

RÉPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE

Union - Discipline - Travail

MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE
CHARGE DE L'ENSEIGNEMENT SECONDAIRE ET SUPÉRIEUR
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET DE LA CULTURE



Année 1989-1990

N°

FACULTÉ DE PHARMACIE

THESE

Présentée en vue de l'obtention du

DIPLOME D'ÉTAT DE
DOCTEUR EN PHARMACIE

par

AKÉ Michèle Dominique
née le 02 Septembre 1966

**DOSAGE DE L'ALPHA TOCOPHÉROL
SÉRIQUE CHEZ L'ENFANT
IVOIRIEN AGÉ DE 12 A 48 MOIS
VALEUR DE RÉFÉRENCE -
RELATION AVEC L'ÉTAT
NUTRITIONNEL**

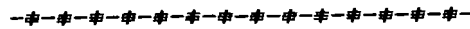
Soutenue publiquement le 4 Décembre 1990

COMPOSITION DU JURY :

Président : Professeur YAPO ABBÉ Étienne
Assesseurs : Professeur Agrégé MALAN KLA Anglade (Directeur de thèse)
Professeur DARRACQ René (Co-Directeur de thèse)
Docteur TEBI Ambroise

CS-02586

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DE PHARMACIE



HONORARIAT : Directeurs Honoraires : Professeurs FOURASTE Isabelle
RAMBAUD André

ADMINISTRATION : Doyen, Professeur YAPO Abbé Etienne
1er Assesseur, Professeur Agrégé KONE Moussa
2e Assesseur, Professeur Agrégé OUATTARA Lassina
Secrétaire Principal, Monsieur ZON Emile.

PERSONNEL ENSEIGNANT :

MM. BAMBA Moriféré	Professeur
DIAINE Charles	Professeur
MARCY René	Professeur
YAPO Abbé Etienne	Professeur
ATINDEHOU Eugène	Maître de Conférences Agrégé
COMOE Léopold	Maître de Conférences Agrégé
DANO Djédjé S.	Maître de Conférences Agrégé
Mme KONE BAMBA D.	Maître de Conférences Agrégé
MM. KONE Moussa	Maître de Conférences Agrégé
LOUKOU YAO G.	Maître de Conférences Agrégé
MALAN Kla A.	Maître de Conférences Agrégé
OUATTARA Lassina	Maître de Conférences Agrégé
Mme BLAVY Gisèle	Maître Assistant, Chargé de cours
MM. FOUNGBE Siéko	Maître Assistant, Chargé de cours
YOLOU Séri	Maître Assistant, Chargé de cours
KOUADIO Luc	Maître Assistant, Chargé de cours
MONNET Dagui	Maître Assistant, Chargé de cours
MAGBI Alain	Maître Assistant, Chargé de cours
M. KABLAN Brou J.	Assistant Docteur d'Etat, Chargé de cours
MM. MACIA Régis	Lecteur - Chercheur
FABO Tadjila G.	Professeur Licencié d'Anglais
Mlle HEMA Chepa	Professeur Licencié d'Anglais

LISTE DES CHERCHEURS :

<i>atherine</i>	<i>Attachée de Recherche</i>
<i>Sabali</i>	<i>Attaché de Recherche</i>
<i>déou</i>	<i>Attaché de Recherche</i>
<i>Meless</i>	<i>Attaché de Recherche</i>
—	

CULTES

COURS

LABORATOIRES

général (Sciences)
dentaire (Médecine)
chirurgie (Médecine)
de Pharmacie (Sciences)

Végétale (Sciences)
de Pharmacie (Sciences)
de Chimie (Sciences)
de Biologie (Sciences)
Médicale (Médecine)

**ENSEIGNANTS D'AUTRES FACULTES
APPORTANT LEURS CONCOURS
A LA FACULTE DE PHARMACIE**

MAITRES-ASSISTANTS :

<i>MM.</i>	<i>ASSA Mathieu</i>	<i>Mathématiques (Sciences)</i>
	<i>KODIA Ahimon A.</i>	<i>Physique (Sciences)</i>
	<i>GNANGBE Félix</i>	<i>Génétique (Sciences)</i>
	<i>SAKO Aboubacar</i>	<i>Physique (Sciences)</i>
	<i>OCHOU Abé</i>	<i>Physique (Sciences)</i>
	<i>YAPO Claude</i>	<i>Mathématiques (Sciences)</i>

ASSISTANTS :

<i>M.</i>	<i>DJESSOU Prosper</i>	<i>Médecine</i>
-----------	------------------------	-----------------

VACATAIRES :

<i>M.</i>	<i>AKRE Beugré</i>	<i>Pharmacologie</i>
<i>Mlle</i>	<i>DANHO Aoutcha J.</i>	<i>Galénique</i>
	<i>DARRACQ René</i>	<i>Toxicologie</i>
	<i>DASSE Henri</i>	<i>Pharmacologie</i>
	<i>DEMPAH Ano J.</i>	<i>Parasitologie Zoologie</i>
	<i>TAPE Legrouan</i>	<i>Pharmacie Galénique</i>

ENSEIGNANTS EN MISSION

- M. BA DOUDOU *Professeur de Chimie Analytique
Faculté de Médecine et de Pharmacie
de DAKAR*
- Mme FOURASTE Isabelle *Professeur de Pharmacognosie,
Faculté de Médecine et de Pharmacie
de TOULOUSE*
- MM. LO Issa *Professeur de Pharmacie Galénique,
Faculté de Pharmacie de
DAKAR*
- TOURE Pierre *Professeur de Pharmacie Galénique
Faculté de Pharmacie de
CAEN*
- RAMBAUD André *Professeur d'Hydrologie,
Faculté de Pharmacie de
MONTPELLIER*
- BADIANE Mamadou *Professeur de Chimie Thérapeutique,
Faculté de Pharmacie et de Médecine
de DAKAR*
- MAX Henri *Professeur de Cryptogamie,
Faculté de Pharmacie de
TOULOUSE*

**ANCIENS ENSEIGNANTS PERMANENTS
DE LA FACULTE DE PHARMACIE**

PROFESSEURS :

<i>Mme FOURASTE Isabelle</i>	<i>(Directeur Honoraire) (1981-1984)</i>
<i>MM. DECLUME Christian</i>	<i>(Professeur Honoraire) (1979-1985)</i>
<i>RAMBAUD André</i>	<i>(Directeur Honoraire) (1979-1981)</i>

MAITRES-ASSISTANTS :

<i>M. Dempah Ano J.</i>	<i>(1980-1985)</i>
<i>Mme LONSDORFER Annick</i>	<i>(1978-1989)</i>
<i>M. PELISSIER Yves</i>	<i>(1985-1989)</i>
<i>Mme RAMBAUD Joelle</i>	<i>(1978-1980)</i>
<i>Mme RICHARD Anne</i>	<i>(1978-1980)</i>
<i>M. TRAORE Moussa</i>	<i>(1978-1988)</i>
<i>Mme ZIPCY Eliane</i>	<i>(1978-1980)</i>

ASSISTANTS :

<i>MM. ADOU Essoh</i>	<i>(1979-1980)</i>
<i>ASSAMOI Alfred</i>	<i>(1985-1988)</i>
<i>DASSE Henri</i>	<i>(1982-1986)</i>
<i>Mlle DANHO Aoutcha J.</i>	<i>(1982-1988)</i>
<i>MM. DAUBARD Alain (Chercheur Lecteur)</i>	<i>(1979-1980)</i>
<i>DIALLO Ousmane</i>	<i>(1985-1986)</i>
<i>Mlle HAXAIRE Claudie</i>	<i>(1979-1983)</i>
<i>MM. KONIN Bouaffon</i>	<i>(1983-1988)</i>
<i>MENSAH Lassey J.</i>	<i>(1982-1988)</i>
<i>OZOUKOU Frédéric</i>	<i>(1981-1986)</i>
<i>TAPE Legrouan</i>	<i>(1981-1983)</i>
<i>YAO Koffi</i>	<i>(1985-1988)</i>

JE DEDIE CETTE THESE...

A Son Excellence

Monsieur Félix HOUPHOUET-BOIGNY

Président de la République,

*en témoignage de ma filiale et affectueuse reconnaissance pour toute votre
paternelle sollicitude à l'égard de ma famille.*

A ma MERE, A mon PERE,

Cette thèse ne peut récompenser la grande affection et les délicates attentions dont vous m'avez toujours entourée, ni tous les sacrifices que vous avez consentis pour m'aider à réussir dans mes études, ni tout ce que je vous dois et que je ne puis exprimer.

Elle est seulement le témoignage de ma filiale et affectueuse gratitude.

Puisse l'avenir me fournir l'occasion de vous la manifester encore d'avantage.

A mes chères soeurs EVELYNE, ANNETTE et JEANINE,

A mon très cher frère JEAN-PHILIPPE,

*Votre benjamine, inspirée par votre exemple, vous dédie cette nouvelle thèse dans la famille,
avec toute ma profonde affection et ma reconnaissance infinie pour tous vos encouragements.*

A mon beau-frère NARCISSE HERVE,

ma soeur BERTHE,

ma grand-mère MARGARET BONFUL,

ma tante GLADYS, pour tes conseils durant toutes ces années d'études universitaires,

mes oncles et mes tantes,

mes cousins et mes cousines,

pour vos aimables attentions,

avec mes affectueuses pensées.

A mes grand-pères : Jean AKE

Isaac M. BONFUL

A ma grand-mère : Victorine AFRAN

A ma tante : Léonore E. AGOH

In mémoriam.

A ma tante NOELLE KACOU,

Monsieur l'Ambassadeur et Madame SOULEYMANE SAKO,

Monsieur le GOUVERNEUR GUY NAIRAY

Monsieur l'Ambassadeur et Madame GEORGES OUEGNIN

qui savent la place qu'ils occupent dans notre famille.

A Monsieur et Madame HAUHOUOT ASSEYPO,

avec mon affectueux souvenir.

A mon amie et "soeur jumelle" MARIE-LAURE,

A mes amis ANNE, PULCHERIE, HONORE,

en témoignage de mon affection,

puisse notre amitié, née au cours de ces années d'études, ne jamais

se ternir. Qu'elle dure et demeure le fondement vivace de notre

solidarité effective dans la vie active.

A tous mes camarades de la Faculté de Pharmacie d'ABIDJAN,

A tous mes amis, en particulier

A OLIVIER KOUTOUA

pour sa précieuse contribution à cette étude,

mes sentiments cordiaux.

SINCERES REMERCIEMENTS...

*A tous mes Maîtres de la Faculté de Pharmacie,
pour tout ce qu'ils m'ont appris et pour leur contribution à ma
formation.*

*A Monsieur GABRIEL OLLO,
Monsieur et Madame JOSEPH AKPO,
pour tous leurs encouragements, leur disponibilité et leur accueil
bienveillant et attentionné.*

*A Monsieur KONAN KOUAKOU
Madame VICTOIRE AKA
Madame ASTOU TIMITE
pour leur aimable assistance.*

*Au Professeur N. COULIBALY, Directeur de l'Institut National de la Santé
Publique*

A Madame ROY et Monsieur HOUDIER du Laboratoire de Nutrition.

*Au Personnel du Service de Nutrition et de la P.M.I. de l'Institut National
de la Santé Publique.*

pour toute l'aide qu'ils m'ont apportée,

Encore Merci.

*A NOS EMINENTS MAITRES QUI ONT ACCEPTE DE JUGER CE TRAVAIL,
NOUS SOLLICITONS VOTRE INDULGENCE.*

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE JURY,

Monsieur le PROFESSEUR ETIENNE ABBE YAPO,

PROFESSEUR TITULAIRE DE BIOCHIMIE,

CHEF DU DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE DE LA FACULTE DE PHARMACIE

BIOLOGISTE DES HOPITAUX, CHEF DU SERVICE DE BIOCHIMIE

CLINIQUE DE L'INSTITUT PASTEUR DE COCODY,

DOYEN DE LA FACULTE DE PHARMACIE D'ABIDJAN,

Nous avons toujours apprécié vos grandes qualités humaines, votre entière disponibilité à l'égard de vos étudiants et plus particulièrement à notre égard, malgré vos nombreuses responsabilités.

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites en présidant le jury de cette thèse.

Puisse ce travail être le témoignage de notre profonde reconnaissance.

A NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE

*Monsieur le PROFESSEUR ANGLADE MALAN KLA,
MAITRE DE CONFERENCES AGREGE DE CHIMIE ANALYTIQUE,
RESPONSABLE DU LABORATOIRE DE CONTROLE DE LA CIPHARM,
PHARMACIEN ANALYSTE AU LABORATOIRE DE NUTRITION DE
L'INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE PUBLIQUE.*

*Vous faites partie de nos "jeunes aînés" dont la Faculté de Pharmacie
peut légitimement s'enorgueillir.*

*En dépit des nombreuses sollicitations dont vous êtes l'objet, vous
avez bien voulu accepter de nous confier ce travail et de nous guider
dans notre étude.*

*Tout au long de nos rencontres, vous avez forcé notre admiration
par vos grandes qualités humaines, par la simplicité et la chaleur de
votre accueil, votre extrême courtoisie et votre disponibilité de tout
instant. Pour la rigueur de votre jugement, pour les longues heures
que vous avez personnellement consacrées à cette étude,
nous vous disons tout simplement merci.*

*Puisse ce travail, qui est également le vôtre, exprimer toute notre
gratitude et notre profond respect.*

A NOTRE MAITRE ET CO-DIRECTEUR DE THESE

Monsieur le PROFESSEUR RENE DARRACQ,

PROFESSEUR DE TOXICOLOGIE,

*PHARMACIEN CHEF, CHEF DU LABORATOIRE DE NUTRITION DE L'INSTITUT
NATIONAL DE SANTE PUBLIQUE,*

*Toujours aimable et accueillant, vous n'avez pas hésité à co-diriger ce travail,
comme vous n'avez jamais hésité à résoudre les différentes difficultés
que nous avons rencontrées.*

*Pour toute votre aide et pour tous vos efforts, nous disons merci et vous
assurons de notre reconnaissance et de notre profonde estime.*

A NOTRE MAITRE ET JUGE

Monsieur le DOCTEUR AMBROISE TEBI,

DOCTEUR EN MEDECINE, DIPLOME DE SANTE PUBLIQUE,

*DOCTEUR ès SCIENCES, NUTRITION et ALIMENTATION, de la FACULTE
DE SCIENCES DE NANCY,*

*DIPLOME DE NUTRITION et de DIETETIQUE THERAPEUTIQUE de la
FACULTE DE MEDECINE DE NANCY I*

*MEDECIN CHEF DE SERVICE DE NUTRITION ET DE DIABETOLOGIE
A L'INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE PUBLIQUE.*

*Vos précieux conseils et votre constante disponibilité ont contribué
à la réalisation de ce travail.*

*Vous avez bien voulu participer au jury de cette thèse. Puisse-t-elle
être une modeste contribution à l'oeuvre que vous accomplissez en
faveur de la Santé Publique.*

SOMMAIRE

	Pages
<u>INTRODUCTION</u> :	4
 <u>CHAPITRE PREMIER : GENERALITES SUR LA VITAMINE E :</u>	
 <u>I. - Biogénèse et structure</u> :	 10
1.1. - <i>Biogénèse de la vitamine E</i> :	10
1.2. - <i>Structure de l'α tocophérol et substances apparentées</i> :	11
 <u>II. - Sources, métabolisme et unités de la vitamine E</u> :	 13
11.1. - <i>Sources de la vitamine E</i> :	14
11.2. - <i>Synthèse</i> :	16
11.3. - <i>Métabolisme</i> :	16
11.4. - <i>Unités de mesure de la vitamine E</i> :	22
 <u>III. - Propriétés et fonctions</u> :	 24
111.1. - <i>Isolement</i> :	24
111.2. - <i>Propriétés physico-chimiques</i> :	24
111.3. - <i>Fonctions et rôles physiologiques</i> :	25

IV. - <u>Intérêt nutritionnel et symptômes de carence</u> :	34
IV.1. - <i>Besoins</i> :	34
IV.2. - <i>Carences et pathologies observées</i> :	38
IV.3. - <i>Indications thérapeutiques de la vitamine E</i> :	44

CHAPITRE DEUXIEME : METHODES DE DOSAGE DE LA VITAMINE E :

I. - <u>Différentes méthodes</u> :	50
II. - <u>Sources d'erreur lors du dosage de la vitamine E</u> :	63

CHAPITRE TROISIEME : PARTIE EXPERIMENTALE

I. - <u>Matériel et méthode</u> :	66
I.1. - <i>Population étudiée</i> :	66
I.2. - <i>Prélèvement</i> :	71
I.3. - <i>Evaluation de la teneur en vitamine E dans les</i> <i>sérums humains</i> :	73
I.3.1. - <i>Matériel</i> :	73
I.3.2. - <i>Mode opératoire</i> :	79
I.3.3. - <i>Validation des conditions opératoires</i> :	82
I.3.4. - <i>Dosage des échantillons</i> :	88

<u>II - Résultats et Discussion</u> :	91
<u>CHAPITRE QUATRIEME : CONCLUSION</u> :	130
<u>BIBLIOGRAPHIE</u> :	135

INTRODUCTION

La santé est un état de bien-être à la fois physique, mental et social ne consistant pas uniquement en l'absence d'infirmités et de maladies .

Dans nos pays, où les taux de morbidité et de mortalité, notamment infantiles restent encore élevés, une alimentation saine et équilibrée aussi bien du point de vue quantitatif que qualitatif, conditionne bien souvent l'état de bonne santé de nos populations. En effet, celle-ci doit contenir des aliments variés recouvrant glucides, protides, lipides, éléments minéraux, eau, vitamines.... Une ration vitaminique convenable est particulièrement importante dans la nutrition infantile pour une croissance régulière et un développement normal.

Les vitamines peuvent être définies comme étant des substances organiques, présentes dans les aliments naturels, actives en très petite quantité et nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme.

Elles présentent des activités diverses : certaines sont connues comme hormones ou précurseurs d'hormones, d'autres comme anti-oxygènes, enfin d'autres constituent le groupement prosthétique de coenzymes.

Les vitamines nécessaires à l'homme ont été classées en deux groupes selon leur caractère de solubilité.

C'est ainsi que l'on distingue :

** Les vitamines hydrosolubles :*

- La vitamine C ;*
- Les vitamines du groupe B : la thiamine (B1), la riboflavine (B2), la pyridoxine (B6), la cyanocobalamine (B12), la biotine, la niacine, l'acide folique et l'acide panthoté-
nique.*

** Les vitamines liposolubles :*

- La vitamine A ou rétinol ;*
- la vitamine D ou calciférol ;*
- La vitamine E ou tocophérol ;*
- La vitamine K.*

Celles-ci sont solubles dans les solvants organiques et leur absorption intestinale nécessite généralement la présence de sels et d'acides biliaires.

C'est en 1922 qu'un facteur liposoluble fut montré capable de prévenir la mort du fœtus et l'atrophie testiculaire chez le rat soumis à des régimes artificiels, supplémentés en vitamines. En effet, seules les vitamines A, B, C, D étaient connues à cette époque. Isolé à partir de l'huile de germe de blé, ce facteur fut appelé vitamine E puis tocophérol du Grec "toco" : descendance, "phérein" : porter et "ol" : alcool. (15) (17)

C'est donc un facteur actif sur les fonctions de reproduction, favorisant la fécondité et retardant le vieillissement.

Mais ce n'est que de façon récente, que son "intérêt" dans la diététique humaine et la pathologie est apparu. En effet, la vitamine E est un agent anti-oxydant. Elle intervient dans la prévention de diverses affections telles que les dystrophies et certaines neuropathies. Les carences liées à la vitamine E s'avèrent particulièrement dangereuses chez l'enfant, surtout chez les prématurés et les nourrissons.

Le tocophérol à l'instar d'autres vitamines (A et C) et du fait de son rôle de protection, participe au développement et à la croissance de l'enfant.

Nous nous proposons au cours de ce travail d'effectuer des dosages afin de déterminer les teneurs sériques en vitamine E chez des enfants apparemment normo-nutris et malnutris recrutés au cours d'une enquête anthropométrique.

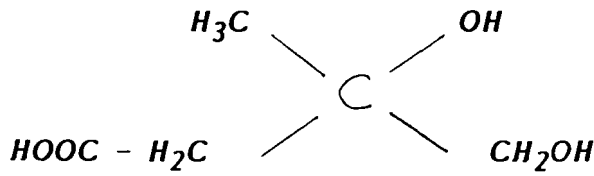
A partir des différents résultats, nous envisagerons les interprétations et la proposition de normes de référence pour les taux sériques de vitamine E chez les enfants sains de 12 à 48 mois de Côte d'Ivoire. Nous tenterons d'établir une corrélation entre malnutrition déterminée par des paramètres anthropométriques et les taux sériques de vitamine E.

CHAPITRE PREMIER : GENERALITES SUR LA VITAMINE E

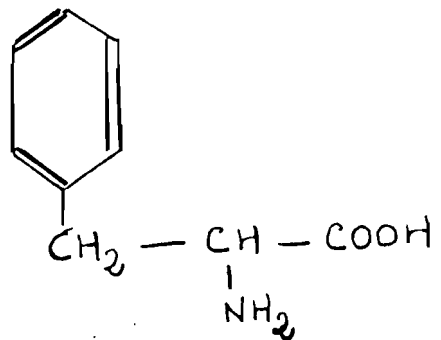
I - BIOGENESE ET STRUCTURE :

I.1. - Biogénèse de la vitamine E :

D'une manière générale, la majeure partie de la vitamine E qui est synthétisée dans les jeunes plantes est constituée d' α tocophérol alors que les autres tocophérols (β , δ etc...) prédominent dans les graines. Les différentes étapes de la biogénèse ne sont pas encore connues mais certains auteurs (6) pensent qu'il s'agirait d'un processus semblable à la synthèse des ubiquinones avec formation de la chaîne terpénoïde à partir de l'acide mévalonique



d'un noyau aromatique et de la phénylalanine.



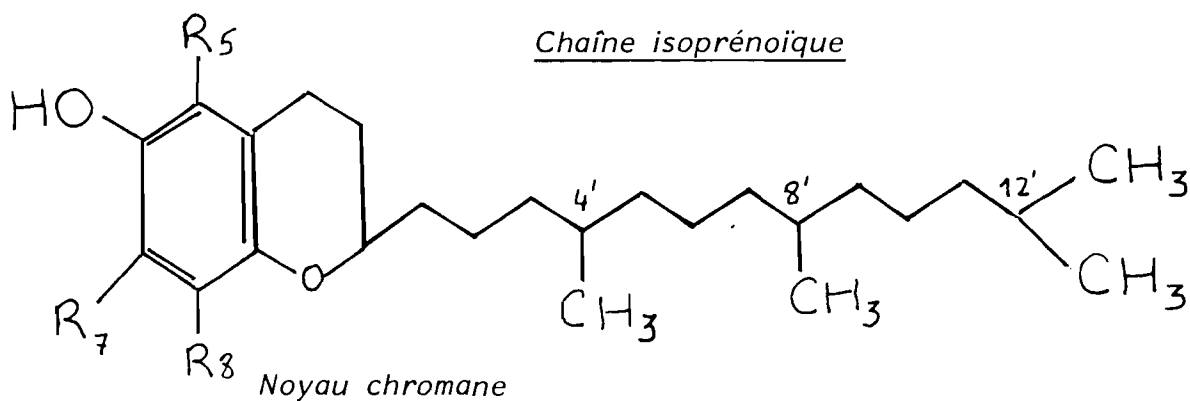
Etudions la structure de la vitamine E.

I.2. - Structure de l' α tocophérol et substances

apparentées : (6) (15) (19) (38)

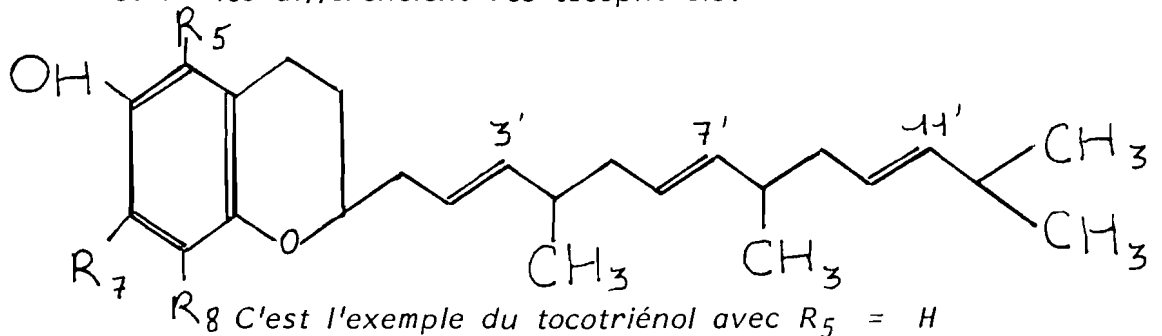
De formule $C_{29} H_{50} O_2$, de masse moléculaire 430,72, l' α tocophérol est la substance douée de la plus forte activité vitaminique E actuellement connue. Les autres tocophérols sont actifs à un degré moindre. Ces notions ont pu être mises en évidence grâce à la mesure de l'activité comparée par l'épreuve d'antistérilité du rat.

Le terme tocophérol désigne les "tocols" substitués en 5,7 et 8.



<u>Tocophérol</u>	<u>R₅</u>	<u>R₇</u>	<u>R₈</u>	<u>Activité Vitaminique Comparée</u> 100
* α	CH ₃	CH ₃	CH ₃	(Activité de référence)
* β	CH ₃	H	CH ₃	40
* γ	H	CH ₃	CH ₃	10
* δ	CH ₃	CH ₃	H	30
* ϵ	H	H	CH ₃	1
* ζ	H	CH ₃	H	3
* (non naturel)	CH ₃	H	H	0

D'autres substances dites "tocotriénols" naturels ont pu être également isolées. Elles ont une très faible activité vitaminique E. Du point de vue structural, trois doubles liaisons en position 3', 7' et 11' les différencient des tocophérols.



dont l'activité vitaminique est de 5 (mesurée dans les mêmes conditions).

Ainsi l'activité vitaminique des tocophérols paraît liée à l'hétérocycle chromanique ayant un groupement hydroxy (-OH) phénolique libre sur le carbone C_6 .

L'ouverture de l'hétérocycle ne fait pas disparaître l'activité si la structure (para) hydroquinone est conservée.

Cette activité dépend aussi :

- du nombre des substituants méthyl (-CH₃) du noyau les dérivés diméthylés et monométhylés sont moins actifs que le dérivé triméthylé (α tocophérol) ;

- de l'asymétrie moléculaire : les deux carbones asymétriques de la chaîne latérale ont la même structure spatiale que dans le phytol ; les isomères (+) et (-) ont ainsi pu être préparés. L'isomère (+) a une activité vitaminique sensiblement double de celle de l'isomère (-) et le racémique a une activité intermédiaire.
- de l'introduction de doubles liaisons ou de fonctions alcool (- OH) dans la chaîne isoprénoïque (exemple : tocotriénol) l'activité est amoindrie mais non supprimée. (38)

II - SOURCES, METABOLISME ET UNITES DE LA VITAMINE E :

La vitamine E, comme la plupart des substances organiques provient de sources exogènes, généralement alimentaires. De plus, une fois consommée par l'intermédiaire des aliments, elle est stockée à différents niveaux (essentiellement le foie et le tissu adipeux) parfois transformée et enfin éliminée de l'organisme humain.

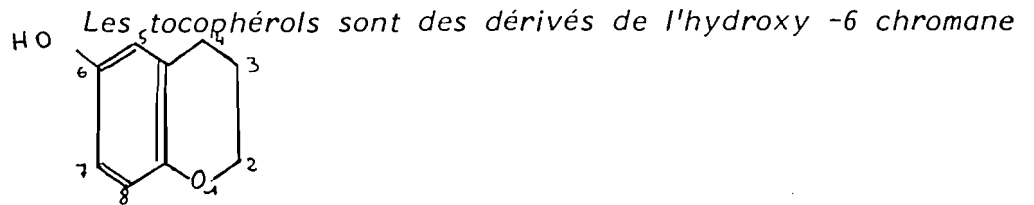
II.1. - Sources de la vitamine E : (6) (8) (15) (38)

Il s'agit d'une vitamine présente dans les céréales et surtout dans le germe comme nous l'indique le tableau I. Ainsi le taux d' tocophérol dans le germe de blé est de l'ordre de 14,5 mg pour 100 grammes de portion comestible. Elle est également retrouvée de manière prépondérante dans les huiles dont l'huile d'arachide ainsi que l'huile de palme qui en renferment une quantité élevée : respectivement 13 et 30 mg pour 100 g de substances comestibles. Certaines autres huiles sont également reconnues pour leur taux important en tocophérol. C'est le cas de l'huile de tournesol. L' tocophérol est également présent dans le soja, le persil, le beurre, les asperges, le chou, les carottes, etc... Le tableau I indique les teneurs en vitamine E de divers aliments (viandes, huiles, fruits, etc...). C'est la plus stable de toutes les vitamines liposolubles, elle résiste à la chaleur (cuisson) alors que le rancissement des graisses la détruit.

