

CAHIER DE

Formation

Biologie médicale

N°38

2007

Les Vitamines



BIOFORMA

FORMATION CONTINUE DES BIOLOGISTES



Chère Consœur, Cher Confrère,

La "vitaminologie" n'a peut-être pas encore ses lettres de noblesse diagnostique et thérapeutique..., mais elle occupe une place grandissante en santé publique.

Les cahiers de formation BIOFORMA ne doivent pas toujours être que des "manuels de laboratoire", ils peuvent aussi élargir le champ des connaissances du biologiste.

Ce numéro 38 fait les deux.

C'est une somme ! Chacun y trouvera matière à renouveler son savoir, ou à l'approfondir par la pertinence des textes proposés et les avancées majeures que les auteurs, biologistes et cliniciens spécialistes dans cette discipline, développent de la biochimie jusqu'à la clinique, proposant des pistes d'investigation et de traitement des pathologies parmi les plus létales.

Le biopathologiste, grâce à l'importante partie dédiée aux techniques et à la pratique, pourra s'informer des examens déjà pratiqués dans les laboratoires hospitaliers, et de plus en plus demandés en biologie de ville.

Bien évidemment, cette évolution doit se faire dans le respect des accords conventionnels, des textes et recommandations, et la nécessaire politique de maîtrise des coûts à laquelle les biologistes participent.

Nous souhaitons donc que ce document sur les vitamines permette au biopathologiste un dialogue fécond et rationnel avec les cliniciens qui réclament de plus en plus l'expertise du laboratoire et la référence aux travaux internationaux.

Nous en profitons pour vous souhaiter une bonne année 2007, pleine de santé.

Très cordialement.

*Adrien BEDOSSA
Président*

230, boulevard Raspail
75014 Paris

Tél. 01.56.54.39.39
Fax : 01.56.54.39.30

site internet : www.bioforma.net
E-mail : bioforma@wanadoo.fr

Association régie par la loi de 1901
siret : 391 155 744 00025
code APE : 8040

Liste des auteurs ayant collaboré à la rédaction de ce cahier

Dominique Bonnefont-Rousselot

Laboratoire des Lipides - Hôpital de la Pitié
Assistance Publique-Hôpitaux de Paris
83 boulevard de l'Hôpital - 75651 Paris Cedex 13
Tél : 01 42 17 78 03 - Fax : 01 42 17 78 74
dominique.rousselot@psl.aphp.fr
Lab. de Biochimie Métabolique et Clinique (EA 3617)
Faculté de Pharmacie -
4 avenue de l'Observatoire - 75270 Paris Cedex 06
Tél : 01 53 73 96 13 - Fax : 01 53 73 97 08
dominique.bonnefont-rousselot@univ-paris5.fr

Sébastien Bonnel

Service du Professeur José-Alain Sahel
Centre Hospitalier National d'Ophthalmologie des
Quinze-Vingts
28 rue de Charenton - 75012 Paris
Tél : 06 62 18 06 53 - Fax : 01 40 02 14 99
bonnel@noos.fr

Patrick Borel

UMR 476 Inserm "Nutrition Humaine et Lipides" /
UMR 1260 INRA-IPHM - Faculté de Médecine
Université Méditerranée Aix-Marseille 2
27 boulevard Jean-Moulin - 13385 Marseille Cedex 5
Tél : 04 91 29 41 02 - Fax : 04 91 78 21 01
Patrick.Borel@medecine.univ-mrs.fr

Dominique Bouglé

Service de Pédiatrie A - CHU de Caen
14033 Caen Cedex
Tél : 02 31 27 25 94 - Fax : 02 31 27 26 55
dbougle@wanadoo.fr

Marie-Josèphe Cals

Hôpital Coirentin-Celton - 4 Parvis Coirentin-Celton
92133 Issy-les-Moulineaux
Tél : 01 58 00 40 75 - Fax : 01 58 00 43 80
marie-josèphe.cals@ccl.aphp.fr

