



**ROYAUME DU MAROC**  
**UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH**  
**FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE**  
**FES**



Année 2015

Thèse N° 157 15

# **VITAMINE B12 CHEZ LES PATIENTS DIABETIQUES TRAITES PAR METFORMINE**

THESE

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 16/10/2015

PAR

**Mr. CHAHBI OTMANE**

Né le 02 Novembre 1989 à Meknès

**POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE**

**MOTS-CLES :**

Vitamine B12 - Diabète de type 2 - Metformine

**JURY**

M. SAFI SOMAYA.....	PRESIDENT ET RAPPORTEUR
Professeur d'Endocrinologie	
M. BALOUCH LHOUSAIN.....	} JUGES
Professeur de Biochimie-Chimie	
Mr. MOUDDEN Mohamed Karim.....	
Professeur agrégé de médecine interne	

# PLAN

---

Introduction .....	9
Rappel .....	11
I. Métabolisme de la vitamine B12 .....	12
II. Metformine .....	18
1. Propriétés pharmacocinétiques .....	18
2. Propriétés pharmacodynamiques .....	19
3. Mécanisme d'action .....	20
4. Autres effets de la Metformine .....	20
5. Effets indésirables .....	21
a. Acidose lactique .....	21
b. Troubles digestifs .....	22
c. Autres effets indésirables .....	22
PARTIE PRATIQUE .....	24
I. Objectifs de l'étude .....	25
II. Matériels et méthodes .....	25
1. Type, lieu de l'étude et population étudiée .....	25
a. Critères d'inclusion .....	25
b. Critères d'exclusion .....	25
2. Recueil et analyse des données .....	26
a. Interrogatoire .....	26
b. Examen clinique .....	26
c. Bilan biologique .....	27
d. Méthode d'analyse et de traitement des résultats .....	31

---

Résultats .....	32
1. Etude descriptive .....	33
1.1. Description de la population DT2 sous Metformine, selon les variables sociodémographiques et physiologiques .....	33
1.1.1. Age et sexe .....	33
1.1.2. Poids, taille, tour de taille et IMC .....	34
1.1.3. Tabac et alcool .....	35
1.1.4. Habitudes alimentaires .....	35
1.2. Description de la population DT2 sous Metformine selon l'état pathologique et thérapeutique.....	35
1.2.1. Durée du diabète.....	35
1.2.2. Prise de Metformine .....	35
1.2.3. Autres traitements ; insuline et IPP .....	35
1.3. Description de la population DT2 selon les bilans biologiques .....	35
1.3.1. Vitamine B12 .....	35
1.3.2. Acide folique.....	38
1.3.3. fer sérique et ferritinémie.....	39
1.3.4. Hémoglobine.....	40
1.3.5. VGM et CCMH .....	40
1.3.6. Hématocrite .....	41
1.3.7. Glycémie et hémoglobine glyquée .....	41
1.3.8. Créatinine .....	41
1.3.9. Bilan hépatique de notre population sous Metformine .....	41
1.3.10. Reste du bilan biologique .....	42
2. Etude analytique.....	45

---

2.1. Analyse uni variée.....	45
2.1.1. Corrélation entre le statut en vitamine B12 chez les patients DT2 sous Metformine et les paramètres cliniques .....	45
2.1.2. Analyse en fonction des variables pathologiques et thérapeutiques .....	47
2.1.3. Analyse en fonction des variables biologiques .....	48
2.2. Analyse de régression multi variée.....	50
Discussion .....	51
Conclusion .....	69
Résumé.....	71
Bibliographie .....	78

## ABREVIATIONS

5-CH3-THF	: 5-méthyl-tétrahydrofolate
ALAT	: Alanine amino transférase
AMM	: Acide méthylmalonique
AMP	: Acide adénosine monophosphorique
AMPK	: Protéine kinase active par l'AMP
ASAT	: Aspartate amino transférase
ATP	: Acide adénosine triphosphate
Cbl	: Cobalamine
CCMH	: Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
CFT	: Capacité totale de fixation du fer par la transferrine
CoA	: Coenzyme A
CRP	: Protéine C reactive
DT2	: Diabète de type 2
FI	: Facteur intrinsèque
GGT	: Gamma-glutamyltranspeptidase
Hb	: Hémoglobine
HbA1c	: Hémoglobine glyquée
HC	: Haptocorrine
HCl	: Acide chlorhydrique
Hcy	: Homocystéine
HDL	: Lipoprotéines de haute densité
Ht	: Hématocrite
IC	: Intervalle de confiance

IMC	: Indice de masse corporelle
IPP	: Inhibiteur de la pompe à protons
LDH	: Lactate déshydrogénase
OR	: Odds ratio
PAL	: Phosphatase alcaline
SH	: Sulfamide hypoglycémiant
TC	: Transcobalamine
THF	: Tétrahydrofolate
TZD	: Thiazolidinedione
UKPDS	: United Kingdom Prospective Diabetes Study
VGM	: Volume globulaire moyen
VLDL	: Lipoprotéines de très basse densité

## Liste Des Figures

Figure 1 : Structure des cobalamines

Figure 2 : Métabolisme de la vitamine B12

Figure 3 : Métabolisme et fonctions biochimique de la vitamine B12

Figure 4 : Interaction entre la méthyl-cobalamine et le cycle des folates

Figure 5 : Formule chimique de la metformine

Figure 6 : Répartition de la population selon le sexe

Figure 7 : Description de la population en fonction de l'IMC et selon le sexe

Figure 8 : Description de la population DT2 selon le taux sérique de la vitamine B12

Figure 9 : Description de la population DT2 selon le taux sérique de l'acide folique

Figure 10: Description de la population sous Metformine selon le taux sérique du fer sérique et la ferritinémie

Figure 11: Description de la population sous Metformine selon la présence ou non d'anémie

Figure12 : Description de la population sous Metformine selon le type d'anémie



## Liste des Tableaux

- Tableau 1 : Tableau récapitulatif des caractéristiques cliniques des patients DT2 sous Metformine
- Tableau 2 : Tableau récapitulatif des caractéristiques biologiques des patients DT2 sous Metformine
- Tableau 3 : Tableau récapitulatif des caractéristiques cliniques et biologiques entre les patients DT2 avec et sans Metformine (groupe Témoin)
- Tableau 4 : Etude analytique entre le statut en vitamine B12 chez les patients DT2 sous Metformine et les paramètres cliniques
- Tableau 5 : Etude analytique entre le statut en vitamine B12 chez les patients DT2 sous Metformine et les variables pathologiques et thérapeutiques
- Tableau 6 : Etude analytique entre le statut en vitamine B12 chez les patients DT2 sous Metformine et l'acide folique et les paramètres hématologiques
- Tableau 7 : Etude analytique entre le statut en vitamine B12 chez les patients DT2 sous Metformine et la créatinine, CRP, glycémie à jeun, l' Hb A1c et le bilan hépatique
- Tableau 8 : Analyse de régression multi variée
- Tableau 9 : Performances des marqueurs biologiques du statut vitaminique B12
- Tableau 10 : Tableau récapitulatif des différentes études internationales
- Tableau 11 : Principales manifestations cliniques associées à la carence en vitamine B12
- Tableau 12: Principales causes d'une carence en vitamine B12

# INTRODUCTION

Le diabète sucré de type 2 (DT2) est défini par un état d'hyperglycémie chronique résultant d'un défaut de la sécrétion et/ou de l'action de l'insuline. [1,2] Il constitue un problème majeur de santé publique en raison de sa prévalence élevée, du risque de complications vasculaires et de son impact socio-économique [2,3].

Pour contrecarrer ce fléau et ses conséquences, plusieurs recommandations ont été établies et qui ont tous en commun, la Metformine (diméthylbiguanide), comme thérapie médicale de première ligne. Ces recommandations ont été établies sur la base d'études ayant démontré son efficacité sur la baisse des chiffres glycémiques et d'hémoglobine A1c (Hb A1c), la réduction du risque de maladies cardiovasculaires et sa faible capacité à provoquer des hypoglycémies (UKPDS) [4].

Cependant, certaines études ont montré que l'utilisation à long terme de la Metformine augmente le risque de carence en vitamine B12 ; ce qui influence le métabolisme de l'homocystéine et contribue à la progression de la neuropathie périphérique [5,6,7,8,9,10,11].

Malheureusement, cette association reste inconnue de la part des médecins et nécessite une meilleure information.

Notre étude a pour objectif d'évaluer :

- le statut en vitamine B12 chez les patients DT2 sous Metformine suivis au service d'endocrinologie de l'hôpital militaire Moulay Ismail à Meknès, comparativement à un groupe témoin.

- la corrélation du statut en vitamine B12 avec la dose et la durée de prise de Metformine, ainsi qu'avec différents paramètres cliniques et biologiques.

# RAPPEL

## I. Métabolisme de la vitamine B12 (Fig 1-2-3-4)

Le terme « vitamine B12 » désigne un ensemble de quatre molécules appartenant à la famille des cobalamines (Cbl): cyano-Cbl, hydroxo-Cbl, méthyl-Cbl et adénosyl- Cbl.

La vitamine B12 (cobalamine) appartient à la famille des corrinoïdes, présentant une structure chimique proche de l'hème ; mais l'atome central de fer est remplacé par un cobalt, d'où leur nom (fig. 1) [12,13].

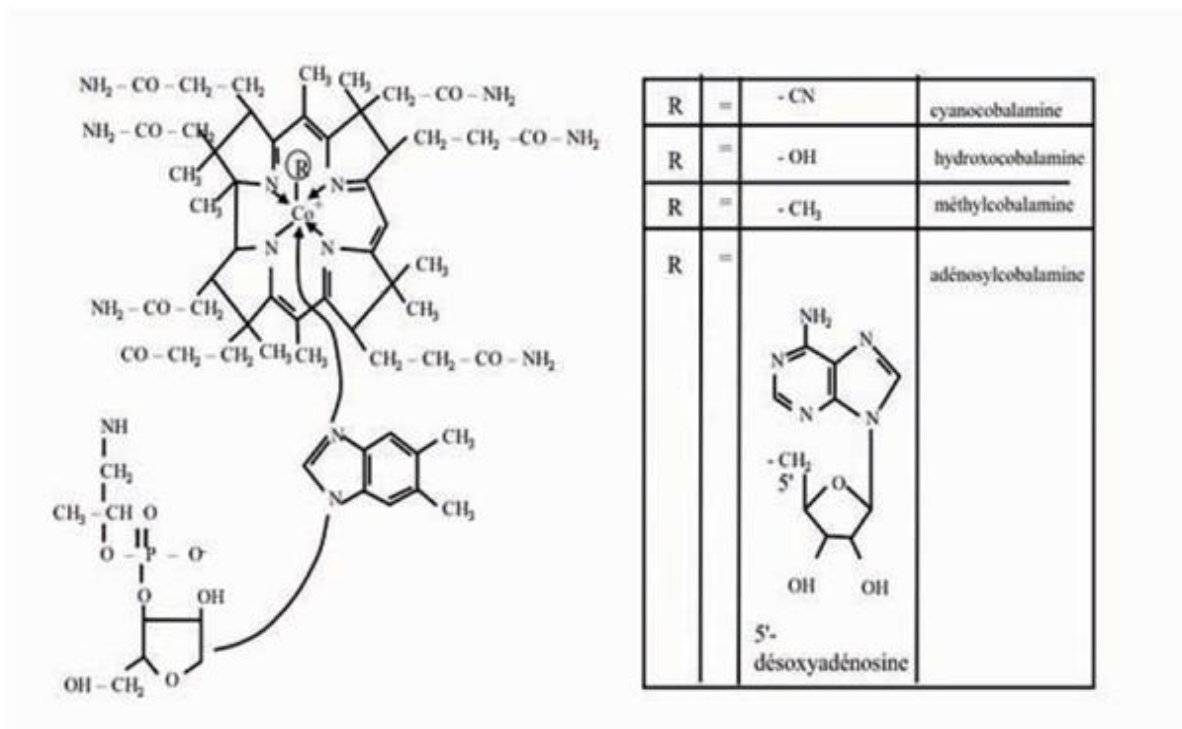


Figure 1 : Structure des cobalamines [76]

La vitamine B12 provient exclusivement des aliments d'origine animale [14].

Les cobalamines alimentaires, libérées des protéines alimentaires par la sécrétion gastrique (acide chlorhydrique et pepsine), se lient à l'haptocorrine.

Au niveau duodénal, l'action des enzymes pancréatiques dégrade l'haptocorrine, libère les cobalamines et permet leur liaison au facteur intrinsèque (FI), transporteur synthétisé par les cellules pariétales de l'estomac. Les complexes Cbl-FI se fixent sur un récepteur spécifique, appelé « cubam », présent à la surface des entérocytes iléaux [15,16,17].

Ce mécanisme est saturable. Lors de l'ingestion d'une dose de vitamine B12 supérieure à 5 µg, un faible pourcentage ( $\approx 1\%$ ) est absorbé par diffusion passive.

La cobalamine, absorbée dans l'iléon terminal, passe dans la circulation sanguine et se lie pour 80 % à l'haptocorrine et pour 20 % à la transcobalamine II (TC-II ou holo-TC-II). Cette dernière représentant la fraction biodisponible de la vitamine B12 [15,18]. La TC-II apporte la vitamine B12 aux cellules des tissus périphériques et la cobalamine libérée dans le compartiment lysosomal est transformée en méthyl-Cbl et ado-Cbl, les deux formes coenzymatiques biologiquement actives de cette vitamine (fig. 2) [19,20,21]. La méthyl-Cbl est le cofacteur de la méthionine synthase, qui catalyse la méthylation de l'homocystéine en méthionine (fig. 3) [22].

Le groupement méthyle est apporté par le 5-méthyl-tétrahydrofolate (5-CH<sub>3</sub>-THF) ; ce qui permet la régénération du tétrahydrofolate (THF), indispensable à la synthèse du thymidilate.

Une carence en méthyl-Cbl a donc pour conséquence une accumulation de l'homocystéine, ainsi qu'un piégeage du 5-CH<sub>3</sub>-THF, indisponible pour la régénération du tétrahydrofolate (fig. 4). La conséquence de cette « trappe métabolique » se traduit par un blocage des mitoses cellulaires, essentiellement observé dans les lignées à renouvellement rapide (cellules sanguines avec apparition de cellules dites « Mégaloblastiques » et cellules intestinales). Cette interaction métabolique, essentielle entre le métabolisme des folates et celui des cobalamines, explique l'existence d'une anémie mégaloblastique lors des carences en vitamines B9 ou B12 [22]. Sous la forme d'adénosyl-Cbl, la vitamine B12 est impliquée dans la conversion du méthylmalonyl-CoA, dont le précurseur est l'acide méthylmalonique, en succinyl-CoA (fig. 2). Un déficit en cobalamines induit de ce fait une accumulation d'acide méthylmalonique [23].

Les apports nutritionnels conseillés varient de 0,8 à 2,8 µg/j, selon l'âge et le sexe.

Chez l'adulte, les réserves hépatiques ( $\approx$  3 à 5 mg) sont suffisantes pour couvrir les besoins en vitamine B12 pendant 3 à 5 ans ; d'autant plus qu'un cycle entéro-hépatique permet le recyclage de la vitamine B12 excrétée par voie biliaire [14,17].