Tableau I : Teneur en vitamine E de divers aliments
(en mg/100 g de portion comestible)

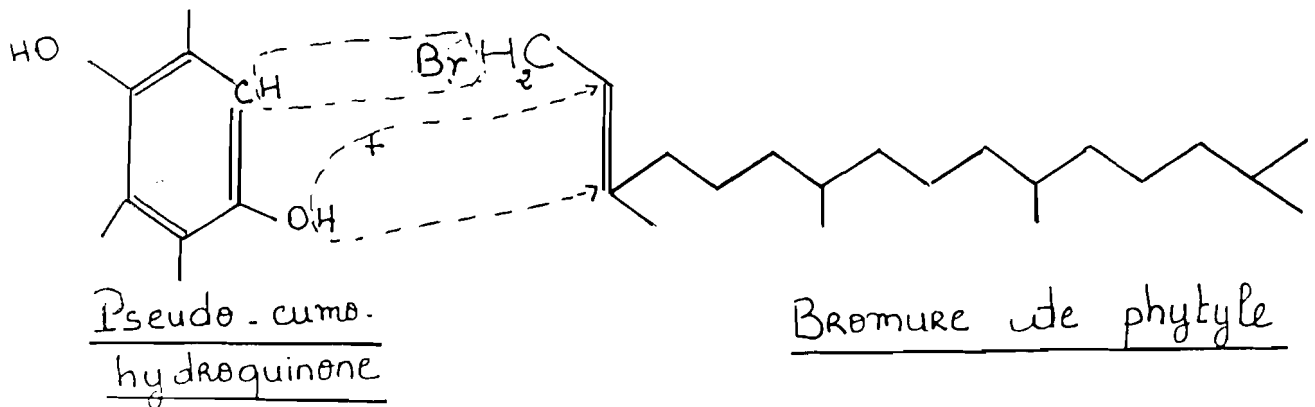
ALIMENTS	TENEUR EN VITAMINE E
<u>Aliments pauvres :</u>	
* Viande rouge	0,5 - 1,6
* Volaille	0,16 - 0,4
* Poissons (carpe, truite, sole)	0,6 - 1,0
* Laitages	
- Beurre	2,4
- Lait pasteurisé entier	0,06
- Fromage	0,2 - 1
<u>Aliments riches :</u>	
* Margarine	28
* Huiles - Foie de morue	20
- Maïs	19
- Palme	30
- Arachide	13
- Tournesol	49
- Soja	18
- Blé	133
- Graines de coton	30
* Germes de blé	14,5
* Asperges	14
* Epinards	23

II.2. - Synthèse : (6)



dont l'hétérocycle est ouvert sous l'action des oxydants. En position 2 se trouve une chaîne latérale saturée de structure isoprénique.

Ceci a été confirmé par voie de synthèse par condensation de la pseudo-cumohydroquinone avec le bromure de phytyle en présence de chlorure de zinc : $ZnCl_2$ KARRER, cité en référence par VUILLAUME (38).



II.3. - Métabolisme :

II.3.1. - Résorption intestinale : (12)

La résorption de la vitamine E ingérée par l'intermédiaire des aliments est fortement liée à la digestion des graisses. Elle nécessite au niveau de l'intestin, la présence de sels biliaires (bile) et d'une enzyme, la lipase pancréatique. Une ester hydrolase est nécessaire. On assiste alors à une hydrolyse des esters de tocophérol avec absorption de la forme alcoolique uniquement, ce qui correspond à environ 35 à 80 % du tocophérol consommé initialement.

Une fois absorbé au niveau de l'intestin, l' α tocophérol accompagne les chylomicrons dans leur trajet qui s'étend des canaux lymphatiques jusqu'à la circulation générale.

11.3.2. - Répartition - Taux circulants : (24) (37)

Dans le plasma, le tocophérol est retrouvé lié à diverses catégories de lipoprotéines à savoir aux L.D.L. (Low Density Lipoprotein) dans une proportion de 40 à 60 % du tocophérol et à 35 % environ aux H.D.L. (High Density Lipoprotein).

Le taux de tocophérol se trouve donc corrélé au taux des lipides totaux soit environ 0,6 à 0,8 mg/g de lipides plasmatiques.

Le tableau II reprend un certain nombre de valeurs plasmatiques puis tissulaires chez l'homme et l'enfant. (15)

La vitamine E est stockée essentiellement dans le foie et le tissu adipeux. Cependant, elle est également retrouvée en concentrations importantes dans l'hypophyse, les surrénales, l'utérus et les testicules (le taux dans le sperme est de 9,8 mg/kg).

Tableau II : Taux de vitamine E : Tocophérol chez l'homme :

- Sérum adulte	5 - 16 mg/l
- Sérum femme enceinte	9 - 25 mg/l
- Sérum nouveau-né prématuré	2 - 6 mg/l
- Sérum nouveau-né 1 semaine	5 mg/l
- Rapport : $\frac{\text{Sérum maternel}}{\text{Sérum nouveau-né}}$	2,6 - 5,7
<u>Corps entier</u>	
- Homme adulte	50 mg/kg
- Femme adulte	160 mg/kg
- Foetus	3 - 7 mg/kg
- Foetus 5 mois	1 mg/kg
- Nouveau-né terme	20 mg/kg
- Foie	10 - 20 µg/g
- Tissu adipeux (triglycérides)	225 - 300 µg/g
- Globules rouges	2,6 ± 0,4 mg/l
	0,4 ± 0,15 nmol/10 ⁹ gr
- Plaquettes	1,5 ± 0,7 nmol/10 ⁹ pl

Certains auteurs rapportent l'existence sur les globules rouges de sites de fixation possédant les caractéristiques biologiques des récepteurs de type protéique. Une protéine hépatique cytosolique a pu être isolée liant fortement l' α tocophérol. (15)

Dans les autres tissus, les sites de fixation sont moins bien connus, mais ceux-ci semblent être présents non seulement au niveau des membranes fortement liposolubles, mais également au niveau du cytosol, des membranes microsomiales et du noyau. C'est ainsi que l' α tocophérol a pu être isolé dans les mitochondries et les microsomes de la cellule hépatique.

De manière expérimentale, l'administration de vitamine E marquée par un isotope, conduit à des taux de l'ordre de 80 % de radioactivité excrétée dans le foie (en 7 jours).

Au niveau des tissus, l'on observe une transformation de l' α tocophérol en tocoquinone.

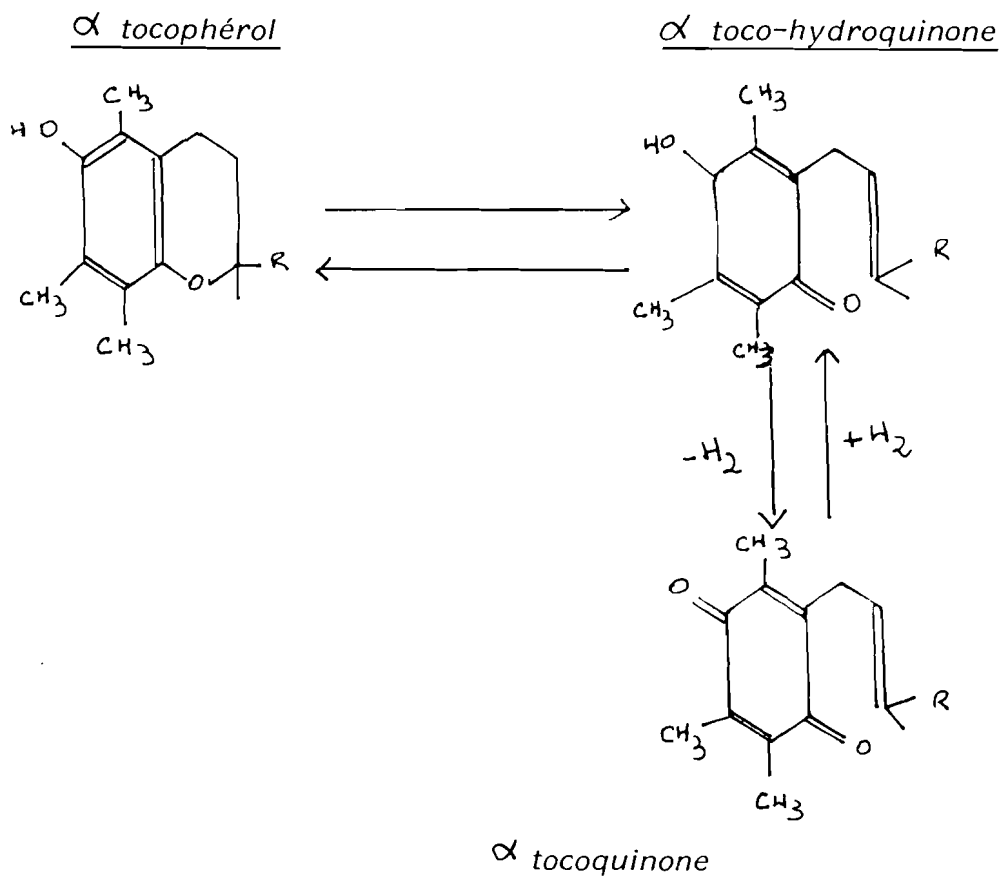
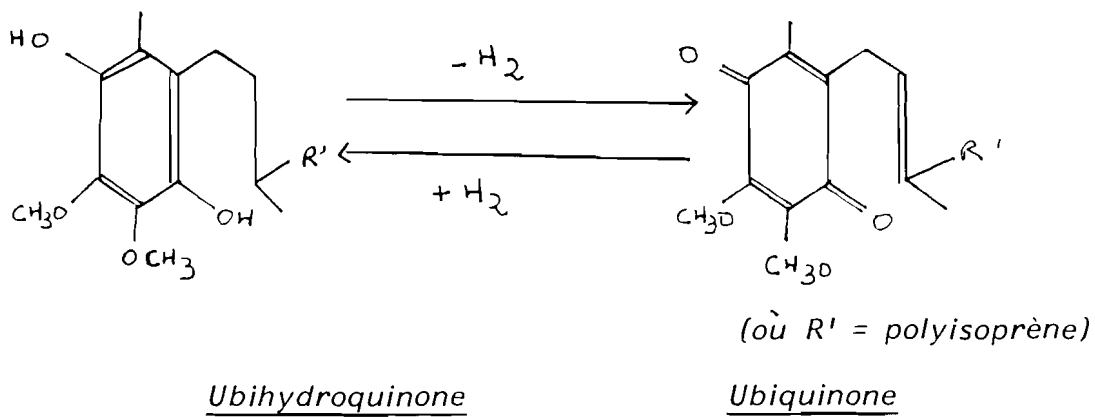


Schéma I :

(où R : triisoprène)

Produits d'oxydation de l' α tocophérol

Ce sont des produits d'oxydation de l' α tocophérol présentant une analogie de structure avec l'ubiquinone également présente dans les mitochondries.



11.3.3. - Elimination :

Après résorption intestinale, environ 35 % des tocophérols d'origine alimentaire sont absorbés et le reste est éliminé. Cette élimination peut se faire par voie biliaire et fécale (80 %) ou encore par voie urinaire (20 %), comme nous l'indique le schéma de métabolisme. (schéma II).

Dans les fèces et la bile, la majeure partie est sous forme libre, mais il y a également des composés d'oxydation tels que l'acide tocophéronique, la tocophérono-lactone, la tocophérol P quinone. De même des métabolites de type acide tocophéronique et tocophérono-lactone sous forme glycuconjugués ont pu être isolés dans l'urine de sujets recevant de grandes quantité d' α tocophérol.

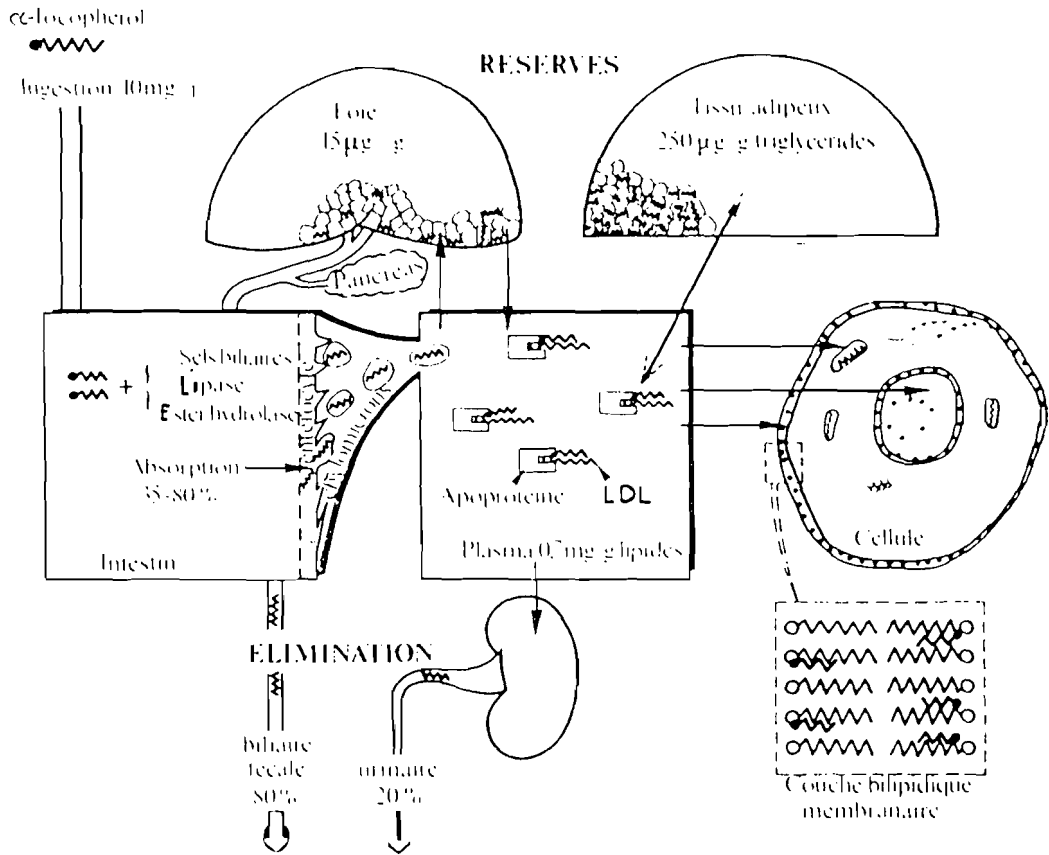


Schéma 11 : - Métabolisme de la vitamine E.

II.4. - Unité de mesure de la vitamine E : (6) (41) (38)

Très tôt les scientifiques ont reconnu l'activité thérapeutique de substances contenues dans les huiles de foie de poisson : il s'agissait des vitamines. Pour mieux les utiliser, il s'est avéré nécessaire de les quantifier. C'est ainsi qu'il a été mis au point l'utilisation d'Unités Internationales. L'Unité Internationale peut se définir comme étant l'activité biologique de la vitamine. Cette notion étant devenue caduque, de nouvelles unités ont été mises au point tenant compte cette fois-ci de l'unité de masse de la substance active.

Le Tableau III récapitule les correspondances entre nouvelles et anciennes unités. Pour ce qui est des substances à activité vitaminique E, une Unité Internationale est maintenant exprimée en milligrammes d'acétate de tocophérol. Rappelons que la forme acétate de tocophérol présente 8 stéréoisomères possibles sous quatre formes racémiques. Il convient de préciser que la forme dextrogyre de l' α tocophérol est la plus répandue dans la nature.

Remarque :

Les valeurs ont pu être obtenues par la mise en évidence de la quantité de tocophérol qui doit être administrée per os à des rates carencées en vitamine E afin de prévenir l'arrêt de la gestation et la résorption du fœtus dans 50 % des cas.

Tableau III : Unités de mesure de la vitamine E :

ANCIENNES UNITES (U.I.)	NOUVELLES UNITES (mg)
1. U.I.	0,909 mg de dl α tocophérol
1 U.I.	0,735 mg d'acétate de d α tocophérol
1 U.I.	0,671 mg de d α tocophérol
1. U.I.	1,75 mg de d β tocophérol
1 U.I.	7 mg de d γ tocophérol

Rappelons que : dl = forme racémique

d = forme dextrogyre

III - PROPRIETES ET FONCTIONS :

III.1. - Isolement :

Les tocophérols sont retirés de l'insaponifiable de l'huile de germe de blé de préférence, par extraction à l'éther de pétrole et à l'alcool méthylique, puis purification par méthode chromatographique sur alumine. La mise en évidence de l'activité de ces tocophérols isolés à partir de leurs sources naturelles, est obtenue grâce aux tests curatifs de la stérilité chez le rat (38).

III.2. - Propriétés physico-chimiques : (6) (38)

Les tocophérols se présentent comme des liquides huileux, visqueux, incolores ou jaunes pâles dont le point de fusion est égal à + 3°. Ils sont :

- très solubles dans les solvants organiques et insolubles dans l'eau d'où leur appellation de vitamines liposolubles.
- stables en présence d'acide et d'alcali.
- très résistants à la chaleur (200° C), à la cuisson, à la dessiccation et aux agents d'hydrogénation du fait de l'existence d'une chaîne saturée isoprénoïque. En présence d'oxygène, pouvant provenir de composés les plus divers tels que l'ozone (O_3), le permanganate de potassium ($KMnO_4$), le chlorure de fer ($FeCl_3$), le nitrate d'argent ($AgNO_3$), etc..., ils s'oxydent en formant des quinones, des dimères et des trimères. Ces composés se présentent généralement

sous la forme de cristaux jaunes. C'est ce caractère très oxydable de la vitamine E ou des substances vitaminiques E qui explique leurs propriétés réductrices et anti-oxydantes.

Il faut noter que l'acylation du groupement hydroxy en position 6, améliore considérablement la stabilité du tocophérol. Ainsi la plupart des substances utilisées dans le commerce sont sous forme d'ester : acétates ou succinates de tocophérol.

III.3. - Fonctions et rôles physiologiques :

Comme nous l'avons signalé dans notre chapitre introductif la vitamine E a été considérée durant de nombreuses années comme un facteur favorisant essentiellement la fécondité et retardant le vieillissement. De ce fait, elle est restée fixée dans l'esprit des hommes sous l'appellation de vitamine de la fertilité. Ce n'est que très récemment, par divers travaux et observations et à la suite de carences, qu'a pu être mis en évidence le rôle joué par la vitamine E à différents niveaux, aussi bien chez l'homme que chez les animaux. C'est ainsi qu'on la retrouve comme agent anti-oxydant, comme élément de stabilisation des membranes cellulaires, intervenant sur l'agrégation plaquettaire, l'hématopoïèse, etc....

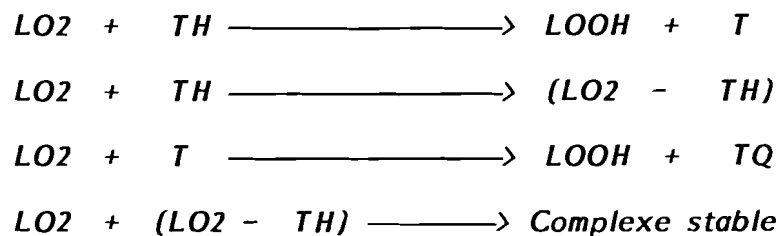
III.3. 1. - Vitamine E et effet anti-oxydant :

(3) (6) (8) (15) (17) (22)

Au niveau des tissus, l'oxygène se comporte plutôt comme deux radicaux libres liés l'un à l'autre. Sa réduction s'accompagne de la production de composés de type O (atome d'oxygène libre), O_2 (superoxyde), H_2O_2 (hydroperoxyde), HO (hydroxyl). Ces radicaux présentent certes une activité biologique : activité bactéricide lymphocytotoxique mais ils sont également susceptibles de déstabiliser des molécules par leur activité toxique et plus particulièrement les acides gras hautement insaturés ou leurs analogues lipidiques. Ce phénomène est renforcé par l'action de la lumière, des ions métalliques comme le fer, le cuivre et certains organo-acides.

En ce qui concerne les acides gras polyinsaturés (A.G.P.) qui sont des constituants des membranes cellulaires, ils sont sensibles à l'oxydation notamment au niveau de leur double liaison (Δ) in vitro. Ce type de réaction a pu être mis en évidence lors des carences en vitamine E, au niveau des mitochondries et des microsomes où il a été observé une diminution de la richesse en acides gras insaturés par rapport à la normale, MOLENAAR et VOS, cités en référence par VUILLAUME (38).

De nombreux systèmes anti-oxydants sont capables de protéger l'organisme contre de telles agressions. Ainsi le tocophérol épargne l'organisme humain de la présence de radicaux libres. En effet, la vitamine E a la capacité, grâce à sa chaîne isoprène latérale, de s'intégrer au niveau des doubles liaisons des acides gras insaturés. Elle contribue ainsi à protéger ceux-ci de l'action des oxydants dont les peroxydes. De plus, du fait de sa capacité de libérer de l'hydrogène provenant du groupement hydroxyl en position - 6, le tocophérol permet la formation de produits stables. Cette propriété est représentée par les réactions suivantes :



où

LO₂ : Peroxyde lipidique

LOOH : Hydroperoxyde

TH : Tocophérol

TQ : Tocophérol quinone.

C'est cette propriété qui est à l'origine de son rôle de protection de certains composés comme la vitamine A et les carotènes (16) (17). On comprend aisément qu'une carence en vitamine A puisse être expliquée par une carence en tocophérol, du fait de ce rôle de protection.

III.3.2. - Vitamine E et stabilisation des membranes cellulaires : (15)

Ce rôle découle de manière directe de l'activité anti-oxydante du tocophérol. En effet, celui-ci protège de l'oxydation les lipides insaturés, constituants de la bicouche lipidique des membranes cellulaires. La vitamine E peut donc être considérée comme un facteur d'intégrité des membranes cellulaires et subcellulaires.

D'autres théories ont été proposées. C'est ainsi qu'il a été suggéré que la vitamine E participait à la structure des lipides membranaires. Elle posséderait une action stabilisatrice, indépendante de son effet anti-oxydant. Elle aurait la possibilité de se fixer dans les encoches formées par les acides gras insaturés au niveau de leurs doubles liaisons (en configuration cis). Ainsi celles-ci se trouveraient protégées de l'action oxydante des peroxydes, LUCY et DIPLOCK, cités en référence par VUILLAUME (38).

Synergie avec d'autres systèmes anti-oxydants :

Il existerait une collaboration entre différents systèmes épargneurs de radicaux libres comme les pyridines nucléotides réduits, certains acides aminés soufrés, certaines protéines comme la transferrine ou encore certains systèmes enzymatiques comme les superoxydes dismutases. Nous pouvons citer en exemple la coopération entre la vitamine E et le glutathion, lors de la décomposition des peroxydes lipidiques.

III.3.3. - Actions sur les systèmes enzymatiques : (15)

La carence en vitamine E chez l'animal, responsable de modifications enzymatiques a mis en relief le rôle de celle-ci au niveau des systèmes enzymatiques. Elle interviendrait au niveau du système oxydase-dépendant du cytochrome P450 microsomial, de la phosphodiesterase, de l'AMP cyclique, du relarguage des hydrolases lysosomiales, de la conversion de la cyanocobalamine en sa forme coenzymatique, etc....

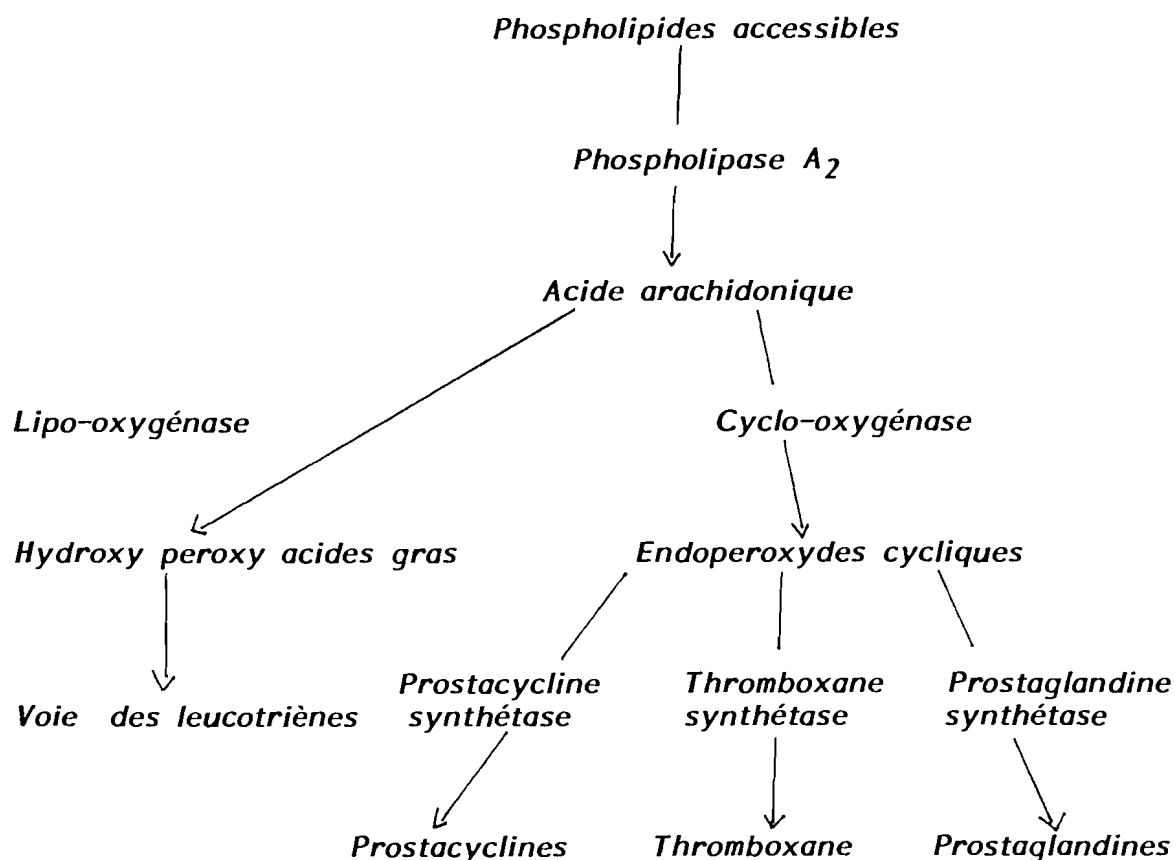
III.3.4. - Vitamine E et agrégation plaquettaire :

(13) (15) (16) (25) (36)

Cette fonction de la vitamine E a été mise en évidence à la suite de constatation sur la teneur des plaquettes en vitamine E et sur l'apparition de microthromboses et de thrombocytes au cours de carence en tocophérol.

La vitamine E module la voie biosynthétique du métabolisme de l'acide arachidonique à différents niveaux. Il semblerait qu'elle inhibe aussi bien la libération d'hydroxy-acides gras que l'activité de la lipo-oxygénase. Par contre, elle n'inhibe pas l'activité de la cyclo-oxygénase. Elle élève le taux de prostaglandines de type PGI_2 et de la thromboxane A_2 en bloquant les effets inhibiteurs des peroxydes lipidiques sur la prostacycline synthétase. Ces effets physiologiques dérivent de son activité anti-oxydante. Cependant cette action semble variable d'un tissu à l'autre et des effets opposés ont été notés dans les microsomes des muscles et des testicules.

Schéma III : Métabolisme de l'acide arachidonique



III.3.5. - Vitamine E et hématopoïèse : (15) (22) (38)

Des constatations sur des sujets carencés en vitamine E ont objectivé une susceptibilité accrue des érythrocytes à l'hémolyse induite par des agents oxydants comme les peroxydes d'hydrogène. Cette fragilité érythrocytaire serait due à une augmentation de la rigidité et de la perméabilité ionique membranaire, raccourcissant la durée de vie des hématies, par une hémolyse.

D'autre part, il a été suggéré que la vitamine E interviendrait dans la synthèse de l'hème. Nous savons que celui-ci dérive initialement de la combinaison de la glycine (ou glyco-colle) et de l'acide succinique aboutissant à la formation d'acide α amino lévulinique (ALA) puis de porphobilinogène, etc.... Ceci fait intervenir deux enzymes : l'ALA synthétase et l'ALA déshydratase. Il semble que la vitamine E agit au niveau de la régulation génétique de ces deux enzymes, ce qui explique son rôle dans la synthèse de l'hème. Ainsi elle module non seulement la formation d'hémoglobine (renfermant l'hème et constituant des globules rouges), mais aussi d'autres éléments comme par exemple la myoglobine et certains systèmes d'oxydo-réduction hème dépendant comme les cytochromes ou les catalases.