Marie-Annette Carbonneau

Laboratoire de Nutrition Humaine et Athérogenèse
Institut de Biologie - Faculté de Médecine
Université Montpellier 1
4 bd Henri IV - 34060 Montpellier
Tél : 04 67 60 65 18 - Fax : 04 67 66 08 71
carbonneau@univ-montp1.fr

Georges Covi

Centre Hospitalier de Metz-Thionville - Hôpital Belair
rue de Friscaty - BP 60327 - 57120 Thionville
Tél : 03 82 55 81 99 - Fax : 03 82 55 82 01
g.covi@wanadoo.fr

Isabelle Cuvelier

Laboratoire Pasteur Cerba
95066 Cergy Pontoise Cedex 9
Tél : 01 34 40 20 27 - Fax : 01.34.40.20.19
lcuvelier@pasteur-cerba.com

Sophie Dalac

Service de Dermatologie - CHRU de Dijon
21034 Dijon Cedex
Tél : 03 80 29 33 36 - sophie.dalac@chu-dijon.fr

Nicolas Danchin

Département de Cardiologie - Hôpital Européen
Georges Pompidou - Paris

Agnès Dauvergne

Laboratoire de Biochimie - Hôpital Beaujon
100 bd du Général Leclerc - 92110 Clichy
Tél : 01 40 87 55 80 - Fax : 01 40 87 53 84
agnes.dauvergne@bjn.ap-hop-paris.fr

Jocelyne Draï

Centre Hospitalier Lyon-Sud. Fédération de Biochimie.
Chemin du Grand Revoyet - 69495 Pierre-Bénite Cedex
Tél : 04.78.86.15.98 - Fax : 04.78.86.66.54
jocelyne.drai@chu-lyon.fr

Olivier Fain

Service de Médecine Interne - Hôpital Jean Verdier -
APHP - avenue du 14 juillet - 93143 Bondy Cedex
olivier.fain@jvr.ap-hop-paris.fr

Henri Faure

Département de Biologie Intégrée - Bâtiment B
CHU La Tronche - BP 217 - 38043 Grenoble Cedex 9
Tél : 04 76 76 54 84 - Fax : 04 76 76 56 64
HFaure@chu-grenoble.fr

Alain Favier

UFR de Pharmacie - Domaine de la Merci
38700 La Tronche - Tél : 04 76 76 54 84
Alain.Favier@ujf-grenoble.fr - AFavier@chu-grenoble.fr

Gilles Fouret

Laboratoire de Nutrition Humaine et Athérogenèse
Institut de Biologie - Faculté de Médecine
Université Montpellier 1
4 Bd Henri IV - 34060 Montpellier
Tél : 04 67 60 65 18 - Fax : 04 67 66 08 71
fouret@univ-montp1.fr

Claude Galabert

Laboratoire de Biologie - Hôpital Renée Sabran
Hospices Civils de Lyon - bd Edouard Herriot - Giens
83406 Hyères Cedex
Tél : 04 94 38 17 80 - Fax : 04 94 38 17 72
claud.galabert@chu-lyon.fr

Anne Galinier

Laboratoire de Biochimie Générale et Nutritionnelle
Hôpital Purpan - Place du Docteur Baylac
31059 Toulouse Cedex
Tél : 05 61 77 99 74 - Fax : 05 61 77 77 91
galinier.a@chu-toulouse.fr

Isabelle Garcia

Centre Hospitalier Lyon-Sud. Fédération de Biochimie.
Chemin du Grand Revoyet - 69495 Pierre-Bénite Cedex
Tél : 04 78 86 15 98 - Fax : 04 78 86 66 54

Maurice Giroud

Service de Neurologie - Hôpital Général
3 rue du Faubourg Raines - BP 1519 - 21033 Dijon Cedex
Tél : 03 80 29 52 53 - Fax : 03 80 29 52 53
maurice.giroud@chu-dijon.fr

Jean-Louis Guéant

Unité Inserm 724 - Laboratoire de Pathologie Cellulaire
et Moléculaire - Université Henri Poincaré
Faculté de Médecine - avenue de la Forêt de Haye -
BP 184 - 54505 Vandœuvre-les-Nancy
Tél : 03 83 68 32 92 - Fax : 03 83 68 32 79
jl.gueant@chu-nancy.fr