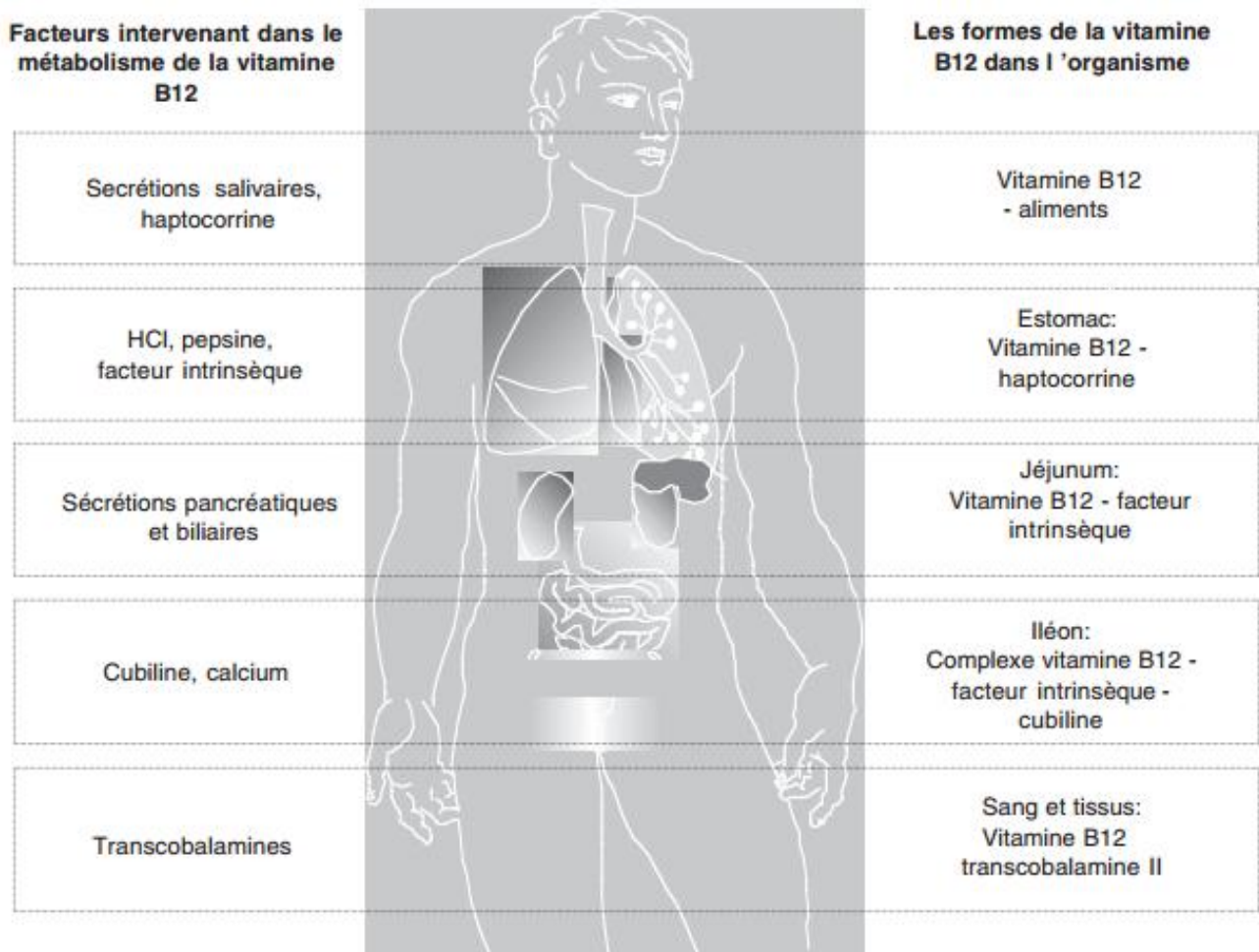


Figure 2 : Métabolisme de la vitamine B12 [77]



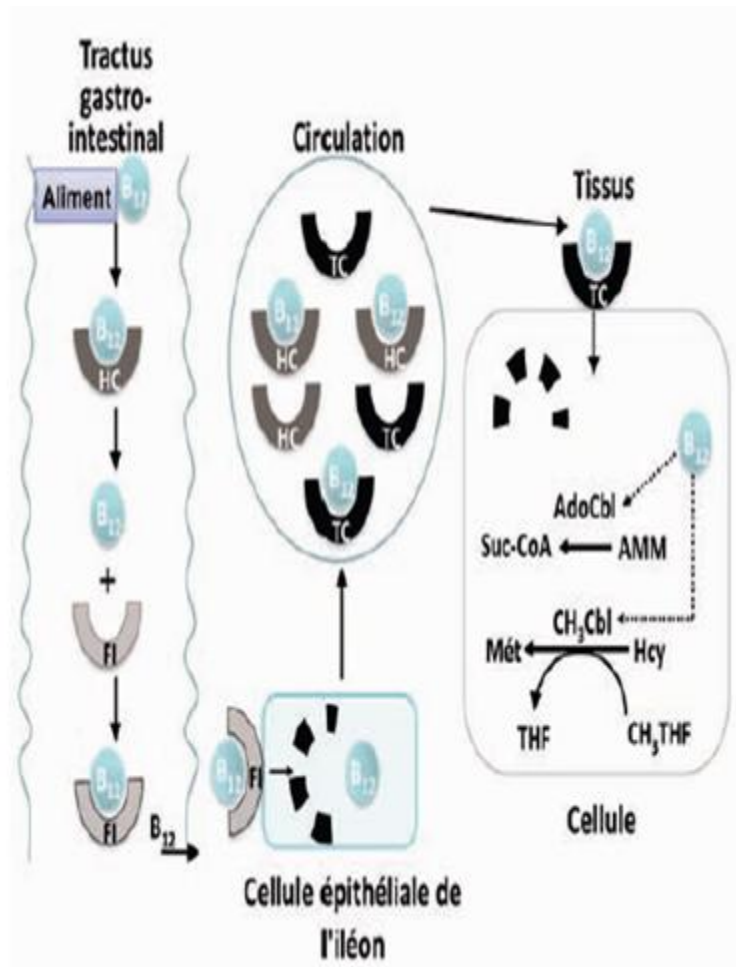
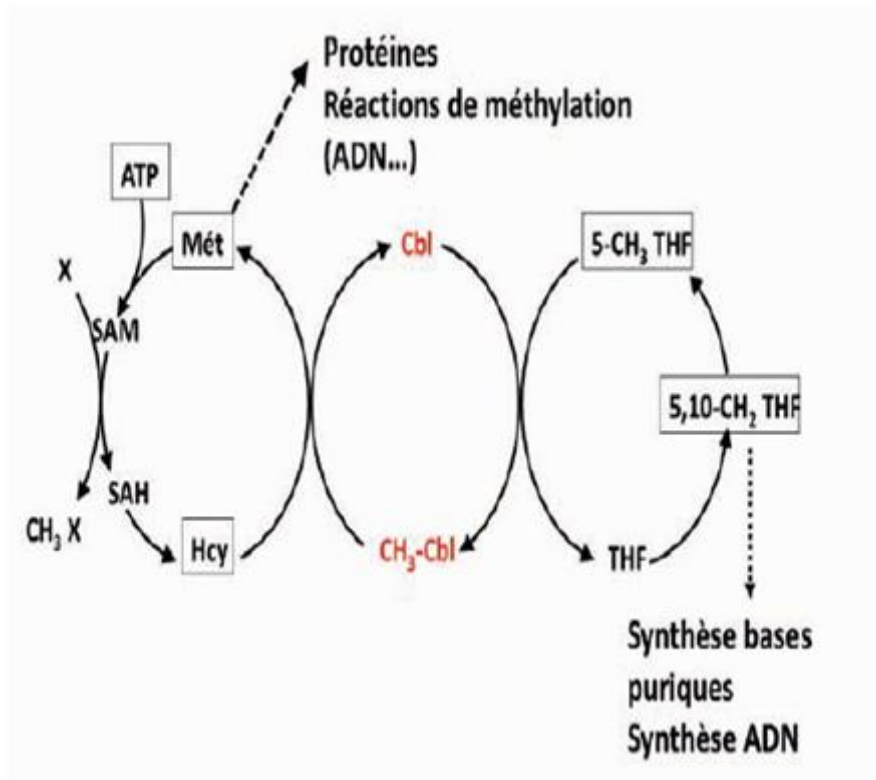


Figure 3 : Métabolisme et fonctions biochimiques de la vitamine B12 [76]



Mét : méthionine ; SAM : S-adenosylméthionine ; SAH : S-adenosylhomocystéine

Figure 4 : Interaction entre la méthyl-cobalamine et le cycle des folates [76]

## II. La Metformine : (Fig 5)

Découverte en 1922, la Metformine (diméthylbiguanide) (Figure 5) a connu une carrière d'ombre et de lumière jusqu'à son approbation par la Food and Drugs Administration (FDA) fin 1994 et sa consécration comme thérapeutique de première ligne suite aux résultats de l'UKPDS.

Il s'agit du seul biguanide encore commercialisé ; ses concurrents, la Phenformine, surtout développée aux États-Unis, et la Buformine en Allemagne, ayant été retirés en raison de leur risque important d'acidose lactique [4,24,25].

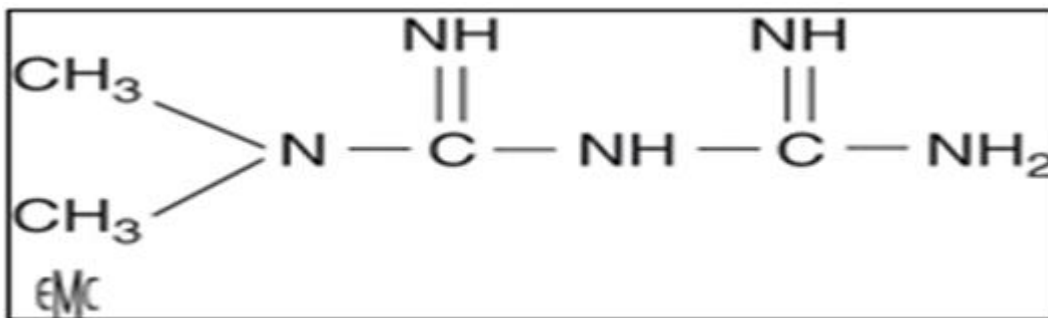


Figure 5: Formule chimique de la Metformine [24]

### 1. Propriétés pharmacocinétiques

La Metformine, base faible très polaire, est extrêmement soluble dans l'eau. Sa biodisponibilité est de l'ordre de 50-60 %, l'absorption s'effectuant au niveau du grêle ; la liaison aux protéines est négligeable et sa demi-vie plasmatique est de 1,5 à 4,9 heures.

Les concentrations circulantes obtenues aux doses thérapeutiques sont de 0,3 à 1 mg/l.

La Metformine est très peu métabolisée et est éliminée sous forme inchangée par voie rénale, 90 % de la dose administrée disparaissant en 12 heures. De ce fait, une altération, même modérée, de la fonction rénale est susceptible

d'avoir un retentissement important sur les concentrations plasmatiques du produit. L'élimination rénale de la Metformine implique à la fois la filtration glomérulaire et une sécrétion tubulaire.

Dans la plupart des tissus, les concentrations intracellulaires de Metformine sont équivalentes aux taux plasmatiques ; mais elles dépassent celles-ci dans le foie, les reins, et surtout les glandes salivaires et la paroi intestinale [26,27,28,29].

## 2. Propriétés pharmacodynamiques (Effet antihyperglycémiant)

La Metformine est classée parmi les insulinosensibilisateurs car elle réduit l'hyperglycémie des patients diabétiques de type 2 sans augmenter leur insulïnémie ; mais une sécrétion résiduelle d'insuline est nécessaire à son action.

L'effet antihyperglycémiant de la Metformine résulte essentiellement de la réduction de la production hépatique de glucose, principalement par inhibition de la néoglucogénèse et, à un moindre degré, par inhibition de la glycolyse [29,30].

En outre, la Metformine potentialise l'effet de l'insuline sur la captation musculaire et adipocytaire du glucose. Dans le muscle, elle favorise le stockage du glucose sous forme de glycogène, mais n'augmente pas son oxydation. Il n'est toutefois pas certain que cet effet périphérique observé in vivo soit direct. Il apparaît plus probable qu'il résulte de l'amélioration de la glucotoxicité [31].

Au niveau intestinal, la Metformine réduit l'absorption du glucose, mais cela ne participe probablement que de façon marginale à son effet thérapeutique.

La Metformine module également le système incrétine, en potentialisant la sécrétion du GLP1 ou en augmentant sa sensibilité [32,33,34].

### 3. Mécanisme d'action

La ou les cibles moléculaires de la Metformine restent mal connues. [29] Sur des hépatocytes isolés, son action nécessite la présence de la protéine kinase activée par l'acide adénosine monophosphorique (AMPK), un système enzymatique de structure hétérotrimérique comportant une sous-unité  $\alpha$  catalytique et deux sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  régulatrices qui jouent un rôle majeur dans l'intégration et la régulation de l'homéostasie énergétique cellulaire. L'AMPK est activée par l'augmentation du rapport acide adénosine monophosphorique (AMP)/adénosine triphosphate (ATP) et par diverses autres kinases. Elle déclenche, par phosphorylation enzymatique directe et modulation de l'expression génique, une série de processus cataboliques conduisant à la production d'ATP et inhibe les voies anaboliques consommatrices d'ATP [35].

### 4. Autres effets de la Metformine

En dehors de son effet sur le métabolisme glucidique, la Metformine exerce un certain nombre d'autres effets directs ou indirects favorables :

- Effet sur le poids : Dans la plupart des études, le traitement par Metformine s'est accompagné d'une stabilité pondérale, voire d'une discrète perte pondérale, contrastant avec la prise de poids observée sous sulfamides hypoglycémiantes (SH) ou thiazolidinediones (TZD) [36,37] ;

- Effet sur les lipides plasmatiques : Le traitement au long cours par Metformine s'accompagne d'une réduction modérée des triglycérides plasmatiques par réduction de la synthèse hépatique des *very low density lipoprotein* (VLDL), ainsi que des acides gras libres circulants. À un moindre degré, une légère baisse du cholestérol total et une augmentation du *high density lipoprotein* (HDL)-cholestérol ont été rapportées dans certaines études [38,39]. La Metformine améliore, par

ailleurs, la stéatose hépatique non alcoolique, conséquence de l'accumulation hépatique des lipides, fréquemment associée au diabète de type 2 [40] ;

- Effet sur la pression artérielle : Une baisse tensionnelle discrète est rapportée de façon inconstante sous Metformine. Elle est sans doute attribuable à la réduction pondérale et à l'amélioration de l'insulinorésistance [41] ;

- Amélioration de l'activité fibrinolytique par diminution du *plasminogen activator inhibitor 1* (PAI-1), le principal inhibiteur de l'activateur du plasminogène, et réduction du risque thrombotique par diminution du facteur de von Willebrand [42,43] ;

- § Diminution de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire [44] ;

- § Amélioration de la relaxation vasculaire [45] ;

- § Réduction de l'excrétion urinaire d'albumine [46].

Enfin, les études cliniques (UKPDS, et post UKPDS) démontrent la réduction du risque de maladies cardiovasculaires et de la mortalité sous Metformine [4].

D'autres études suggèrent, par ailleurs, un effet bénéfique sur le risque de survenue de cancer [47,48,49].

## 5. Effets indésirables

### a. Acidose lactique [29,51]

L'acidose lactique est la complication la plus grave du traitement par Metformine et est à l'origine des contre-indications et précautions d'emploi de la molécule. Sa fréquence, évaluée entre 2 et 9/100 000 patients-années, est très inférieure à celle observée sous Phenformine. Un certain nombre de travaux récents remettent même en cause la responsabilité dans la survenue d'acidoses lactiques chez les patients diabétiques, l'augmentation du risque paraissant davantage liée au diabète lui-même qu'à son traitement. Aux doses thérapeutiques, la Metformine

majore discrètement les taux circulants de lactate par augmentation de sa production intestinale et réduction de la glucogenèse à partir des produits terminaux de la glycolyse. Une acidose lactique risque de se produire en cas d'anoxie tissulaire, ou en situation d'insuffisance rénale qui conduit à une accumulation anormale de Metformine.

