Lefaucheur R, Triquenot-Bagan A, Quillard M, Genevois O, Hannequin D. [Stroke and iridodonesis revealing a homocystinuria caused by a compound heterozygous mutation of cystathionine beta-synthase]. *Rev Neurol (Paris)*. sept 2008;164(8-9):728-32.

## **SERMENT DE GALIEN**

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

**Nom - Prénoms :** BLIN Justine

**Titre de la thèse :** DOSAGE DE L'HOMOCYSTÉINE : ANALYSE DES PRESCRIPTIONS AU CHU DE NANTES DE 2014 À 2020 ET EXAMEN CRITIQUE DES BONNES PRATIQUES CLINICO-BIOLOGIQUES

---

**Résumé de la thèse :**

L'homocystéine est un acide aminé soufré situé au carrefour de voies métaboliques essentielles. Son dosage est largement prescrit pour des situations cliniques variées. Les hyperhomocystéinémies peuvent être d'origine acquise ou génétique. Dans cette étude on analyse les prescriptions de dosage d'homocystéine au CHU de Nantes entre 2014 et 2020. Sur une période de 5 ans, on comptabilise 4752 dosages dont les prescripteurs principaux sont la neurologie et la pédiatrie. L'indication majoritaire de ce dosage est l'exploration de thrombose artérielle ou veineuse. Alors que les hyperhomocystéinémies intermédiaires et sévères représentent moins de 4% des dosages, leurs prises en charge ne sont pas toujours appropriées. La prescription de dosage est indiquée dans la suspicion de MHM, l'exploration d'un déficit en vitamine B12 ou encore le bilan étiologique de l'AVC du sujet jeune. La mise en évidence d'une hyperhomocystéinémie intermédiaire ou sévère doit être explorée.

---

**MOTS CLÉS :** HOMOCYSTEINE, HOMOCYSTINURIE, VITAMINE B12, AVC

---

**JURY**

**PRÉSIDENT :** Mme Edith BIGOT-CORBEL, MCU-PH de Biochimie, Faculté de Pharmacie de Nantes

**ASSESEURS :** M Damien MASSON, PU-PH de Biochimie, Faculté de Médecine de Nantes, Mme Alice KUSTER, Praticien Hospitalier (Pédiatrie), M Thomas DEJOIE, Praticien Hospitalier (Biochimie)

---

**Adresse de l'auteur :** 37 rue du 65<sup>ème</sup> Régiment d'Infanterie, 44000 Nantes