III.3.6. - Vitamine E et respiration cellulaire : (15)

Plusieurs chercheurs ont constaté que la nécrose hépatique accompagnant la carence en vitamine E est précédée d'un abaissement de la respiration cellulaire. Celle-ci a lieu au niveau des mitochondries grâce à la chaîne respiratoire. Elle correspond à une série de réactions faisant intervenir des systèmes transporteurs d'hydrogène, selon leur potentiel d'oxydo-réduction. L'énergie libérée à la suite de cette chaîne réactionnelle est mise en réserve sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), molécule synthétisée par absorption de phosphate inorganique. Ainsi, on définit un rapport P/O c'est-à-dire nombre d'atomes de phosphore inorganique qui disparaissent lorsqu'un atome d'oxygène est réduit. Ce rapport est généralement égal à 3 et une diminution signifierait un appauvrissement des réserves en ATP donc une perturbation de la respiration cellulaire.

L'un des maillons de cette chaîne respiratoire est constitué par les cytochromes. Nous avons signalé auparavant que la vitamine E intervient dans la synthèse de l'hème, constituant des cytochromes. On conçoit donc aisément que l'abaissement de la respiration cellulaire consécutif à la carence en tocophérol découle d'une perturbation de l'activité des cytochromes.

Enfin l'analogie structurale entre l'ubiquinone (intervenant dans la chaîne respiratoire) et l' α tocoquinone (métabolite de l' α tocophérol) suggère une intervention éventuelle de la vitamine E comme remplaçante de l'ubiquinone dans la chaîne respiratoire.

La vitamine E s'avère nécessaire au bon fonctionnement de la chaîne respiratoire c'est-à-dire au maintien de l'équilibre métabolique des cellules.

III.3.7. - Rôle d'épargne du sélénium et des acides aminés soufrés vis-à-vis de la vitamine E : (38)

Comme nous l'avons déjà montré, il existe une relation entre divers systèmes épargneurs de radicaux libres comme les acides aminés soufrés.

En effet, il a été constaté chez l'animal que la carence en sélénium se traduit par des troubles parfois semblables à ceux observés lors des carences en tocophérol. Cette constatation suggère que le sélénium comme la vitamine E, protège les membranes cellulaires mais par un mécanisme différent. En effet, il permet à la glutathion peroxydase de détruire les peroxydes, agents d'oxydation. Il semble également que les amino-acides soufrés exercent le même rôle.

A travers toutes ces fonctions de la vitamine E, il devient plus aisé de comprendre que les carences peuvent être à l'origine de troubles et de pathologies graves telles les anémies hémolytiques, les syndromes neurodégénératifs avec diverses atteintes, etc....

Il convient donc de déterminer chez l'adulte comme chez l'enfant les besoins susceptibles d'être assurés par l'alimentation.

IV - INTERET NUTRITIONNEL ET SYMPTOMES DE CARENCE :

IV.1. - Besoins :

IV.1.1. - Rappel sur la notion d'apport recommandé : (41)

L'apport recommandé vitaminique représente la quantité de vitamines qui, ingérée chaque jour, garantirait la couverture des besoins quotidiens de l'ensemble des membres d'une population normale, en bonne santé tout en évitant les risques d'une surcharge.

Il ne concerne en aucune façon les dispositions diététiques ou thérapeutiques particulières, requises par un certain nombre de maladies héréditaires métaboliques ou encore d'autres situations pathologiques.

Définir un apport recommandé, c'est prendre une marge par rapport à la notion de besoin. On retrouve aussi les notions de R.D.A. (Recommended Dietary Allowance) correspondant à la D.J.R. (Dose Journalière Recommandée). C'est ainsi que la F.A.O. (Food and Agricultural Organisation) et l'O.M.S. (Organisation Mondiale de la Santé) ont établi des normes concernant les besoins en éléments nutritifs. Celles-ci permettent aux Etats membres d'établir selon leurs propres ressources alimentaires, leurs propres recommandations. Ces apports peuvent être définis comme des quantités à fournir par personne, par jour, pour satisfaire les besoins des individus et favoriser un bon état de nutrition.

IV.1.2. - Spécificités des besoins en vitamine E :

(6) (7) (8) (15) (41)

D'une manière générale, la dose journalière recommandée en vitamine E a subi une évolution. En effet, les besoins étaient estimés entre 10 et 30 mg de tocophérol par jour, chez l'adulte dans les années 1960. Ces doses ont été réajustées à environ 10 à 15 mg par jour et ces valeurs sont celles utilisées encore aujourd'hui. Cependant, on assiste à une légère augmentation de cette dose avec l'âge.

Certains auteurs expriment les besoins par gramme d'acides gras poly-insaturés (PUFA). C'est ainsi qu'un apport d'environ 0,6 mg de tocophérol (α) par gramme de PUFA est recommandé (15).

Chez le nouveau-né et le nourrisson, le besoin est de l'ordre de 0,5 mg par jour, ce qui est généralement couvert par le lait maternel.

En ce qui concerne les prématurés dont la croissance dans des conditions normales est plus rapide que chez le nouveau-né, les besoins vitaminiques sont accrus. L'absorption de la vitamine E est diminuée chez les prématurés. Cette déficience serait aggravée par l'adjonction au lait de matières grasses riches en fer et en acides gras polyinsaturés. L'emploi de cette vitamine chez les prématurés permet de prévenir deux complications essentielles particulièrement graves : la fibroplasie rétrolentale et la bronchodysplasie.

Selon les recommandations de l'Association Américaine de Pédiatrie, un lait pour prématuré doit apporter une unité de vitamine E pour un gramme d'acide linoléique, mais avec un supplément d'au moins cinq unités par jour (41).

Quant aux personnes âgées, l'on dispose de très peu d'information sur les apports nécessaires mais il est généralement admis que leurs besoins ne diffèrent que très peu de ceux de l'adulte jeune, lorsqu'elles sont en bonne santé et ne souffrent d'aucune pathologie.

Les valeurs d'apport recommandé en vitamine E en fonction de l'âge et du sexe se retrouvent dans le tableau IV (41).

Apport recommandé en vitamine E :

POPULATION CONCERNEE	APPORT RECOMMANDE EN VITAMINE E (en mg)
<i>Nourrissons (- de 6 mois)</i>	<i>4,7/720 ml lait maternel</i> <i>4,7 - 14 mg/720 ml</i> <i>Lait diététique (1er âge)</i>
<i>Enfants * 6 - 12 mois</i> <i>* 1 - 3 ans</i> <i>* 4 - 9 ans</i> <i>* 10 - 12 ans</i>	<i>3 - 4 mg</i> <i>5 - 7 mg</i> <i>10 - 15 mg</i> <i>12 - 15 mg</i>
<i>Adolescents * 13 - 19 ans ♂</i> <i>* 13 - 19 ans ♀</i> <i>Adultes ♂</i> <i>* 23 - 50 ans</i> <i>Adultes ♀</i> <i>Femmes enceintes</i> <i>Femmes en période d'allaitement</i>	<i>12 - 15 mg</i> <i>12 - 15 mg</i> <i>12 - 15 mg</i> <i>12 - 15 mg</i> <i>15 mg</i> <i>15 mg ; 11 mg</i> <i>(France) (Américain Aca-</i> <i>demy of Pediatrics)</i>
<i>Personnes âgées</i> <i>(Adultes >> 51 ans)</i>	<i>10 mg</i>

IV.2. - Carences et pathologies observées : (15)

Une fois les besoins déterminés, il est aisé de comprendre que les carences en vitamine E peuvent avoir des retentissements graves sur la santé de l'être humain et plus particulièrement sur celle de l'enfant et du prématuré. Ceci découle de manière évidente des multiples fonctions que présente la vitamine E. Les syndromes décrits depuis peu chez l'homme confirment les lésions expérimentales observées chez l'animal. Celles-ci semblent surtout concerner l'organisme en croissance : l'enfant, cible de nombreuses affections.

Les pathologies procèdent très souvent d'anomalies intervenant au cours des diverses étapes de la cinétique vitaminique dans l'organisme. C'est ainsi que l'on retrouve les carences de réserve et d'apport responsables du syndrome hémolytique chez le prématuré, des carences d'absorption et de transport de tocophérol, à l'origine des troubles neuro-dégénératifs. D'autre part, du fait de son rôle de protection de la vitamine A contre l'oxydation, toute carence en tocophérol peut s'accompagner d'un déficit en vitamine A et entraîner des troubles tels que des perturbations de la croissance, des troubles ophtalmiques : xérophtalmie, héméralopie, etc...

Il apparaît important de préciser que les carences d'origine alimentaire observées dans nos pays s'intègrent dans les carences multiples ; ainsi, le déficit en vitamine E ne donne pas lieu à une symptomatologie autonome identifiable. Nous avons relevé pour exemples quelques cas de pathologies directement liées à une déficience en vitamine E.

IV.2.1. - Anémie hémolytique : (15)

Elle a été observée pour la première fois chez le prématuré. De nombreux facteurs seraient responsables de cette affection. Parmi ceux-ci, on cite :

- les faibles réserves en vitamine E du fœtus,
- une faible absorption digestive pendant les trois premiers mois suivant la naissance,
- une faible teneur du lait maternel et des laits artificiels en tocophérol,
- l'adjonction inconsidérée de fer agissant comme agent anti-oxydant.

Une anémie est ainsi retrouvée et se développe en quatre à six semaines avec réticulocytose et des modifications de la morphologie des hématies : acanthocytose et poïkylocytose. Cette perturbation se traduit par une auto-hémolyse des globules rouges en présence de peroxydes et parfois des oedèmes des membres inférieurs.

Les travaux de différents chercheurs donnent des résultats contradictoires quant à une supplémentation systématique des régimes des prématurés en vitamine E (41).

IV.2.2. - Syndrome neuro-dégénératif :

(14) (15) (23) (18) (3)

Il résulte d'un défaut de nutrition des cellules nerveuses de l'organisme. Le syndrome apparaît chez le sujet ayant reçu un apport normal en vitamine E mais qui ne peut le renouveler du fait d'un trouble d'absorption lipidique. Le tableau le plus caractéristique est retrouvé chez l'enfant atteint d'hypoplasie des voies biliaires intra-hépatiques où le déficit d'absorption est très sévère. Les troubles hépatiques qui en découlent sont compatibles avec la vie. On le retrouve également dans la mucoviscidose où le syndrome est plus long à se révéler et dans la maladie du "grèle court".

Différentes atteintes sont observées :

- Une atteinte périphérique : à type de polyneuropathie, à évolution insidieuse, se traduisant par une abolition des réflexes ostéo-tendineux et des troubles de la sensibilité lemniscale. Il s'ensuit une dégénérescence axonale et des dépôts lipopigmentaires à la fois intra-neuronaux et dans les cellules de Schwann.

L'atteinte chez l'enfant résulte de la dénervation chronique accompagnée d'une dégénérescence des fibres musculaires. Sur le plan biologique, cela se traduit par une augmentation massive de la créatininurie (la créatinine étant un composé azoté du muscle).

- Une atteinte du système nerveux central :

Cliniquement, l'on observe des troubles de l'oculomotricité conjuguée et une ataxie cérébelleuse (cette dernière ayant été mise en évidence chez le poulet au cours de l'encéphalomalacie carentielle). Ces atteintes neurologiques centrales ont été surtout observées après autopsies de patients décédés d'atrésie biliaire et de mucoviscidose.

- Une atteinte rétinienne :

Une rétinopathie pigmentaire ophtalmoscopique, favorisée par ailleurs par une carence en vitamine A est observée. Il semblerait que les photorécepteurs aient une teneur élevée en acides gras polyinsaturés et que l'action de la lumière explique leur susceptibilité aux phénomènes de lipoperoxydation.

Ce syndrome dégénératif peut être stabilisé en totalité ou en partie par un traitement vitaminique E injectable.

IV.2.3. - Abétalipoprotéinémie (15) (18) :

Elle comporte un déficit en vitamine E, lié aussi bien à une malabsorption des graisses qu'à un déficit des transporteurs de lipoprotéines de basse densité (V.L.D.L. = Very Low Density Lipoprotein).

Ces patients développent un syndrome neuro-dégénératif avec ataxie, neuropathie périphérique et rétinienne identique. Sur le plan hématologique, l'on constate une acanthocytose et une poïkylocytose.

IV.2.4. - Autres affections :

D'autres affections associant un déficit en vitamine E à un syndrome neuro-dégénératif d'origine indéterminée ont pu être mises en évidence. C'est le cas de sujets présentant ces deux phénomènes sans malabsorption des graisses ou d'hypo bétalipoprotéinémie.

Cela fait penser à un défaut d'absorption sélective de la vitamine E en rapport à l'apoprotéine B₁₀₀.

Toutes ces pathologies ont pu être observées chez l'homme mais d'autres troubles ont été mis en évidence chez l'animal expérimental, pouvant éventuellement se retrouver chez l'homme.

Ainsi :

* au niveau cardiovasculaire chez le poulet, une diathèse exsudative pré-capillaire caractérisée par un oedème hémorragique généralisé a pu être observée. Ce phénomène serait dû à une oxydation excessive des acides gras de l'endothélium vasculaire. DAM et coll. (1940) pensent que celui-ci serait lié également à une carence en sélénium (38).

* au niveau des organes reproducteurs l'on note une embryopathie par carence maternelle avec déficience de la prolifération vasculaire. A cela s'ajoute une atrophie testiculaire due à la dégénérescence de l'épithélium des tubes séminifères (rat).

* au niveau du foie : chez le rat, l'accumulation de lipopigments et la dégénérescence stéatosique aboutit à une nécrose hépatocytaire.

* au niveau musculaire : chez le veau, l'agneau et le poulet, une dystrophie musculaire a été mise en évidence. Elle est due à la dégénérescence des fibres musculaires.

* au niveau de l'immunité : des modifications de l'immunité humorale, de la réponse lymphocytaire aux infections existent chez les mammifères. (36)

IV.3. - Indications thérapeutiques de la vitamine E :

(6) (15) (9) (29)

Ces différentes pathologies peuvent être selon le cas, traitées par la vitamine E.

Parmi les spécialités contenant la vitamine E, nous pouvons citer :

- Ephynal* Roche ;
- Toco 500* Negma ;
- Tocomine* Clin Midy,

et en association dans :

- Difrarel E* MSD-Chibret,
- Rovigon* Roche.

La vitamine E est préconisée dans le traitement de l'impuissance masculine et la stérilité féminine, notamment si une hypovitaminose E est à la base. Elle est également utilisée dans la prévention des avortements habituels. Certains auteurs nient cependant l'efficacité du tocophérol dans ces indications. D'autres suggèrent l'association avec la progestérone. (8)

Mais la vitamine E peut être utilisée à d'autres fins thérapeutiques à savoir :

- dans les carences d'absorption, notamment dans le traitement d'insuffisance bilio-pancréatique afin de rétablir en quelques semaines les taux normaux et dans le traitement de l'abétalipoprotéine chez le prématuré présentant une anémie régénérative.

Le tocophérol est également utilisé dans la prévention des effets indésirables de l'oxygénothérapie.

L'espoir que la vitamine E puisse atténuer les effets secondaires de l'utilisation de l'oxygène est à l'étude depuis 1970. Des résultats satisfaisants ont été obtenus dans rétinoopathie du nouveau-né mais non dans la dysplasie broncho-pulmonaire.

Par ailleurs, de nombreux travaux ont mis en relief l'utilisation théorique de la vitamine E dans certains cas comme les hémolyses constitutionnelles et la lutte contre les toxiques oxydants tels que le fer, le cuivre et le sélénium.

Enfin, concernant les cancers, certaines cellules tumorales en culture présentent des indices de lipoperoxydabilité anormalement bas, qui peuvent être partiellement corrigés par la vitamine E. Des études sont actuellement en cours. (15)

CHAPITRE DEUXIEME : METHODES DE DOSAGE DE LA VITAMINE E

Connue comme vitamine de la fertilité, elle présente également d'autres fonctions importantes dont le rôle d'anti-oxydant cellulaire. De ce fait, sa carence chez l'être humain et plus particulièrement chez l'enfant et le prématuré peut être à l'origine de manifestations pathologiques graves.

Il apparaît important de pouvoir quantifier cette vitamine, afin d'en déterminer les valeurs de référence.

Différentes méthodes ont été rapportées pour le dosage de cette vitamine aussi bien dans les milieux biologiques (microsomes hépatiques, sang), que dans les aliments et dans certaines préparations pharmaceutiques (spécialités). Ces méthodes recouvrent le plus souvent quatre étapes. Cependant le nombre de celles-ci varie selon la méthode de dosage utilisée et l'échantillon. Ces étapes sont les suivantes :

- * l'extraction
- * la purification
- * la séparation
- * le dosage.

L'extraction consiste au transfert d'une substance ou d'un soluté initialement contenu dans un milieu vers un solvant non miscible au premier milieu. Il est possible de la rendre plus sélective par l'ajustement des différents paramètres tels que la nature et/ou la composition des solvants, le pH, etc...

La purification est une opération qui consiste à éliminer les interférences pouvant fausser les réactions de dosage.

La séparation consiste, quant à elle, à séparer et à différencier diverses substances.

Le dosage permet de quantifier la substance à analyser dans l'échantillon.

Il existe différentes méthodes d'évaluation quantitative telles les méthodes colorimétriques, les méthodes titrimétriques, les méthodes spectrophotométriques et les méthodes chromatographiques.

Toutes ces techniques peuvent être regroupées en méthodes chimiques, physicochimiques et physiques, etc...

Dans le cas des vitamines liposolubles (A, D, E, K), le dosage repose sur des techniques fluorimétriques, colorimétriques et spectrophotométriques qui sont pratiquées avec une préférence pour la chromatographie liquide à haute performance.

La chromatographie est une méthode de séparation, de purification, d'identification et de dosage. (20) Elle fonctionne essentiellement grâce à deux phases :

- une phase stationnaire ;*
- une phase mobile.*

Le principe de fonctionnement peut être décrit succinctement comme comprenant :

- une fixation initiale de l'échantillon contenant la ou les substances à analyser sur la phase stationnaire ;
- un déplacement sélectif de la substance par la phase mobile entraînant la séparation ;
- une identification et/ou une quantification des différentes fractions par un système détecteur-enregistreur.

La classification des différentes techniques chromatographiques repose sur différents critères, à savoir :

- la nature physique des phases ;
- le phénomène chromatographique mis en oeuvre ;
- le procédé opératoire.

Il faut par ailleurs noter que ces techniques de dosage sont généralement applicables pour la détermination des différents tocophérols (α , β , γ , etc...).

Cependant, c'est l'alpha tocophérol que l'on recherche le plus souvent du fait de sa très forte activité vitaminique E et de son intérêt. Dans de rares cas, le dosage des tocophérols totaux est effectué.

Avant d'envisager la partie expérimentale de notre étude, nous décrirons les différentes méthodes de dosage de la vitamine E, recensées dans la revue de la littérature.

I. - DIFFERENTES METHODES :

I.1. - Dosage titrimétrique de la vitamine E par le sulfate cérique (STROBECKER) : (34)

C'est une méthode utilisée pour l'évaluation de la teneur en tocophérol libre ou estérifié dans certaines préparations pharmaceutiques comme les comprimés ou les solutions huileuses.

Une hydrolyse acide ou alcaline est nécessaire afin de transformer toutes les formes estérifiées en formes libres. L'hydrolyse alcaline s'applique particulièrement aux préparations pharmaceutiques. Le dosage se fait par titrimétrie sur le résidu repris par de l'éthanol, par une solution de sulfate cérique en présence d'un indicateur : le sulfate de diphénylamine. Le dosage se poursuit jusqu'à apparition d'une coloration bleue persistante.

I.2. - Dosage photométrique de la vitamine E
par la méthode FURTER et MEYER : (34)

Le principe est basé sur le fait que l'oxydation du tocophérol libre par de l'acide nitrique, aboutit à la formation d'un complexe réactionnel rouge marron appelé "tocophérol rouge". La densité optique de ce composé sera mesurée au spectrophotomètre à 470 nanomètres par rapport à un témoin étalon de tocophérol.

L'extraction se fait à l'aide de plusieurs fractions d'éther de pétrole. Le résidu après évaporation est repris par de l'éthanol et soumis à l'action de l'acide nitrique. Cette étape est suivie de la lecture de la densité optique au spectrophotomètre. Une gamme étalon sera traitée dans les mêmes conditions. Les résultats seront déterminés par comparaison avec celle-ci.

Cette méthode est suffisamment spécifique pour le contrôle des préparations pharmaceutiques contenant la vitamine E. Pour l'exploration des produits naturels, elle s'avère beaucoup moins spécifique du fait de l'existence de substances interférentes.

D'autre part, la teneur en vitamine E est généralement très peu élevée et difficile à évaluer. Les substances interférentes peuvent être éliminées par des méthodes de purification de type chromatographie sur colonne haute.

1.3. - Dosage photométrique de la vitamine E par la méthode d'EMMERIE et ENGEL : (15) (31) (34) (10)

Le complexe rouge intense formé à l'issue de la réduction des ions ferriques en ions ferreux par le tocophérol en présence d'une solution éthanolique de 2,2' bipyridyl aura une densité optique proportionnelle à la concentration en tocophérol.

Des fractions d'éther de pétrole ou de chloroforme sont utilisées pour l'extraction. Le résidu évaporé sur courant d'azote est repris par de l'alcool. Il est additionné à une solution de chlorure ferrique et une solution de 2,2' bipyridyl. L'intensité de la coloration est ensuite mesurée au spectrophotomètre par rapport à une gamme étalon.

C'est une méthode peu spécifique du fait de l'existence de substances interférentes. Elle est généralement combinée avec des procédures convenables de purification dont certaines seront passées en revue.

Ce sont des méthodes de chromatographie sur colonne haute. Dans ce cas, la phase stationnaire est contenue dans une colonne pouvant être en verre ou en métal à travers laquelle passe la phase mobile entraînant la ou les substances à identifier et à doser.

Parmi ces méthodes, il faut retenir :

1.3.1. - Purification par la terre de FULLER : (34)

C'est une méthode de purification où la phase stationnaire est constituée de terre de FULLER coulée dans une colonne. La phase mobile est constituée de benzène. Les carotènes, la vitamine A et les stérols sont retenus dans la colonne mais la séparation des différents tocophérols est insuffisante, parfois inexistante.

La phase stationnaire doit être soumise à un traitement préalable avant l'introduction dans la colonne. La substance à doser se retrouve dans l'éluat pour être soumise à la technique de dosage. La séparation n'est pas toujours parfaite. Elle est également couplée avec une autre technique chromatographique.

1.3.2. - Chromatographie sur colonne de phosphate acide de magnésium ($MgHPO_4$) :

C'est une méthode très intéressante pour l'élimination des tocophérols à faible activité vitaminique E ainsi que d'autres substances gênantes.

Le procédé de fonctionnement est identique à celui précédemment décrit. La phase stationnaire sera recouverte d'une fine couche de sulfate de sodium anhydre. La phase mobile est constituée d'éther de pétrole. Si l'on veut réaliser le dosage séparé des différents tocophérols, une colonne plus longue est nécessaire.

L'élimination des impuretés est satisfaisante et les pertes en alpha tocophérol sont moindres. Cependant, la séparation peut s'avérer moins bonne si la quantité des substances interférentes est très élevée. Une purification préalable à la terre de FULLER a alors été suggérée par certains auteurs. (34)

1.3.3. - Chromatographie sur alumine :

Le principe est le même que les méthodes précédentes. L'alumine présente l'avantage de donner lieu à un procédé chromatographique plus rapide du fait de la taille des particules. Cependant, les pertes en tocophérol dues à sa dégradation sont relativement élevées. D'une manière générale, c'est la technique de purification la plus utilisée. Il est possible d'accroître la spécificité d'une telle méthode par la modification de certains paramètres tels que la taille de la colonne, les constituants de la phase mobile, etc... Elle est considérée comme préliminaire à des techniques de chromatographie sur papier ou sur couche mince.

Des variantes de la méthode d'EMMERIE et ENGEL ont été rapportées. C'est ainsi que ROUGEREAU propose une méthode de dosage avec extraction préalable pour l'évaluation de la teneur en tocophérol dans les aliments. (31).

Cette méthode consiste en l'action répétée de fractions d'éther éthylique sur les aliments broyés en solution méthanolique d'acide ascorbique. Une saponification est souvent nécessaire

lorsqu'il s'agit de produits gras. Par ailleurs, une centrifugation à 1.000 tours par minute pendant dix à quinze minutes avant chaque nouvelle extraction est indispensable. Le dosage est effectué sur le résidu d'évaporation, repris par du n-heptane. Quelques gouttes de $\alpha\alpha'$ bipyridyl sont ajoutées à la solution suivie de la lecture au spectrophotomètre à 460 nanomètres. Il faut préciser que les dosages sont réalisés par rapport à une gamme étalon d'alpha tocophérol S.C.R. (Substance Chimique de Référence). Les différents éléments de la gamme seront traités dans les mêmes conditions que l'échantillon à analyser. (31)

1.4. - Dosage fluorimétrique de DUGGAN (34) :

Cette méthode est applicable à l'évaluation de la teneur en vitamine E dans les échantillons de sang. Le principe combine un hydrolyse à l'hydrure de lithium et d'aluminium et la mesure de la fluorescence obtenue au spectrofluorimètre :

- excitation à 295 nanomètres ;*
- émission à 340 nanomètres.*

La spécificité n'ayant pas été prouvée, très peu d'analyses sont réalisées actuellement par cette méthode.

1.5. - Dosage par spectrométrie de masse (WALTON)(40) :

Cette technique est beaucoup plus appliquée à l'identification qu'au dosage des diverses substances. Elle est essentiellement basée sur l'ionisation du ou des composés entraînant la rupture des liaisons chimiques des molécules. Les différents fragments seront ensuite séparés selon le rapport de leur charge à leur masse.

Le recueil sélectif des différents ions permet l'établissement d'un spectre caractéristique appelé spectre de masse. Cette méthode a permis une caractérisation directe et aisée de chaque classe de tocochromanols : tocophérols et certains tocotriénols. Dans le cas des monométhyltocols, la différenciation du 5 méthyltocol des isomères 7,8 méthyltocol a été prouvée dans les analyses au niveau des tissus et/ou liquides biologiques.

1.6. - Dosage par chromatographie sur papier (34) :

Le principe repose sur la chromatographie de partage liquide-liquide. Une surface plane de cellulose considérée comme support maintient par imbibition une phase stationnaire liquide. Le domaine d'application concerne aussi bien la purification de l'échantillon à analyser que le dosage quantitatif. Deux techniques peuvent être utilisées :

- la chromatographie unidimensionnelle qui permet la séparation des différents tocophérols ;*

- la chromatographie bidimensionnelle qui assure la séparation et le dosage.

Le mode opératoire consiste en une migration des différentes fractions sur le papier avec découpage et élution de celles-ci dans un solvant afin d'effectuer le dosage. L'inconvénient essentiel est que les pertes en tocophérol au cours des différentes manipulations sont inévitables. La réduction de ces pertes est possible cependant si les opérations de vaporisation, de découpage et d'élution sont réalisées rapidement mais avec soin. Le dosage quantitatif par cette méthode est moins spécifique que le dosage par d'autres méthodes telles que la chromatographie sur couche mince, etc...

1.7. - Dosage par chromatographie sur couche mince : (34)

La phase stationnaire, généralement de la silice ou de l'alumine est déposée en film très adhérent sur une surface solide (verre ou aluminium).

Les phénomènes de séparation sont complexes et tiennent aussi bien de l'absorption que du partage. Le temps de manipulation est nettement réduit par rapport aux méthodes précédentes. De plus, la séparation des différents tocophérols est meilleure. Avec de

l'expérience, la vitamine E ou tocophérol peut être éluée et ensuite dosée par colorimétrie avec une meilleure spécificité. La révélation peut se faire à l'aide de réactifs appropriés qui seront révélés en lumière ultra-violette (U.V.) à une longueur d'onde de 254 nanomètres (pour les plaques fluorescentes). Les mêmes quantités d'échantillons et d'étalons doivent être déposées sur la plaque afin de faciliter l'analyse qualitative et quantitative.

Dans les laboratoires équipés et dans le cas d'une analyse quantitative, les taches obtenues seront grattées, éluées et soumises ensuite à un dosage colorimétrique ou photométrique.

La technique de chromatographie sur couche mince est utilisée pour l'identification de la vitamine E dans une solution d'Hydrosol avec révélation sous forme de taches bleues par un mélange de chloroforme, de chlorure ferrique et de ferricyanure de potassium. La lecture doit être effectuée aussitôt car ces taches s'estompent très rapidement.*

1.8. - Dosage par chromatographie en phase gazeuse

(C.P.G.) (SMIDTC) (33) :

Cette méthode permet de séparer des mélanges gazeux complexes par une suite d'équilibres entre une phase mobile et une phase stationnaire liquide ou solide dans une colonne soumise à une température compatible avec les produits à analyser. Elle s'applique

donc aux molécules ou aux composés susceptibles d'être volatilisés par l'élévation de la température, mais aussi à des produits non volatiles après dérivatisation.

C'est une technique utilisée pour la détermination du rétinol et de l'alpha tocophérol dans des échantillons biologiques. Une chambre d'injection spéciale et une colonne également spéciale permettent d'éviter une décomposition de la vitamine A et d'obtenir une séparation efficace des autres vitamines liposolubles.