Le traitement par Metformine doit être interrompu en cas d'insuffisance rénale sévère (débit de filtration glomérulaire estimé [DFGe] inférieur à 30 ml/min) ; et les doses réduits de moitié en cas d'insuffisance rénale modérée avec surveillance de la Metforminémie, ou s'il existe un risque d'insuffisance rénale aiguë (déshydratation, utilisation de contraste iodé) ou d'ischémie tissulaire (anesthésie générale, insuffisance cardiorespiratoire sévère, infarctus du myocarde, affection intercurrente sévère). L'apparition de signes prémonitoires d'acidose lactique (asthénie, crampes musculaires, douleurs abdominales et thoraciques) doit également conduire à son arrêt immédiat avant l'apparition des manifestations plus graves (oligurie, état de choc).

#### b. Troubles digestifs [25,29]

Les troubles digestifs à type de pesanteur épigastrique, ballonnement abdominal, nausées, diarrhées, dysgueusie (goût métallique) et anorexie représentent les effets indésirables les plus fréquents. Ils sont dose-dépendants et s'atténuent parfois avec le temps ; mais on peut évaluer à 5-10 % le pourcentage de patients ayant une intolérance totale et durable à la Metformine conduisant à son arrêt.

#### c. Autres effets indésirables

Les autres effets indésirables sont rares : allergies (rash, prurit, urticaire) [25,51].

La Metformine ne provoque pas d'hypoglycémies en l'absence d'associations thérapeutiques, de jeûne prolongé ou de prise massive d'alcool [25].

Cependant, certaines études ont montré que l'utilisation à long terme de la Metformine augmente le risque de carence en vitamine B12 ou en folate. Elle influence ainsi le métabolisme de l'homocystéine, voire contribue à la progression de la neuropathie diabétique [5,6,7,8,9,10,11].



# PARTIE PRATIQUE

## I. Objectifs de l'étude

L'objectif de notre étude est d'évaluer de manière prospective le statut en vitamine B12 chez 130 patients DT2 traités par Metformine, comparativement à un groupe témoin incluant 50 patients DT2 non traités par Metformine et aussi d'évaluer la corrélation entre le statut vitaminique et la dose, la durée de prise de Metformine, ainsi qu'avec différents paramètres cliniques et métaboliques.

## II. Matériels et méthodes

### 1) Type, lieu de l'étude et population étudiée :

Il s'agit d'une étude transversale à visée descriptive et analytique menée chez des patients DT2, consultant au service d'endocrinologie et de maladies métaboliques de l'hôpital militaire Moulay Ismail de Meknès sur une période de 06 mois (du 01 janvier 2014 au 30 juin 2014) incluant 130 patients traités par Metformine et 50 patients sans Metformine (groupe témoin). Le consentement de tous les patients a été obtenu avant leur participation.

#### a. Critères d'inclusion

Le diabète de type 2 est retenu :

- Chez des patients diabétiques traités par antidiabétiques oraux.
- Chez des patients traités par insuline, et dont le diagnostic a été fait à

un âge  $\geq$  40 ans.

#### b. Critères d'exclusion

Les patients DT2 avec :

- Gastrectomie partielle ou totale
- Maladie de Crohn, ou autre pathologie digestive
- Supplémentation en vitamine B12

## 2) Recueil et analyse des données :

Pour la collecte des informations, une fiche d'enquête constituée de trois parties a été utilisée :

### a. Interrogatoire:

Dans un premier temps, les participants ont répondu à un questionnaire préétabli qui comporte des informations sur:

- Les caractéristiques de la population : âge, sexe
- Les habitudes toxiques comprenant la consommation de tabac et d'alcool
- Les habitudes alimentaires (présence ou non de régime végétalien)
- La durée du DT2, la durée d'utilisation de la Metformine, la dose actuelle de Metformine et la présence d'une intolérance à la Metformine.
- Les autres prises médicamenteuses particulièrement celles interférant avec le métabolisme de la vitamine B12 (inhibiteurs de la pompe à protons ou antagonistes des récepteurs H2)

### b. Examen clinique :

L'examen clinique a compris

- La mesure du poids, de la taille, avec le calcul de l'IMC (en divisant le poids en Kg par la taille en mètre carré)
- Le tour de taille (mesuré en position debout, au niveau de l'ombilic)
- La pression artérielle (mesuré à l'aide d'un manomètre standard à mercure ; on considère hypertendu tout patient présentant une tension artérielle systolique  $\geq 140$  mmHg, ou une tension artérielle diastolique  $\geq 90$  mmHg, ou sous traitement anti-hypertenseur)

c. Bilan biologique:

Le bilan biologique a été réalisé par prélèvement sanguin veineux, le matin après au moins 09 heures de jeûne, sur tube non hépariné, avec dosage :

- De la vitamine B12 par méthode électrochimiluminescence
- Les valeurs normales sont comprises entre (200 à 866 pg/ml)
- Folates par méthode électrochimiluminescence
- Les valeurs normales sont comprises entre 3 à 19,9 µg/l.
- L'équilibre glycémique a été évalué grâce à la mesure de la glycémie à jeun (Valeur normale 0,72 à 1,07 g/l) et de l'hémoglobine A1c (mesuré par chromatographie liquide haute performance par échange de cation sur automate D-10 Bio-Rad ; valeur normale est de 4% à 5,9%).
- Les paramètres hématologiques ont compris l'évaluation de l'hémoglobine (VN : 12 à 17 g/dl), hématocrite, le volume globulaire moyen (VGM) et la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH)
- Le reste de l'examen a compris un dosage :
- Créatinine : (VN : 7 à 13 mg/L)
- Bilan hépatique : Bilirubine libre (VN : 2 à 7 mg /l ) , Alanine aminotransférase (ALAT) (VN : 5 à 50UI/l), Aspartate aminotransférase (ASAT) (VN : 10 à 50 UI/l), la phosphatase alcaline (PAL) (VN/ 40 à 129 UI/l), la gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) (VN : 10 à 55 UI/L)
- Fer sérique (VN : 0.6 à 1.9 mg/l), ferritinémie (VN : 20 à 300 µg/l), Capacité totale de fixation du fer par la transferrine (CFT) (VN : 2,6 à 4,6 mg/l)
- CRP (VN : 0 à 4,5 mg/l) et LDH (VN : 190 à 430 UI /l )

- Par ailleurs, les patients présentant une carence en vitamine B12 (définie par un taux de vitamine B12 < 200 pg/ml) ont bénéficié d'un dosage des auto-anticorps anti-facteur intrinsèque et anti-cellules pariétales gastriques. De même, une fibroscopie oeso-gastrique a été pratiquée afin d'objectiver la présence ou non d'une gastrite atrophique.

## Fiche d'exploitation: Diabète et vitamine B12

### Données générales du patient :

- Nom : ..... Prénom : .....
- Age : .....
- Sexe : Femme  Homme
- Lieu d'habitat : .....
- Téléphone : .....
- Profession : .....
- ATCD :
  - Tabac : Oui  Non
  - Alcool : Oui  Non
  - Autres tares associées (Médicale/chirurgicale) : .....
  - Habitudes alimentaires : .....
  - Durée du diabète : .....

### Données concernant le traitement :

- Metformine :
  - Dose : .....
  - Durée : .....
  - Intolérance : .....
- Insuline : Oui  Non
- Autres traitements (IPP) : .....

## Fiche d'exploitation: Diabète et vitamine B12

### Données cliniques du patient :

- Poids :.....
- Taille :.....
- Tour de Taille :.....
- IMC :.....
- TA :.....

### Données biologiques du patient :

- Vitamine B12 :.....
- Acide folique :.....
- Fer :.....
- Ferritine :.....
- CFT :.....
- Bilan hématologique :
  - Hb :.....
  - Ht :.....
  - VGM :.....
  - CCMH :.....
- Bilan glycémique :
  - GJ :.....
  - HbA1c :.....
- Bilan hépatique :
  - Bilirubine libre :.....
  - ASAT :.....
  - ALAT :.....
  - PAL :.....
  - GGT :.....
- CRP :.....
- LDH :.....
- Créatinine :.....

d. Méthode d'analyse et de traitement des résultats :

Les données ont été saisies et codées sur Excel, puis analysées à l'aide du logiciel SPSS v20 au sein du laboratoire d'épidémiologie, recherche clinique et médecine communautaire à la faculté de médecine et de pharmacie de Fès.

Pour la partie descriptive, les variables quantitatives ont été exprimées par leur moyenne et leur écart-type, ainsi que par leurs valeurs minimale et maximale.

Les variables qualitatives ont été exprimées par leur effectif et leur fréquence. Le seuil de signification ( $p$ ) retenu était de 5 %.

La réalisation des graphiques a été effectuée avec le logiciel Microsoft Excel 2010.



# RESULTATS

## 1. Etude descriptive:

Durant la période de l'étude (6 mois), 130 patients DT2 sous Metformine ont été inclus, 50 patients DT2 non traités par Metformine (groupe témoin apparié pour l'âge, le sexe, l'IMC et la durée du diabète).

1.1 Description de la population DT2 sous Metformine, selon les variables sociodémographiques et physiologiques :

### 1.1.1 Age et sexe

- L'âge moyen des patients est de  $55,25 \pm 9,08$  ans, le minimum étant de 38 ans et le maximum étant de 83 ans.
- 52 des patients examinés sont de sexe féminin (40% notre population),

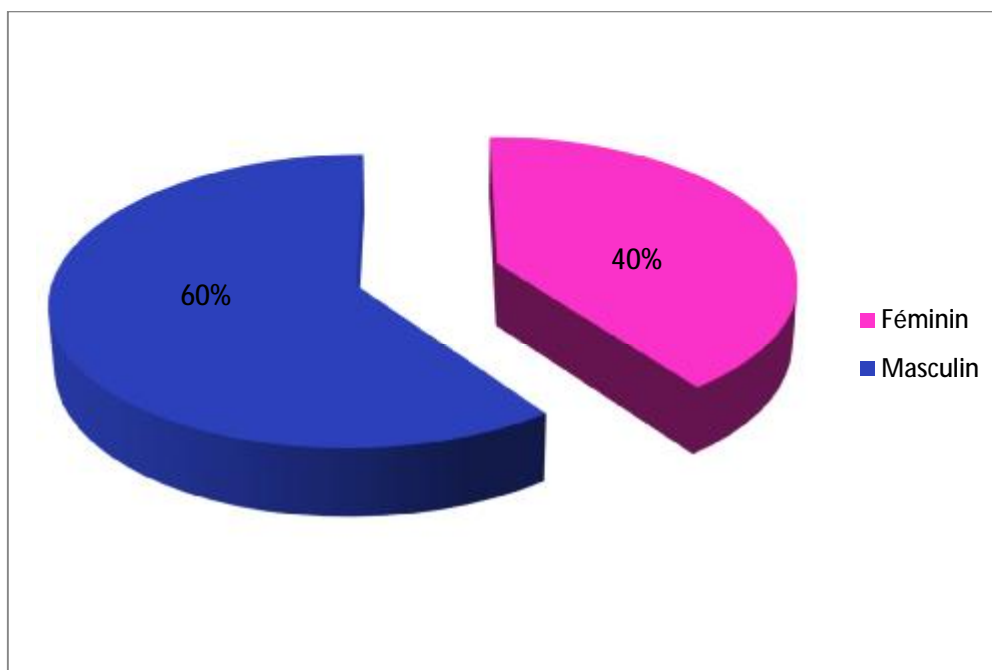


Figure 6: Répartition de la population selon le sexe

### 1.1.2 Poids, taille, tour de taille et IMC:

Le poids moyen de notre population est de  $74,58 \pm 16$  Kg, le minimum étant de 48 Kg et le maximum étant de 123 Kg.

La taille moyenne est de  $167,24 \pm 7,75$  cm, le minimum étant de 150 cm et le maximum de 185 cm.

Le tour de taille moyen de ces patients est de  $96,94 \pm 16,40$  cm, le minimum étant de 70 cm et le maximum étant de 148 cm.

L'IMC (Body Mass Index) de cette population est de  $26,67 \pm 5,35$   $\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$ , le minimum étant de  $17 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$  et le maximum étant de  $41 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$  ;

3,8% de la population présentent un sous poids dont 1,9% des femmes et 5,1% des hommes ; 33,1% présentent un IMC normal dont 30,8% de femmes et 34,6% d'hommes ; 33,8% présentent un surpoids dont 25% de femmes et 39,7% d'hommes ; 20,8% présentent une obésité modérée dont 25% de femmes et 17,9% d'hommes ; 6,2% présentent une obésité sévère dont 15,4% de femmes et 0% d'hommes. Enfin 2,3% présentent une obésité morbide avec 1,9% de femmes et 2,6% d'hommes.

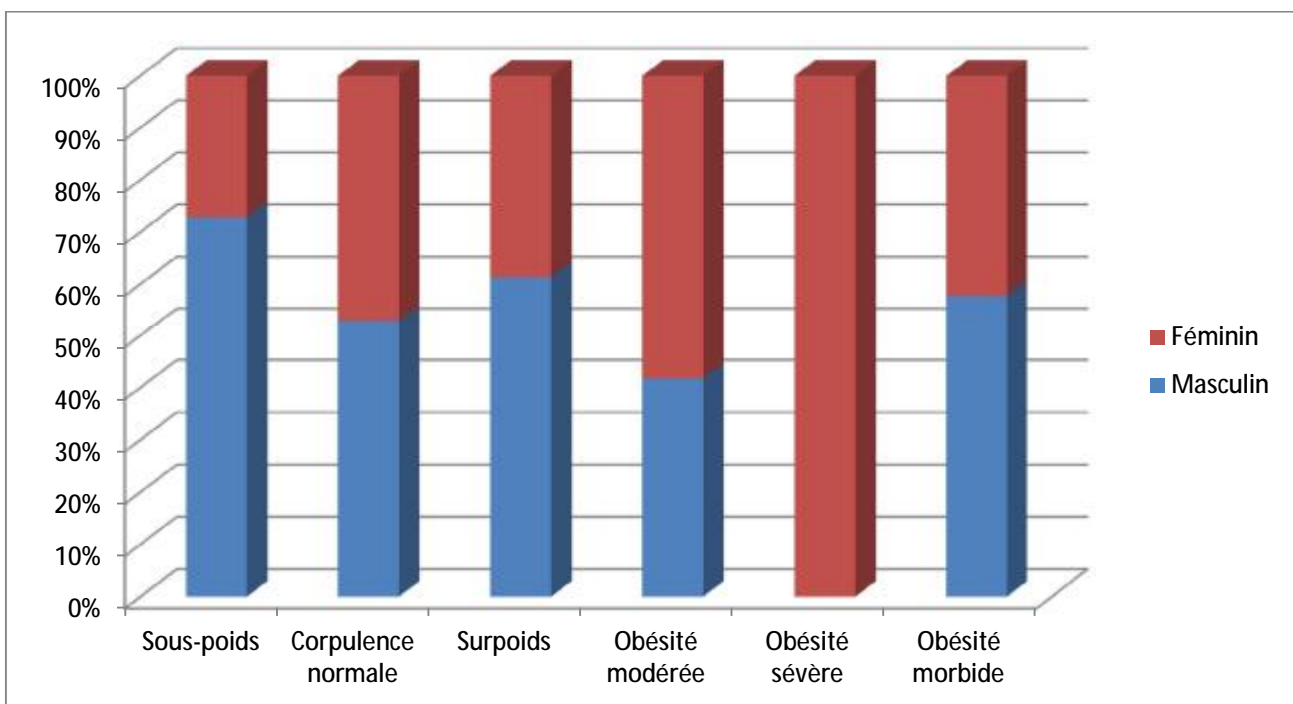


Figure 7 : Description de la population en fonction de l'IMC et selon le sexe

### 1.1.3 Tabac et alcool:

30 patients présentent un tabagisme actif (23,1% de notre population), 6 patients consommaient de d'alcool (4,6 %)

### 1.1.4 Habitudes alimentaires :

Aucun patient ne prend de régime alimentaire de type végétarien

1.2. Description de la population DT2 sous Metformine selon l'état pathologique et thérapeutique:

#### 1.2.1 Durée du diabète :

La durée moyenne du diabète dans notre population est de  $6 \pm 4,18$  ans (minimum de 1 an et maximum de 22 ans).