Rosa-Maria Guéant-Rodriguez

Unité Inserm 724 - Laboratoire de Pathologie Cellulaire
et Moléculaire - Université Henri Poincaré
Faculté de Médecine - avenue de la Forêt de Haye -
BP 184 - 54505 Vandœuvre-les-Nancy
Tél : 03 83 15 44 83 - rm.rodriquez@chu-nancy.fr

Jean-Claude Guillard

Unité Neuromédiateurs et Vitamines - Hôpital Général
3 rue du Faubourg Raines - BP 1519
21033 Dijon Cedex - Tél/Fax : 03.80.29.52.01
jean-claude.guillard@chu-dijon.fr

Bernard Herbeth

Inserm U 525 - Faculté de Pharmacie
30 rue Lionnois - 54000 Nancy
Tél : 03 83 68 21 72 - Fax : 03 83 32 13 22
bernard.herbeth@nancy.inserm.fr

Marie Hervieux

Service de Neurologie - Hôpital Général
3 rue du Faubourg Raines - BP 1519 - 21033 Dijon Cedex
Tél : 03 80 29 37 53 - Fax : 03 80 29 52 67

Alain Jardel

UFR de Pharmacie Laboratoire de Physiologie
Unité mixte INSERM U 771 CNRS 6214
16 Boulevard Daviers - 49045 Angers Cedex
Tél : 02 41 22 66 07 - Fax : 02 41 48 67 33
alain.jardel@univ-angers.fr

Yves Juillièrè

Département de Cardiologie - CHU de Nancy
54505 Vandœuvre-les-Nancy Cedex

Claude-Louis Léger

Laboratoire de Nutrition Humaine et Athérogenèse
Institut de Biologie - Faculté de Médecine
Université Montpellier 1
4 Bd Henri IV - 34060 Montpellier
Tél : 04 67 60 65 18 - Fax : 04 67 66 08 71
leger@univ-montp1.fr

Gisèle Le Moel

Laboratoire de Biochimie A - Hôpital Bichat
Claude-Bernard - 46 rue Henri Huchard - 75018 Paris
Tél : 01 40 25 85 42 - Fax : 01 40 25 58 21
gisele.lemoel@tiscali.fr

Alain Lemoine

Service de Gastroentérologie et Nutrition
Hôpital de Nevers
1 boulevard de l'hôpital - 58033 Nevers Cedex
Tél : 03 86 93 71 00 - Fax : 03 86 93 71 02
alain.lemoine@ch-nevers.fr

Stéphanie Limbach

Unité Neuromédiateurs et Vitamines - Hôpital Général
3 rue du Faubourg Raines - BP 1519
21033 Dijon Cedex - Tél : 06 66 32 48 07
stephanie.limbach@wanadoo.fr

Laurent Mely

Centre de Ressources et Compétences pour la
Mucoviscidose - Hôpital Renée Sabran
Hospices Civils de Lyon bd Edouard Herriot - Giens
83406 Hyères Cedex
Tél : 04 94 38 17 40 - Fax : 04 94 38 15 09
laurent.mely@chu-lyon.fr

Fathi Moussa

Service de Biochimie - Hôpital Trousseau
26 rue du Dr Netter - 75012 Paris
Tél : 01.44.73.68.96 - Fax : 01.44.73.66.87
fathi.moussa@trs.ap-hop-paris.fr

Françoise Paillard

Service d'Explorations Fonctionnelles
Hôpital Tenon - 75020 Paris

Monique Pressac

Service de Biochimie - Hôpital Trousseau
26 rue du Dr Netter - 75012 Paris
Tél : 01.44.73.68.96 - Fax : 01.44.73.66.87
monique.pressac@trs.ap-hop-paris.fr

Lucien Richard

Centre Hospitalier de Saint-Germain-en-Laye
Département de Biologie Médicale
Rue Baronne Gérard - 78104 Saint-Germain-en-Laye
Tél : 01 39 27 47 44
lrichard@chi-poissy-st-germain.fr