Dans la phase d'extraction, les échantillons biologiques seront saponifiés et les stérols seront éliminés par complexation avec la digitoxine. La détection s'effectue à l'aide d'un détecteur à ionisation de flamme (F.I.D.) permettant l'identification de l'alpha tocophérol et du rétinol selon leur temps de rétention.

1.9. - Dosage par chromatographie liquide à haute performance (H.P.L.C.) (1) (4) (5) (11) (20) (26) (28) (30) (35) (39)

C'est une technique de chromatographie liquide caractérisée par une élution des substances à des pressions élevées. Ceci par opposition à la chromatographie liquide ordinaire basée sur l'action de la pesanteur pour faire migrer les phases mobiles. La mise

au point des phases stationnaires de granulométrie très fine et l'introduction d'une élévation de la pression sont à l'origine d'une réduction du temps d'analyse. Les séparations sont obtenues avec une bonne résolution comparable et parfois supérieure à celle observée en chromatographie en phase gazeuse, y compris pour les substances non volatiles. L'appareillage est schématisé comme suit (20) :

- un ou plusieurs réservoirs de phase mobile ;
- un système de pompe ;
- un système injecteur ;
- une colonne généralement courte, contenant la phase stationnaire de fine granulométrie ;
- un système de détection et d'enregistrement (Schéma IV).

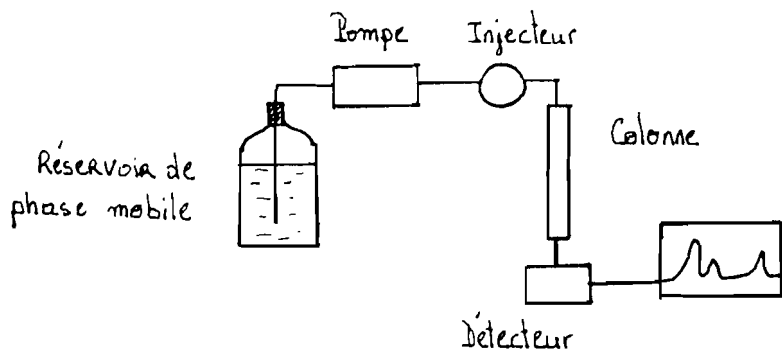


Schéma IV : Chromatographe liquide à haute performance

Les méthodes de dosage par C.L.H.P. se différencient par la nature de la phase stationnaire et de la phase mobile, par les caractéristiques des différents appareillages. Dans le cas du dosage de la vitamine E, une méthode d'extraction est généralement associée.

Nous prendrons deux exemples pour illustrer cette méthode :

1.9.1. - Dosage par C.L.H.P. pour la détermination rapide du rétinol et de l'alpha tocophérol (BIEZALSKI) (4) :

Ce dosage est réalisé sur des sérums humains. L'extraction se fait à l'aide d'une solution de n-heptane après précipitation des protéines par de l'éthanol. Une centrifugation est nécessaire à 3.500 tours par minute pour séparer la phase organique qui sera prélevée aux fins du dosage. La phase mobile est constituée d'un mélange de n-hexane/isopropanol dans les proportions de 98 pour 2 volumes. Le débit dans les conditions d'analyse est de 2 ml par minute. Les deux substances sont détectées à une longueur d'onde unique de 300 nanomètres. Mais une modification de la longueur d'onde est possible pour assurer un dosage spécifique de l'alpha tocophérol à 292 nanomètres. Il est bon de préciser que les dosages de vitamines sont toujours effectués par rapport à des étalons internes.

1.9.2. - Dosage de routine par C.H.L.P. des teneurs en vitamine A, E et en Bêta carotène des plasmas (VUILLEUMIER) (39) :

L'extraction s'effectue avec un solvant tel que l'hexane. Après précipitation des protéines, l'extrait est soumis à une centrifugation et la phase hexanique est utilisée pour le dosage. Le principe est le même que dans la technique précédente, mais la détection du tocophérol se fait séparément. En effet, le détecteur utilisé est un détecteur à fluorimétrie avec excitation à 290 nanomètres et émission à 330 nanomètres. Ceci aboutit à un résultat plus spécifique.

Nous utiliserons ce type de méthode pour l'évaluation de la teneur en alpha tocophérol dans les sérums des enfants recrutés au cours de notre enquête.

1.10. - Dosage biologique (6) (38) :

Deux méthodes nous ont paru intéressantes :

- l'épreuve de l'antistérilité par détermination de la dose capable d'empêcher la stérilité de la rate carencée, effectuée le jour de la copulation, EVANS, cité en référence par VUILLAUME (38).

- l'épreuve d'hémolyse des hématies avec de l'acide dialurique chez le rat.

II. - SOURCES D'ERREUR LORS DU DOSAGE DE LA VITAMINE E (34) :

De nombreuses sources d'erreur ont rendu le dosage du tocophérol difficile à réaliser. L'alpha tocophérol est une substance très sensible à l'oxydation atmosphérique. De ce fait, malgré les précautions prises au cours des manipulations, les pertes dues à une dégradation demeurent relativement élevées. Le pourcentage d'erreur apparaît d'autant plus élevé que les teneurs en tocophérol à évaluer sont faibles. Certaines erreurs proviennent par ailleurs de la présence de substances interférantes lors des dosages colorimétriques. En raison de leurs propriétés réductrices semblables à celles de la vitamine E, ces substances provoquent des erreurs par excès et des réactions faussement positives. Ceci est à l'origine de l'introduction des méthodes chromatographiques de purification et de séparation dont quelques unes ont été décrites. Les solvants utilisés peuvent également se décomposer et libérer des substances qui faussent les réactions. Les méthodes de purification et de séparation contribuent à rendre les dosages plus fiables et les résultats meilleurs. Mais la séparation des différents tocophérols n'est pas toujours bonne et le temps de travail élevé. C'est pourquoi des méthodes combinant la séparation et la purification avec le dosage sont apparues. La plus performante actuellement nous paraît être la chromatographie liquide à haute performance.

La bonne séparation, la réduction du temps de manipulation, la réduction de la quantité de solvants et de réactifs utilisés, la possibilité d'analyser un nombre plus élevé d'échantillons et l'obtention de résultats fiables et facilement interprétables, sont parmi tant d'autres, des avantages non négligeables qui ont motivé le choix de cette technique dans le cadre de notre travail. Associée à une méthode d'extraction convenable, c'est la technique utilisée pour effectuer notre étude.

En raison de l'intérêt particulier de cette technique, nous en décrivons le principe, le mode opératoire, la préparation des réactifs, les caractéristiques de l'appareillage.

CHAPITRE TROISIEME : PARTIE EXPERIMENTALE

I. - MATERIEL ET METHODE :

Les différentes généralités décrivant aussi bien les caractéristiques du tocophérol que les méthodes de dosage doivent nous permettre de comprendre l'importance de son évaluation dans le sang de l'être humain. Notre étude portera sur l'évaluation de la teneur en vitamine E chez des enfants sains et malnutris de 12 à 48 mois recrutés à travers une enquête épidémiologique. Dans ce chapitre nous développerons les différents aspects de notre travail (échantillonnage, prélèvement, dosage, etc...), tout en notant les difficultés rencontrées lors de la mise en oeuvre de ceux-ci. Enfin nous étudierons les résultats obtenus et les conclusions qui en découlent.

I.1. - Population étudiée :

Le recrutement des différents enfants constituant la population testée est une étape importante. En effet, il est à la base du travail et conditionne l'obtention de résultats interprétables et homogènes.

Notre étude a porté sur un échantillon de 120 enfants âgés de 12 mois (1 an) à 48 mois (4 ans). Tous ces enfants ont été soumis à différents examens cliniques et biologiques :

- un examen nutritionnel couplé à un examen clinique réalisé par les médecins du service de nutrition. Cet examen a servi de base à la répartition de l'échantillon en groupe d'enfants normo-nutris et d'enfants malnutris de différents types ;

- un prélèvement sanguin, réalisé au laboratoire de nutrition en vue de la détermination de la tocophérolémie ;

- un test cytologique réalisé au laboratoire de microbiologie après impression oculaire. Les résultats de ce test seront exploités par comparaison avec l'étude de la teneur en vitamine A (ou rétinol) chez les enfants recrutés.

Tous les enfants recrutés dans notre enquête proviennent de la P.M.I. ou sont régulièrement suivis dans ce service. Aucun enfant n'a été recruté dans d'autres formations sanitaires d'Abidjan (P.M.I. ou Centre Hospitalier). Ceci permet de dire que ces enfants ont fait l'objet d'un contrôle plus ou moins régulier par les médecins et les sages-femmes de l'I.N.S.P. qu'ils soient apparemment sains ou malnutris. Le recrutement repose sur des critères précis définis à l'annexe (1) afin d'éliminer les facteurs qui peuvent rendre les résultats difficilement exploitables.

L'examen nutritionnel couplé à un examen clinique détermine les critères d'inclusion dans l'échantillonnage. Les deux examens sont réalisés par les médecins du service de nutrition.

L'examen clinique comporte l'évaluation de différents paramètres :

- * statut vaccinal (bon, moyen, mauvais, rougeole non faite, etc...).*
- * les antécédents de maladies à savoir : diarrhée, rougeole, paludisme, toux ou simultanément diarrhée et paludisme, etc...*
- * l'existence de maladies autres que la malnutrition parmi lesquelles :*
 - . les affections de la sphère O.R.L. (rhinite, otite) ;*
 - . les pneumopathies, les bronchites, l'asthme ;*
 - . les dermatoses, les candidoses, le pemphigus, etc... ;*
 - . les diarrhées, les infections dysentériques ;*
 - . les furoncles ;*
 - . les anémies cliniques, etc...*

L'examen nutritionnel a porté sur la recherche :

- des signes de malnutrition : l'existence d'un amaigrissement, la nature du cheveu (fin, décoloré, roux), les caractéristiques du visage (bouffi, aminci, etc...).*

- les paramètres anthropométriques que sont :

- . l'âge
- . le poids
- . la taille
- . le périmètre du bras ou PB
- . le périmètre du crâne ou PC
- . le rapport : $\frac{\text{périmètre brachial}}{\text{périmètre crânien}} = PB/PC$

L'affectation d'un statut découle de l'examen de ces différents paramètres et permet de classer les sujets en enfants normo-nutris ou malnutris.

En définitive, nous avons établi deux grands groupes d'enfants :

- Un groupe "témoin" constitué d'enfants recensés normo-nutris :

Ces enfants de 12 à 48 mois sont suivis depuis la naissance par le service de la P.M.I. de l'Institut National de la Santé Publique d'Adjamé. De plus ces enfants présumés normo-nutris doivent être indemnes d'affections et ne doivent présenter ni syndrome inflammatoire, ni fièvre, ni diarrhée, etc... Les résultats obtenus à partir de ce groupe témoin devront servir à l'établissement de valeurs de référence de la vitamine E sanguine (α tocophérolémie) chez l'enfant ivoirien sain. A l'aide de ces résultats, une comparaison sera envisagée avec les résultats du groupe d'enfants malnutris.

- Un groupe "malade" constitué d'enfants recensés malnutris :

Ce groupe est également constitué d'enfants de 12 à 48 mois pris en charge au niveau du service de réhabilitation nutritionnelle de l'I.N.S.P. Ces enfants ont été regroupés suivant leur statut, à la suite de l'examen nutritionnel. Trois grandes classes ont été définies :

- enfants malnutris légers ou mineurs ;
- enfants malnutris modérés ;
- et enfants malnutris sévères constitués des marasmes, kwashiorkors et kwashiorkors-marasmes.

Il nous paraît intéressant de signaler que certains enfants orientés de prime abord comme enfant normonutris au vue de l'examen clinique ont été révélés malnutris par l'examen anthropométrique. Ceci nous montre l'importance de l'examen nutritionnel dans le recrutement des enfants et la nécessité de pratiquer au moins 2 types de tests.

Tous les enfants recrutés à la P.M.I. ou au Service de Nutrition ont été ensuite orientés au Laboratoire de Nutrition. Ces enfants sont identifiés sur une petite fiche comportant le numéro d'ordre ainsi que des renseignements tels que le nom, l'âge exact en mois, la liste des différents examens dans l'ordre de leur réalisation. Ces fiches seront très importantes pour l'étude et l'interprétation des résultats.

Les divers examens sont réalisés en général en deux jours. Cependant certaines mères ne respectent pas les rendez-vous, ceci nous a contraint à recruter un plus grand nombre d'enfants afin d'atteindre le nombre défini initialement c'est-à-dire 120.

1.2. - Prélèvement :

1.2.1. - Conditions de prélèvement :

Le prélèvement se fait tous les matins entre 8 H et 8 H 30, sur les enfants recrutés la veille pour l'étude. Le tocophérol étant liposoluble, le jeûne de l'enfant doit être absolument respecté afin d'éviter l'incidence de l'alimentation sur la vitaminémie E. Le prélèvement se fait avec une aiguille au pli du coude après la pose d'un garot, dans un flacon sec (sans anticoagulant). L'enfant est allongé et maintenu dans cette position. 3 à 5 ml de sang sont généralement prélevés par enfant. Dans certains cas d'enfants malnutris, une quantité moindre a pu être prélevée.

1.2.2. - Traitement des échantillons :

Chaque flacon de prélèvement est identifié par étiquetage avec un numéro d'ordre affecté à l'enfant.

Le flacon est immédiatement bouché et recouvert de papier aluminium pour le protéger de la lumière. On y introduira par un orifice une baguette de verre afin d'activer la formation du caillot. Une fois le caillot formé, le sang est centrifugé le plus rapidement possible à 3.500 tours par minute pendant quinze minutes. Le sérum est ensuite prélevé et introduit dans des tubes à hémolyse également étiquetés.

1.2.3. - Conservation :

Les tubes de sérum sont ensuite bouchés et emballés dans du papier aluminium. Le sérum doit être immédiatement analysé, ou conservé quelques mois au congélateur entre - 18° et - 20° C ou quelques heures à + 4° C.

1.2.4. - Difficultés et contraintes :

La réalisation du prélèvement rencontre certaines difficultés. Il n'est pas aisé d'effectuer des prélèvements sur des enfants, car ils ont facilement tendance à s'agiter quel que soit leur état. Par ailleurs, les enfants présentant une malnutrition (souvent très sévère) sont difficiles à prélever. En effet, leurs veines sont difficiles à trouver et sont le plus souvent aplaties. Parfois, un prélèvement au dos de la main, malheureusement très douloureux a dû être pratiqué lorsque le prélèvement au pli du coude est impossible.

Enfin d'autres difficultés liées à l'indiscipline des mères qui arrivent avec des enfants ayant déjà mangé ou tété rendent nécessaire leur reconvoction.

1.3. - Evaluation de la teneur en vitamine E dans les sérums humains :

1.3.1. - Matériel :

1.3.1.1. - Verrerie et accessoires :

La verrerie utilisée au cours de nos manipulations comprend :

- des flacons secs pour le prélèvement ;
- des baguettes de verre pour activer la formation du caillot ;
- des tubes à hémolyse avec bouchon ;
- une éprouvette graduée de 500 millilitres ;
- des pipettes de 0,1 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 millilitres ;
- un dispositif de distillation (ballons, colonne de rectification, réfrigérant).

Parmi les accessoires, nous pouvons citer :

- du papier filtre millipore ;
- un agitateur VORTEX pour assurer les mélanges ;
- une bouteille d'azote ;
- un thermomètre ;
- du papier aluminium servant à protéger les échantillons de la lumière ;
- une centrifugeuse réfrigérée.

1.3.1.2. - Etalons :

Des substances de référence sont utilisées comme substance étalon. C'est le cas de l' *α*-tocophérol, Merck Art 8283 (*α*-tocophérol). Celui-ci sera utilisé pour l'établissement d'une gamme en vue de tracer la courbe d'étalonnage.

Le tocophérol acétate (*α*-tocophérol acétate) Merck Art 8284 est utilisé comme étalon interne. Cette substance de référence sera utilisée pour préparer une seconde gamme d'étalonnage.

Les vitamines et dérivés sont généralement des substances sensibles à la température et à la lumière. De ce fait, elles doivent être conservées à l'abri de la lumière et au congélateur.

1.3.1.3. - Solvants :

Les solvants nécessaires pour la réalisation des dosages sont :

- l'eau distillée ;
- le méthanol distillé ;
- l'éthanol absolu pur, RIEDEL - DE HAEN AG SEELZE 24103 ;
- l'hexane, MERCK 4367.

Le dosage est réalisé par H.P.L.C. en phase inverse.

1.3.1.4. - Appareillage :

Nous distinguons :

. Le dispositif de filtration sur millipore :

Cet ensemble comprend :

- un entonnoir de 300 ml ;
- un support à filtre avec verre fritté interchangeable ;
- une pince de serrage ;
- une fiole à vide d'un litre.

Ce dispositif permet de réaliser une filtration sous vide.

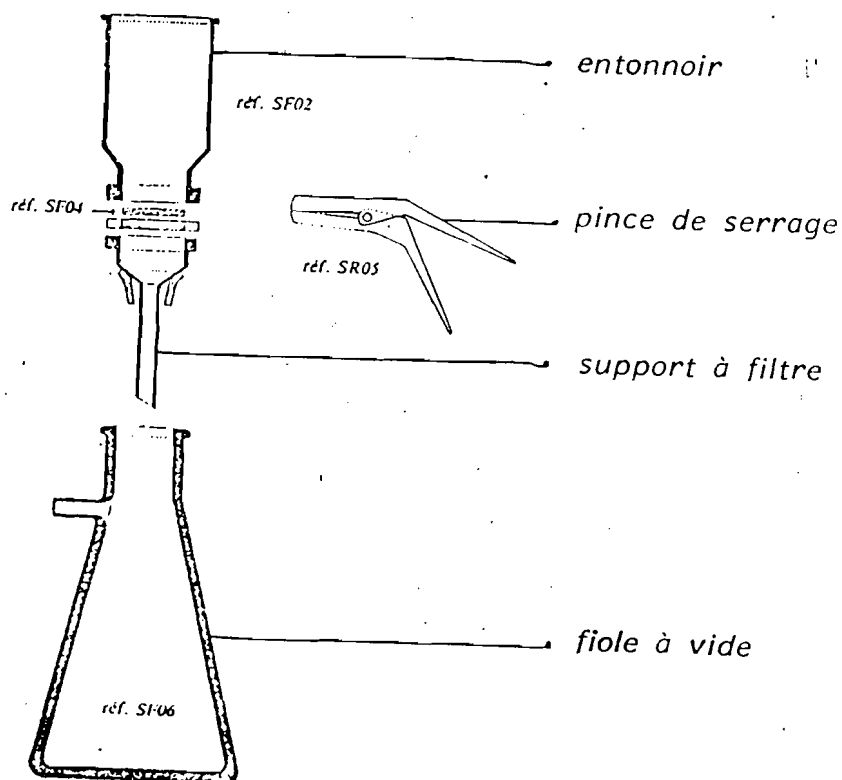


Schéma V : Dispositif de filtration sur millipore

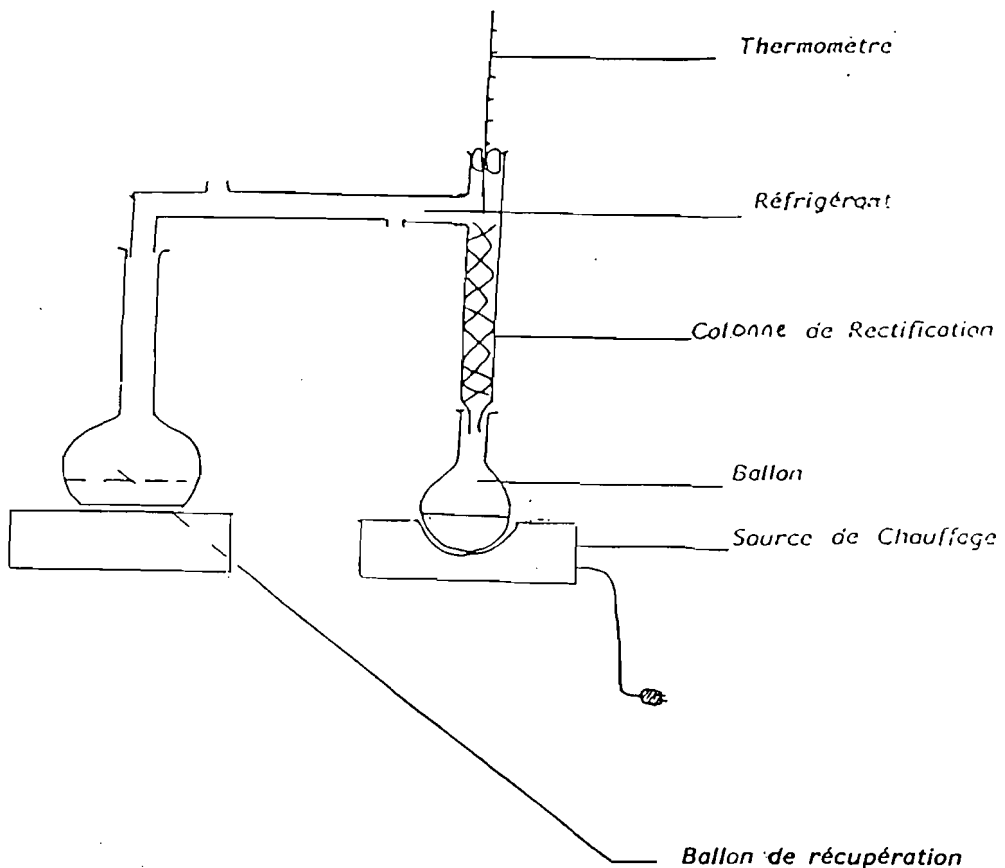
. Le dispositif de distillation :

La distillation permet la séparation de constituants liquides en se basant sur leurs volatilités différentes. Les températures de distillation sont pour l'eau 100° C et pour le méthanol de 64° C (Schéma VI).

Il comprend :

- Deux ballons ;
- Un réfrigérant relié à une source d'eau ;
- Une colonne de rectification ;
- Un thermomètre pour contrôler la température de distillation.

Schéma VI : Dispositif de distillation.



. La centrifugeuse :

La centrifugeuse utilisée est de marque JOUAN. Elle présente l'avantage de pouvoir réaliser des centrifugations à des températures variant de - 8° C à 25° C.

. Le dispositif d'évaporation :

Une bouteille d'azote est reliée à un système d'alimentation permettant d'assurer l'évaporation à sec des extraits hexaniques (par série de 6 maximum).

. Le Chromatographe H.P.L.C. :

L'appareil utilisé est un chromatographe GILSON dont les différents éléments sont :

- le réservoir de phase mobile qui est un flacon de verre de 1.000 ml contenant la phase mobile ;
- les pompes à piston (au nombre de deux A et B) ;
- la chambre de mélange (GILSON 811 M) ; mais le dosage est réalisé en système isocratique, c'est-à-dire que le mélange de la phase mobile est préparé à l'avance ;
- l'injecteur manuel d'échantillon de type RHEODYNE 7125 avec une boucle de 20 microlitres utilisé pour des séparations analytiques.

- la colonne de phase inverse de type ZORBAX ODS (ODS = Octodécylsilane) dont les caractéristiques sont : 4,6 mm ID X 15 cm ODS, le diamètre des particules est de 5 μ . Elle est par ailleurs munie d'une précolonne dont le rôle est d'éliminer les différentes impuretés susceptibles d'encrasser et de dégrader la colonne ;
- le détecteur utilisé est un détecteur à ultra-violet UV GILSON modèle 116. Cet appareil nous offre en outre la possibilité de travailler à des longueurs d'onde variables ;
- le système enregistreur assure le traitement des données.

Le programmeur de systèmes est un micro-ordinateur APPLE II. Deux logiciels sur les disquettes 704 (WORK COPY, H.L.P.C. Manager) et 620 : (DATA MASTER, GILSON, modèle 920) permettent le dosage analytique par H.L.P.C. L'intégrateur-enregistreur enregistre le chromatogramme en temps réel. Dans notre cas, les pics sont proportionnels aux concentrations à étudier et les surfaces sont imprimées en pourcentage. L'appareillage est relié à un générateur (Micropac S X 1 200) qui lui permet une certaine autonomie de fonctionnement en cas de coupure électrique.

1.3.2. - Mode opératoire :

1.3.2.1. - Préparation de la phase mobile :

La phase mobile est un mélange méthanol/eau 99/1 (volume pour volume V/V). Elle est préparée par fraction de 500 millilitres dans une éprouvette graduée.

Le mélange est filtré et dégazé sur millipore sous vide (voir dispositif de filtration). Une fois la filtration réalisée, il est nécessaire de continuer à dégazer le solvant par agitation légère tout en maintenant le vide. La phase mobile sera ensuite disposée dans le réservoir de phase mobile en évitant la formation de bulles d'air.

1.3.2.2. - Conditions opératoires :

Les conditions d'analyse sont :

- débit : 1,8 mm/mn ;
- phase mobile : méthanol/eau 99/1 (V/V) ;
- longueur d'onde de travail : 290 nm.

Avant l'imprégnation de la colonne par la phase mobile, il est nécessaire de purger le circuit d'analyse. Ainsi, la vanne d'alimentation étant ouverte, la pression affichée au niveau du manomètre étant nulle (000), nous vérifions le bon fonctionnement de la phase mobile et l'absence de bulles d'air dans le circuit.

Lorsque les bulles d'air persistent, elles devront être retirées du système par une purge.

L'imprégnation de la colonne par la phase mobile se fait après fermeture de la vanne, en augmentant progressivement le débit des pompes jusqu'à atteindre le débit d'analyse.

Les différentes données concernant le dosage par C.L.H.P. sont disponibles sur le logiciel 704.

Deux options sont possibles :

- le dosage manuel ;*
- le dosage automatique.*

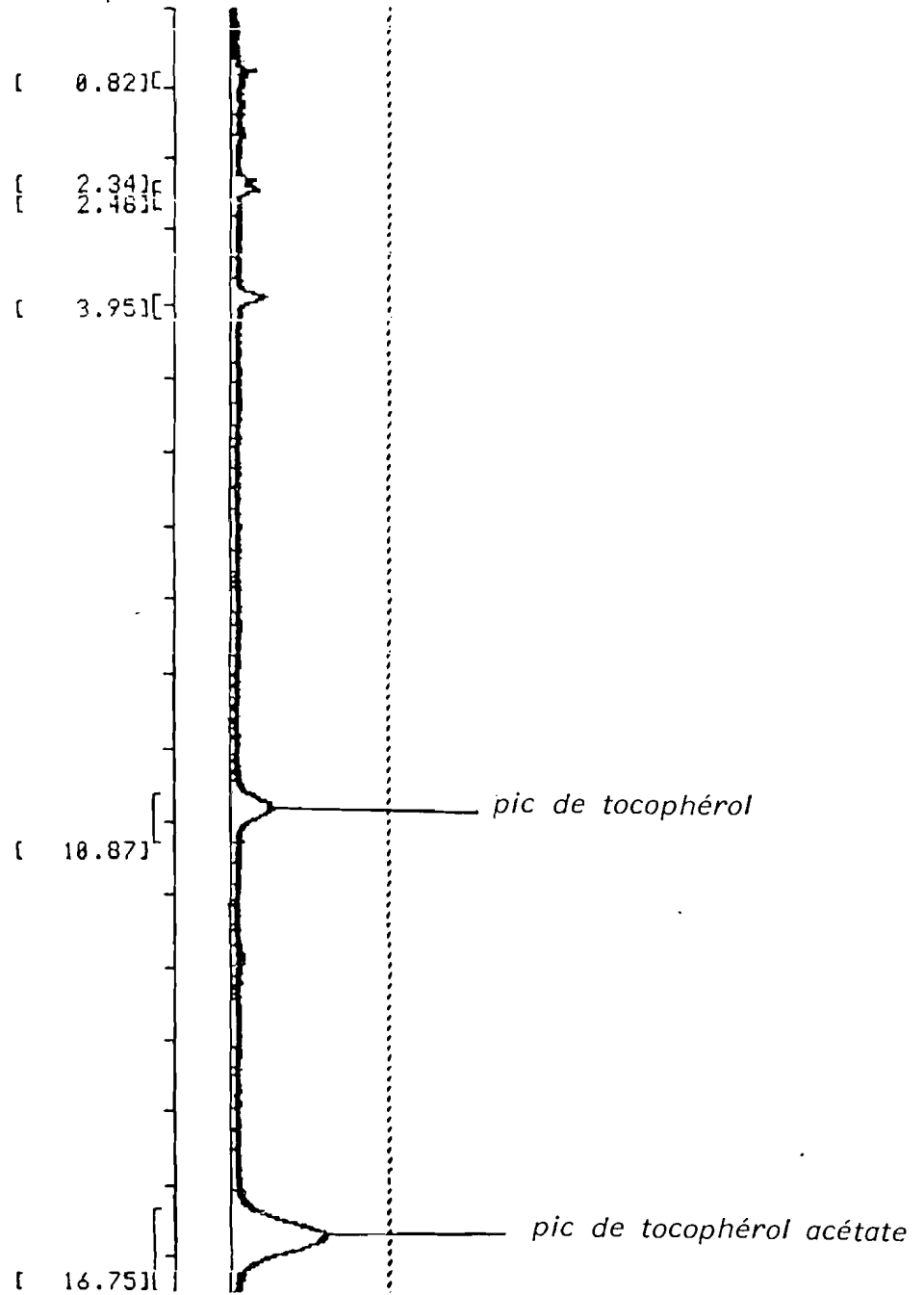
Nous avons opté pour le dosage automatique où toutes les données contenues dans le programme VITE (Channel, Scale, Offset, Chart Speed, etc...), le temps d'analyse de chaque échantillon, le traitement des résultats sont inclus.