#### 1.2.2 Prise de la Metformine:

La dose moyenne de Metformine dans notre population est  $2353 \pm 419,81$  mg/j, le minimum étant 850mg/j et le maximum étant 3000 mg/j.

La durée moyenne de prise de Metformine est de  $3,46 \pm 4,37$  ans, le minimum étant de 1 an et le maximum de 20 ans.

23.1% de notre population présentent une intolérance à la Metformine dont 38.5% sont des femmes et 12.8% des hommes

#### 1.2.3 Autres traitements, insuline et IPP :

94 patients de notre population (72.3%) sont traités en plus par l'insuline, dont 37 femmes (71.2%) et 57 hommes (73.1%).

13 patients (10%) de notre population reçoivent des IPP ou des antagonistes des récepteurs H2, dont 5 femmes (9.6%) 8 hommes (10.3%).

### 1.3 Description de notre population DT2 selon les bilans biologiques :

#### 1.3.1 Vitamine B12

Le taux moyen de la vitamine B12 des patients DT2 sous Metformine est de  $427,93 \pm 177,87$  pg/ml, le minimum étant de 70 pg/ml et le maximum étant de

1982 pg/ml alors qu'elle est de  $570,21 \pm 187,41$  pg/ml chez les patients DT2 sans Metformine avec des extrêmes allant de 156 pg/ml à 1965 pg/ml.

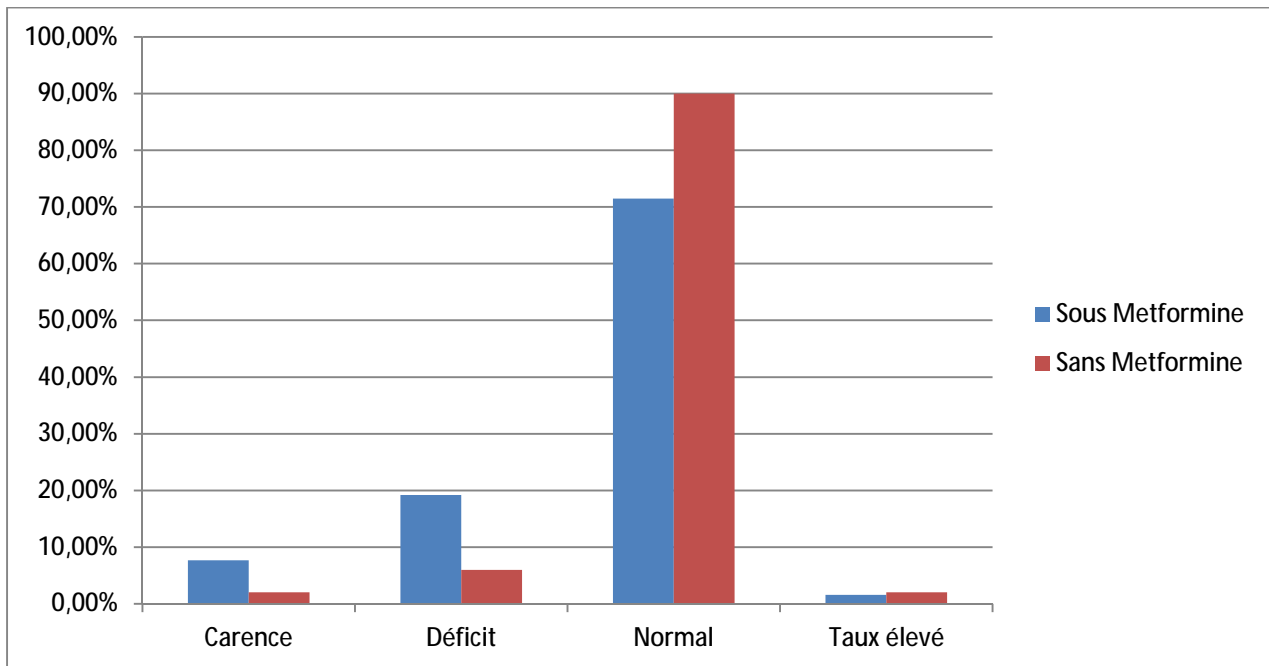
10 patients sous Metformine (7,7 %) présentent une carence en vitamine B12 (taux < 200 pg/ml) dont 5 femmes (9,6%) et 5 hommes (6,4%) versus un seul patient diabétique sans Metformine (2%).

25 patients sous Metformine (19,2 %) présentent un taux de vitamine B12 compris entre 200 et 300 pg/ml) versus 3 patients diabétiques sans Metformine (6%).

2 Patients sous Metformine (1,6%) présentent par contre une hypervitaminose (taux > 1000 pg/ml) versus un seul patient diabétique sans Metformine (2%).

Les patients présentant un taux de vitamine B12 < 200 pg/ml, ne prennent pas de régime végétarien, ni de médicaments pouvant interférer avec le métabolisme de la vitamine B12 en dehors de la Metformine ; le dosage des auto-anticorps anti-facteur intrinsèque et anti-cellules pariétales gastriques est négatif ; de même la fibroscopie oeso-gastrique n'objective pas de gastrite atrophique.

Aucun patient avec carence ou déficit en vitamine B12 ne présente de trouble hématologique (macrocytose, hyperségmentation des neutrophiles, pancytopenie), de neuropathie ou de trouble cognitif.



**Figure 8:** Description de la population DT2 selon le taux sérique de la vitamine B12

### 1.3.2 Acide folique

Le taux moyen de l'acide folique chez les patients DT2 sous Metformine est de  $13,95 \pm 3,86 \mu\text{g/l}$ , le minimum étant de  $6 \mu\text{g/l}$  et le maximum étant de  $21 \mu\text{g/l}$  alors qu'il est de  $13,2 \pm 6,5 \mu\text{g/l}$  chez les patients DT2 sans Metformine avec des extrêmes allant de  $4 \mu\text{g/l}$  à  $18 \mu\text{g/l}$ .

Aucun patient ne présente de déficit en acide folique dans notre population ; en revanche 110 patients (84.6%) présentent des valeurs normales et 20 patients (15.4%) présentent des valeurs au-delà de la norme supérieure chez les patients DT2 sous Metformine.

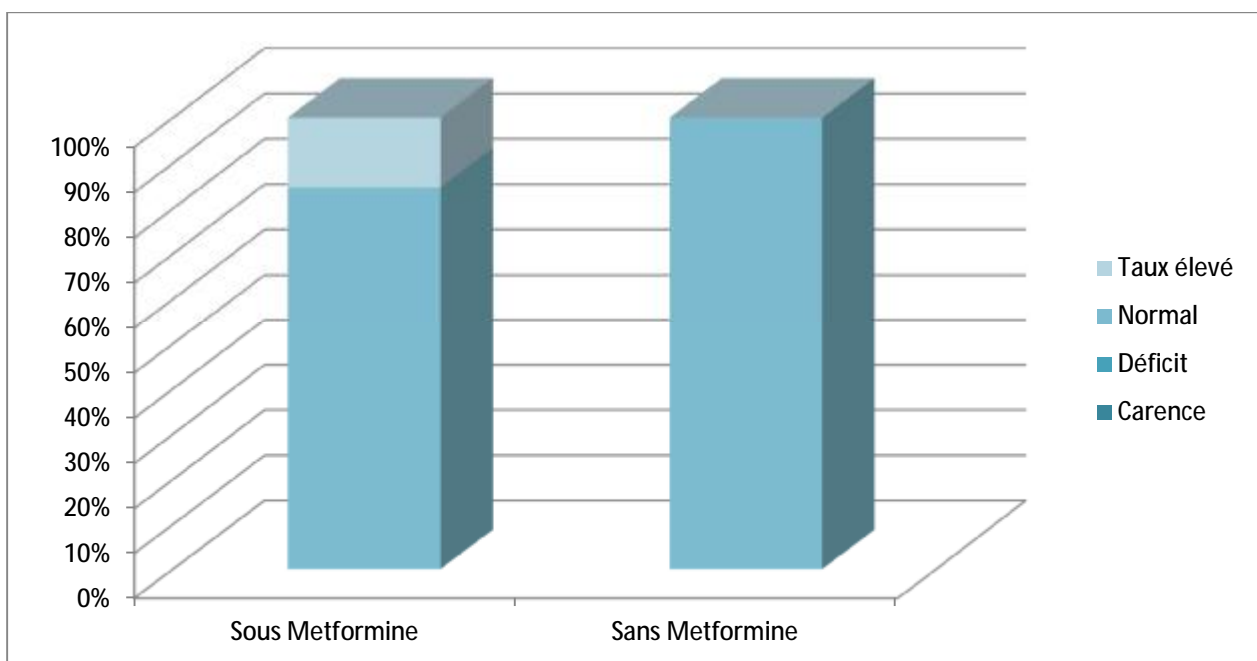


Figure 9: Description de la population DT2 selon le taux sérique de l'acide folique

### 1.3.3 Fer sérique et ferritinémie

- Le fer sérique moyen de notre population sous Metformine est de  $0.88 \pm 0.35$  mg/l, le minimum étant de 0.19 mg/l et le maximum étant de 2.19 mg/l. 13 patients (10%) de l'ensemble de la population présentent une carence en fer sérique dont 8 femmes (15.3%) et 5 hommes (6,4%).
- La ferritinémie moyenne de notre population sous Metformine est de  $132.79 \pm 110.96$  ug/l, le minimum étant de 6 ug/l et le maximum étant 516 ug/l. 11 patients (8.5%) de notre série présentent une diminution de la ferritinémie dont 9 femmes (17.3%) et 2 hommes (2.6%).

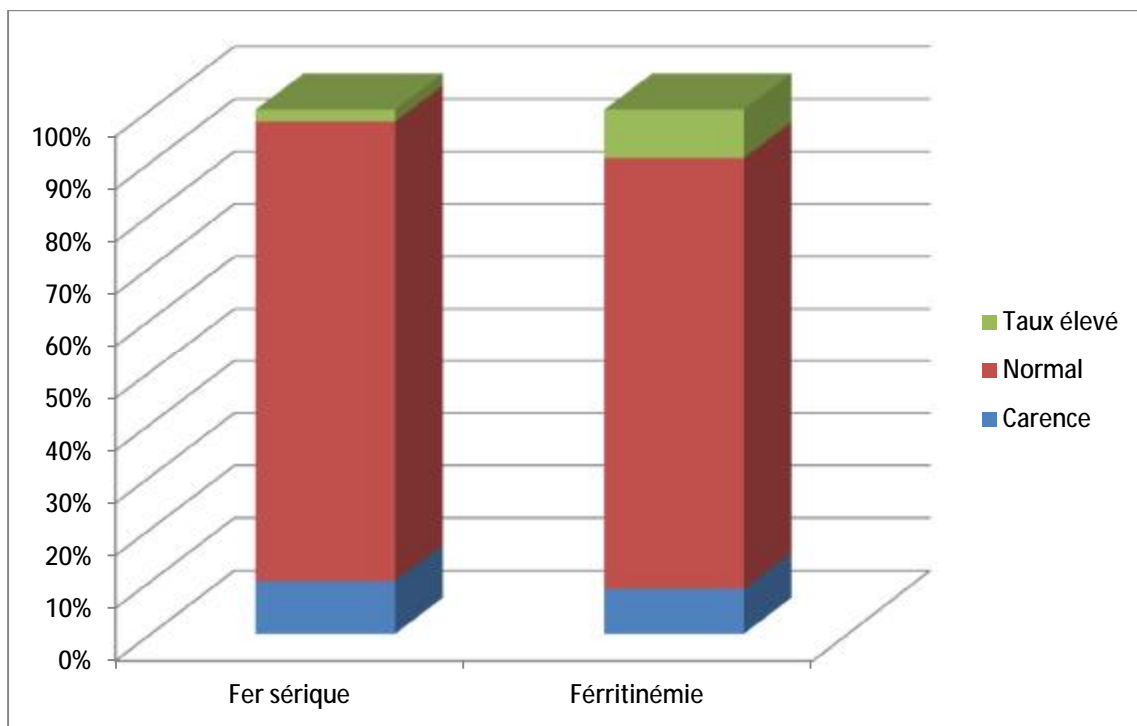


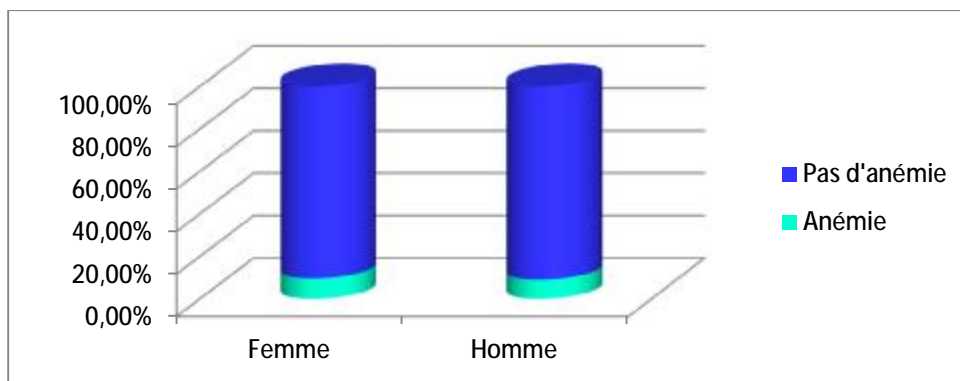
Figure 10: Description de la population sous Metformine selon le taux sérique du fer sérique et la ferritinémie



### 1.3.4 Hémoglobine

L'hémoglobine moyenne de notre population sous Metformine est de  $14,06 \pm 1,5$  g/dl, le minimum étant de 9,9 g/dl et le maximum étant de 17,9 g/dl.

12 patients (9,2%) présentent une anémie, dont 5 femmes (9,6%) et 7 hommes (9%).



**Figure 11:** Description de la population sous Metformine selon la présence ou non d'anémie

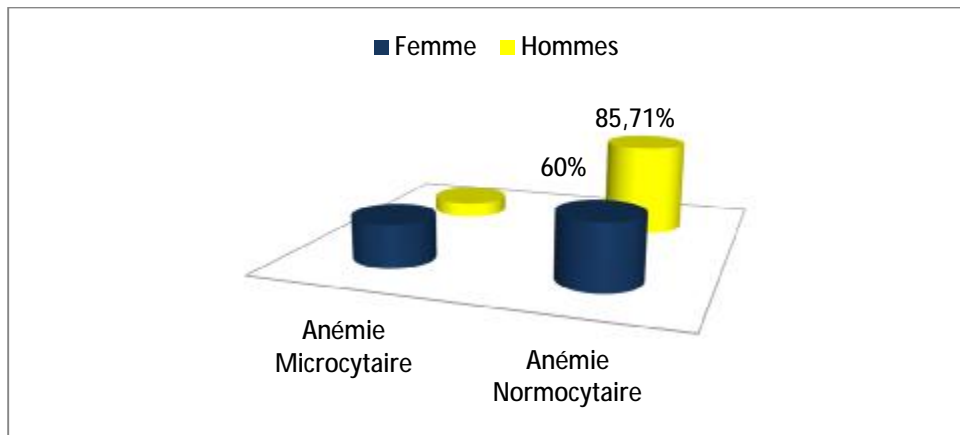
### 1.3.5 VGM et CCMH :

Le VGM de notre population sous Metformine est de  $85 \pm 5,05$   $\mu$ 3, extrême de 64,7 à 95,6  $\mu$ 3.

Le CCMH de notre population sous Metformine est de  $33,69 \pm 1,25$  g/100ml, extrême de 29,2 à 36,1 g/100ml.

Parmi les 5 femmes anémiques, 40% présentent une anémie de type microcytaire et 60% normocytaire.

Parmi les 7 hommes, 14,28% ont une anémie de type microcytaire et 85,72% de type normocytaire.



**Figure12 :** Description de la population sous Metformine selon le type d'anémie

### 1.3.6 Hématocrite :

L'hématocrite moyen de notre population sous Metformine est de  $41,96 \pm 4,35$  %, extrême allant de 26 à 52,8 %.