Daniel Rigaud

Nutrition - CHU Le Bocage - 21033 Dijon Cedex
Tél : 03 80 29 52 72 - Fax : 03 80 29 35 19
daniel-rigaud@chu-dijon.fr

Patrice Théron

Département de Biologie
Centre Hospitalier de Versailles
177 rue de Versailles - 78157 Le Chesnay Cedex
Lab. de Biochimie Métabolique et Clinique (EA 3617)
Faculté de Pharmacie - 4 avenue de l'Observatoire
75270 Paris Cedex 06
Tél : 01 39 63 88 09 - Fax : 01 39 63 95 98
ptherond@ch-versailles.fr

Michel Vidailhet

Faculté de Médecine de Nancy - Hôpital d'Enfants
Pédiatrie 3 et Génétique Clinique
Tél : 03 83 15 46 47 - Fax : 03 83 29 37 33
michel.vidailhet@wanadoo.fr

Christian Villaume

Unité Inserm 724 - Laboratoire de Pathologie
Cellulaire et Moléculaire - Université Henri Poincaré -
Faculté de Médecine - avenue de la Forêt de Haye -
BP 184 - 54505 Vandœuvre-les-Nancy
Tél : 03 83 68 32 92 - Fax : 03 83 68 32 79

Les Vitamines

Coordonnateurs :

Jean-Claude Guillard, Bernard Herbeth et Gisèle Le Moel

Ce cahier a été rédigé sous l'égide de la Société Francophone Vitamines et Biofacteurs

PRÉFACE

En 1890, C Eijkmann met en évidence un facteur nutritionnel extrait de la cuticule de riz susceptible de guérir le béribéri. En 1910, C Funk isole de la cuticule de riz cette substance, la thiamine, et lui donne le nom de "vitamine". Ce terme fut étendu par la suite aux substances indispensables à la vie et agissant à faible dose. Les vitamines sont des substances organiques, indispensables à la croissance et aux différentes fonctions de l'organisme, sans valeur énergétique propre et incapables d'être synthétisées par l'homme. Treize substances répondent à cette définition. Les vitamines sont des micronutriments, car présentes à l'état de traces dans l'alimentation. Chez un sujet sain, une alimentation variée et suffisante couvre efficacement les besoins vitaminiques. Des apports nutritionnels conseillés, quantités de chacune des vitamines permettant de couvrir les besoins de la majorité de la population générale, ont été définis pour chaque vitamine.

Les vitamines sont impliquées dans quatre grands types de fonctions : une fonction de type hormonal pour les vitamines A et D ; une fonction de coenzyme et de cofacteur (transfert de protons, d'électrons, de groupements) ; une fonction de stabilisation des membranes pour la vitamine E ; une fonction antioxydante pour la vitamine C, la vitamine E et les caroténoïdes.

Le problème majeur en vitaminologie est l'évaluation d'une carence. On distingue la carence avec manifestations cliniques de la déficience caractérisée par des réserves vitaminiques insuffisantes pour maintenir un état fonctionnel physiologique normal, entraînant à long terme une altération de l'état de santé. Certaines déficiences vitaminiques peuvent augmenter le risque de survenue de pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, la cataracte, les malformations congénitales...

La constitution d'une carence se déroule en plusieurs étapes : épuisement des réserves, signes biologiques, puis signes cliniques qui affirment la carence. Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans une carence : défaut d'apport, malabsorption, défaut de stockage, augmentation de l'élimination, anomalie d'utilisation, augmentation des besoins.

Les carences d'apport par dénutrition sévère persistent dans les pays en voie de développement et posent un vrai problème de santé publique.

Dans les pays industrialisés, les états précarentiels se trouvent à l'intérieur de groupes de population à risques, et sont déterminés par des circonstances physiologiques : nouveau-né, femme enceinte ou allaitant ; par des circonstances pathologiques : alcoolisme chronique, tabagisme, dialyse rénale, interactions médicamenteuses ; par des comportements alimentaires particuliers : régimes végétariens, végétaliens, amaigrissants ; chez la personne âgée vivant seule ou en institution. En l'absence de mesures préventives l'état précarentiel évolue rapidement vers la carence.