La boucle d'injection est de 20 μ l. Il est possible en outre, d'arrêter l'analyse avant la fin du temps d'analyse déterminé.

L'imprimante délivre les pics ainsi que les surfaces en pourcentage (voir exemple de résultats).

Figure 1 : Exemple de chromatogramme.

Date: 6/ 5/98 Time: 11: 2:39
Chart Speed: 10 mm/min



Sur le plan pratique et en raison de la consommation importante de la phase mobile, nous avons redistillé le solvant de récupération. Cette façon de procéder nous a permis de réduire le coût des analyses.

1.3.3. - Validation des conditions opératoires :

1.3.3.1. - L'étalonnage :

Deux gammes étalons ont été effectuées. Le principe est de réaliser des dilutions décroissantes d'une solution concentrée (α tocophérol et α tocophérol acétate) et de tracer des courbes d'étalonnage à partir des résultats obtenus.

. Courbe d'étalonnage de l' α tocophérol :

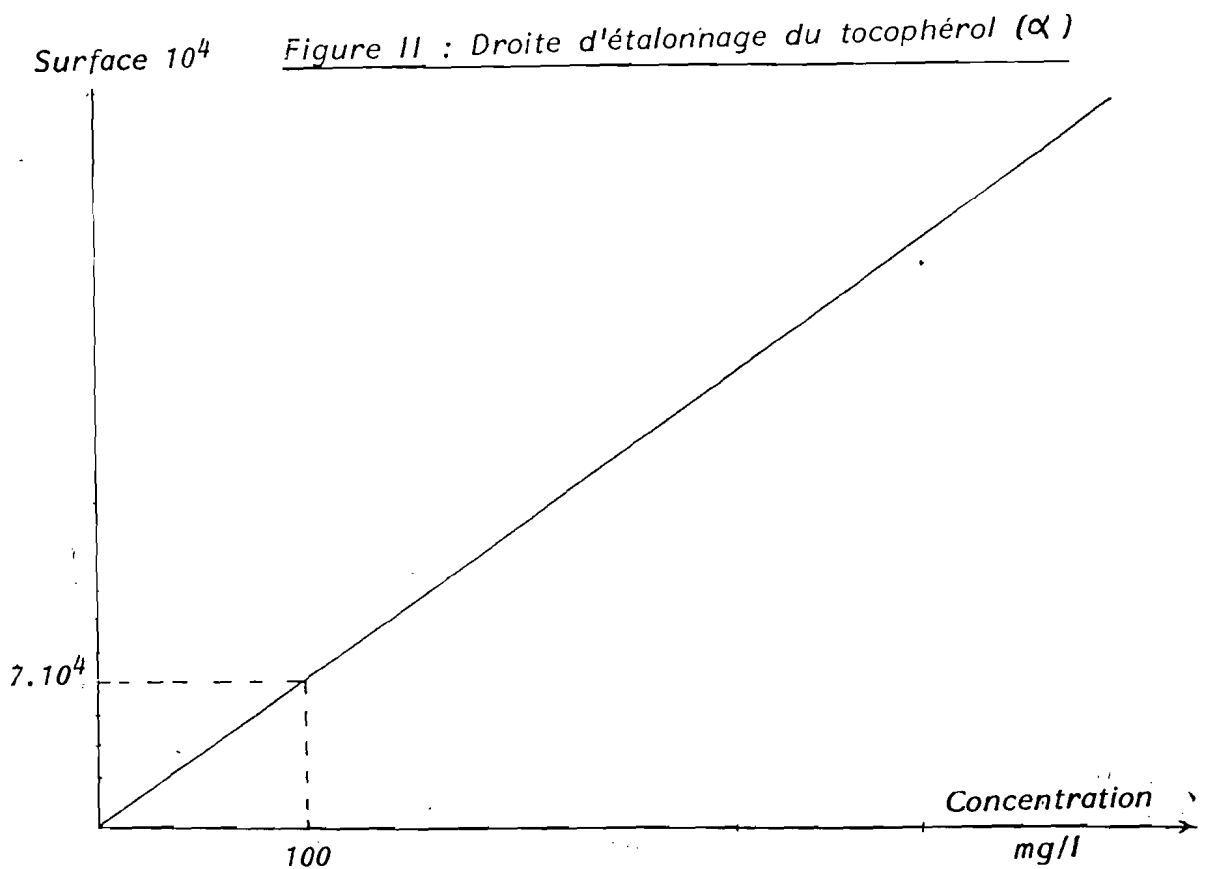
La prise d'essai est de 1 gramme d' α tocophérol. La dilution est effectuée dans une fiole jaugée de 10 millilitres. La solution mère obtenue correspond donc à 100 mg/ml. Ensuite l'on réalise des dilutions successives. Un volume de 20 μL de chaque dilution est injecté dans l'appareil.

Les dilutions, concentrations et surfaces obtenues sont résumées dans le tableau V :

DILUTION	CONCENTRATION (mg/l)	SURFACE
1/2000	50	36.445
1/1000	100	72.845
1/500	200	155.395
1/200	500	279.050

Tableau V : Etalonnage de l' α tocophérol.

A partir de ces résultats, l'on trace la droite d'étalonnage à partir de la surface en fonction de la concentration (voir Droite I).



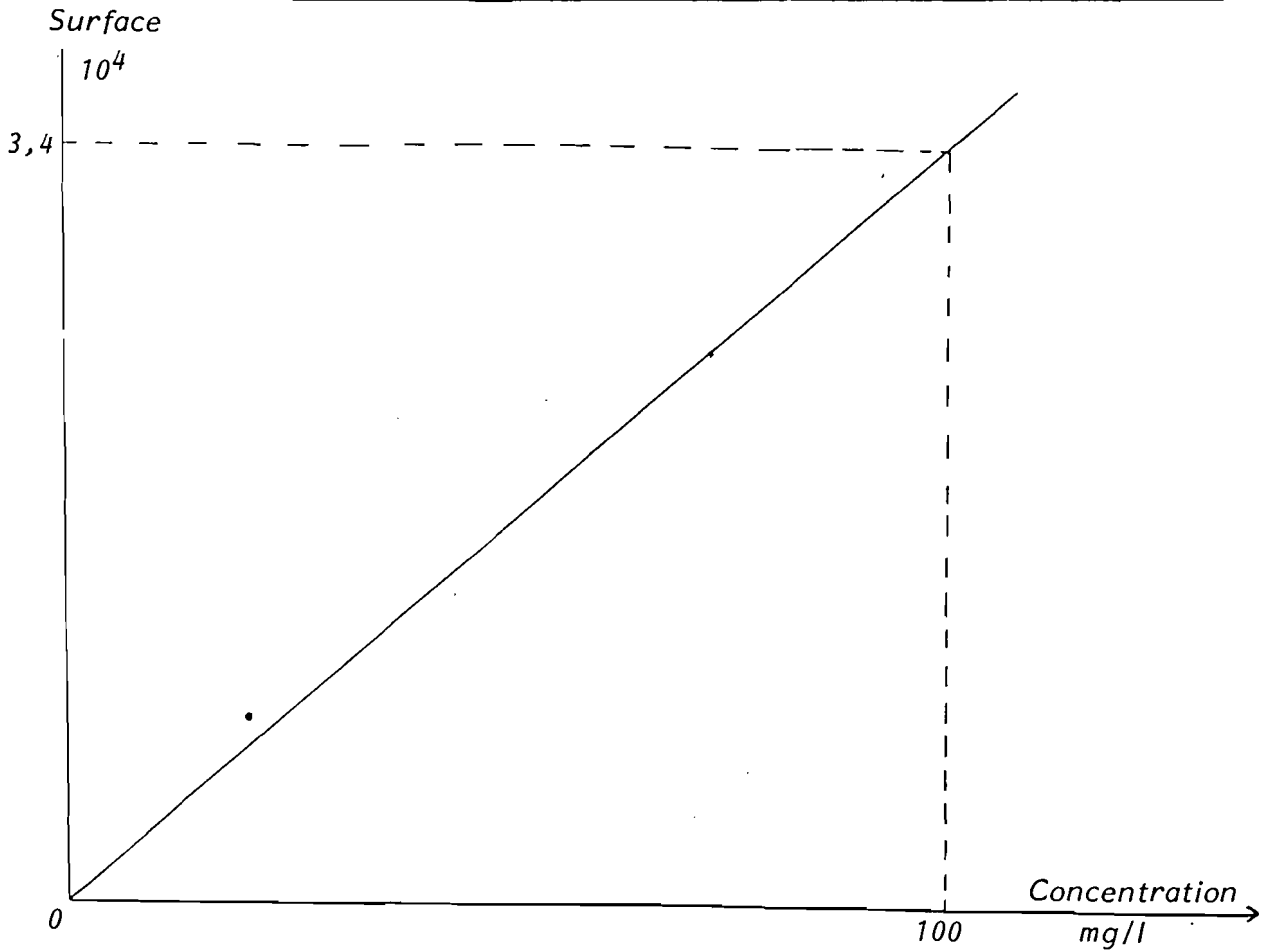
. Courbe d'étalonnage de l' α tocophérol acétate :

La préparation de la solution mère est identique. L'on obtient également une solution à 100 mg/ml, des dilutions sont réalisées et 20 μ l de chaque dilution sont injectés. Le tocophérol acétate étant plus lourd, le pic sortira après celui de l' α tocophérol. Le tableau VI résume tous les résultats.

Tableau VI : Etalonnage de l' α tocophérol acétate.

DILUTION	CONCENTRATION (mg/l)	SURFACE
1/3.000	33	14.370
1/2.500	40	14.565
1/1.750	57	19.910
1/1.500	67	25.800
1/1.250	80	27.150
1/100	100	27.520

Figure III : Droite d'étalonnage du tocophérol acétate (α)



1.3.3.2. - Validation de la méthode d'analyse :

Dans le but de proposer des résultats fiables, nous avons étudié les différents paramètres qui permettent de valider les conditions opératoires. Cette validation de la méthode a porté sur la vérification de la précision de celle-ci et sur la linéarité de réponse du système.

- Précision de la méthode :

Pour étudier ce paramètre, nous avons utilisé une solution extemporanée d'étalon interne (α tocophérol acétate) à 100 mg/l. La quantité injectée est de 20 μ l. Cette manipulation a été répétée dix fois et les résultats ont permis d'apprécier la précision de la méthode de détection.

Les résultats obtenus sont les suivants.

SURFACE DU PIC	34 500	34 880	35 290	35 840	34 500	31 660	35 700	33 555	32 970	33 445
CONCENTRATION (mg/l)	101,5	102,5	103	105,5	101,5	93	99,5	98,5	97	98

Tableau VII : Précision de la méthode de détection.

La moyenne des concentrations est de 100 mg/l.

L'écart type est de 3,57.

Le coefficient de variation est de 3,57 %.

La valeur du coefficient de variation 3,57 % inférieure à 10 % nous permet de conclure que les conditions opératoires assurent une précision satisfaisante.

- Linéarité des droites :

La linéarité des courbes d'étalonnage (d' α tocophérol et d' α tocophérol acétate) a été mise en évidence par la recherche d'une proportionnalité entre la surface des pics et la concentration connue d' α tocophérol étalon.

Dans ces conditions :

$$C_i = K_i \times A_i$$

où C_i : Concentration du composé à injecter

A_i : Surface du pic

K_i : Facteur de réponse encore appelé coefficient de proportionnalité.

La mesure de K_i peut être effectuée par étalonnage direct.

Dans le cas du tocophérol, les valeurs obtenues à partir de la droite d'étalonnage sont :

$$- C_1 = 100 \text{ mg/l} ; A_1 = 7.10^4$$

$$- C_2 = 200 \text{ mg/l} ; A_2 = 14.10^4$$

$$K_T = \frac{C_1}{A_1} = \frac{C_2}{A_2} = 1,42.10^{-3}$$

Pour le tocophérol acétate, les surfaces des pics correspondant aux concentrations choisies sont :

$$C'_1 = 50 \text{ mg/l} \quad A'_1 = 1,7 \cdot 10^4$$

$$C'_2 = 100 \text{ mg/l} \quad A'_2 = 3,4 \cdot 10^4$$

$$K'_T = \frac{C'_1}{A'_1} = \frac{C'_2}{A'_2} = 2,94 \cdot 10^{-3}$$

La linéarité des deux courbes d'étalonnage peut être admise car il y a proportionnalité entre les concentrations des substances injectées et les surfaces des pics obtenus.

1.3.4. - Dosage des échantillons :

Le dosage peut s'appliquer aussi bien au plasma qu'au sérum. Notre étude concerne le dosage de la vitamine E dans le sérum des enfants.

Le principe du dosage est le suivant :

Le tocophérol sérique, libéré de son complexe protéique par l'éthanol, est extrait à l'hexane après addition d'un étalon interne (α tocophérol acétate). Sur une aliquote d'hexane évaporée à sec, reprise par du méthanol, la chromatographie est réalisée en quelques minutes sur une colonne en phase inverse.

Comme nous l'avons mentionné, chaque échantillon à analyser sera extrait en même temps que l'étalon interne.

Le dosage de la vitamine A et la vitamine E étant réalisé simultanément, l'étalon interne sera un mélange de rétinyl acétate et de tocophérol acétate. Dans notre cas nous avons préparé une solution de tocophérol acétate à 100 milligrammes par litre. Ceci à partir de la solution mère à 100 mg/l en réalisant une dilution au 1/1000e.

L'extraction se fait de la manière suivante :

Introduire dans un tube à hémolyse identifié :

- 100 μ l de sérum ;
- 100 μ l de l'étalon interne (rétinyl acétate + tocophérol acétate) ;
- 100 μ l d'éthanol absolu pur ;
- mélanger au Vortex 1 X 20 secondes ;
- puis ajouter 400 μ l d'hexane ;
- mélanger à nouveau au Vortex 2 X 30 secondes ;
- centrifuger à 3.500 tours/mn et à 0° C pendant 10 minutes ;

- prélever 300 μ l de surnageant organique contenant les vitamines liposolubles ;
- évaporer à sec sous courant d'azote ;
- reprendre le résidu par 100 μ l de méthanol.

La quantité injectée sera de 20 μ l.

Remarques :

L'extrait doit être analysé immédiatement car les substances à doser sont très fragiles et se dégradent rapidement. Il pourra éventuellement être analysé après conservation à - 20° C avant 24 heures. Au mieux il est recommandé d'effectuer l'analyse immédiatement.

Des précautions particulières sont recommandées :

- travailler rapidement ;
- éviter un éclairage trop intensif pendant la durée de la manipulation ;
- effectuer les différents prélèvements à la seringue Hamilton pour plus de précision.

La seringue servant à prélever le sérum ne doit pas être rincée à l'éthanol, afin d'éviter la précipitation des protéines qui peuvent colmater la seringue.

- respecter les temps de mélange au Vortex.

Une fois l'extraction réalisée, le dosage est effectué sur l'extrait obtenu.

La technique d'extraction ainsi que celle du dosage sont aisées à réaliser. La fiabilité et la sélectivité de la méthode ont été prouvées. Le temps d'analyse est relativement court et cette technique peut être utilisée pour les dosages de routine.

A l'issue de ces recommandations, nous passons à l'exploitation des résultats obtenus après l'analyse de ces 120 échantillons.

II. - RESULTATS ET DISCUSSION :

Nous avons utilisé une formule simple tenant compte des courbes d'étalonnage pour le calcul des concentrations à partir des surfaces de pics obtenus.

La formule utilisée est la suivante :

$$C_j = \frac{S_{vit E} \text{ échantillon} \times S_{T.A} \text{ gamme étalon} \times C_T \text{ gamme étalon}}{S_{T.A} \text{ échantillon} \times S_T \text{ gamme étalon}}$$

où C_j = concentration en tocophérol dans l'échantillon (i) en mg/l

$S_{vit E}$
échantillon = surface correspondante en tocophérol obtenue dans l'échantillon (i).

$S_{T.A}$
gamme étalon = surface correspondante en tocophérol acétate obtenue à partir de la courbe d'étalonnage pour une concentration de 100 mg/l (concentration à laquelle l'étalon interne est présent dans chaque échantillon).

C_T
gamme étalon = concentration en tocophérol dans la gamme étalon, en mg/l.

S_T
gamme étalon = surface correspondante en tocophérol obtenue à partir de la courbe d'étalonnage pour une concentration C_T .

$S_{T.A}$
échantillon = surface correspondante en étalon interne (tocophérol acétate) obtenue pour une concentration connue de 100 mg/l.

Il faut préciser le rapport $\frac{S_{TA}}{S_{TA}}$ gamme étalon correspond à la $\frac{S_{TA}}{S_{TA}}$ échantillon

correction systématique que l'on réalise en introduisant un étalon interne. D'autre part, certaines valeurs au niveau de la formule sont des constantes. En effet :

$$\frac{S_{TA}}{\text{gamme étalon}} = 34.000$$

$$\frac{C_T}{\text{gamme étalon}} = 100 \text{ mg/l}$$

$$\frac{S_T}{\text{gamme étalon}} = 70.000$$

Nous pouvons donc écrire que :

$$C_i = \frac{S_{\text{vit E}}}{\frac{S_{T.A}}{\text{échantillon}}} \times K \quad \text{où} \quad K = \frac{S_{T.A} \times \frac{C_T}{\text{gamme étalon}}}{S_T \text{ gamme étalon}}$$
$$= \underline{48,57}$$

Les résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux suivants en fonction de l'état nutritionnel.

Tableau VIII : Paramètres pour les enfants nonnutris.

N°	Taux Vit, E mg/l	Age mois	Poids Kg	Taille Cm	Per B mm	Per C mm	PB/PC
1	12.03	14	11.90	78.00	170	460	0.37
3	11.10	15	11.00	82.00	150	470	0.32
4	6.90	24	11.80	89.00	160	455	0.35
6	17.54	24	13.71	90.00	160	470	0.34
8	8.14	12	9.35	73.50	145	480	0.30
13	10.48	31	12.00	90.00	150	470	0.32
17	7.82	16	9.80	79.00	180	440	0.41
18	12.63	13	11.20	80.00	150	450	0.33
19	11.23	25	11.10	87.00	140	470	0.30
20	10.62	18	9.80	78.00	140	470	0.30
21	7.79	17	11.50	80.00	150	460	0.33
25	9.10	20	9.60	78.00	145	450	0.32
26	8.75	22	10.50	83.50	160	490	0.33
29	9.94	16	10.40	80.00	160	460	0.35
31	11.53	12	9.70	77.00	150	470	0.32
35	7.69	48	15.10	94.00	170	500	0.34
37	17.27	13	11.50	78.00	165	475	0.35
38	10.35	17	10.60	79.00	155	450	0.34
40	25.69	14	10.60	77.00	155	450	0.34
41	9.25	34	12.50	87.50	160	480	0.33
43	17.67	16	10.30	79.00	145	450	0.32
44	22.81	14	8.80	69.00	130	460	0.28
45	10.35	20	9.05	79.00	150	445	0.34
46	6.94	18	10.20	79.50	165	455	0.36
47	13.40	23	11.50	82.50	155	500	0.31
49	11.92	16	9.40	75.50	150	465	0.32
50	8.09	33	11.75	89.00	150	460	0.33
52	15.07	13	9.15	74.00	145	430	0.34
53	8.68	13	8.70	74.50	145	450	0.32
55	5.65	18	11.75	83.50	160	480	0.33
56	6.96	21	11.85	83.50	160	485	0.33
57	13.12	17	9.55	76.00	140	470	0.30
58	6.83	20	10.55	80.50	150	460	0.33
59	8.16	21	10.70	84.50	150	470	0.32
60	9.64	32	14.00	91.50	170	480	0.35
61	13.28	17	11.00	80.50	160	470	0.34
63	6.95	19	12.00	85.50	155	470	0.33
64	11.03	20	11.00	79.00	170	465	0.37
65	14.36	14	9.45	78.00	140	455	0.31
67	16.62	24	10.75	83.50	145	470	0.31
68	11.33	23	10.60	82.00	150	450	0.33
69	6.28	29	13.35	88.00	160	475	0.34
70	6.08	17	9.65	77.00	140	470	0.30
71	11.40	13	11.35	78.00	155	475	0.33
72	8.57	17	11.00	72.00	155	490	0.32
73	9.71	14	8.00	80.00	140	450	0.31
77	12.22	13	9.25	76.00	140	445	0.31
78	11.30	14	10.20	76.50	145	470	0.31
80	11.18	16	8.50	73.00	145	430	0.34
82	27.03	17	10.20	76.50	145	470	0.31
92	7.62	16	13.00	82.00	165	480	0.34
93	7.76	17	10.10	48.00	140	480	0.29
94	8.74	19	11.05	83.50	140	480	0.29
95	5.60	16	8.90	47.50	135	475	0.28
97	26.39	46	14.30	96.00	160	505	0.32
105	11.79	22	10.90	77.50	150	470	0.32
106	13.04	36	14.90	96.50	160	490	0.33
107	15.04	13	9.05	75.00	140	455	0.31
116	7.59	19	12.90	86.00	160	500	0.32
119	10.20	20	11.00	82.00	150	470	0.32

Tableau IX : Paramètres pour les enfants malnutris mineurs.

N°	Taux Vit. E mg/l	Age mois	Poids Kg	Taille Cm	Per B mm	Per C mm	PB/PC
33	15.59	19	7.50	67.00	120	410	0.29
39	21.04	12	6.80	71.00	120	440	0.27
79	7.78	14	6.50	71.00	110	430	0.26
86	8.05	14	7.40	72.00	130	455	0.29
89	18.88	14	6.50	70.50	120	445	0.27
90	21.37	19	7.70	78.00	125	430	0.29
101	9.26	28	8.40	77.50	115	480	0.24
111	8.82	13	8.50	77.00	120	470	0.26
120	8.38	15	7.70	78.00	120	450	0.27
126	6.48	12	8.10	77.00	130	455	0.29
128	11.80	19	7.05	72.50	125	435	0.29
129	17.15	22	9.00	82.00	130	480	0.27
130	26.67	12	5.95	67.00	115	430	0.27
132	8.50	18	8.50	80.00	120	470	0.26
139	10.83	17	8.20	76.00	120	470	0.26
141	12.15	12	7.30	73.50	125	440	0.28
143	10.49	26	8.00	77.00	120	470	0.26
146	17.89	26	9.25	86.00	120	475	0.25
149	13.52	16	7.00	72.00	120	470	0.26
154	9.71	13	6.75	71.50	120	440	0.27
155	8.82	13	6.65	73.00	120	440	0.27

Tableau X : Paramètres pour les enfants malnutris modérés.

N°	Taux Vit. E mg/l	Age mois	Poids Kg	Taille Cm	Per B mm	Per C mm	PB/PC
5	7.23	14	8.40	75.00	135	470	0.29
34	15.04	16	8.50	77.00	130	455	0.29
81	12.38	13	6.50	67.00	115	455	0.25
84	5.29	12	6.90	72.00	115	465	0.25
85	6.90	13	6.60	72.00	115	435	0.26
91	10.20	12	7.20	71.00	120	435	0.28
113	13.49	21	8.70	79.00	130	445	0.29
131	8.83	13	8.40	75.00	135	440	0.31
136	6.03	13	7.30	69.00	130	435	0.30
137	10.30	27	9.45	82.00	115	495	0.23
138	12.13	15	8.25	78.00	125	445	0.28
140	16.21	14	8.05	75.00	125	460	0.27
144	5.89	15	8.40	77.00	115	470	0.24

Tableau XI : Paramètres pour les cas de kwashiorkor.

N°	Taux Vit. E mg/l	Age mois	Poids Kg	Taille Cm	Per B mm	Per C mm	PB/PC
10	3.70	17	10.50	73.00	160	460	0.35
27	2.71	16	7.50	74.00	110	460	0.24
62	2.60	23	10.50	78.00	135	475	0.28
83	4.22	21	7.65	77.00	115	470	0.24
99	9.64	23	10.10	81.00	130	455	0.29
110	4.85	21	6.20	75.00	100	465	0.22
112	15.10	19	7.60	74.00	110	450	0.24
118	2.81	34	8.90	82.00	125	465	0.27
125	13.66	27	10.50	84.50	135	460	0.29
142	7.79	24	8.00	82.50	120	470	0.26
147	4.85	25	10.65	85.00	140	460	0.30

Tableau XII : Paramètres pour les cas de marasme.

N°	Taux Vit. E mg/l	Age mois	Poids Kg	Taille Cm	Per B mm	Per C mm	PB/PC
23	6.51	24	7.90	80.00	110	470	0.23
28	3.15	28	7.85	80.50	105	465	0.23
30	8.36	21	6.50	75.00	95	455	0.21
100	5.39	16	7.80	81.00	100	450	0.22
102	7.47	13	5.90	70.00	105	420	0.25
103	4.82	22	7.65	81.00	100	450	0.22
104	5.51	30	8.70	85.00	115	460	0.25
134	4.30	13	7.85	75.50	130	435	0.30
148	8.58	12	5.90	67.00	110	430	0.26
151	8.83	22	5.30	74.50	90	420	0.21

Tableau XIII : Paramètres pour les cas de kwashiorkor-marasme.

N°	Taux Vit. E mg/l	Age mois	Poids Kg	Taille Cm	Per B mm	Per C mm	PB/PC
76	11.33	19	7.98	76.00	100	465	0.22
121	11.48	13	9.00	87.00	110	480	0.23
124	10.22	18	7.20	77.00	105	470	0.22
152	6.48	30	8.75	83.50	110	480	0.23
153	10.76	18	8.55	75.00	120	470	0.26

Tableaux comparatifs des paramètres des différentes
formes de malnutrition sévère.

L'étude a porté sur 120 enfants répartis de la manière suivante, à l'issue de l'examen nutritionnel et anthropométrique :

- 60 enfants normnutris ou sains ;*
- 60 enfants malnutris répartis en :*

- . 13 malnutris mineurs (soit 21,7 % des malnutris) ;*
- . 21 malnutris modérés (soit 36 % des malnutris) ;*
- . 26 malnutris sévères*

parmi lesquels :

- . 10 cas de marasme (soit 16,7 % des malnutris) ;*
- . 11 cas de kwashiorkor (soit 18,3 % des malnutris) ;*
- . 5 cas de kwashiorkor-marasme (soit 8,3 % des malnutris).*

Les 120 enfants recrutés sont âgés de 12 à 48 mois avec une moyenne d'âge de 19 mois.

Les 60 enfants sains ont une moyenne d'âge de 20 mois.

Les 60 enfants malnutris ont une moyenne d'âge de 18 mois.

Le groupe d'enfants recrutés est constitué de 57 filles soit 47,50 % de l'effectif et de 63 garçons soit 52,50 % de l'effectif.

REPARTITION DE LA POPULATION DES MALNUTRIS

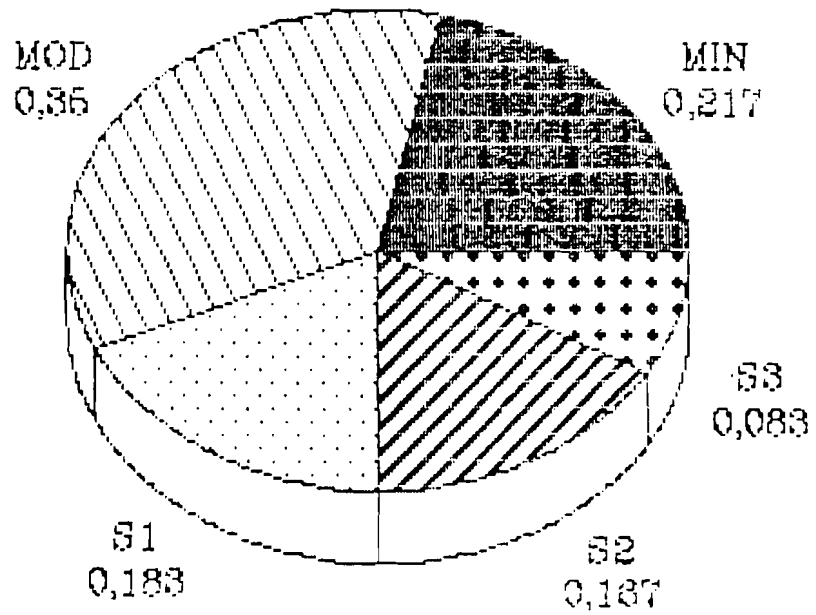


Figure IV

Dans le groupe des enfants normnutris, nous avons recensés 26 garçons (43,34 %) et 34 filles (56,66 %).