### 1.3.7 Glycémie et hémoglobine glyquée :

- La glycémie moyenne de notre population sous Metformine est de  $1,98 \pm 0,79$  g/l, le minimum étant de 0,65 g/l et le maximum étant de 4,86 g/l
- L'hémoglobine glyquée moyenne de notre population sous Metformine est de  $9 \pm 2,74$  %, le minimum étant de 5% et le maximum étant de 18%

### 1.3.8 Créatinine:

La moyenne de la créatinine de notre population sous Metformine est de  $8,25 \pm 2,74$  mg/l, extrême allant de 4 mg/l à 24 mg/l.

### 1.3.9 Bilan hépatique de notre population sous Metformine

- La bilirubine a une valeur moyenne de  $2,15 \pm 1,81$  mg/l, extrême allant de 1 à 15 mg/l
- ASAT a une valeur moyenne de  $18,25 \pm 9,31$  UI/l, extrême allant de 10 à 98 UI/l

- ALAT a une valeur moyenne de  $18,27 \pm 11,12$  UI/l, extrême allant de 5 à 81 UI/l
- PAL a une valeur moyenne de  $84,37 \pm 32,88$  UI/l, extrême allant de 18 à 305 UI/l
- GGT a une valeur moyenne de  $38,14 \pm 58,8$  UI/l, extrême allant de 10 à 577 UI/l

#### 1.3.10 Reste du bilan biologique

Pour le reste du bilan et chez les patients sous Metformine, la CRP présente une moyenne de  $3,66 \pm 3,76$  mg/l, extrême allant de 0 mg/l à 17,53 mg/l et la LDH une moyenne de  $175,25 \pm 38,81$  UI/l, extrême allant de 111 UI/l à 315 UI/l.

**Tableau 1 :** Tableau récapitulatif des caractéristiques cliniques des patients DT2 sous Metformine

	Valeur moyenne	extrêmes
Age moyen (ans)	55,25 ± 9,08	38 à 83
Sexe (H/F)	1,5	-----
Tabac	23,1%	-----
Alcool	4,6%	-----
Durée diabète (ans)	6 ± 6,18	1 à 22
Dose de Metformine (mg/j)	2353 ± 419,81	850 à 3000
Durée traitement Metformine (ans)	3,46 ± 4,37	1 à 20
Intolérance à la Metformine	23,1%	-----
Médicaments interférant Metformine	10%	-----
Poids (Kg)	74,58 ±16	48 à 123
Taille (cm)	167,24 ±7,75	150 à 185
IMC (Kg/m2)	26,67± 5,35	17 à 41
Tour de taille (cm)	96,94 ±16,40	70 à 148
TA systolique	12,93±1,82	10 à 18
TA diastolique	7,06±0,98	5 à 10

**Tableau 2 :** Tableau récapitulatif des caractéristiques biologiques des patients DT2 sous Metformine

	Valeurs moyennes	extrêmes	Valeurs normales
Vitamine B12 (pg/ml)	427,93 ± 177,87	70 à 1982	200 à 866
Acide folique (µg/l)	13,95 ± 3,86	6 à 21	3 à 19,9
Fer sérique (mg/l)	0,88 ± 0,35	0,19 à 2,19	0,6 à 1,9
Ferritine (µg/l)	132,79 ± 118,73	6 à 516	20 à 300
CFT (mg/l)	3,36 ± 1,14	1,6 à 6,1	2,6 à 4,6
Hémoglobine (g/dl)	14,06 ± 1,5	9,9 à 17,9	12 à 17
Hématocrite (%)	41,96 ± 4,35	26 à 52,8	41 à 52
VGM (µ3)	85 ± 5,05	64,7 à 95,6	80 à 95
CCMH (g/100ml)	33,69 ± 1,25	29,2 à 36,1	32 à 36
G à J (g/l)	1,98 ± 0,79	0,65 à 4,86	0,72 à 1,07
HbA1c (%)	9 ± 2,74	5 à 18	4 à 5,9
Créatinine (mg/l)	8,25±2,74	4 à 24	7 à 13
ALAT (UI/l)	18,27±11,12	5 à 81	5 à 50
ASAT (UI/l)	18,25±9,31	10 à 98	10 à 50
Bilirubine (mg/l)	2,15±1,81	1 à 15	2 à 7
PAL (UI/l)	84,37±32,88	10 à 305	40 à 129
GGT (UI/l)	38,14±58,8	10 à 577	10 à 55
CRP (mg/l)	3,66±3,76	0 à 17,53	0 à 6
LDH (UI/l)	175,25±38,81	111 à 315	190 à 430

**Tableau 3 :** Tableau récapitulatif des caractéristiques cliniques et biologiques entre les patients DT2 avec et sans Metformine (groupe Témoin)

	Valeurs moyennes Sous Metformine	Valeurs moyennes Sans Metformine	p
Age moyen (ans)	55,25 ± 9,08	57,64 ± 8,78	NS
Sexe (H/F)	1,5 (78/52)	1,5 (30/20)	NS
Durée diabète (ans)	6 ± 6,18	6,8 ± 5,95	NS
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	26,67 ± 5,35	25,45 ± 4,16	NS
Vitamine B12 (pg/ml)	427,93 ± 177,87	570,21 ± 187,41	0,001
Acide folique (µg/l)	13,95 ± 3,86	13,2 ± 6,5	NS

## 2. Etude analytique

### 2.1 Analyse uni variée

#### 2.1.1 Corrélation entre le statut en vitamine B12 chez les patients DT2 sous Metformine et les paramètres cliniques

Notre étude ne rapporte aucune corrélation statistiquement significative entre le taux de vitamine B12 et le poids, l'IMC, l'âge, le sexe, la tension artérielle et les habitudes alcool-tabagiques.

**Tableau 4 : Etude analytique entre le statut en vitamine B12 chez les patients DT2 sous Metformine et les paramètres cliniques**

	Vitamine B12 < 200 pg/l	Vitamine B12 200 à 300 pg/l	Vitamine B12 >300 pg/l	P value
Age	53,37±7,71	55,63±8,01	55,34±9,41	0,89
Sexe (Féminin/Masculin)	9,6% / 6,4%	25% / 15,4%	65,4 % / 78,2 %	0,07
Poids	80,96±19,23	80,11±17,82	73,62±15,77	0,32
IMC	26,67±5,39	29,08±5,13	26,03±5,454	0,21
Tour taille	94,44±18,87	105,13±18,1	95,04±15,86	0,09
TA systolique	13,3±1,97	12,2±0,92	12,8±1,85	0,26
TA diastolique	7,17±0,98	6,75±0,7	7,13±1	0,573
Tabac	40%	0%	27,36%	0,16
Alcool	0%	0%	6,3%	0,68

### 2.1.2 Analyse en fonction des variables pathologiques et thérapeutiques:

D'après l'étude des variables pathologiques et thérapeutiques, il s'avère qu'il n'existe aucune corrélation statistiquement significative entre le taux de vitamine B12 et la durée du diabète, la dose de Metformine, ou la prise de médicaments pouvant interférer avec le métabolisme de la vitamine B12.

Il existe, par contre, une relation négative statistiquement significative entre les taux de vitamine B12 et la durée de prise de Metformine ( $P=0,04$ ).

**Tableau 5 :** Etude analytique entre le statut en vitamine B12 chez les patients DT2 sous Metformine et les variables pathologiques et thérapeutiques

	Vitamine B12 < 200 pg/l	Vitamine B12 200 à 300 pg/l	Vitamine B12 >300 pg/l	P value
Durée diabète	5,06±4,35	7,33±6,86	5,74±6,97	0,46
Dose Metformine	2708,33±370,69	2630±303,42	2464,51±422,89	0,25
Durée Metformine	4,1±4,41	6,6±6,5	2,57±4,05	0,04
Médicaments interférant Metformine	0%	12%	10,52%	0,747



### 2.1.3 Analyse en fonction des variables biologiques :

Parmi les variables biologiques étudiées, on remarque que la glycémie à jeun, l'HbA1c, le taux de l'acide folique, la créatinine, le bilan hépatique et les paramètres hématologiques n'ont aucune corrélation avec le statut vitaminique.

Seul l'hémoglobine (Hb) présente une corrélation positive avec le statut en vitamine B12 ( $p=0,032$ ).

**Tableau 6 :** Etude analytique entre le statut en vitamine B12 chez les patients DT2 sous Metformine et l'acide folique et les paramètres hématologiques

	Vitamine B12 < 200 pg/l	Vitamine B12 200 à 300 pg/l	Vitamine B12 > 300 pg/l	P value
Acide folique	13,33±4,41	14,25±3,37	13,94±3,76	0,90
Fer sérique	74,33±38,56	85,25±26,92	91,83±36,08	0,46
Férritine	47,13±29,6	149,88±164,9	137,31±107,94	0,14
CFT	4,26±1,68	3,38±1,01	3,26±1,65	0,78
Hb	12,8±0,9	13,7±0,17	14,3±0,15	0,032
Ht°	39,7±3,31	40,97±4,87	42,47±4,33	0,22
VGM	81,26±9,07	85,01±3,92	85,4±4,8	0,148
CCMH	32,9±0,91	33,36±0,91	33,86±1,27	0,116

**Tableau 7 :** Etude analytique entre le statut en vitamine B12 chez les patients DT2 sous Metformine et la créatinine, CRP, glycémie à jeun, l' Hb A1c et le bilan hépatique

	Vitamine B12 < 200 pg/l	Vitamine B12 200 à 300 pg/l	Vitamine B12 >300 pg/l	P value
G à J	2,34±0,86	1,99±0,85	2,07±0,77	0,70
Hb A1c	8,5±2,3	8,18±3,13	9,26±2,75	0,28
Créatinine	7,83±1,47	8,62±2,82	8,21±2,8	0,86
ALAT	18,5±8,24	13,5±6,5	19,51±11,46	0,337
ASAT	17±4,42	15,13±4,05	19,21±9,73	0,435
Biliribine	1,83±0,75	1,63±0,51	2,33±1,9	0,48
PAL	92,33±11,84	75±19,84	86±34,3	0,572
GGT	33,5±15,71	26,13±12,38	41,79±62,19	0,739
CRP	3,27±2,48	3,31±2,82	3,8±3,89	0,892
LDH	172,33±39,9	193,88±28,34	170,66±39,23	0,266

## 2.2 Analyse de régression multi variée :

En analyse multi variée par méthode de régression logistique, on trouve au niveau de notre étude que seul l'hémoglobine (P=0,021) et la durée de prise de Metformine (P=0,045) ont une relation significative avec le taux de vitamine B12.

**Tableau 8 : Analyse de régression multi variée**

	B	OR	IC 95%	P
Hémoglobine	0,046	1,047	[1,002-1,095]	0,021
Durée de prise de la Metformine	-0,12	0,887	[0,788-0,997]	0,045

La relation est ainsi considérée comme négative entre la durée de prise du traitement de Metformine et le taux de vitamine B12 (B= -0,12 ; OR= 0,887 ; [0,788-0,997] ; P= 0,045) ; alors qu'elle est positive entre l'hémoglobine et le taux de la vitamine B12 (B= 0,046; OR= 1,047 ; [1,002-1,095] ; P= 0,021).

# DISCUSSION

Découverte en 1922, la Metformine (1- $\beta$ -diméthylbiguanide hydrochloride) est utilisée avec succès dans le traitement du DT2 [24].

L'effet antihyperglycémiant de la Metformine résulte essentiellement de la réduction de la production hépatique de glucose, principalement par inhibition de la néoglucogenèse et, à un moindre degré, par inhibition de la glycolyse [29,30]

En outre, la Metformine potentialise l'effet de l'insuline sur la captation musculaire et adipocytaire du glucose. Dans le muscle, elle favorise le stockage du glucose sous forme de glycogène [31].

En plus de ces effets antihyperglycémians, la Metformine a un effet bénéfique sur la réduction du risque de maladies cardiovasculaires, la mortalité cardiovasculaire et la mortalité de toutes causes. Elle est donc considérée comme une thérapeutique de première ligne dans le traitement du DT2, particulièrement suite aux résultats de l'UKPDS, et bien d'autres études [1,2,4].

Récemment, on évoque même un effet bénéfique de la Metformine dans la protection contre le cancer [47,48,49].

Cependant, certaines études ont montré que l'utilisation à long terme de la Metformine chez les patients DT2, augmente le risque de carence en vitamine B12, et même en folate. Cette carence en vitamine B12 pourrait avoir d'une part des répercussions sur le métabolisme de l'homocystéine [52] et contribuer d'autre part à la progression de la neuropathie périphérique diabétique [5,6,10,11].

Le dosage de la vitamine B12 sérique est le test le plus couramment utilisé pour l'évaluation du statut en vitamine B12 [76].

Le déficit en vitamine B12 est défini par un taux de vitamine B12 entre 200 et 300 pg/ml (148 à 220 pmol/L).

La carence en vitamine B12 est définie par un taux de vitamine B12 inférieur à 200 pg/ml (< 148 pmol/L).

L'évaluation du statut en vitamine B12 peut toutefois nécessiter, outre le dosage de la vitamine B12 sérique, le recours aux dosages des concentrations d'holo-TC-II sérique, d'acide méthylmalonique et d'homocystéine plasmatiques.

L'interprétation de la concentration plasmatique de ces dosages peut elle-même être difficile en présence de facteurs confondants (Tableau 9). A l'heure actuelle, aucun test n'a une spécificité ou une sensibilité suffisante pour être considéré comme un « étalon-or ». Ainsi le dosage de la vitamine B12 reste le test le plus couramment employé en première intention pour l'évaluation du statut en vitamine B12.

Tableau 9 : Performances des marqueurs biologiques du statut vitaminique B12 [76]

Marqueur	Déficience	Carence	Justification - Facteurs confondants
Vitamine B <sub>12</sub> sérique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Déficience si 200-300 pg/mL (148-220 pmol/L)</li> <li>- Sensibilité insuffisante</li> <li>- Valeur prédictive améliorée si association au dosage des marqueurs métaboliques Hcy + AMM</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Carence si &lt; 200 pg/mL (&lt; 148 pmol/L)</li> <li>- Sensibilité: 65-95 %</li> <li>- Spécificité moins bonne: 50-60 % (possibilité de valeurs basses si statut normal et de valeurs hautes si carence)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Variations physiopathologiques de TC-II et/ou HC (↓B<sub>12</sub> si déficit congénital en TC-II; ↑B<sub>12</sub> si grossesse; ↑B<sub>12</sub> si syndromes myéloprolifératifs, hépatomes...)</li> <li>- Hépatopathies</li> <li>- Insuffisance rénale chronique</li> <li>- Présence anticorps anti-facteur intrinsèque (interférences si dosage par immunocompétition)</li> </ul>
Transcobalamine-II ou holo-TC-II sérique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensibilité non encore déterminée (données insuffisantes)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Carence si &lt; 35 pmol/L</li> <li>- Sensibilité identique à B<sub>12</sub> sérique</li> <li>- Spécificité non déterminée (données insuffisantes)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reflet de la fraction qui est captée par les cellules ou « B<sub>12</sub> active »</li> <li>- Insuffisance rénale chronique</li> </ul>
Acide méthylmalonique sérique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bonne sensibilité</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Carence si &gt; 370 mmol/L (si fonction rénale normale)</li> <li>- Bonne sensibilité : 98 %</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Effecteur métabolique – s'accumule en cas de déficit en ado-Cbl</li> <li>- Insuffisance rénale chronique</li> <li>- Méthylmalonique acidurie</li> </ul>
Homocystéinémie plasmatique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bonne sensibilité</li> <li>- Spécificité moins bonne que l'AMM</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Carence si &gt; 15 μmol/L</li> <li>- Sensibilité : 96 %</li> <li>- Mauvaise spécificité</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Effecteur métabolique en cas de déficit en méthyl-Cbl</li> <li>- Homocystinurie</li> <li>- Insuffisance rénale chronique</li> <li>- Carence en folates et vitamine B<sub>6</sub></li> <li>- Médicaments</li> <li>- Autres xénobiotiques (alcool, tabac...)</li> </ul>

Le taux moyen de la vitamine B12 des patients DT2 sous Metformine est de  $427.93 \pm$  pg/ml versus  $570.2$  pg/ml chez les patients DT2 non traités par Metformine ( $p=0,001$ ).