L'évolution des méthodes d'évaluation du statut vitaminique a permis de déceler l'état carentiel au stade préclinique. Le diagnostic biologique d'une carence fait appel, le plus souvent, au dosage du taux circulant de la vitamine, reflet indirect du stock tissulaire. Les dosages des formes actives des vitamines, ou de marqueurs métaboliques, des protéines de transport ont amélioré le diagnostic étiologique de certaines anomalies héréditaires du métabolisme et du transport de quelques vitamines.

Cet ouvrage prend en compte ces différentes évolutions. Dans la 1ère partie, chaque vitamine fait l'objet d'un chapitre traitant des aspects biologiques et cliniques du statut vitaminique, des explorations fonctionnelles complémentaires. Pour chaque vitamine, une technique performante de dosage, couramment utilisée, est présentée en faisant référence au livre : "Le statut vitaminique. Physiologie, exploration biologique et intérêt clinique", auquel la plupart des auteurs ont participé.

Dans la 2^{ème} partie, sont développés les états pathologiques pour lesquels l'exploration du statut vitaminique a un intérêt clinique essentiel.

La diversité de ces thèmes implique une collaboration étroite entre cliniciens et biologistes dans l'exploration et le traitement d'une pathologie par carence ou déficience vitaminique.

Gisèle Le Moel

SOMMAIRE

PARTIE I MONOGRAPHIES	13
Vitamine A	14
Structure et propriétés physico-chimiques.....	14
Métabolisme.....	16
Rôles physiologiques.....	17
Exploration du statut vitaminique.....	21
Variations pathologiques.....	24
Recherches actuelles.....	26
Références bibliographiques.....	27
Caroténoïdes	29
Structure chimique - nomenclature.....	29
Rôle provitaminique A.....	29
Métabolisme.....	31
Intérêt physiopathologique - Défenses antioxydantes.....	32
Prévention des grands problèmes de santé publique actuels.....	32
Dosage.....	35
Résultats.....	36
Références bibliographiques.....	38
Vitamine D	40
Définition.....	40
Intérêt physiopathologique.....	42
Sources et apport de vitamine D.....	43
Dosage.....	44
Interprétation des résultats.....	46
Les recherches actuelles sur la vitamine D.....	47
Références bibliographiques.....	48
Vitamine E	49
Définition.....	49
Métabolisme.....	52
Rôle physiologique.....	55
Exploration du statut vitaminique - dosages.....	57
Variations physiopathologiques.....	60
Références bibliographiques.....	62
Vitamine K	64
Définition.....	64
Intérêt physiopathologique.....	64
Étape pré-analytique.....	67
Les techniques de dosages et leurs performances.....	68
Interprétation des résultats.....	69
L'état de la recherche actuelle.....	71
Références bibliographiques.....	73
Vitamine B₁	74
Définition.....	74
Exploration biologique.....	77
Interprétation des résultats.....	79
L'état de la recherche actuelle.....	81
Références bibliographiques.....	82

Vitamine B₂	84
Définition.....	84
Intérêt physiopathologique.....	86
Exploration biologique.....	89
Interprétation des résultats.....	92
L'état de la recherche actuelle.....	94
Références bibliographiques.....	95
Niacine	98
Définition.....	99
Sources.....	100
Métabolisme.....	100
Physiologie.....	103
Exploration : méthodes analytiques.....	105
Variations physiopathologiques.....	108
Stratégie diagnostique.....	111
Conclusion.....	111
Références bibliographiques.....	112
Acide pantothénique : vitamine B₅	114
Structure chimique et nomenclature.....	114
Métabolisme.....	115
Sources et apports.....	116
Physiologie.....	117
Méthodes d'exploration.....	118
Variations physiopathologiques.....	120
Traitement.....	122
Références bibliographiques.....	123
Vitamine B₆	125
Structure chimique et propriétés physicochimiques.....	125
Métabolisme.....	127
Rôles fonctionnels et intérêt physiopathologique.....	130
Apport et statut nutritionnel.....	134
Exploration du statut vitaminique.....	134
Interprétation des résultats.....	137
Recherches actuelles.....	139
Références bibliographiques.....	140
Biotine : vitamine B₈	141
Structure chimique, nomenclature.....	142
Métabolisme.....	143
Sources et apports.....	144
Physiologie.....	145
Méthodes d'exploration.....	146
Pathologies.....	148
Traitements.....	149
Références bibliographiques.....	150