La répartition selon le sexe dans le groupe des enfants malnutris est de 31 garçons (51,66 %) pour 29 filles (48,34 %).

Cinq paramètres ont servi à la réalisation de l'examen nutritionnel. Ce sont le poids, la taille, le périmètre brachial, le périmètre crânien, le rapport $\frac{\text{périmètre brachial}}{\text{périmètre crânien}}$.

Nous avons étudié les deux groupes d'enfants que sont les normnutris et les malnutris. La comparaison des valeurs moyennes de chaque groupe montre qu'elles sont significativement différentes à un risque d'erreur usuel de 1 %. Ainsi nous pouvons affirmer que le groupe des enfants normnutris peut être considéré comme groupe de référence. Les résultats obtenus avec ce groupe par comparaison avec les normes proposées par la littérature, peuvent donc servir pour l'exploitation des valeurs obtenues au niveau des enfants malnutris.

PARAMETRES	P O P U L A T I O N		Ecart réduit à la moyenne Σ_m
	Enfants sains (60)	Enfants malnutris (60)	
Taille (cm)	80,03 $\pm 8,31$	76,21 $\pm 4,95$	3,03
Poids (kg)	10,89 $\pm 1,56$	7,87 $\pm 1,19$	12,08
Périmètre brachial (mm)	152,08 $\pm 10,09$	118,92 $\pm 11,90$	16,33
Périmètre crânien (mm)	467,33 $\pm 16,23$	455,00 $\pm 17,67$	3,95
<u>Périmètre brachial</u> Périmètre crânien	0,33 $\pm 0,02$	0,26 $\pm 0,02$	23,33

Tableau XIV : Exploitation des paramètres anthropométriques chez les enfants normnutris et malnutris.

La revue de la littérature nous indique que la plupart des travaux effectués dans le domaine de la vitamine E concernent essentiellement les prématurés, les nouveaux-nés et les adultes (6) (11) (14) (17) (28). Des normes de référence se rapportant à ces sujets ont ainsi été déterminées. Par contre aucun intervalle précis de valeurs n'est proposé pour la tranche d'âge recrutée dans le cadre de notre travail, à savoir de 12 à 48 mois. Dans ces conditions nous avons choisi comme normes les valeurs allant de 5 à 16 mg/l, en nous inspirant des autres valeurs proposées par la littérature (7) (14).

Dans le cas du groupe des enfants normo-nutris, l'interprétation statistique des résultats nous révèle un taux moyen de 11,38 mg/l avec un écart type de 4,79. L'intervalle de valeurs de 6,59 à 16,17 mg/l est relativement proche de celui proposé par la littérature. De plus environ 86,6 % des teneurs en tocophérol de ce groupe appartiennent aux normes de la littérature.

L'étude de la moyenne des taux en fonction du sexe des enfants recrutés n'objective pas de différence significative avec des valeurs de l'ordre de :

- 11,51 mg/l chez les garçons ;
- 11,23 mg/l chez les filles.

De même l'exploitation de la tocophérolémie en fonction de l'âge ne met en évidence aucune différence significative.

A partir de ces données essentielles nous effectuerons une comparaison de nos résultats par rapport à l'intervalle de référence allant de 5 à 16 mg/l.

Dans le groupe des enfants malnutris, 83,3 % des valeurs obtenues sur les 60 cas sont inclus dans l'intervalle de 5 à 16 mg/l. Le taux moyen obtenu est de 9,99 mg/l. Ce taux est plus faible que celui du groupe précédent, même s'il appartient à l'intervalle. La différence de moyenne entre ces deux classes n'est pas significative en raison de l'écart type élevé. Dans le souci d'exploiter au mieux nos résultats, nous avons subdivisé les enfants malnutris en sous-classes. Les valeurs des moyennes sont difficiles à exploiter parce que contradictoires. Ainsi, les taux moyens obtenus pour les malnutris mineurs d'une part et pour les malnutris modérés d'autre part sont de 9,99 mg/l et 13,01 mg/l. Ces deux valeurs appartiennent à l'intervalle de référence. Cependant la comparaison s'avère assez difficile avec le groupe des enfants normonutris. En effet, lorsque nous regroupons les malnutris mineurs et modérés en une sous-classe de malnutris dits intermédiaires, la valeur moyenne est de 11,86 mg/l et elle est comprise dans l'intervalle de 5 à 16 mg/l.

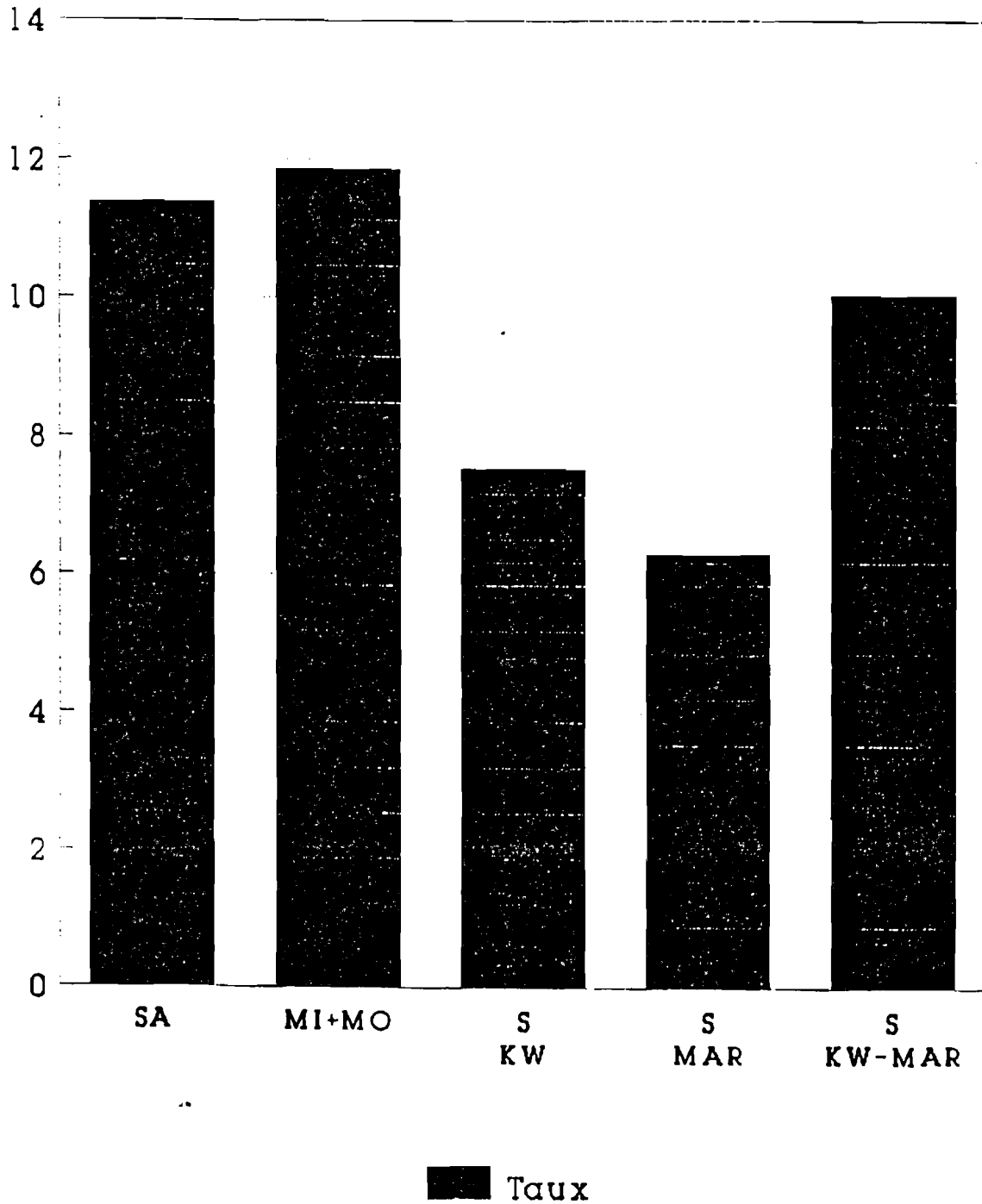
Par ailleurs, la comparaison des valeurs statistiques indique une meilleure homogénéité des taux au niveau de cette nouvelle sous-classe par rapport aux deux précédentes. La différence des taux n'est pas significative du fait du nombre de cas différents mais surtout des écarts-types respectifs.

Enfin la valeur de 11,86 mg/l, supérieure au taux moyen obtenu chez les normnutris paraît inexplicable. Nous nous serions attendu à une valeur égale ou plus faible. Par contre, lorsque l'on analyse les taux de l'ensemble des malnutris sévères, la valeur moyenne est de 7,54 mg/l. Celle-ci, plus faible que les valeurs moyennes précédentes, appartient néanmoins à l'intervalle de référence. Elle traduit déjà une diminution des taux en tocophérol chez ces enfants souffrant de malnutrition sévère comparativement aux enfants sains et aux malnutris intermédiaires. La différence entre les valeurs moyennes des normnutris et des malnutris sévères est hautement significative pour un risque de 1 % ($\frac{d}{\sigma_d} = 4,30$).

Si nous analysons les résultats sous-classe par sous-classe, l'ensemble des valeurs observées est plus faible. En effet, les faibles taux (<10,05 mg/l) sont relativement nombreux. Les valeurs très élevées rencontrées dans les classes précédentes ne s'observent que rarement au niveau de ces sous-classes. La dispersion est également meilleure. Les taux moyens sont respectivement de 7,54 mg/l pour les kwashiorkors, de 6,29 mg/l pour les marasmes et paradoxalement de 10,05 mg/l pour les cas de kwashiorkor-marasmes (tableau XV). Si nous prenons le groupe de normnutris comme référence, les moyennes sont significativement différentes en cas de marasme et de kwashiorkor ($\frac{dk}{\sigma_{dk}} = 2,78$: $\frac{dm}{\sigma_{dm}} = 5,78$ pour un risque de 1 %). Les cas de kwashiorkor-marasmes présentent des valeurs plus élevées que celles des marasmes, kwashiorkors : ($\frac{dk - m}{\sigma_{dk.m}} = 1,19$ pour un risque de 1 %).

ETAT NUTRITIONNEL DES ENFANTS	: NORMONUTRIS OU SAINS	: M A L N U T R I S			
		: S E V E R E S			
		: Intermédiaires	: Kwashiorkor- marasme	: Kwashiorkor	: Marasme
Taux moyens de tocophé- rolémie (en mg/l)	11,38	11,86	10,05	7,54	6,29

Tocophérolémie moyenne en fonction de l'état nutritionnel.



Histogramme 1 : Tocophérolémie moyenne en fonction de l'état nutritionnel

D'une manière générale, à l'exception des malnutris intermédiaires, si l'on n'analyse que les valeurs moyennes, nous constatons une diminution de celles-ci par rapport au taux moyen de référence de 11,38 mg/l. Les kwashiorkor-marasmes présentent un taux moyen plus élevé de façon inexplicable.

A partir des informations obtenues avec l'exploitation des paramètres précédents, nous avons étudié de manière plus précise les différents taux obtenus en fonction de l'intervalle de référence (5 à 16 mg/l), subdivisé en deux tranches :

- 5 à 10,5 mg/l
- 10,5 à 16 mg/l

L'histogramme utilisé présente le nombre de cas en fonction de quatre intervalles de taux :

- de 0 à 5 mg/l
- de 5 à 10,5 mg/l
- de 10,5 à 16 mg/l
- et supérieur à 16 mg/l

L'histogramme II des enfants normnutris montre une répartition régulière des cas et les taux varient essentiellement de 5 à 16 mg/l, avec quelques valeurs supérieures à 16 mg/l.

Les cas de malnutrition intermédiaire (mineure + modérée) représentés sur l'histogramme sont relativement semblables quant à la répartition observée au niveau des enfants normo-nutris.

Au niveau de l'histogramme V, l'on observe un déplacement de la répartition des cas vers la gauche, c'est-à-dire vers les plus faibles valeurs. Il y a en effet environ le tiers des cas de malnutrition sévère dont les valeurs sont inférieures aux normes (comprises entre 0 et 5 mg/l).

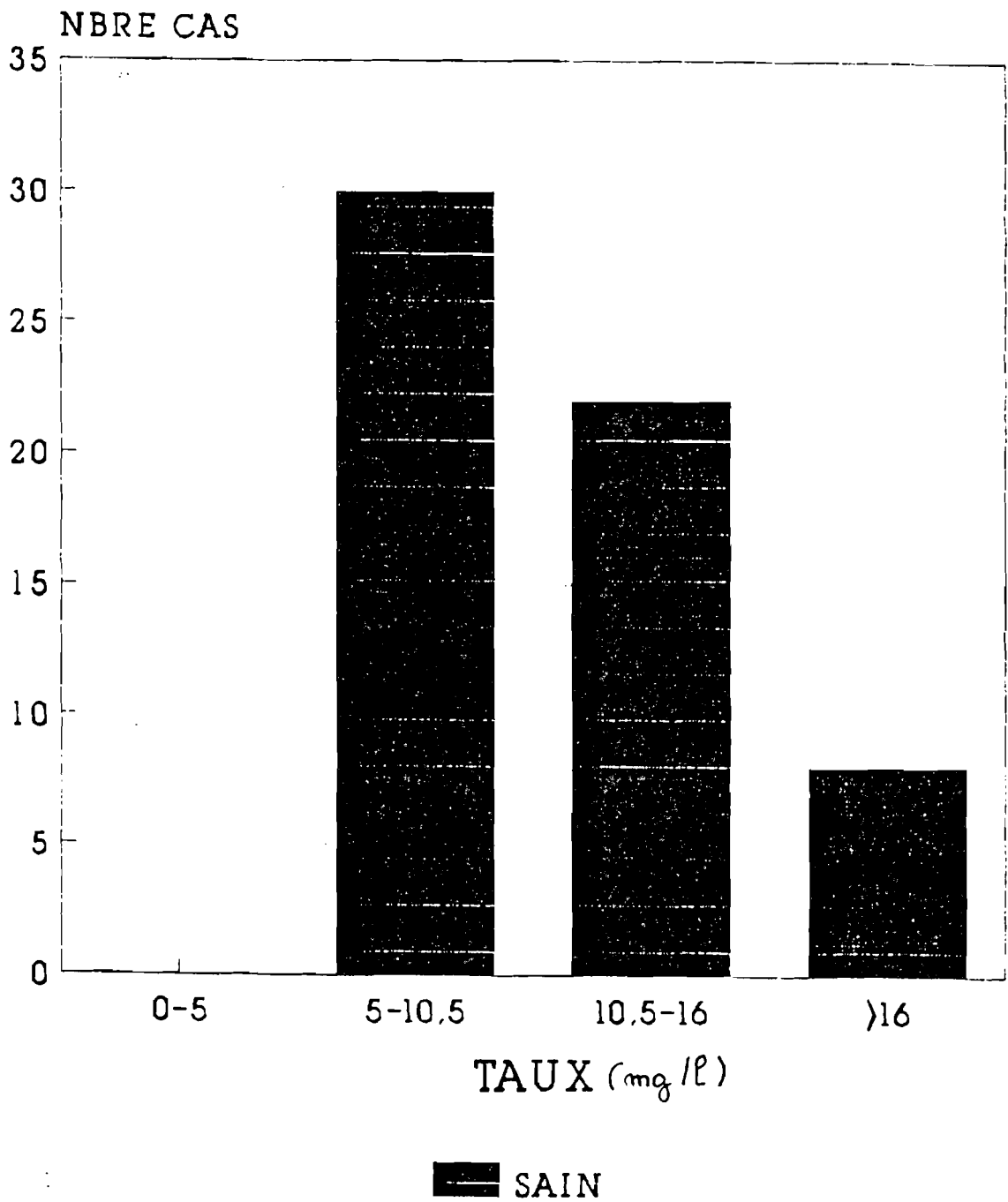
De manière plus spécifique, 5 cas de kwashiorkor sur 11 ont des taux inférieurs à 5 mg/l (histogramme VI).

De même, 3 cas de marasme ont des taux compris entre 0 et 5 mg/l (première partie de l'intervalle de référence allant de 5 à 16 mg/l) : histogramme VII. L'histogramme VIII nous indique que l'ensemble des valeurs se situe dans l'intervalle de référence pour ce qui est des cas de kwashiorkor-marasmes.

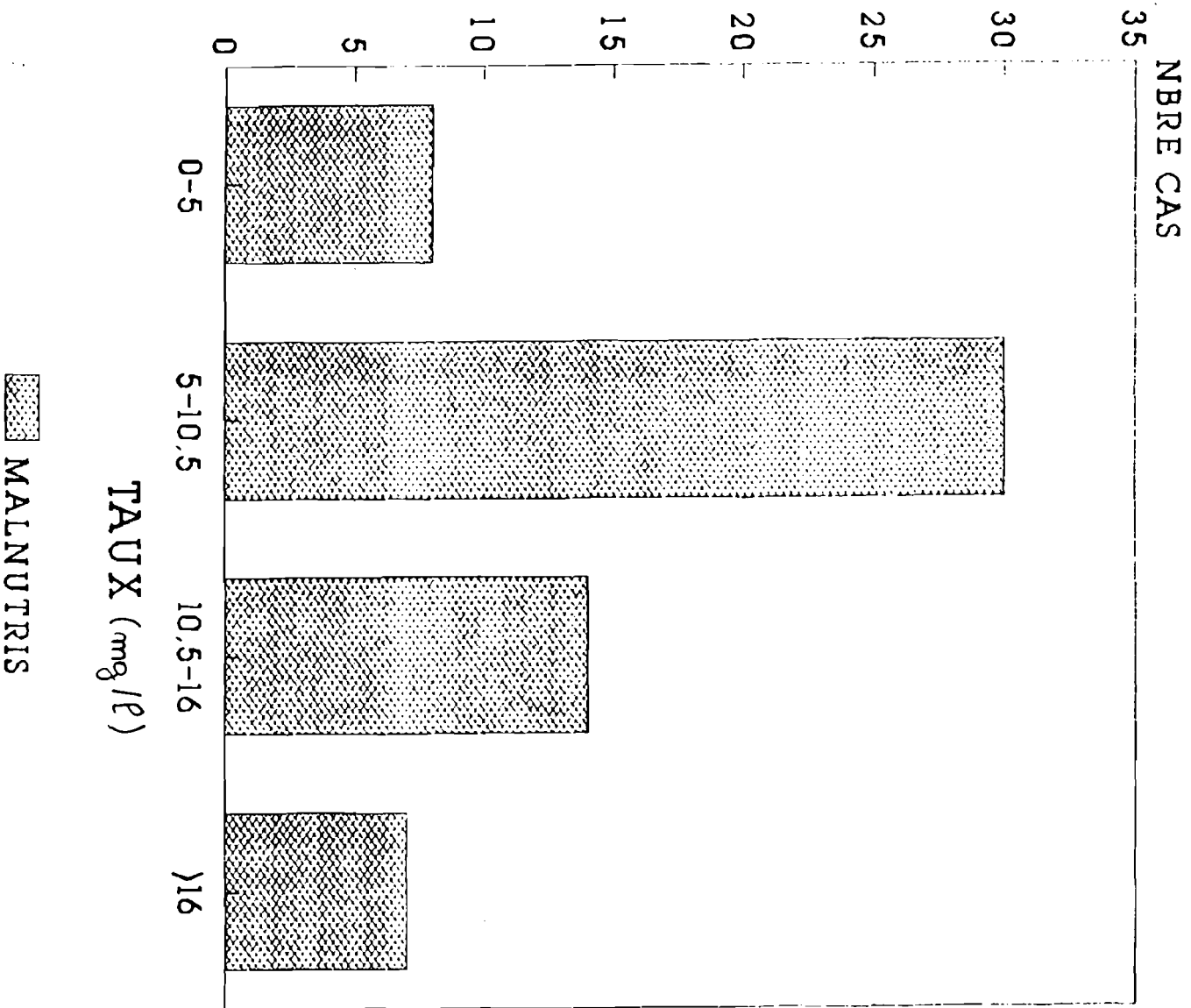
D'une manière générale, nous constatons un déplacement des valeurs vers la gauche au niveau des histogrammes pour les marasmes et les kwashiorkors.

Ce déplacement indique en fait une diminution des taux en tocophérol. Cette constatation vient souligner celle déjà observée par l'étude des taux moyens.

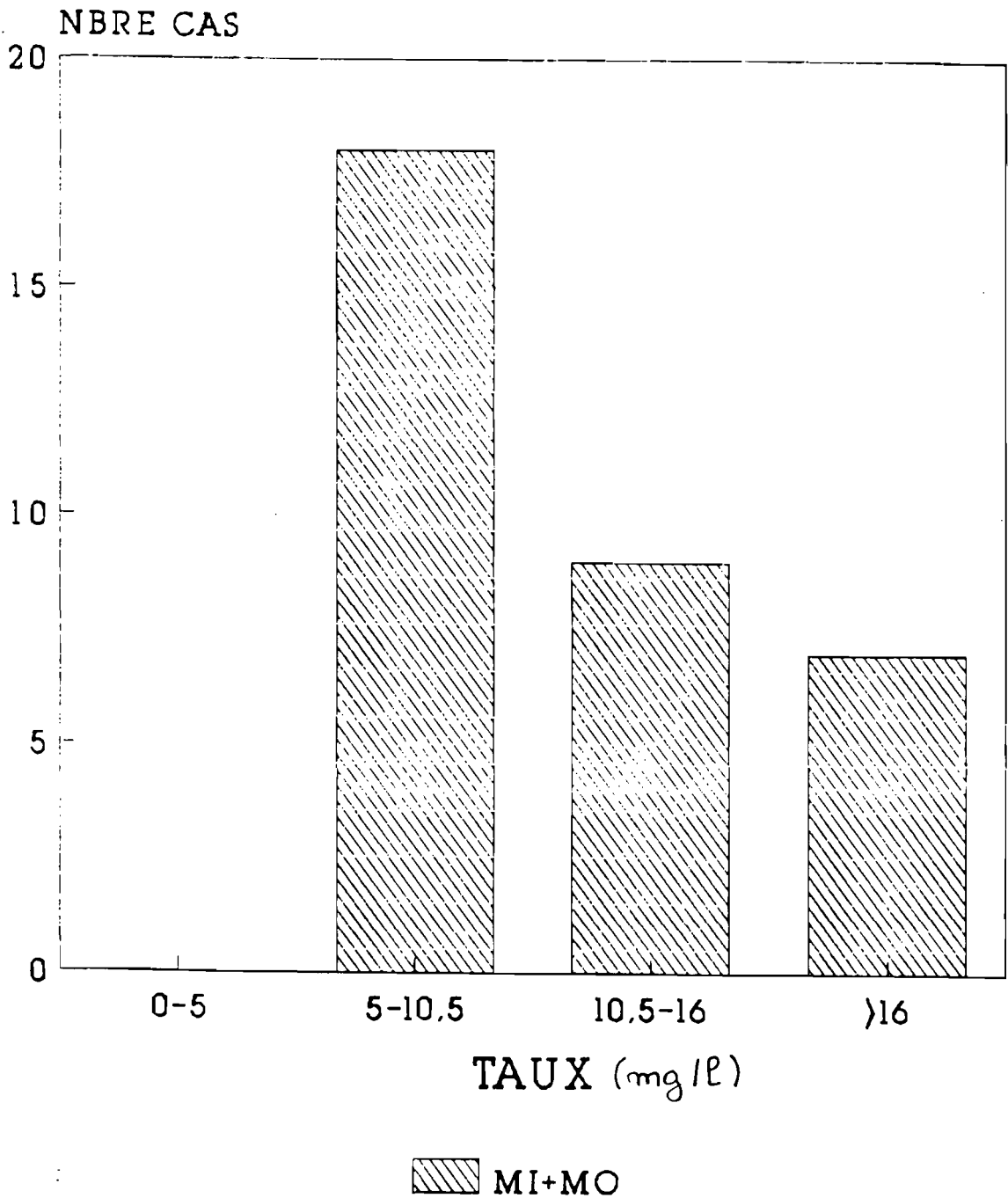
L'histogramme IX est une représentation de l'ensemble des cas en fonction de l'intervalle de référence d'une part (5 à 16 mg/l) et d'autre part de l'état nutritionnel.



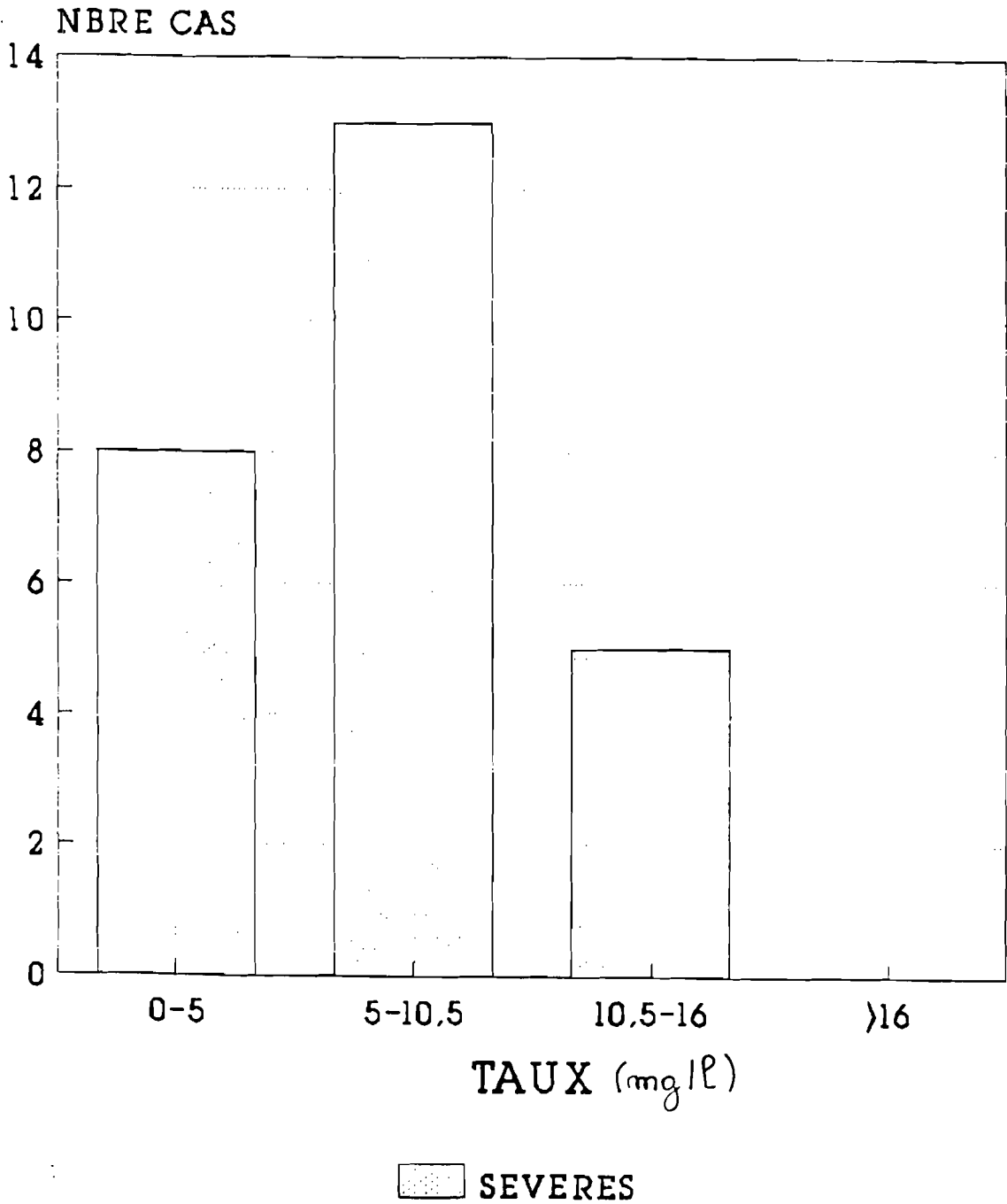
Histogramme II : Répartition des cas d'enfants normonutris en fonction de l'intervalle de référence.