10 patients diabétiques sous Metformine (7.6%) présentent une carence en vitamine B12 (taux  $< 200$  pg/ml) versus un seul patient diabétique sans Metformine (2%).

25 patients diabétiques sous Metformine (19,2%) présentent un déficit en vitamine B12 (taux entre 200 et 300 pg/ml) versus 3 patients diabétiques sans Metformine (6%).

Les résultats obtenus sont en accord avec d'autres études:

José María Calvo Romero [53] retrouve dans une population intéressant 114 patients DT2 (dont 81 sous Metformine, avec une durée moyenne de traitement de 43,5 mois et une dose moyenne de Metformine de 1779 mg/jour), des taux plasmatiques de vitamine B12 significativement bas chez les patients traités par Metformine ( $393,5 \pm 184,2$  versus  $509 \pm 176,4$  pg/ml,  $p = 0,0008$ ). Sept patients traités par la Metformine (8,6%) ont une carence en vitamine B12 ( $< 200$  pg/ml), alors que dans l'autre groupe aucun patient ne présente de carence en vitamine B12 (0%).

Pflipsen MC [54] note que les patients DT2 traités par Metformine ont des taux sériques de vitamine B12 plus bas que les patients DT2 sans Metformine ( $425,99$  pg/ml vs  $527,49$  pg/ml;  $p=0,012$ ). 79 patients DT2 traités par Metformine (40,5%) ont des taux sériques de vitamine B12 compris entre 99,79 et 349,05 pmol/l. Parmi eux, 43 patients ont de plus, une élévation de l'AMM ou de l'homocystéine.

Monique Nervo [55] retrouve dans une population intéressant 144 patients DT2, âgés de  $63.7 \pm 11.30$  ans, IMC  $30.62 \pm 5.18$  Kg/m<sup>2</sup>, traités par Metformine



(durée moyenne de traitement de 4 ans et dose moyenne de Metformine de 2550 mg/jour), une valeur moyenne sérique de vitamine B12 à  $414 \pm 207,6$  pg/ml.

Les niveaux de vitamine B12 sériques sont  $< 125$  pmol/l chez 10 patients (6,9%) et entre 125 pmol/l à 250 pmol /l chez 53 patients (36,8%).

G. Gastaldi et col [56] évaluent le statut en vitamine B12, dans une population comportant 645 patients DT2 (266 femmes/379 hommes, âge moyen  $62,5 \pm 9,2$  ans, ancienneté du diabète:  $12,9 \pm 9,2$  ans, IMC  $30,4 \pm 5,5$  kg/m<sup>2</sup>, HbA1c  $8,2 \pm 1,5$  %), avec 1 ou plusieurs facteurs de risques cardiovasculaires associés.

Les patients traités par Metformine (N= 414, 64,2 %) ont plus fréquemment de carence en Vitamine B12 définie par une valeur  $< 200$  pg/ml (12,9 % vs 5,6 %  $p < 0.01$ ). Cette carence en vitamine B12 chez les patients traités par Metformine est associée à une hyperhomocystéinémie (24,0 vs 18,4  $\mu$ g/ml ;  $p < 0,001$ )

De Jager J [5] inclut, dans une autre étude en double aveugle, 390 patients DT2 traités par insuline. Ceux-ci sont ensuite randomisés en 2 groupes: Le premier, adjonction de Metformine 850 mg 3 fois par jour (n : 196) ; le second groupe adjonction d'un placebo (n : 194). Les malades sont suivis pendant 4,3 ans. Au terme de la période d'observation, les patients traités par Metformine ont une diminution de la concentration de la vitamine B12 de 19 % (-24% à -14% ; IC 95 % ;  $p < 0,001$ ); de folates de 5 % (-10 % à -0,4 ; IC 95 % ;  $p=0,033$ ) et une augmentation non significative de la concentration d'homocystéine de 5 % (-1 à 11 % ; IC 95 % ;  $p = 0,091$ ) par rapport à ceux traités dans le groupe placebo.

A l'issue de l'étude, le risque de déficit en vitamine B12 ( $< 200$  pg/ml) est plus important dans le groupe Metformine (augmentation de 7,2%,  $p= 0,004$ ) que dans le groupe placebo. La concentration d'homocystéine chez les patients ayant un déficit en vitamine B12 est plus forte que chez les patients sans déficit (31,6 pg/ml vs 19,86 pg/ml,  $p < 0,001$ ).

Enfin, Reinstatler [6], dans une étude intéressant des adultes américains âgés de  $\geq 50$  ans, avec 1621 patients DT2 et 6867 patients non diabétiques de la National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), entre 1999 et 2006, révèle que le déficit biologique en cobalamine (défini par une concentration  $\leq 200$  pg/ml) est présent chez 5.8% des patients diabétiques sous Metformine (durée moyenne de traitement 5 ans), versus 2.4% chez les patients diabétiques n'utilisant pas la Metformine et 3.3% dans la population non diabétique

En revanche, Gauthier [57], ne retrouvent pas de carence en vitamine B12 malgré des valeurs moyennes plus basses de vitamine B12 sérique sous Metformine.

Leur étude inclut 106 patients diabétiques, âgés de  $62 \pm 11$  ans, avec une durée moyenne de diabète de  $13 \pm 9$  ans ; dont 64 patients (60 %) traités par Metformine (durée moyenne de traitement de  $10 \pm 8$  ans).

La concentration de cobalamine est plus basse chez les patients traités par Metformine ( $415 \pm 293$  vs  $560 \pm 204$  pg/ml ;  $p = 0,0054$ ). Il n'y a pourtant pas plus de carence en vitamine B12 (cobalamine  $< 200$  pg/ml) chez les patients traités par Metformine (2 vs 9 patients).

La disparité des résultats peut être expliquée par:

1. La variabilité de la limite inférieure normale de la concentration sérique de vitamine B12, fonction de la technique de mesure utilisée
2. L'utilisation de la vitamine B12 seule pour définir le déficit, sans évaluation de l'homocystéine, et l'AMM pour confirmer le déficit
3. La variabilité de la dose et de la durée d'utilisation de la Metformine.

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des différentes études internationales

Nom de l'étude	Nb de patients	Durée du TRT Metformine	Dose moy/jour Metformine	Moyenne vitamine B12 : Sous Metformine vs sans Metformine	P
<b>Notre étude</b>	180 patients dont 130 sous Metformine	3,46±4,37 ans	2353±419,81 mg	427,93±177,87 pg/ml vs 570,21±187,41 pg/ml	0,001
<b>José Maria [53]</b>	109 patients dont 81 sous Metformine	43,5 mois	1779 mg	395.5±184.2 pg/ml vs 509±176.4 pg/ml	0,0008
<b>Gauthier [57]</b>	106 patients dont 64 sous Metformine	10±8 ans	Non rapportée	415±293 pg/ml vs 560±204 pg/ml	0,0054
<b>Gastaldi [56]</b>	645 patients dont 414 sous Metformine	Non rapportée	Non rapportée	La moyenne non rapportée mais déficit chez 12,9% des patients sous Metformine vs 5,6% des patients sans Metformine	Non rapportée
<b>Pfilpden [54]</b>	195 patients dont 133 sous Métformine	Non rapportée	1776,32 pour les patients avec un déficit et 1602,52 pour les patients sans déficit	425 ,99 pg/ml vs 527,49 pg/ml	0,01
<b>De jager [5]</b>	390 patients dont 194 sous Metformine	52 mois	2050	408,24 pg/ml vs 504,26 pg/ml	Non rapportée
<b>Nervo [55]</b>	144 patients sous Metformine	4 ans	2550	414±207,6 pg/ml vs « pas de groupe témoin »	Non rapportée
<b>Reinstatler [6]</b>	1621 patients dont 575 sous Metformine	7 ans	Non rapportée	423,33 pg/ml vs 515,6 pg/ml	0,0116
<b>Liu [10]</b>	134 patients dont 56 sous Metformine	Non rapportée	Non rapportée	376,13 pg/ml vs 506,8 pg/ml	0,023

Le mécanisme responsable de la carence en vitamine B12 induite par la Metformine reste sujet à controverse.

D'ailleurs, plusieurs mécanismes sont évoqués [57,58,59]:

- Inhibition compétitive ou inactivation de l'absorption de la cobalamine.
- Altération du FI.
- Altération de la flore bactérienne ou de la motilité gastro-intestinale.
- Altération de la morphologie structurale de l'iléon
- Interaction avec les récepteurs «cubuline»

Toutefois, un autre mécanisme est fortement incriminé ; celui de l'altération par la Metformine, de la fixation calcium dépendante du complexe cobalamine facteur intrinsèque au niveau de son récepteur membranaire iléal [59].

L'inhibition de l'absorption calcium-dépendante du complexe cobalamine-facteur intrinsèque au niveau iléale semble réversible après supplémentation calcique [59]. Néanmoins, celle-ci ne permet pas une augmentation des niveaux sériques de cobalamine dans cette même étude.

Plus de recherches sont donc nécessaires pour clarifier le mécanisme de la carence en vitamine B12 induite par la Metformine.

Plusieurs études, ont rapporté également, une diminution de l'acide folique sérique, chez les patients traités par Metformine [5,38,60]. Le mécanisme d'action n'est pas encore élucidé [5,60].

Dans notre étude, la valeur moyenne de l'acide folique sous Metformine est de  $13,95 \pm 3,86 \mu\text{g/l}$  versus  $13,2 \pm 6,5 \mu\text{g/l}$  sans Metformine ; le déficit en acide folique ( $< 3 \text{ ng/ml}$ ) n'est pas retrouvé dans notre population. Il en est de même dans l'étude de Jager.

La carence en vitamine B12 induite par la Metformine est souvent asymptomatique. Elle peut toutefois avoir une traduction clinique.

Le premier cas de déficit en cobalamine induit par la Metformine, responsable d'une anémie mégalo-blastique a été rapporté en 1980. La durée d'utilisation de la Metformine était de 8 ans [61]. Depuis, plusieurs cas ont été rapportés [9,10,11,62,63].

Les tableaux clinico-biologiques peuvent être polymorphes et de gravité variable (Tableau 11), allant d'anomalies isolées de l'hémogramme (macrocytose ou hypersegmentation des neutrophiles) ou de polynévrites sensitives banales jusqu'à des manifestations hématologiques à type de pancytopénie, de microangiopathie thrombotique ou de pseudoleucémies et des troubles neurologiques en rapport avec une sclérose combinée de la moelle (atteinte pyramidale et cordonale postérieure de la moelle cervicale et thoracique).

Les manifestations neurologiques (polynévrites périphériques) peuvent apparaître en l'absence d'anomalies hématologiques. elles sont alors souvent rapportés à tort comme une neuropathie diabétique. ce qui n'attire pas l'attention du clinicien et peut même aggraver une neuropathie diabétique préexistante [7,64,65]. Il est intéressant de noter que dans la neuropathie diabétique, les réflexes ostéotendineux sont presque toujours abolis ; alors que dans la neuropathie carencielle, les réflexes ostéotendineux sont préservés, même à un stade avancé de l'atteinte neurologique [10,11,66].

Dans notre étude, les patients présentant une carence en vitamine B12 n'ont pas de trouble hématologique (macrocytose, hyperségmentation des neutrophiles, pancytopénie), de neuropathie clinique ou de trouble cognitif. Ceci peut être expliqué par la durée moyenne de prise de Metformine chez ces patients ( $3,46 \pm 4.37$  ans), qui n'est peut être pas assez longue pour induire une symptomatologie clinique. Nos résultats rejoignent donc ceux d'autres auteurs [53,55, 69].

Tableau 11 : Principales manifestations cliniques associées à la carence en vitamine B12 [76]

<b>Manifestations hématologiques (60 % des cas)</b>
Macrocytose isolée, anémie ± macrocytaire si présence d'un déficit ferrique, mégaloblastose médullaire, hypersegmentation des neutrophiles, leucopénie, thrombocytopénie, pancytopénie, anémie hémolytique, pseudomicroangiopathie thrombotique.
<b>Manifestations neurologiques (80 % des cas)</b>
Paresthésies symétriques, ataxie spastique, atteinte de la sensibilité profonde (si sclérose combinée de la moelle), polynévrites (névrite optique, atrophie optique)
<b>Manifestations psychiatriques (10 % des cas)</b>
Troubles des fonctions supérieures, démence, dépression (rarement états maniaques ou schizophréniques)
<b>Autres</b>
Glossite atrophique, anorexie, ulcères, ictère, vaginite, infections urinaires, hypofertilité

La présence d'une carence en vitamine B12 chez un patient diabétique traité par Metformine ne doit pas faire omettre la recherche d'autres étiologies afin d'éliminer les diagnostics différentiels (Tableau 12):

- La carence d'apport est exceptionnellement observée (patients adeptes de régimes végétaliens stricts et prolongés)
- La malabsorption des cobalamines alimentaires est, quant à elle, fréquemment impliquée dans la survenue des carences en vitamine B12. Elle peut concerner les différentes étapes du transport intraluminal et de l'absorption iléale de cette vitamine.
- Enfin, plus rarement, la carence peut être due à un défaut de transport plasmatique (déficit congénital en transcobalamine II [TC-II]) ou à des anomalies héréditaires du métabolisme intracellulaire des cobalamines.

Dans notre population, les patients présentant un taux de vitamine B12 < 200 pg/ml n'ont pas d'antécédents personnels de (gastrite atrophique, gastrectomie, insuffisance pancréatique...), ne prennent pas de régime végétaliens, ni de médicaments pouvant interférer avec le métabolisme de la vitamine B12 en dehors de la Metformine.

Le dosage des auto-anticorps anti-facteur intrinsèque et anti-cellules pariétales gastriques est négatif. De même, la fibroscopie oeso-gastrique avec biopsie n'objective pas de gastrite atrophique.

Tableau 12: Principales causes d'une carence en vitamine B12 [76]

Etapes défailiantes	Acteurs	Causes
Apport	Aliments	Végétalismes pur, enfants allaités par mères carencées
Transport intraluminal	Sécrétions gastriques (pepsine et HCl), haptocorrine, sécrétions pancréatiques	Gastrite atrophique (non-dissociation des protéines alimentaires ou des protéines porteuses), gastrectomie partielle, inhibiteurs de la pompe à protons ou antagonistes des récepteurs H2, insuffisance exocrine, alcoolisme...
	Facteur intrinsèque	Gastrectomie (cancer, bypass gastrique ou chirurgie bariatrique), maladie de Biermer (anémie pernicieuse, absence e FI)
Absorption iléale	Facteur intrinsèque	Maladie de Biermer (anémie pernicieuse, absence e FI), résections iléales, maladie de Crohn, lymphome intestinal, grêle radique, sprue tropical...
	Récepteur du FI (« cubam »)	Syndrome d'Imerslund-Gräsbeck (transmission autosomique récessive)
Transport sanguin	TC-II	Déficits congénitaux en TC-II
Métabolisme intracellulaire	Récepteurs et enzymes	Déficits congénitaux en enzymes intracellulaires



Dans un deuxième temps, on a analysé les corrélations entre les taux sériques de vitamine B12 et les différents paramètres cliniques. Les taux sériques de vitamine B12 sont statistiquement corrélés à la durée du traitement par Metformine ( $p=0,04$ ), alors qu'il n'existe pas de corrélation avec l'âge, le sexe, le poids, l'IMC, le tour de taille, la tension artérielle, les habitudes tabagiques ou alcooliques, la durée de diabète et la dose de Metformine.