SOMMAIRE

Folates : vitamine B₉	151
Définition	151
Structure et propriétés physico-chimiques	151
Métabolisme	152
Physiopathologie	155
Populations à risques de carence	156
Exploration biologique	157
Stratégie diagnostique	159
Sources et besoins	161
Conclusion	161
Références bibliographiques	162
Vitamine B₁₂	163
Définition	164
Structure	164
Métabolisme	164
Rôle physiologique et manifestations de la carence	167
Populations à risque de carence	168
Exploration biologique	169
Stratégie diagnostique	173
Sources et besoins	174
Conclusion	174
Références bibliographiques	175
Vitamine C	176
Structure chimique - Nomenclature actualisée	176
Propriétés physico-chimiques	176
Métabolisme	179
Physiologie	181
Exploration du statut	184
Variations pathologiques	186
Références bibliographiques	188
Dossier clinique	189
Assurance qualité des dosages de vitamines	190
Critères de qualité d'une analyse	191
Étalonnage	194
Contrôle interne de qualité des dosages de vitamines	195
Contrôle de qualité externe des vitamines	196
Références bibliographiques	198
PARTIE II ASPECTS PHYSIOPATHOLOGIQUES	199
Le stress oxydant	200
La notion de stress oxydant et d'espèces réactives de l'oxygène (ERO)	200
Les systèmes de défense antioxydants	201
Références bibliographiques	206
Vitamine D & PTH	207
Rappel physiologique	207
Dosages	208
Contexte pathologique de prescription du dosage	209
Interprétation et diagnostic différentiel	210
Utilisation pour le suivi biologique	211

Application à un cas clinique	211
Références bibliographiques.....	212
Hyperhomocystéinémie, vitamines du groupe B et maladies cardiovasculaires	213
Introduction.....	213
Métabolisme de l'homocystéine et effets cellulaires	214
L'homocystéine circulante.....	216
Études épidémiologiques transversales.....	218
Essais de supplémentation en vitamines du groupe B.....	219
Études cliniques.....	220
Conclusion	221
Références bibliographiques.....	222
Vitamines & facteurs xénobiotiques : alcool, tabac	226
Alcool et alcoolisme.....	226
Tabagisme actif et passif.....	232
Autres xénobiotiques.....	233
Au total.....	233
Références bibliographiques.....	235
Interférences des traitements médicamenteux au long court sur le statut vitaminique	238
Références bibliographiques.....	239
Vitamines et dermatologie	242
Rappel sur la morphologie de la peau humaine.....	242
La vitamine D et ses dérivés	244
La vitamine A	246
Indications de l'exploration du statut vitaminique en dermatologie	249
Références bibliographiques.....	251
Vitamines et neurologie	252
Vitamine A	252
Vitamine B ₁	253
Vitamine B ₂	254
Vitamine B ₃	255
Vitamine B ₆	255
Vitamines B ₉ et B ₁₂	256
Vitamine C	258
La vitamine D	258
La vitamine E.....	258
Déficit global.....	259
Indications de l'exploration du statut vitaminique en neurologie.....	259
Conclusion	260
Références bibliographiques.....	261
Vitamines liposolubles et malabsorptions lipidiques - mucoviscidose - maladie de Crohn - maladie cœliaque - pancréatites - pathologies hépatobiliaires	264
Mucoviscidose.....	265
Maladie de Crohn.....	270
Maladie cœliaque	271
Pancréatites.....	271
Maladies hépatobiliaires.....	272
Références bibliographiques.....	272