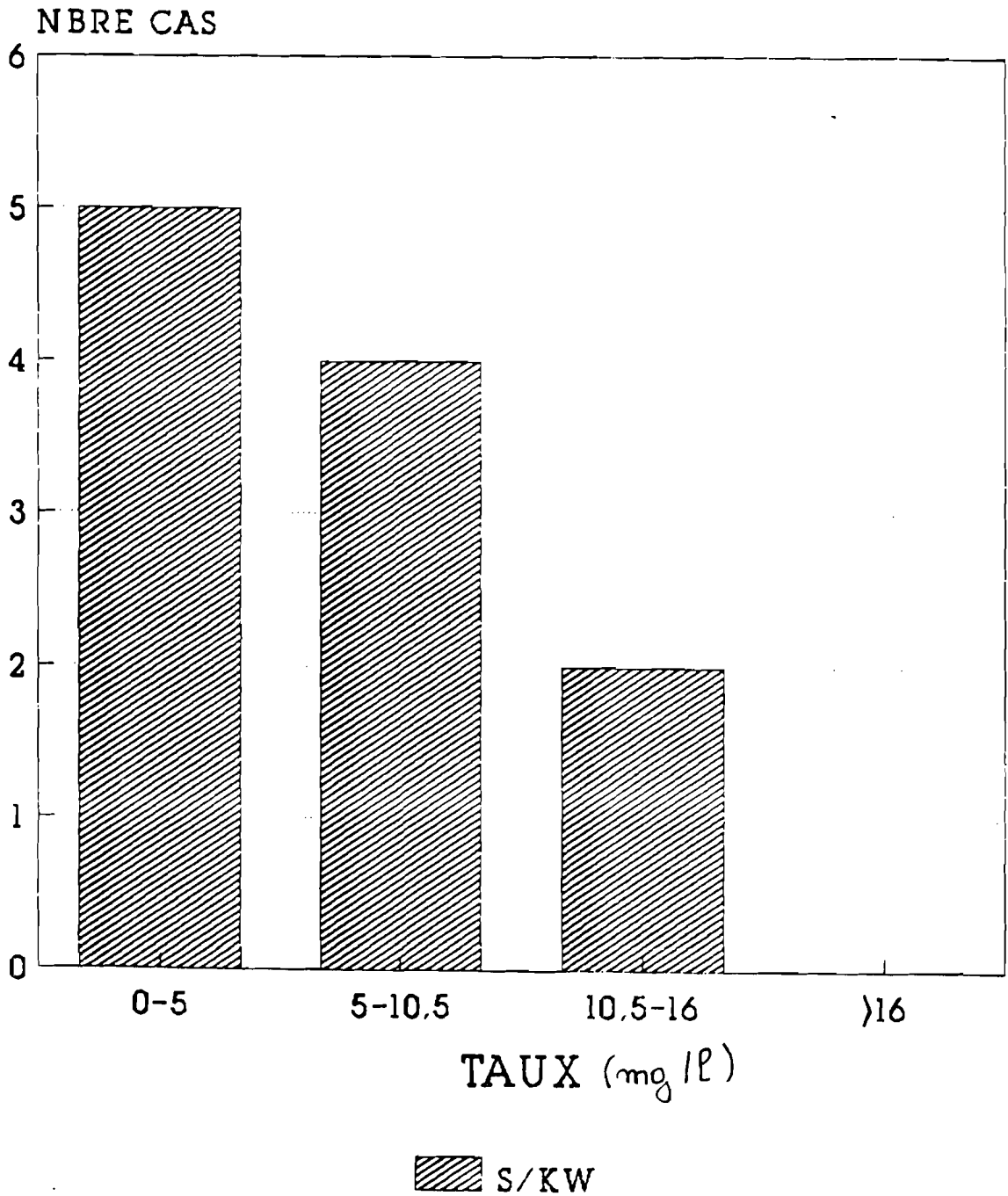
Histogramme III : Répartition des cas d'enfants malnutris en fonction de l'intervalle de référence.



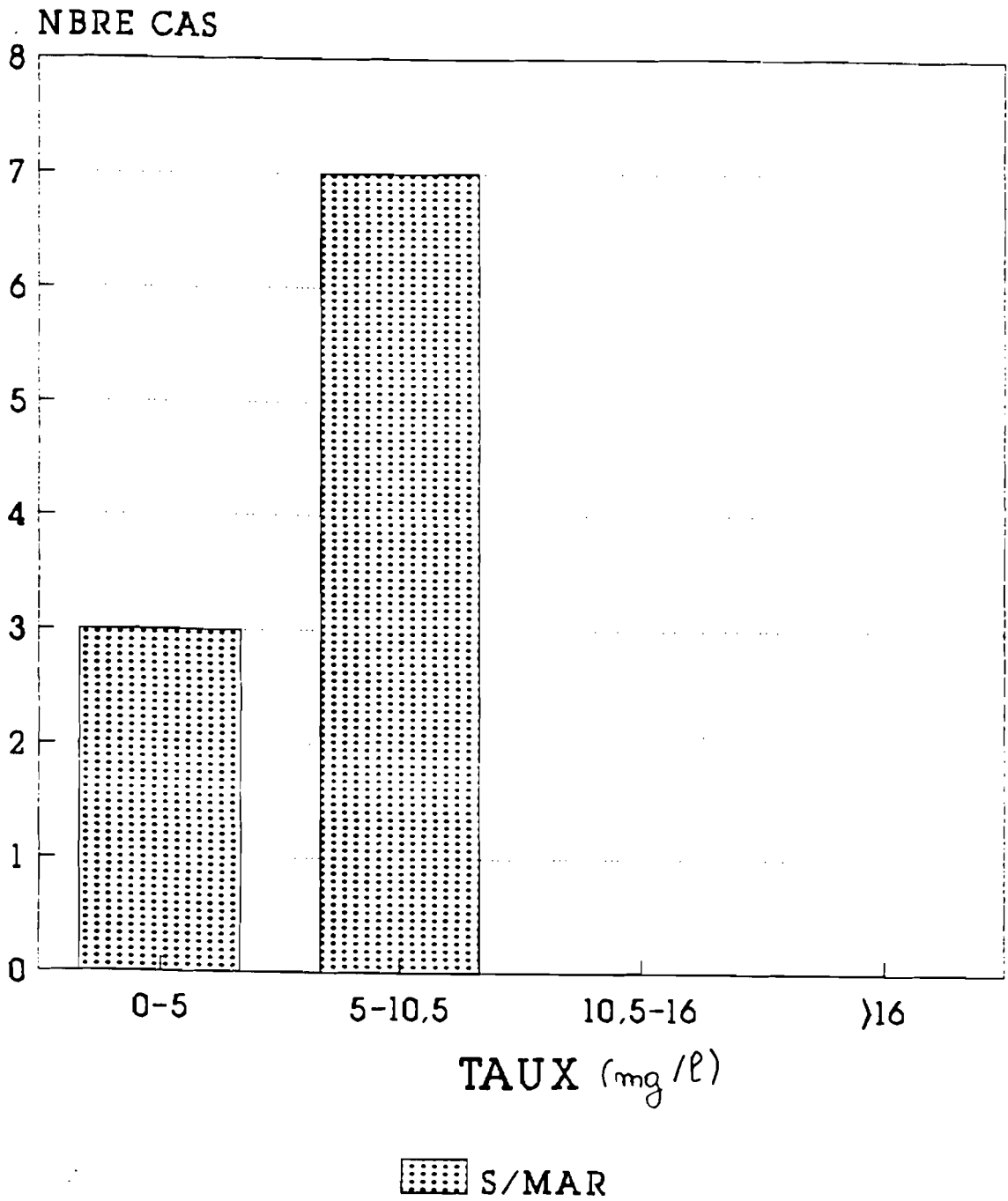
histogramme IV : Répartition des cas d'enfants présentant une malnutrition intermédiaire en fonction de l'intervalle de référence.



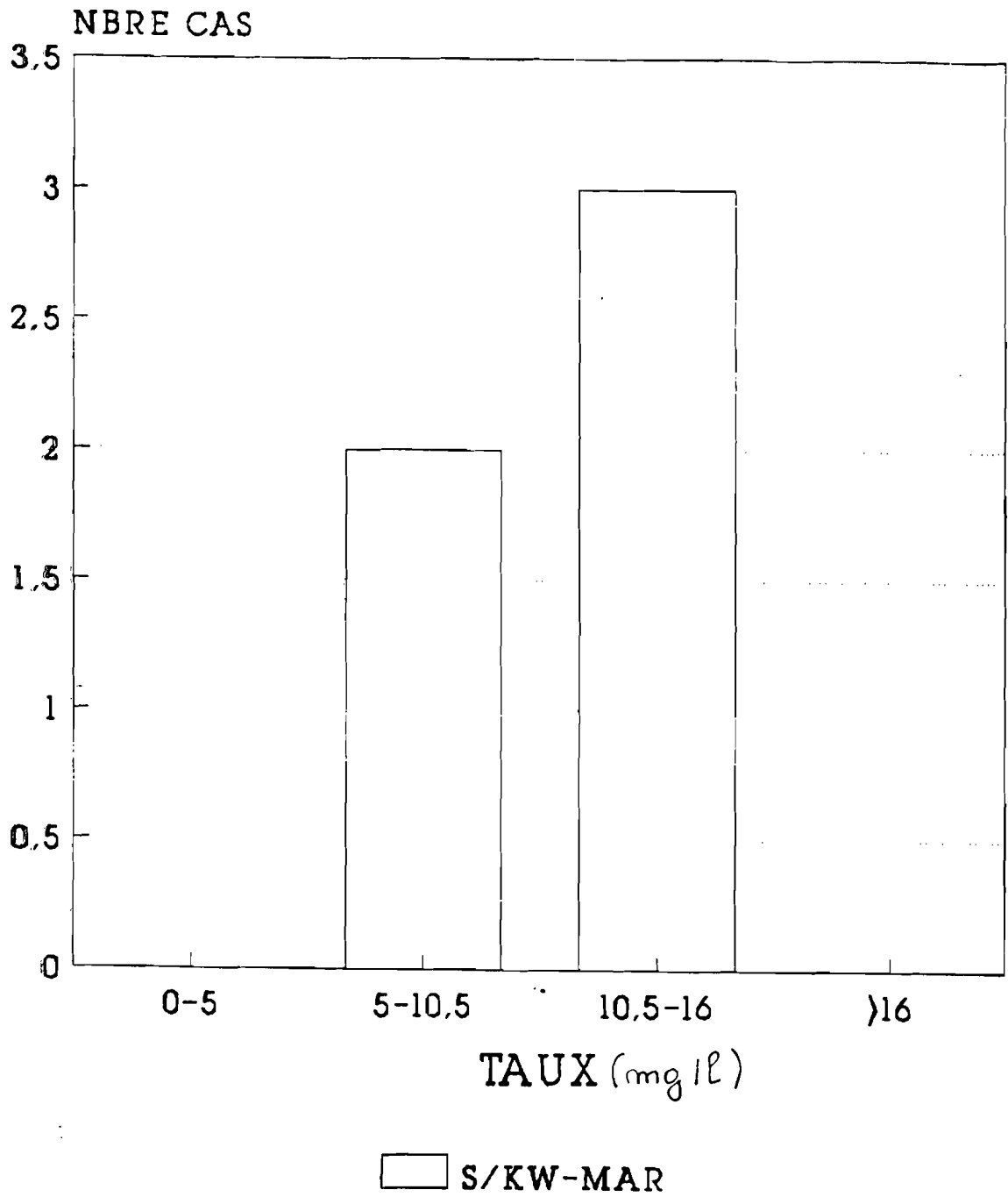
Histogramme V : Répartition des cas d'enfants malnutris sévères en fonction de l'intervalle de référence.



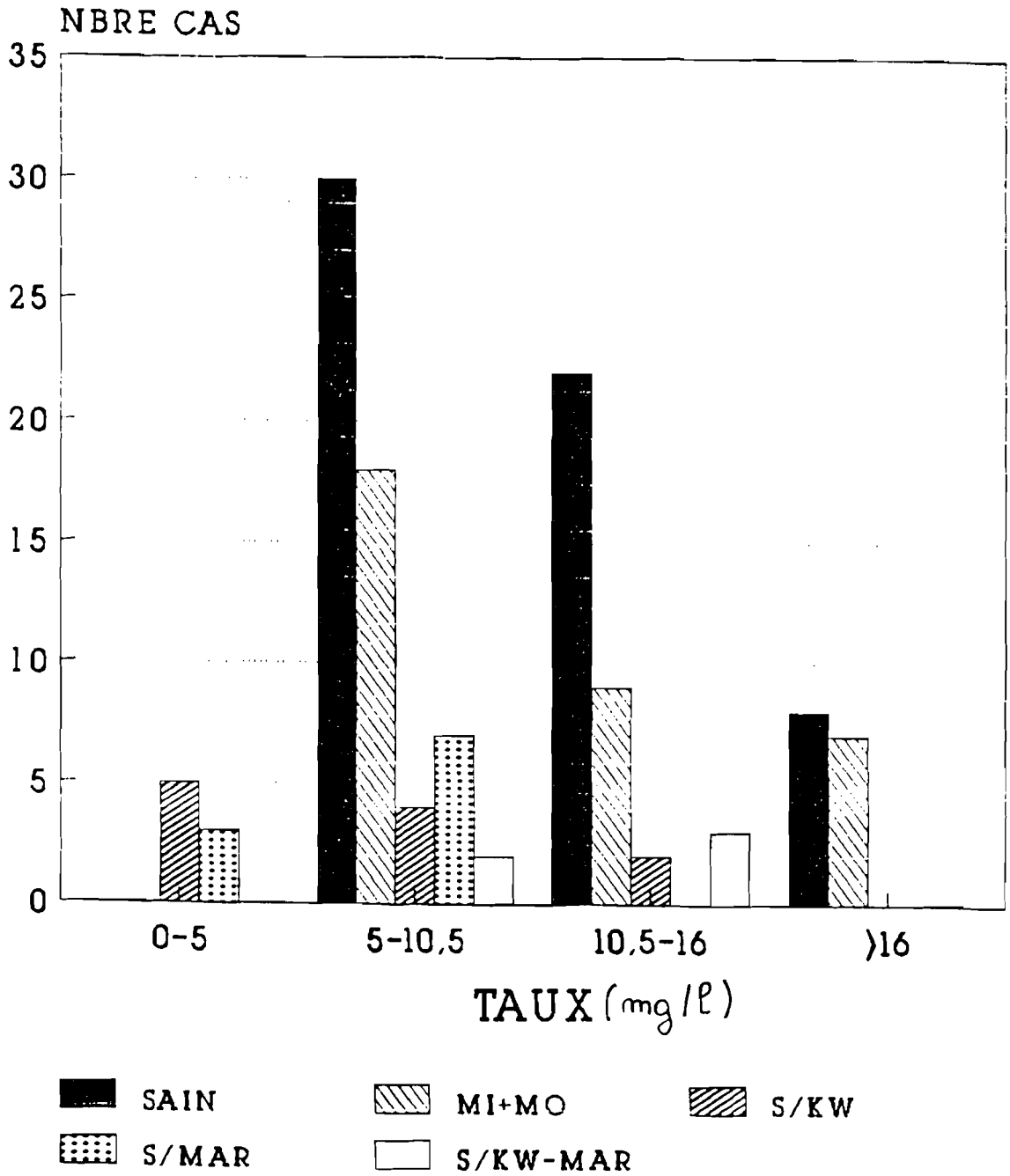
Histogramme VI : Répartition des cas de kwashiorkor en fonction de l'intervalle de référence.



Histogramme VII : Répartition des cas de marasme en fonction de l'intervalle de référence.



Histogramme VIII : Répartition des cas de kwashiorkor-marasme en fonction de l'intervalle de référence.



Histogramme IX : Récapitulatif

Différents paramètres anthropométriques ont été retenus pour la réalisation de l'examen nutritionnel à savoir :

- . l'âge*
- . le poids*
- . la taille*
- . le périmètre brachial (PB)*
- . le périmètre crânien (PC)*
- . le rapport $\frac{\text{périmètre brachial}}{\text{périmètre crânien}}$ (PB/PC)*

L'étude du poids et de la taille en rapport avec les taux obtenus se fait en fonction de l'âge du sujet. Aucune valeur constante ne peut être obtenue pour la tranche d'âge sur laquelle porte notre travail. Par contre, la littérature (27) nous indique l'existence d'une valeur constante du rapport périmètre brachial/périmètre crânien pour la tranche d'âge allant de 3 mois à 48 mois. Notre étude portant sur des enfants âgés de 12 à 48 mois, nous avons choisi d'exploiter ce paramètre par rapport aux autres précités.

La valeur constante retenue pour cette tranche d'âge est de 0,320.

KANAWATI et McLAREN (27) proposent une classification entre le rapport des périmètres (PB/PC) et l'état nutritionnel de l'enfant. La classification se présente comme suit :

$PB/PC > 0,35$	—————>	sujet obèse
$0,30 < PB/PC < 0,35$	—————>	état nutritionnel normal
$0,28 < PB/PC < 0,30$	—————>	malnutrition moyenne
$0,25 < PB/PC < 0,28$	—————>	malnutrition sévère.

En pratique, nous avons obtenu pour :

Les enfants normoalimentés ou sains, un rapport moyen de 0,33, ce qui correspond à un état nutritionnel normal selon KANAWATI et McLAREN ; (60 cas d'enfants normoalimentés retenus).

Les enfants souffrant de malnutrition intermédiaire (mineure et modérée, 34 cas), un rapport moyen de 0,27, ce qui correspond à une malnutrition sévère selon la classification citée en référence.

Si nous considérons les classes prises individuellement, la moyenne est de 0,27 pour les 13 cas de malnutrition mineure et de 0,25 pour les 21 cas de malnutrition modérée. Dans les deux cas, les rapports moyens correspondent à une malnutrition sévère.

Les enfants présentant une malnutrition sévère avec un rapport moyen de 0,25 correspondent à une malnutrition sévère selon cette classification.

Si nous considérons les sous-classes, le rapport moyen est respectivement de 0,24 pour les marasmes (sévère), 0,27 pour les cas de kwashiorkor (sévère) et 0,23 pour les kwashiorkor-marasmes (sévère).

Il apparaît possible au vue de ces comparaisons d'établir un parallèle entre la classification de KANAWATI et McLAREN et la classification retenue pour notre étude. En effet des rapprochements sont possibles entre :

- état nutritionnel normal et enfant normonutri ou sain ;*
- malnutrition sévère et malnutrition intermédiaire et sévère selon nos critères.*

L'analyse des relations entre rapport périmètre brachial/périmètre crânien et taux sériques en tocophérol aboutit aux interprétations suivantes :

Il apparaît une diminution progressive du rapport PB/PC en fonction de l'état nutritionnel. Ce rapport passe en effet de 0,33 pour un état nutritionnel normal à 0,23 pour un kwashiorkor-marasme. Les valeurs sériques en vitamine E diminuent dans le même sens.

- la valeur moyenne du rapport PB/PC dans le cas de kwashiorkor seul est sensiblement plus élevée que celle observée dans les deux autres cas de malnutrition sévère. En réalité, la mesure de ce rapport n'est pas significative pour ce qui est du kwashiorkor. En effet, ce type de malnutrition s'accompagne du point de vue clinique, d'œdèmes (infiltration liquidienne intersticielle), ce qui augmente la mesure du rapport PB/PC et fausse la valeur du test. De ce fait nous retiendrons ce paramètre PB/PC pour l'exploitation de tous les types d'état nutritionnel à l'exception du kwashiorkor.

Les histogrammes à double entrée X, XI, XII, XIII et XIV montrent :

- . un déplacement vers les ordonnées les plus faibles (0,27 ; 0,24 ; 0,23) ;
- . un déplacement vers les abscisses les plus faibles (inférieures à 5 mg/l).

Si nous tenons compte de l'intervalle de normes de référence de 5 à 16 mg/l (subdivisé en deux sous-intervalles), nous pouvons établir une relation entre rapport PB/PC et les taux en tocophérol en tenant compte de l'état nutritionnel.

Ainsi, un enfant normonutri a un rapport PB/PC compris entre 0,30 et 0,35 et un taux sérique en tocophérol compris entre 5 et 16 mg/l (dans 86,67 %) alors qu'un enfant souffrant de malnutrition intermédiaire a un rapport PB/PC compris entre 0,25 et 0,30 et un taux sérique compris entre 5 et 16 mg/l (dans 79,41 %).

Un enfant souffrant de marasme a un rapport PB/PC compris entre 0,20 et 0,25 et un taux sérique en vitamine E compris :

- entre 0 et 5 mg/l (30 % des cas) ;*
- entre 5 et 10,5 mg/l (70 % des cas).*

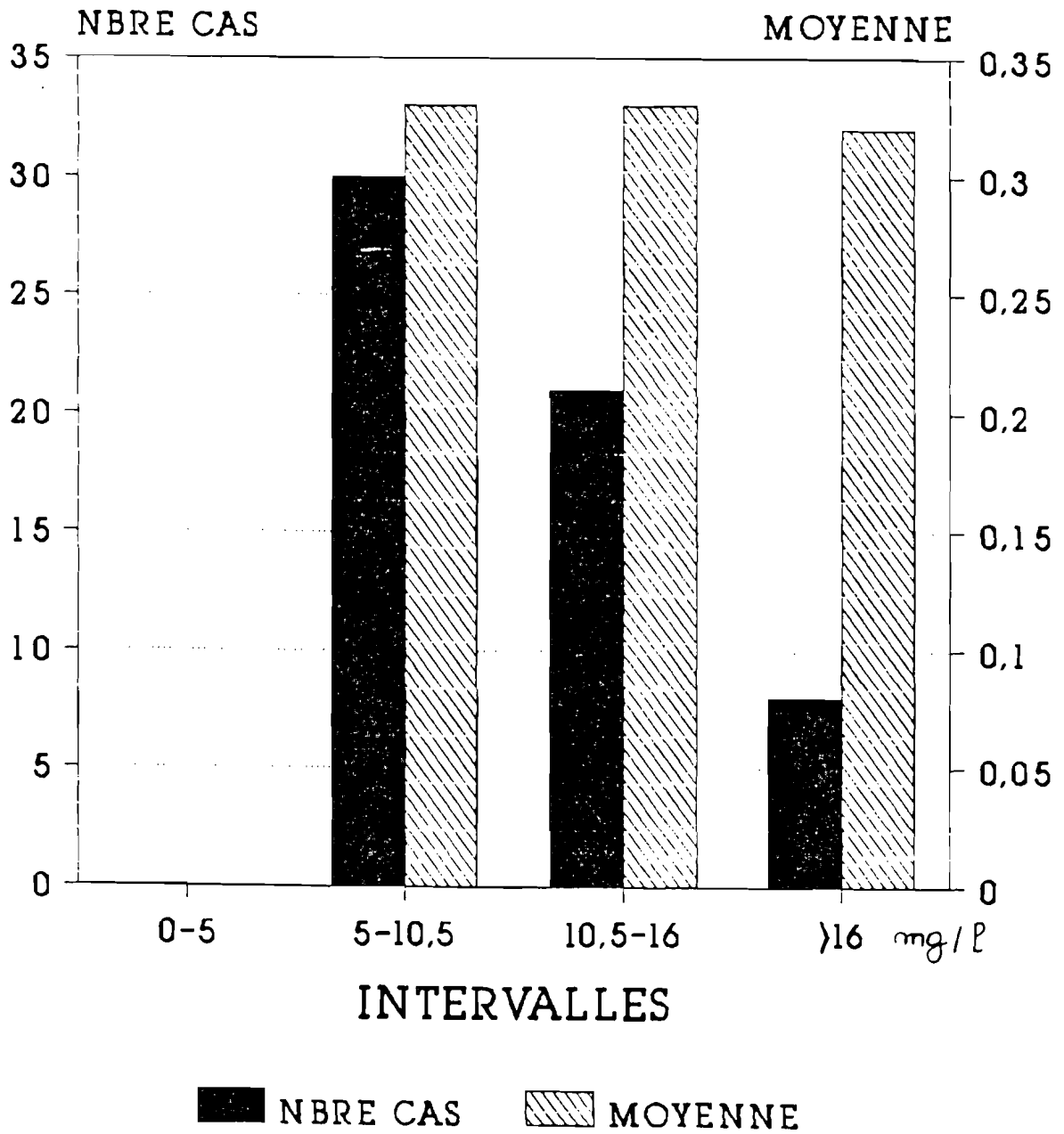
Un enfant présentant un kwashiorkor-marasme a un rapport PB/PC compris entre 0,20 et 0,25 et un taux sérique compris entre 5 et 16 mg/l. :

- 40 % des cas ont des taux sériques entre 5 et 10,5 mg/l ;*
- 60 % des cas ont des taux compris entre 10,5 et 16 mg/l.*

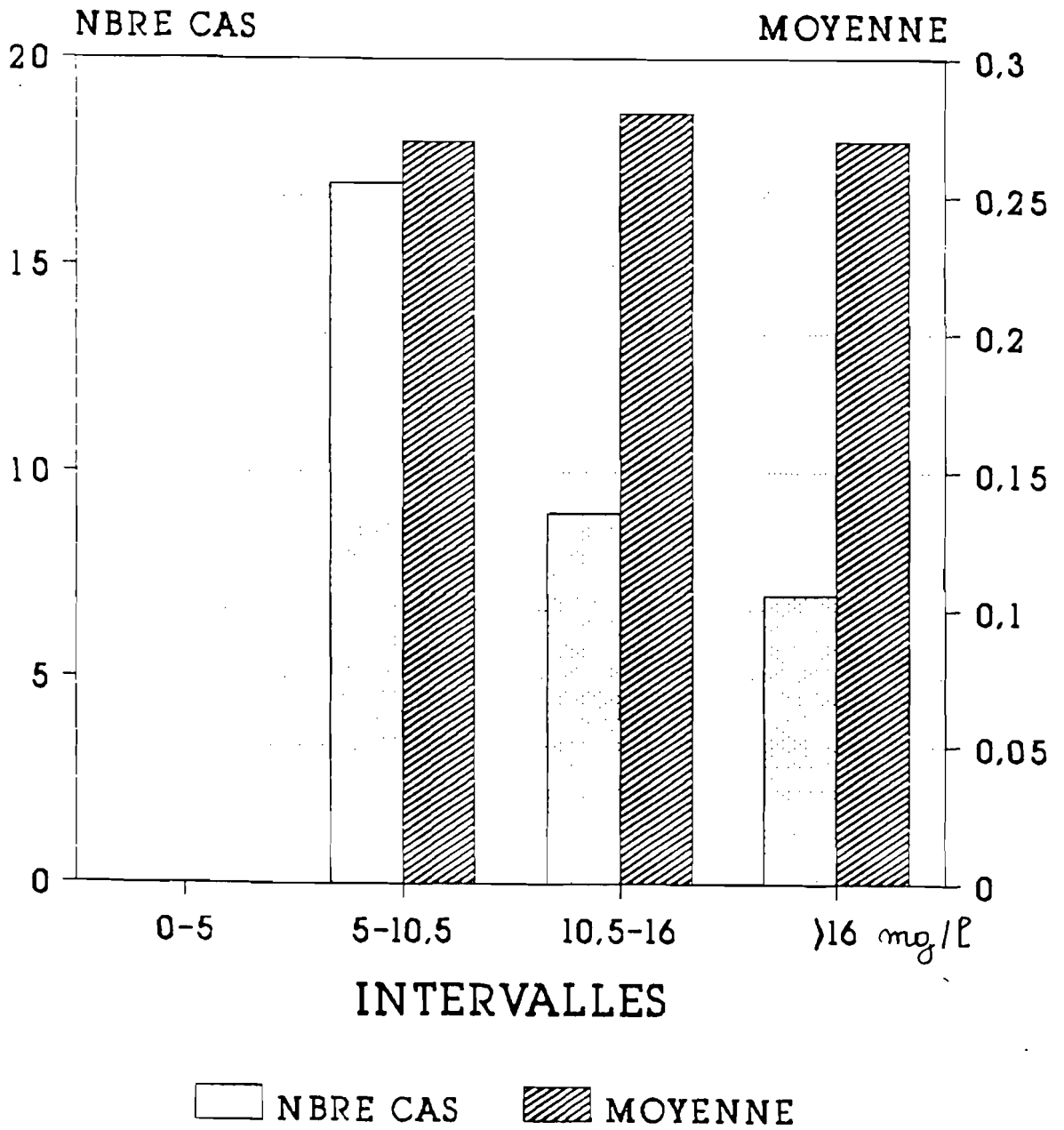
Nous avons donc pu ainsi établir une corrélation entre les taux sériques en vitamine E et l'un des paramètres anthropométriques retenus pour l'examen nutritionnel à savoir le rapport PB/PC.