La corrélation négative entre le statut de vitamine B12 et la durée du traitement par Metformine peut s'expliquer par l'existence de réserves hépatiques suffisantes en vitamine B12 ( $\approx 3$  à  $5$  mg), pour couvrir les besoins pendant 3 à 5 ans ; alors que les pertes journalières ne sont que de 1 à 2  $\mu\text{g}/\text{j}$ , d'autant plus que le cycle entéro-hépatique permet le recyclage de la vitamine B12 excrétée par voie biliaire.

Nos résultats rejoignent ceux de :

De Jager J [5] qui objective que la durée du traitement par Metformine est un facteur significativement déterminant dans la survenue d'un déficit en vitamine B12 ( $p = 0,023$ ).

C Gauthier [69], qui démontre que la baisse de la concentration de la vitamine B12 est corrélée à la durée de traitement ( $p = 0,0092$ ).

On doit pourtant noter, qu'un traitement de courte durée par Metformine peut entraîner de façon précoce un déficit en vitamine B12.

Ainsi, Wulffelé [68], dans une étude randomisée incluant 400 patients DT2, montre qu'en seulement 16 semaines d'utilisation de Metformine, les patients présentent une réduction de la moyenne sérique des folates et de la vitamine B12 de 7% et de 14% respectivement, et une élévation de 4% de la moyenne sérique d'homocystéine.

Dans l'étude de Sahin [60], le traitement par Metformine à la dose de 850 mg 2 fois par jour, pendant 6 semaines, chez des patients DT2 nouvellement diagnostiqués, a entraîné une augmentation de 2,36  $\mu\text{mol/l}$  de l'homocystéine (95% IC, 2,93-1,78 (24,37%) ; P : 0,000), une diminution des folates de -1,04 ng/ml (95% IC, -0,42 à - 1,67 (7,02%); P : 0,001), une diminution de la vitamine B12 de 20,2 pg/ml, mais de manière non significative (p 0,119).

- D'autres études retrouvent une corrélation négative entre le taux sérique de vitamine B12 et la dose de Metformine :

Ainsi Ting [67], dans une étude cas contrôle, incluant 155 patients diabétiques avec déficit en vitamine B12, la dose et la durée de traitement par Metformine apparaissent comme des facteurs de risque indépendant du déficit en vitamine B12, après ajustement des facteurs confondants. On note aussi que chaque augmentation de 1g par jour de la dose de Metformine confère un risque de 2.88 (95% CI, 2.15-3.87) de développer un déficit en cobalamine.

- D'autres auteurs comme nous ne retrouvent pas de corrélation entre le statut de la vitamine B12 et la dose de Metformine :

Ainsi José María Calvo Romero [53] n'objective pas dans son étude de corrélation entre les niveaux plasmatiques de vitamine B12 et la dose de Metformine ( $r = -0,02$  ;  $p = 0,45$ ), de même que Monique Nervo [55].

Ceci peut être expliqué par les effets secondaires de la Metformine tels la diarrhée, la nausée, le changement de goût. Ce qui peut entraîner une prise irrégulière du traitement, non rapporté par le malade lors de l'interrogatoire.

Dans un troisième temps, nous avons évalué la corrélation entre le statut en vitamine B12 et différents paramètres biologiques et hématologiques.

On note qu'une relation statistiquement significative existe entre le taux plasmatique de la vitamine B12 et le taux d'hémoglobine ( $p=0.032$ ) alors qu'il n'y a pas de corrélation avec les autres paramètres notamment la macrocytose. Ceci peut être expliqué par la durée moyenne de prise de Metformine par nos patients DT2 qui est de 3,46 ans, insuffisante probablement pour permettre la manifestation des signes hématologiques.

Dans d'autres études :

G. Gastaldi [56] ne retrouve pas d'association entre la carence en Vit B12 induite par la Metformine, et le risque d'anémie (26 % vs 22 % ;  $p = 0,50$ ) ou de macrocytose (4 % vs 2 %  $p = 0,36$ ).

C. Gauthier [69] ne note pas de différence des concentrations d'hémoglobine entre le groupe traité par Metformine et le groupe sans traitement ( $13.0 \pm 1.7$  g/dl vs  $13.2 \pm 1.7$  g/dl). De manière inattendue, le VGM est significativement plus bas dans le groupe Metformine ( $89 \pm 6 \mu^3$  vs  $87 \pm 5 \mu^3$ ,  $p = 0.05$ ). Il n'y a pas plus d'anémie chez les patients traités par Metformine que dans le groupe non traité par Metformine (12 vs 18 patients).

KW Liu [10] ( $p= 0.673$ ) ne retrouve pas également une corrélation entre le taux sérique de la vitamine B12 et l'hémoglobine ( $p=0.836$ ).

Même si dans notre étude, la carence en vitamine B12 est asymptomatique, la mise en place d'une supplémentation vitaminique (hydroxo ou surtout cyanocobalamine) est nécessaire pour prévenir le développement des manifestations hématologiques ou neurologiques irréversibles. Celle-ci doit être précoce, et débiter dès que les taux sériques de vitamine B12 sont inférieurs à 300 pg/ml (22 pmol/L).

Cependant, la dose nécessaire pour corriger le déficit en vitamine B12, ainsi que la voie d'administration (voie orale ou parentérale: intra musculaire) ne sont pas clairement définies et varient d'un patient à l'autre.

La voie parentérale est intéressante, particulièrement chez les patients présentant des déficits neurologiques, en raison du risque potentiel d'atteinte irréversible. La cyanocobalamine est administrée à la dose de 1 mg par jour pendant une semaine, permettant la reconstitution des stocks hépatiques. Elle est relayée par une injection de 1 mg par semaine pendant un mois [70]. Si le traitement par Metformine est maintenu, la supplémentation vitaminique est continuée à raison d'une injection par mois.

Le traitement par voie orale (250 µg/j) est une alternative possible. Il permet d'éviter l'inconfort des injections mensuelles. Toutefois, il n'est pas encore entièrement validé à l'heure actuelle. Une étude menée aux États-Unis, entre 1999 et 2006, a montré que l'administration orale de Cobalamine chez les patients prenant de la Metformine au long cours, n'a pas permis de corriger les taux sériques de la vitamine B12 [6]. Plus de recherches sont nécessaires afin d'optimiser cette voie d'administration.

L'administration de vitamine B12 impose une évaluation de l'observance et de la réponse thérapeutique.

Certains auteurs recommandent, en cas de carence en vitamine B12 sous Metformine, le retrait des biguanides [71]. Nous préconisons, ainsi que d'autres auteurs [5,72], de continuer le traitement par Metformine et de traiter toute carence ou déficit en vitamine B12 même asymptomatique. La Metformine est un médicament de premier choix dans le traitement du DT2. Par ailleurs, la vitamine B12 est un traitement simple, peu coûteux et sûr, avec des bénéfices potentiels sur les complications hématologiques et neurologiques [73,74,75].

L'intérêt du dosage systématique de la vitamine B12, chez tous les patients DT2 traités par Metformine, reste discuté.

Le coût que représente cet examen à long terme, l'absence de répercussions cliniques dans la plupart des études, dont la nôtre, font recommander par la plupart des auteurs, un dosage ciblé de la vitamine B12 chez les patients DT2 traités par Metformine, en présence d'un 1 ou plusieurs des signes suivants:

- Macrocytose, avec ou sans anémie
- Hypersegmentation des neutrophiles (> 5% des neutrophiles avec  $\geq 5$  lobes ou  $\geq 1\%$  des neutrophiles avec  $\geq 6$  lobes)
- Pancytopénie
- Manifestations neuropsychiatriques: paresthésies, ataxie spastique, démence
- Les patients diabétiques âgés, sous Metformine au long cours ( $\geq 3-4$  ans), à dose élevée ( $\geq 2g/l$ ), particulièrement en présence de neuropathie périphérique, avec ou sans manifestations neurologiques, en présence ou non de médicaments interférant avec l'absorption de la vitamine B12 (anti-H2, antiacides, inhibiteurs pompe à protons)

Notre étude a certaines limites :

Nous n'avons pas dosé les métabolites intermédiaires de la vitamine B12: Homocystéine, AMM, holocobalamine. Dosage non disponible.

Ces métabolites sont particulièrement intéressants en cas de déficit en vitamine B12 (valeur entre 200 et 300 pg/ml) et chez les patients DT2 présentant des manifestations neurologiques ou des troubles cognitifs inexplicés, malgré des valeurs normales ou normales basses de vitamine B12. L'évaluation du statut en vitamine B12 peut alors être facilitée par la prescription de ces effecteurs métaboliques, tout en sachant que ces dosages ont leur propre limite [118].

# CONCLUSION

Notre étude atteste de la présence d'une carence et/ou déficit en vitamine B12 sous traitement par Metformine chez les patients DT2 comparativement à un groupe contrôle ; elle reste néanmoins asymptomatique.

Des recommandations intéressant les modalités de dépistage et de traitement devraient être établies en raison de la large utilisation de la Metformine chez les patients DT2.

# RESUME



## RESUME

### Introduction :

La Metformine est la thérapie médicale de première ligne du diabète de type 2 ; mais des études récentes ont fait état d'une diminution de la vitamine B12 plasmatique chez les patients traités par cette molécule. L'objectif de notre étude est d'évaluer le statut en vitamine B12 chez les patients diabétiques de type 2 (DT2) traités par Metformine comparativement à un groupe témoin et aussi d'évaluer la corrélation entre le statut vitaminique et la dose, la durée de prise de Metformine, ainsi qu'avec différents paramètres cliniques et métaboliques.

### Matériels et Méthodes :

Il s'agit d'une étude transversale menée chez des patients DT2, 130 patients sous Metformine et 50 patients sans Metformine (groupe témoin).

### Résultats :

La durée moyenne de prise de la Metformine est de  $3,46 \pm 4,37$  ans et la dose moyenne est de  $2353 \pm 419,81$ mg/j. Les patients traités par Metformine ont un taux de vitamine B12 sérique significativement plus faible ( $427.93$  pg/ml versus  $570.2$  pg/ml,  $p=0,001$ ). 10 patients diabétiques sous Metformine (7.6%) présentent une carence en vitamine B12 (taux  $< 200$  pg/ml) versus un seul patient diabétique sans Metformine (2%). 25 patients diabétiques sous Metformine (19,2%) présentent un déficit en vitamine B12 (taux entre 200 et 300 pg/ml) versus 3 patients diabétiques sans Metformine (6%).

Une corrélation négative entre le taux sérique de vitamine B12 et la durée du traitement par Metformine a été retrouvée ( $p=0,04$ ) ; alors qu'elle est positive entre le taux sérique de vitamine B12 et le taux d'hémoglobine ( $p=0,032$ ).

En analyse multi variée, seule l'hémoglobine (OR= 1,047 ; [1,002-1,095] ; P= 0,021) et la durée de prise de Metformine (OR= 0,887 ; [0,788-0,997] ; P= 0,045) ont une relation significative avec le taux de vitamine B12.

### Conclusion :

Nous confirmons la baisse de la concentration de cobalamine chez les patients traités par Metformine. Celle-ci est corrélée à la durée de traitement et au taux d'hémoglobine ; Sans répercussion clinique. D'où la nécessité des recommandations pour le dépistage et le traitement.

## ABSTRACT

### Introduction:

Metformin is the first-line therapy for type 2 diabetes; but recent studies have reported a decrease of plasma levels of vitamin B12 in patients treated with this molecule.

The objective of our study is to evaluate vitamin B12 status among patients with type 2 diabetes (T2D) treated with Metformin, compared to a control group and the correlation between vitamin B12 status and dose, duration of Metformin use and with different clinical and metabolic parameters.

### Materials and methods:

A Cross-sectional study of type 2 diabetic patients; 130 patients with Metformin and 50 patients without Metformin (control group).

### Results:

Mean time on Metformin treatment was  $3.46 \pm 4.37$  years and the mean drug dose was  $2353 \pm 419,81$ mg/day. Patients treated with Metformin have significantly lower plasma levels of vitamin B12 ( $427.93$  pg / ml versus  $570.2$  pg / ml,  $p = 0.001$ ). 10 diabetic patients treated with Metformin (7.6%) had a vitamin B12 deficiency (levels  $<200$  pg / ml) versus a single diabetic patient without Metformin (2%). 25 diabetic patients treated with Metformin (19.2%) had low dose of vitamin B12 (between 200 and 300 pg/ml) versus 3 diabetic patients without Metformin (6%).

Serum vitamin B12 levels were negatively associated with duration of Metformin use ( $p = 0.04$ ); while it was positively associated with hemoglobin ( $p = 0.032$ ).

In multivariate analysis, only hemoglobin (OR = 1.047; [1.002 to 1.095];  $p = 0.021$ ) and duration of Metformin use (OR = 0.887; [0.788 to 0.997];  $p = 0.045$ ) had a significant association with serum vitamin B12 levels.

### CONCLUSION:

We confirm the decrease of the concentration of cobalamin in patients treated with Metformin. This is correlated with the duration of treatment and hemoglobin; without clinical repercussion.

For this reason, we need to establish recommendations for the screening and treatment.

## مطى

### مقدمة:

الميتقو رمين هو العلاج الطبي الأولي لمضاد السكري من النوع 2 ؛ لإزالة أعراض انخفاض مستوى الفيتامين B12 في الإلزام عندنا لمرضى الذين تم تعالجهم بهد للمدة .

البحث الحالي يهدف إلى تحديد الفيتامين B12 عندنا لمرضى السكري من النوع 2 مع الجبيلهم يتقو رمين مع مجموعة علاش هود، وأيضا العلاقة بين الفيتامين في الدم والجرعة ، مدة أو الهم يتقو رمين ومعهم ختلف المعطيات السريرية والإستقلالية.

### مواد أسد اليب:

يتعلق الأمر برصد أسد فقط يجرى ريت عندنا لمرضى السكري من النوع 2، 130 مريض مع الجبيلهم يتقو رمين و 50 مريض بدون يتقو رمين (مجموعة علاش هود)

### نتائج:

متوسط المعالجهم يتقو رمين هو  $4.37 \pm 3.46$  نوك، أما الجرعة المتوسطة فكانت هي  $419,81 \pm 2353$  مع /يوم. الهم مرضى الذين يعانون من الجبيلهم يتقو رمين يميلون إلى انخفاض مستوى الفيتامين B12 في الدم مقارنة مع مجموعة علاش هود ( $427.93 \text{ pg/ml}$  مقابل  $570.2 \text{ pg/ml}$  ،  $P=0.001$ )

10 مرضى السكري مع الجبيلهم يتقو رمين ( $7.6\%$ ) يعانون من انخفاض مستوى الفيتامين B12 في الدم ( $200 \text{ pg/ml}$  مقابل  $300 \text{ pg/ml}$ ) مريض سكري واحد من يتقو رمين ( $2\%$ ).

25 مريض سكري مع الجبيلهم يتقو رمين ( $19.2\%$ ) يعانون من انخفاض مستوى الفيتامين B12 (معدلات بين 200 و 300  $\text{pg/ml}$ ) مقابل 3 مرضى سكري بدون يتقو رمين ( $6\%$ ).

هناك علاقة قسدا بالاعتماد على الهم مرضى الذين يعانون من انخفاض مستوى الفيتامين B12 في الدم ومدى العلاج يتقو رمين ( $P=0.04$ )، في حين أن العلاقة بين الهم مرضى الذين يعانون من انخفاض مستوى الفيتامين B12 في الدم وبينهم ( $P=0.032$ )

التي تحل في متعلمت غيرت وحلها هم يموغلو بين ( $OR = 1.047$ ؛  $[1,095 \text{ } 1,002]$ ؛  $P = 0.021$ ) ومدى المعالجهم يتقو رمين ( $OR = 0.887$ ؛  $[0,997 \text{ } 0,788]$ ؛  $P = 0.045$ ) يميلون إلى انخفاض مستوى الفيتامين B12.

### الخلاصة:

نؤكد على أن حفظ تفرک يلكو بلامين عندالم رضىالذين تمتع الجبلهم يتقو رمين، وعلى وجود علاقة ذو لالة إهداء ية بين معد ألفيتلمين B12 من جهة ومدة اللاللم يتقو رولينهم يوجدو بين من جهة خرى؛ بدون تدايعات سدريولها هذا نالاحاجة لتويدت تصفى الفصى واللاج.

# BIBLIOGRAPHIE

- 1-American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 2014; 32 (1suppl): S62-6
- 2-World Health Organization. WHO/IDF report of consultation, Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate. Genève:s.n, 2006.
- 3- Tazi AM,abir-khalil S,chaouki N,et al.(2003) prevalence of the main cardiovascular risk factors in Morocco :results of a National survey ,2000.J Hypertens 21:897-903.
- 4-UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group.Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). Lancet 1998;352:854-65
- 5-Jager J, Kooy A, Lehert P, Wulffele MG, van der Kolk J, Bets D, et al. Long term treatment with metformin in patients with type 2 diabetes and risk of vitamin B-12 deficiency: randomised placebo controlled trial. BMJ 2010;340:c2181
- 6-Reinstatler L, Qi YP, Williamson RS, Garn JV, Oakley Jr GP. Association of biochemical B12 deficiency with metformin therapy and vitamin B12 supplements: the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2006. Diabetes Care 2012;35:327-33
- 7-Wile DJ, Toth C. Association of metformin, elevated homocysteine, and methylmalonic acid levels and clinically worsened diabetic peripheral neuropathy. Diabetes Care 2010;33:156-61.
- 8-Gilligan MA. Metformin and vitamin B12 deficiency. Arch Intern Med 2002;162:484-5
- 9-Andre`s E, Noel E, Goichot B. Metformin-associated vitamin B12 deficiency. Arch Intern Med 2002;162:2251-2.
- 10- Liu KW, Dai LK, Jean W. Metformin-related vitamin B12 deficiency. Age Ageing 2006;35:200-1.



- 11-Bell DS. Metformin-induced vitamin B12 deficiency presenting as a peripheral neuropathy. *South Med J* 2010;103:265-7.
- 12-Zittoun J. Anémie macrocytaire carentielle .EMC, Hématologie.13.001-A-2002.11p
- 13-Gueant & Namour, 2003; Genetic determinants of folate and vitamin B12 metabolism: a common pathway in neural tube defect and Down syndrome?
- 14-Andrès E, Affenberger S, Vinzio S , Noel E , Kaltenbach G , Schlienger J-L . Carences en vitamine B12 chez l'adulte : étiologies, manifestations cliniques et traitement. *La revue de médecine interne* 26 (2005) 938-946
- 15-ZITTOUN J. Anémies macrocytaires carentielle. EMC 13-001-A-10, 2002.
- 16-Russell-Jones GJ, Alpers DH (1999) Vitamin B12 transporters. *Pharmaceutical biotechnology* 12: 493-520
- 17-Nicolas JP, Gueant JL (1994) [Absorption, distribution and excretion of vitamin B12]. *Annales de gastroenterologie et d'hepatologie* 30: 270-276, 281; discussion 281-272
- 18-Gueant JL, Gerard A, Monin B, Champigneulle B, Gerard H, Nicolas JP (1988) Radioautographic localisation of iodinated human intrinsic factor in the guinea pig ileum using electron microscopy. *Gut* 29: 1370-1378
- 19-Seetharam B, Bose S, Li N (1999) Cellular import of cobalamin (Vitamin B-12). *The Journal of nutrition* 129: 1761-1764
- 20-Jiang W, Nakayama Y, Sequeira JM, Quadros EV (2013) Mapping the functional domains of TCbIR/CD320, the receptor for cellular uptake of transcobalamin-bound cobalamin. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*

- 21-Lildballe DL, Mutti E, Birn H, Nexo E (2012) Maximal load of the vitamin B12 transport system: a study on mice treated for four weeks with high-dose vitamin B12 or cobinamide. PloS one 7: e46657
- 22-Kapadia CR (1995) Vitamin B12 in health and disease: part I--inherited disorders of function, absorption, and transport. The Gastroenterologist 3: 329-344
- 23-Yamanishi M, Vlasie M, Banerjee R (2005) Adenosyltransferase: an enzyme and an escort for coenzyme B12? Trends in biochemical sciences 30: 304-308
- 24- Howlett HC, Bailey CJ. Discovery of metformin. In: Bailey CJ, Campbell IW, Chan JCN, et al, editors. Metformin: the gold standard. Chichester:John Wiley & Sons Ltd; 2007:11-6
- 25- Diabetes & Metabolism 37 (2011) 90-96 Review Metformin and digestive disorders M. Bouchoucha a, B. Uzzan b, R. Cohen
26. Hundal RS, Inzucchi SE., Metformin. New understandings, new uses. Drugs 2003;63:1879-94.
27. Robert F, Fendri S, Hary L, Lacroix C, Andrejak M, Lalau JD. Kinetics of plasma and erythrocyte metformin after acute administration in healthy subjects. Diabetes Metab 2003;29:279-83.
- 28-.Bouchoucha a, B. Uzzan b, R. Cohenc ; Metformin and digestive disorders, Service de gastroentérologie, hôpital Avicenne, AP-HP, université Paris-V René-Descartes ;Service de médecine interne et d'endocrinologie-nutrition, online 13 January 2011
- 29-[http://www.vidal.fr/Medicament/metformine\\_biogaran-1771-pharmacocinetique.htm](http://www.vidal.fr/Medicament/metformine_biogaran-1771-pharmacocinetique.htm)

- 30-Sambol NC, Chiang J, O'Conner M, Liu CY, Lin ET, Goodman AM, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of metformin in healthy subjects and patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Pharmacol* 1996;36:1012-21.
- 31-Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR. Metformin: an update. *Ann Intern Med*. 2002 Jul 2;137(1):25-33
- 32-Bailey CJ, Wilcock C, Scarpello JH. Metformin and the intestine. *Diabetologia* 2008; 51: 1552-1553.
- 33- *Diabetologia*. 2011 Feb;54(2):219-22. New aspects of an old drug: metformin as a glucagon-like peptide 1 (GLP-1) enhancer and sensitiser. Cho YM<sup>1</sup>, Kieffer TJ.
- 34- Migoya EM, Bergeron R, Miller JL, Snyder RN, Tanen M, Hilliard D, Weiss B, Larson P, Gutierrez M, Jiang G, Liu F, Pryor KA, Yao J, Zhu L, Holst JJ, Deacon C, Herman G, Thornberry N, Amatruda J, Williams-Herman D, Wagner JA, SinhaRoy R; Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors administered in combination with metformin result in an additive increase in the plasma concentration of active GLP-1.. *Clin Pharmacol Ther*. 2010 Dec;88(6):801-8
- 35- Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:774-85.
- 36- Ievri KM et al. Metformin as treatment for overweight and obese adults: a systematic review. *Ann Fam Med*, 2005; 3: 457-461
- 37- I.W. Campbell, H.C. Howlett, Worldwide experience of metformin as an effective glucose-lowering agent: a meta-analysis, *Diabetes Metab. Rev.* 11 (Suppl. 1) (1995) S57-S62.

- 38 - M.G. Wulffele, A. Kooy, D. de Zeeuw, C.D. Stehouwer, R.T. Gansevoort, The effect of metformin on blood pressure, plasma cholesterol and triglycerides in type 2 diabetes mellitus: a systematic review, *J. Intern. Med.* 256 (2004) 1–14.
39. J.P. Despre's, Potential contribution of metformin to the management of cardiovascular disease risk in patients with abdominal obesity, the metabolic syndrome and type 2 diabetes, *Diabetes Metab.* 29 (2003) 6S53–6S61.
- 40- Foretz M, Leclerc J, Hebrard S, Viollet B. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through an AMPK-independent mechanism. *Diabetes* 2008;57(Suppl1):A423
- 41- J.C.N. Chan, B. Tomlinson, J.A.J.H. Critchley, C.S. Cockram, R.J. Walden, Metabolic and hemodynamic effects of metformin and glibenclamide in normotensive NIDDM patients, *Diabetes Care* 16 (1993) 1035–1038.
- 42- P.J. Grant, The effects of high- and medium-dose metformin therapy on cardiovascular risk factors in patients with type II diabetes, *Diabetes Care* 19 (1996) 64–66.
- 43- De Jager J, Kooy A, Lehert P, et al: Effects of short-term treatment with metformin on markers of endothelial function and inflammatory activity in type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled trial. *J Intern Med* 2004, 256:1–14.
- 44- Standeven KF, Ariens RA, Whitaker P, et al: The effect of dimethylbiguanide on thrombin activity, FXIII activation, fibrin polymerization, and fibrin clot formation. *Diabetes* 2002, 51:189–197.
- 45- N.F. Wiernsperger, E. Bouskela, Microcirculation in insulin resistance and diabetes: more than just a complication, *Diabetes Metab.* 29 (6) (2003) S77–S87.

- 46- Amador-Licona N, Guízar-Mendoza J, Vargas E, Sánchez-Camargo G, Zamora-Mata L : The short-term effect of a switch from glibenclamide to metformin on blood pressure and microalbuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res* 31: 571– 575, 2000
- 47- Bo S, Benso A, Durazzo M, Ghigo E. Does use of metformin protect against cancer in type 2 diabetes mellitus? *J Endocrinol Invest* 2012;35:231-5.
- 48- J.-F. Blicklé Service de médecine interne, diabète et maladies métaboliques, Clinique médicale B, Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. Le parcours accidenté de la metformine : de l'ombre à la lumière
- 49- Evans J, Donnelly L, Emslie A, et al: Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* 2005, 330(7503):1304–1305
- 50- Lalau JD. Lactic acidosis induced by metformin: incidence, management and prevention. *Drug Saf* 2010;33:727-40
- 51- Rosacea-like facial rash related to metformin administration in a young woman. Mumoli L, Gambardella A, Labate A, Succurro E, De Sarro G, Arturi F, Gallelli L. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2014 Feb 8;15:3
- 52- Hyperhomocysteinemia, Deep Vein Thrombosis and Vitamin B12 Deficiency in a Metformin-treated Diabetic Patient Hsuan-Yu Lin, Chih-Yuan Chung, Cheng-Shyong Chang, Ming-Lun Wang, Jen-Shiou Lin, Ming-Ching Shen *J Formos Med Assoc* 2007 • Vol 106 • No 9
- 53- José María Calvo Romero \*, José Manuel Ramiro Lozano Servicio de Medicina Interna, Hospital Ciudad de Coria, Coria, Cáceres; Vitamin B12 in type 2 diabetic patients treated with metformin, Spain *ENDOCRINOLOGÍA Y NUTRICIÓN* 2012;59(8):487---490

- 54- Pflipsen MC, Oh RC, Saguil A, Seehusen DA, Topolski R; The prevalence of vitamin B(12) deficiency in patients with type 2 diabetes: a cross-sectional study. *J Am Board Fam Med.* 2009; 22(5):528-34
- 55- Monique Nervo, Adriano Lubini, Fabiana Viegas Raimundo, Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber, Carine Leite, Leonardo Moura Fischer, Tania Weber Furlanetto ; Vitamin B12 in metformin-treated diabetic patients: a cross-sectional study in Brazil .*Rev Assoc Med Bras* 2011; 57(1):46-49
- 56- G. Gastaldi, T. Mura, A. Sultan, C. Piot, J.-P. Cristol, E. Renard, F. Galtier ; Déficit en vitamine B12 et metformine : quelles répercussions cliniques ? A. Avignon1 CHRU, Montpellier © 2011. Elsevier Masson
- 57- Wile DJ, Toth C.; Association of metformin, elevated homocysteine, and methylmalonic acid levels and clinically worsened diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes Care* 2010;33:156-61.
- 58- Adams JF, Clark JS, Ireland JT, Kesson CM, Watson WS. ; Malabsorption of vitamin B12 and intrinsic factor secretion during biguanide therapy. *Diabetologia* 1983;24:16-8.
- 59- Bauman WA, Shaw S, Jayatilleke E, Spungen AM, Herbert V. Increased intake of calcium reverses vitamin B12 malabsorption induced by metformin. *Diabetes Care* 2000;23:1227-31.
- 60- Sahin M, Tutuncu NB, Ertugrul D, Tanaci N, Guvener ND. Effects of metformin or rosiglitazone on serum concentrations of homocysteine, folate, and vitamin B12 in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complicat* 2007;21:118-23.
- 61- Callaghan TS, Hadden DR, Tomkin GH. Megaloblastic anaemia due to vitamin B12 malabsorption associated with long-term metformin treatment. *Br Med J* 1980;280:1214-5.

- 62- Filioussi K, Bonovas S, Katsaros T. Should we screen diabetic patients using biguanides for megaloblastic anaemia. *Aust Fam Physician* 2003;32:383-4.
- 63- Moon Ley Tung , Lip Kun Tan; Long term use of metformin leading to vitamin B 12 deficiency, National University Hospital, Haematology-Oncology, 1E Kent Ridge Road, NUHS Tower Block, Level 7, Singapore 119228, Singapore *diabetes research and clinical practice* 104(2014) e75 – e76
- 64- Solomon LR. Disorders of cobalamin (vitamin B12) metabolism: emerging concepts in pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood Rev.* 2007;21:113---30.
- 65- Solomon LR. Diabetes as a cause of clinically significant functional cobalamin deficiency. *Diabetes Care.* 2011;34: 1077---80.
- 66- Bell DS. Nondiabetic neuropathy in a patient with diabetes. *Endocr Pract* 1995;1:393-4.
- 67- Ting RZ, Szeto CC, Chan MH, Ma KK, Chow KM. Risk factors of vitamin B(12) deficiency in patients receiving metformin. *Arch Internal Med.* 2006;166:1975.
- 68- Wulffélé MG, Kooy A, Lehert P, et al. Effects of short-term treatment with metformin on serum concentrations of homocysteine, folate and vitamin B12 in type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled trial. *J Intern Med* 2003;254(5):455-63.
- 69- C. Gauthier, A. Radu, C. Gonfroy, M. Rotariu, L. Saatdjian, V. Bernard, C. Boitard, E. Larger ; *Diabetes Metab* 2011, 37, A24-A35 Baisse de la concentration de cobalamine chez les patients diabétiques de type 2 traités par metformine, Hôtel Dieu de Paris, APHP et Université René Descartes, Faculté de Médecine, Paris. 2011. Elsevier Masson
- 70- Schrier SL. Diagnosis and treatment of vitamin B12 and folic acid deficiency. Available on 2012 UpToDate, Inc

- 71- Elias E. Mazokopakis a, Ioannis K. Starakis; Recommendations for diagnosis and management of metformin-induced vitamin B12 (Cbl) deficiency, diabetes research and clinical practice 97(2012) 359 – 367
- 72- Tomkin GH, Hadden DR, Weaver JA, Montgomery DA. Vitamin-B12 status of patients on long-term metformin therapy. Br Med J 1971;2:685-7.
- 73- Vogel T, Dali-Youcef N, Kaltenbach G, Andrès E. Homocysteine, vitamin B12, folate and cognitive functions: a systematic and critical review of the literature. Int J Clin Pract. 2009 Jul;63(7):1061-7
- 74- Naurath HJ, Joosten E, Riezler R, Stabler SP, Allen RH, Lindenbaum J. Effects of vitamin B12, folate, and vitamin B6 supplements in elderly people with normal serum vitamin concentrations. Lancet 1995;346:85-9.
- 75- Lindenbaum J, Savage DG, Stabler SP, Allen RH. Diagnosis of cobalamin deficiency: II. Relative sensitivities of serum cobalamin, methylmalonic acid, and total homocysteine concentrations. Am J Hematol 1990;34:99-107.
- 76- J-C Guillard, I Aimone-Gastin ; Vitamine B12 (cobalamine) , La revue du praticien Vol 63 Octobre 2013 ;1085-1090
- 77- N.Henoun; Vitamine B12 chez l'adulte : du métabolisme aux carences, Annales d'Endocrinologie Vol 64, N° 5-C1 - novembre 2003 pp. 376-382