ETAT NUTRITIONNEL DES ENFANTS	NORMONUTRIS OU SAINS	MALNUTRIS			
		Intermédiaires	SEVERES		
			Kwashiorkor- marasme	Kwashiorkor	Marasme
Rapport $\frac{\text{Périmètre brachial}}{\text{Périmètre crânien}}$ moyen	0,33	0,27	0,23	0,27	0,24

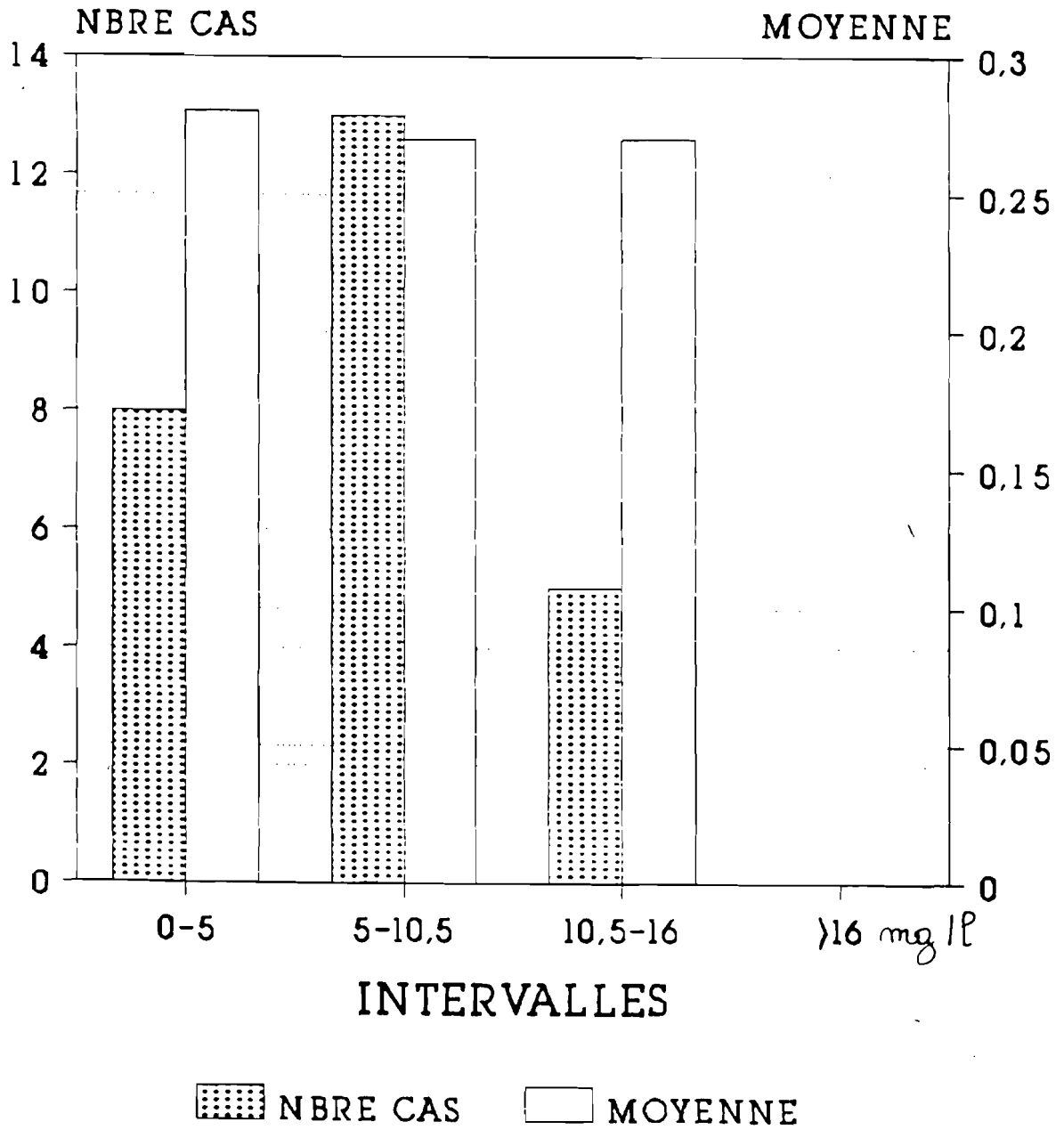
Tableau XVI : Rapport $\frac{\text{Périmètre brachial}}{\text{Périmètre crânien}}$ moyen en fonction de l'état nutritionnel.



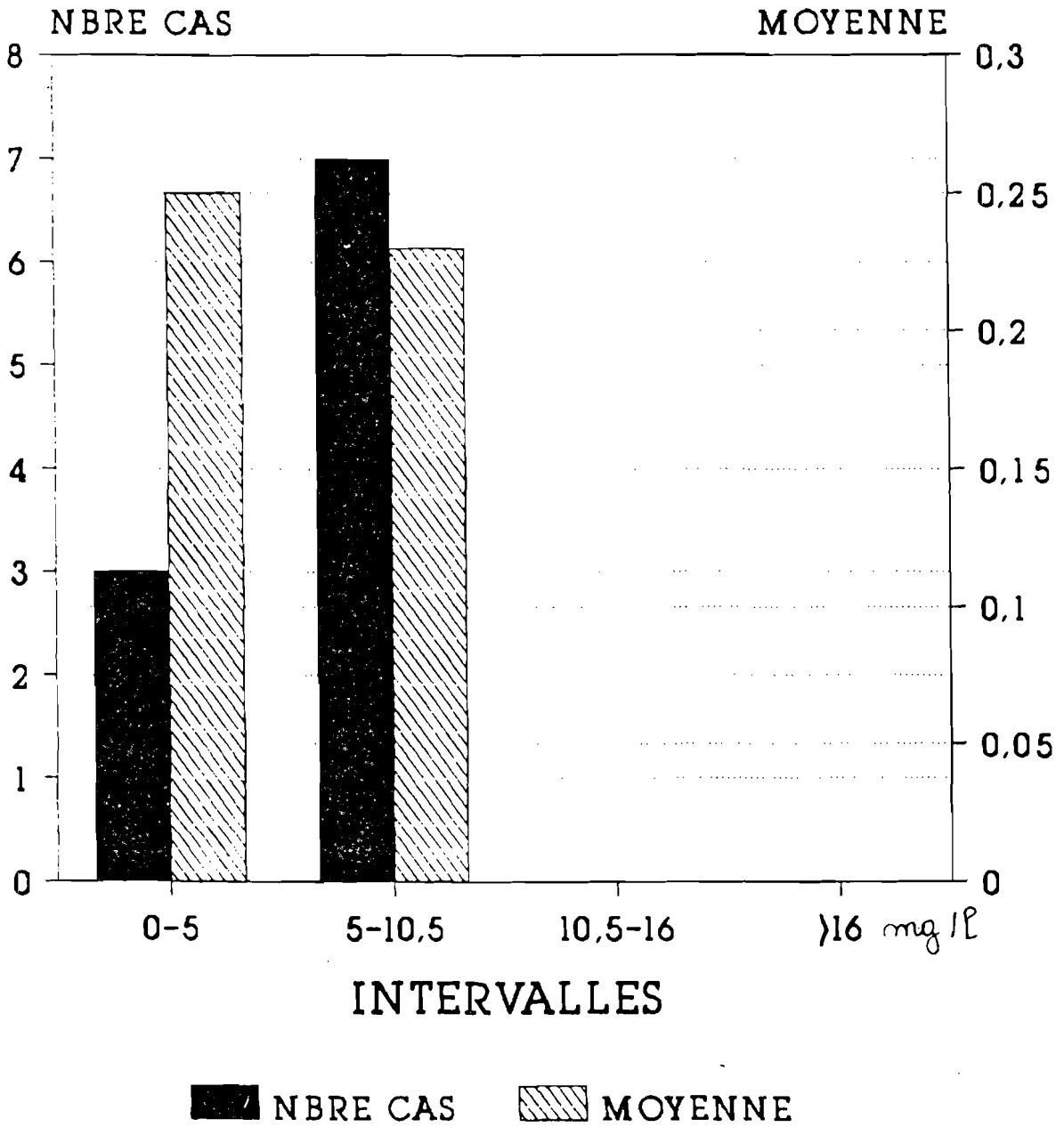
Histogramme X : Répartition des cas d'enfants normonutris en fonction de la tocophérolémie et du rapport PB/PC.



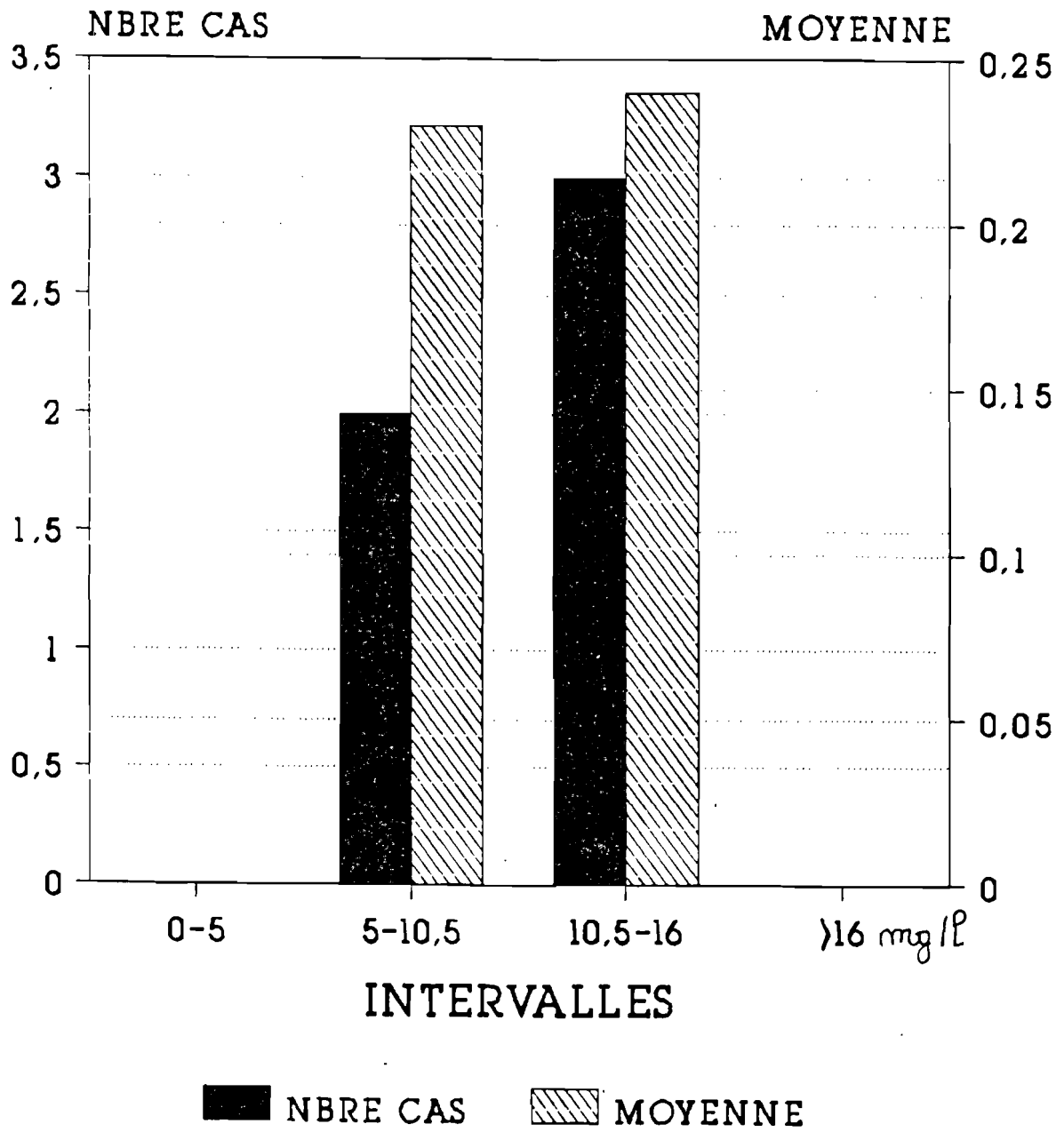
Histogramme XI : Répartition des cas d'enfants souffrant de malnutrition intermédiaire en fonction de la tocophérolémie et du rapport PB/PC.



Histogramme XII : Répartition des cas de malnutrition sévère en fonction de la tocophérolémie et du rapport PB/PC.



Histogramme XIII : Répartition des cas de marasme en fonction de la tocophérolémie et du rapport PB/PC.



Histogramme XIV: Répartition des cas de kwashiorkor-marasmes en fonction de la tocophérolémie et du rapport PB/PC.

Nous avons en outre recherché l'existence éventuelle d'une relation entre tocophérolémie et morbidité infantile, ceci en étudiant les taux de vitamine E en fonction de trois maladies retenues parmi les critères de l'échantillonnage. La première retenue est la rougeole dont l'une des complications est la survenue de troubles nutritionnels. L'on dit souvent que "la rougeole est l'avenue du kwashiorkor".

La relation entre tocophérolémie et diarrhée a été également étudiée. En effet, la fuite hydroélectrolytique observée au cours de cette affection pourrait s'accompagner d'une perte de l'ensemble des vitamines et plus particulièrement de la vitamine E. Enfin, nous avons choisi les cas de paludisme associé à la diarrhée.

Dans le cas de la rougeole, les enfants normonutris n'ont pas été pris en compte, parce que non mentionné au cours du recrutement. A l'analyse des résultats, aucune relation de cause à effet n'a pu être définie. Quant aux diarrhées simples et/ou celles associées au paludisme, l'existence d'une relation entre ces affections et les taux sériques en tocophérol est également difficile à mettre en évidence. Tous les types d'état nutritionnel ont été retrouvés sans prédominance particulière de l'un d'entre eux.

Il nous paraît donc difficile d'établir l'existence d'une incidence de ces affections sur les teneurs sériques en tocophérol, de même que sur la morbidité et la mortalité infantile qu'entraîneraient ces maladies.

POPULATION	M A L A D I E S		
	ROUGEOLE Vaccin non réalisé à ce jour)	DIARRHÉES	DIARRHÉES + PALUDISME
Taux moyens (mg/l) Enfants normonutris	/	9,79 ± 2,15 (8 cas)	10,77 ± 3,80 (14 cas)
Taux moyens (mg/l) Enfants malnutris	8,99 ± 2,18 (6cas)	8,44 ± 3,72 (15 cas)	10,16 ± 4,48 (29 cas)
Ecart réduit à la moyenne	32,10	2,45	0,80

Tableau XVII : Exploitation de la tocophérolémie moyenne en fonction de l'état nutritionnel et de certaines maladies.

CHAPITRE QUATRIEME : CONCLUSION

Initialement connue comme vitamine de la fertilité, le tocophérol est aujourd'hui apprécié pour ces divers autres rôles, notamment dans la croissance et le développement normal de l'enfant.

Notre étude a porté sur la réalisation d'un dosage pour l'évaluation des teneurs sériques en vitamine E chez des enfants âgés de 12 à 48 mois. L'objectif était d'établir un intervalle de normes de référence applicables à l'enfant ivoirien normonutri (ou sain). Nous avons également analysé les différents résultats obtenus afin de mettre en évidence une éventuelle relation entre taux sériques et malnutrition déterminée par des paramètres anthropométriques. L'existence d'une incidence de ces teneurs en vitamine E sur l'état de morbidité de ces enfants a également fait l'objet de notre étude.

Le dosage s'est fait par chromatographie liquide à haute performance (H.P.L.C.). La validité et la fiabilité de la méthode pour ce type d'analyse ont été mises en évidence. Les nombreux avantages que la méthode d'analyse présente et ses performances nous autorise à la proposer comme méthode de dosage pour une analyse de routine de la vitamine E dans les sérums humains.

Les résultats obtenus montrent que les taux sériques de vitamine E diminuent en fonction de l'état nutritionnel. La diminution de ces taux devient très appréciable devant des cas de malnutrition sévère tels que kwashiorkor, marasme ou même kwashiorkor-marasme.

En effet, comparativement au taux moyen de 11,38 mg/l pour les enfants normo-nutris, nous avons obtenu les valeurs moyennes de l'ordre de :

- . 11,86 mg/l pour les malnutris intermédiaires ;
- . 9,99 mg/l pour les malnutris sévères avec des taux de :
 - . 10,05 mg/l pour les kwashiorkor-marasmes ;
 - . 7,54 mg/l pour les kwashiorkors ;
 - . 6,29 mg/l pour les marasmes.

La diminution de la tocophérolémie dans les cas de malnutrition sévère peut nous orienter vers le rôle éventuel de l'alimentation de l'enfant ivoirien. Il serait intéressant d'étudier la composition de celle-ci afin de mettre en évidence son influence sur la tocophérolémie et l'état nutritionnel.

L'étude des paramètres anthropométriques et plus particulièrement du rapport $\frac{\text{périmètre brachial}}{\text{périmètre crânien}}$ (PB/PC) montre qu'une diminution des taux de vitamine E peut être corrélée à un abaissement des valeurs de ce rapport.

L'incidence d'une carence en vitamine E sur la morbidité n'a pu cependant être mise en évidence, en raison du manque de données suffisantes.

L'étude des valeurs obtenues lors du dosage de la vitamine E dans les sérums de notre échantillon montre que l'intervalle de normes de référence allant de 5 à 16 mg/l proposé par la littérature peut être retenu pour l'enfant ivoirien normonutri pour la tranche d'âge de 12 à 48 mois.

Annexe I

FICHE D'ENQUETE

1 - ENQUETE

- Date $\frac{\quad}{\text{Jour}}$ $\frac{\quad}{\text{Mois}}$ $\frac{\quad}{\text{An}}$

- Nom de l'enfant :

- Adresse des Parents :

- Sexe : M $\frac{\quad}{\quad}$ 1 F $\frac{\quad}{\quad}$ 2

- Age en mois : connu $\frac{\quad}{\quad} / \frac{\quad}{\quad} / \frac{\quad}{\quad}$

estimé $\frac{\quad}{\quad} / \frac{\quad}{\quad} / \frac{\quad}{\quad}$

2 - EXAMEN CLINIQUE

a - Statut vaccinal :

b - Antécédents (diarrhée, paludisme, etc...)

c - Maladies autre que la malnutrition

3 - EXAMEN NUTRITIONNEL :

- Poids (P) $\frac{\quad}{\quad} / \frac{\quad}{\quad}$ kg

- Taille (T) $\frac{\quad}{\quad} / \frac{\quad}{\quad} / \frac{\quad}{\quad}$ cm

- Périmètre du bras (B) $\frac{\quad}{\quad} / \frac{\quad}{\quad} / \frac{\quad}{\quad}$ mm

- Périmètre du crâne (C) $\frac{\quad}{\quad} / \frac{\quad}{\quad} / \frac{\quad}{\quad}$ mm

- Signes de malnutrition

- B/C $\frac{\quad}{\quad} / \frac{\quad}{\quad} / \frac{\quad}{\quad}$

- Forme de malnutrition =

BIBLIOGRAPHIE

1. **AARAN R. K., NIKKARI T.**
H.P.L.C. method for the simultaneous determination of carotene, retinol, α tocopherol in serum, J. Pharm. Biomed Anal., 1987, 6, 6-8, 853 - 857.

2. **AUDIGIE C., DUPONT G., ZONSAIN F.**
Principes des méthodes d'analyse biochimique, PARIS, DOIN, 1985, p. 137 - 138.

3. **BARNES A.**
Introduction in Lubin, Machlin ed, Vitamine E : Biochemichal, Hematological and Clinical Aspects, New-York, The New-York Academy of Science, 1982, (Ann. N-Y Acad. Sci.), vol 393, p. 83.

4. **BIEZALSKI et coll.**
Rapid determination of Vitamine A (Retinol) and Vitamin E (α Tocopherol) in human serum by isocratic adsorption H.P.L.C., Int. J. Vit. Nutr. Res. ; 1986 ; 56, 319 - 327.

5. **CAUDE M.**
Aspects théoriques de la chromatographie en phase liquide à haute performance, Feuill. Biol., 1979, 20, 106, 39 - 51.

6. **CIBA-GEIGY**

Vitamin E in Tables Scientifiques, BALE,
CIBA-GEIGY S.A. Ed., 1972, p. 473 - 475.

7. **CIBA-GEIGY**

Vitamine E in GEIGY Scientific tables, BASLE,
CIBA-GEIGY Limited, 1984, Vol. 3, p. 127.

8. **DRESSANT L.**

Connaître et utiliser les Vitamines, 3e Ed., - PARIS,
Editions Andrillon, p. 93 - 96.

9. **DUNANT Y.**

Le Vitamines ; Dial. Ther., Med. et Hyg. 6362
1989, 3772.

10. **FARELL et coll.**

Evaluation of Vitamin E deficiency in children lung
disease in Lubin, Machlin Ed. ; Vitamin E : Biochemical,
Hematological and Clinical Aspects, New-York, The
New-York Academy of Science ; 1982, (Ann. N-Y Acad.
Sci.) ; Vol. 393 ; p. 96-98.

11. **GODEL J. C.**

Vitamin E Status of Northern Canadian Newborns
Relation of Vitamin E to blood lipids, Am. J. Clin. Nutr., 1989, 50 ; 375 - 380.

12. **GRASSET E.**

Absorption intestinale des vitamines in Les Vitamines,
PARIS, MASSON, 1985, p. 378 - 379.

13. **JANDAK J., STEINER H., RICHARDSON P. D.**

Alpha tocopherol, an effective inhibitor of platelet
adhesion, Blood ; 1989, 73, 1, 141 - 149.

14. **JOHNSON et coll.**

Vitamin E Supplementation in the retinopathy of pre-
maturity in Lubin/Machlin Ed., Vitamin E : Biochemical,
Hematological and Clinical Aspects, New-York, The
New-York Academy of Science ; 1982, (Ann. N-Y Acad.
Sci.), Vol. 393, p. 473 - 495.

15. **LANDRIEU P.**

Tocophérol (Vitamine E) in Les Vitamines, PARIS,
MASSON, 1985, p. 58 - 79.

16. **LEHMANN J., RAO D.D., CANARY J.J., JUDD J.J.**
Vitamin E and relationships among tocopherols in human plasma, platelets, lymphocytes and red blood cells, Am. J. Clin. Nutr., 1988, 47, 3, p. 470 - 474.

17. **LEHNINGER A.**
Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires ; PARIS, Flammarion Médecine Sciences, 1977, p. 353 - 354.

18. **LLOYD J. K.**
The importance of vitamin E in human nutrition, Acta Paediatr. Scand., 79, 1990, p. 6 - 11.

19. **LOUISOT P.**
Vitamines et Coenzymes, Biochimie Structurale 3, 2e Ed., Villeurbanne, SIMEP Ed., 1974, p. 98 - 99.

20. **MAHUZIER G., HAMON M.**
Abrégé de Chimie Analytique Tome 2 : Méthodes de Séparation, PARIS, Masson, 1978, p. 91 - 222.

21. **MALVY J. MD. et coll.**
Enquête sur les taux sériques de rétinol, β carotène, tocophérol et cholestérol dans une population d'enfants de la région de Tours. 3èmes Journées Scientifiques Internationales du GERM, NiaNing (Sénégal), du 4-9 Octobre 1987, PARIS, KARTHALA, PARIS A.C.C.T., 1989, p. 351 - 355.

22. **McCAY P. ; KING M.M. ; POYER J.L. ; LAI E.K.**
An update on antioxydant theory ; Spin trapping of chloromethyl radicals in vivo in Lubin, Machlin Ed., Vitamin E : Biochemical, Hematological and Clinical Aspects, New-York, The New-York Academy of Science, 1982, (Ann. N.-Y. Acad. Sci.), Vol. 393, p. 23 - 31.

23. **NELSON J. S.**
The neuropathology of chronicle vitamin E deficiency in man and other mammals in Lubin, Machlin Ed., Vitamin E : Biochemical, Hematology and Clinical Aspects, New-York, The New-York Academy of Science, 1982, (Ann. N.-Y. Acad. Sci.), Vol. 393, p. 172 - 173.

24. **OGIHARA T., MIKI M., KITAGAWA M., MINO M.**
Distribution of tocophérol among human plasma lipoproteins, Clin. Chim. Acta, 1988, 174, 3, p. 299-305.
25. **PANGANAMALA R.V., CORNWELL G.**
*The effects of Vitamin E on arachidonic metabolism in Lubin, Machlin Ed., *Vitamin E : Biochemical, Hematological and Clinical Aspects*, New-York, The New-york Academy of Science, 1982, (Ann. N.-Y. Acad. Sci.) Vol. 393, p. 376 - 391.*
26. **PELISSIER et coll.,**
Concentration hépatique de Rétinol, Palmitate de Rétinol et α Tocophérol chez le rat déficient en Vitamine A et/ou Vitamine E, 3^{èmes} Journées Scientifiques Internationales du G.E.R.M., Nianing (Sénégal) du 4 - 9 Ocotbre 1987, PARIS, KARTHALA ; PARIS A.C.C.T., 1979, p. 370 à 375.

27. **ROBILLARD P.X. et coll.**

Intérêt de la mesure du rapport périmètre brachial
(P_b) sur périmètre crânien (P_c) dans l'évaluation du
statut nutritionnel du nourrisson et du jeune enfant,
3^{èmes} Journées Scientifiques Internationales du G.E.R.M.
Nianing (Sénégal) du 4 - 9 Octobre 1987, PARIS
KARTHALA PARIS A.C.C.T., 1989, p. 52 - 56.

28. **RÖNNHOLM K.A.R. ; DOSTÁLOVÁ L. ; SIIMES M.A.**

Vitamin E supplementation in very-low birth weight
infants : Long term follow up at two different levels
of vitamin E supplementation, Am. J. Clin. Nutr., 1989,
49, p. 121 - 126.

29. **ROQUIER-CHARLES D.**

Les vitamines en cosmétologie, Actual Pharm., 1988,
257 ; p. 5 - 6.

30. **ROSSET R., CAUDE M., JARDY A.**

Manuel pratique de chromatographie en phase liquide,
Paris, Masson, 1982.

31. **ROUGEREAU A.**

Vitamines in Analyse des constituants alimentaires.
Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, (Coll. Sciences et Techniques agro-alimentaires), APPRIA 1981, p. 246 à 252.

32. **SAYARE M., FIKIET M. , PAULUS J.**

Effect of Vitamin E on the binding of hemoglobin to the red cells in Lubin, Machlin Ed., *Vitamine E : Biochemical, Hemotological and Clinical Aspects, New-York, the New-York Academy of Science, 1982, (Ann. N.-Y. Acad. Sci.), Vol 393, p. 237 - 250*

33. **SMIDTC R. et coll.**

Gas Chromatography of retinol and α tocopherol without derivatization, J. Chromotogr. Biomed. Appl., 1988, 484, p. 21 - 29.

34. **STROBECKER R., HENNING H. M.**

*Vitamin E (α Tocopherol) in "Vitamin Assay"
*Tested methods, Berlin, Verlag Chemie, p. 283 - 300.**

35. **STUKALOV Y. U. V., OSLOV E. N. J.**
Estimation of retinol, α tocopherol, β carotene and total carotenoids using H.P.L.C., Vopr. Med. Chim., 1988, 34, 5, 121 - 124.
36. **TENGERDY R. P.**
Vitamin E, Immune response and disease resistance, Ann. N.-Y. Acad. Sci., 1989, 570, 335 - 344.
37. **TRABER M. G., KAYDEN H. J.**
 α Tocopherol as compared with γ Tocopherol is preferentially secreted in human lipoproteins, Ann. N.-Y. Acad. Sci., 1989, 570, 95 - 105.
38. **VUILLAUME R.**
Vitamine E in Biochimie des vitamines chez les animaux, 1966, p. 37 - 47.
39. **VUILLEUMIER et coll.**
Clinical methods for the routine assessment of the vitamin status in human populations ; Part I : The fat soluble vitamin A and E and β carotene, Int. J. Vit. Nut. Res., 1983, 53, 265 - 272.

40. **WALTON T. J., MULLINS C. J.**
Tandem mass spectrometry in vitamin E analysis,
Biomed. Environ. Mass. Spectrom., 1988 16, 1-12,
Spec. iss, 289 - 298.
41. **WATIER B., DUHAMEL J. F., SALLE B., BRESSON J.L.**
Aspects pratiques in les Vitamines, Paris, Masson, 1985
p. 359 - 369.

RESUME

L'étude réalisée a porté sur la détermination du taux sérique de vitamine E chez des enfants âgés de 12 à 48 mois. Ceux-ci ont été recrutés à l'issue d'une enquête épidémiologique et ils ont été regroupés en enfants normnutris et malnutris.

Un prélèvement sanguin est effectué et le sérum obtenu soumis à un dosage analytique par chromatographie liquide à haute performance C.L.H.P. en phase inverse, sur une colonne de type ZORBAX X ODS (4,6 mm I.D. X 15 cm ODS), par détection UV à 290 nanomètres.

Les résultats obtenus à l'issue du dosage indiquent que les enfants normnutris présentaient un taux sérique de 11,38 mg/l d' tocophérol dans le sang.

. Les enfants présentant une malnutrition intermédiaire (mineure et modérée), ont un taux moyen de 11,86 mg/l.

. Les enfants souffrant de malnutrition sévère, ont un taux moyen de 7,54 mg/l :

- kwashiorkors : 7,54 mg/l ;
- marasmes : 6,29 mg/l
- kwashiorkor-marasmes : 10,05 mg/l.

L'interprétation des résultats indique l'existence d'une relation entre taux sérique en tocophérol et état nutritionnel. Peu significative au niveau des malnutritions intermédiaires, la diminution des taux l'est plus dans les malnutritions sévères (kwashiorkor, marasme). Ceci a pu être confirmé par le rapport périmètre brachial sur périmètre cranien. En effet, l'étude de ce paramètre anthropométrique a objectivé une diminution de cet indice par rapport à sa valeur de référence quel que soit le type de malnutrition en cause. En ce qui concerne les enfants sains, les taux sont comparables aux valeurs de référence de la littérature. De ce fait, nous pouvons proposer l'intervalle de normes de 5 à 16 mg/l pour l'évaluation de la tocophérolémie chez l'enfant ivoirien normnutri âgé de 12 à 48 mois.

MOTS CLES : Vitamine E

Chromatographie liquide à haute performance (H.P.L.C.)
Etat nutritionnel.