SOMMAIRE

Vitamines et micronutriments dans le diabète	274
Utilisation de minéraux micronutriments dans le diabète.....	274
Utilisation de vitamines antioxydantes et de cofacteurs dans le diabète.....	277
Conclusion.....	280
Références bibliographiques.....	282
Les vitamines et les caroténoïdes impliqués dans la vision	284
La vitamine A et son implication dans la cascade visuelle des photorécepteurs.....	284
Les vitamines E et C : des vitamines antioxydantes participant à la lutte contre le stress oxydarif	285
Les caroténoïdes, des microconstituants alimentaires impliqués dans les mécanismes de photoprotection	285
Vitamines, caroténoïdes et pathologies oculaires.....	287
Conclusion.....	290
Références bibliographiques.....	291
Interrelations entre statut vitaminique et vieillissement	293
Méthodes d'études du statut vitaminique.....	293
Statut vitaminique des sujets âgés	294
Conclusion.....	299
Références bibliographiques.....	300
Vitamines, grossesse et prématurité	302
Vitamines et grossesse.....	302
Vitamines et prématuré	310
Conclusion.....	317
Références bibliographiques.....	318
Vitamines et cancers	321
Certaines vitamines agissent sur la prévention des cancers.....	321
Les vitamines chez le malade cancéreux	336
Conclusion.....	338
Références bibliographiques.....	339
Carences en vitamine C et scorbut	345
Rappels physiologiques	345
Prévalence de l'hypovitaminose C.....	346
Quelles circonstances favorisent la carence en vitamine C dans les pays industrialisés	347
Diagnostic d'une hypovitaminose C et d'une carence : scorbut chez l'adulte, maladie de Barlow chez l'enfant.....	348
Déplétions asymptomatiques en vitamine C	351
Traitement et prévention du scorbut	352
Conclusion	352
Références bibliographiques.....	353
Anorexie mentale et troubles du comportement alimentaire	354
Définitions.....	354
Epidémiologie et fréquence	355
La dénutrition et les carences vitaminiques.....	356
Conclusion.....	358
Références bibliographiques.....	359

MONOGRAPHIES

PARTIE I

Vitamine A

Gisèle Le Moel, Agnès Dauvergne, Jean-Claude Guillard

La vitamine A, ou rétinol, intervient dans de nombreux processus biologiques essentiels : vision, kératinisation épidermique, différenciation cellulaire...

La découverte en 1987 des récepteurs nucléaires aux rétinoïdes par les équipes de Chambon et Evans a permis de mieux comprendre le mécanisme d'action de la vitamine A.

STRUCTURE ET PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

Le terme "vitamine A" désigne le rétinol, ses esters et ses dérivés métaboliques (figure 1). La structure chimique de la vitamine A a été identifiée en 1931 et sa synthèse réalisée en 1947. L'appellation "rétinoïdes" recouvre à la fois les composés naturels, mais également les composés de synthèse dérivés de la vitamine A et utilisés en tant que médicaments aux indications thérapeutiques bien précises.

Le rétinol est formé d'un noyau β -ionone sur lequel se greffe une chaîne composée de deux unités isoprénoïques portant une fonction alcool terminale. Les caractéristiques structurales du rétinol déterminent ses propriétés physico-chimiques et ses fonctions. C'est ainsi que la structure isoprénoïde du rétinol détermine sa liposolubilité. Les dérivés biologiquement actifs sont obtenus par oxydation en rétinaldéhyde ou en acides rétinoïques (acides rétinoïques tout-*trans*, 9-*cis*-ou 13-*cis*). L'estérification de la fonction alcool primaire par un acide gras, le plus souvent l'acide palmitique, produit des esters de rétinol, qui constituent la forme de stockage de la vitamine A dans l'organisme.

La présence de doubles liaisons sur la chaîne latérale entraîne des possibilités d'isomérisation qui confèrent une spécificité d'action aux différentes substances dérivées du rétinol.

La présence conjointe de la fonction alcool et de doubles liaisons rend la vitamine A très sensible à l'oxydation.

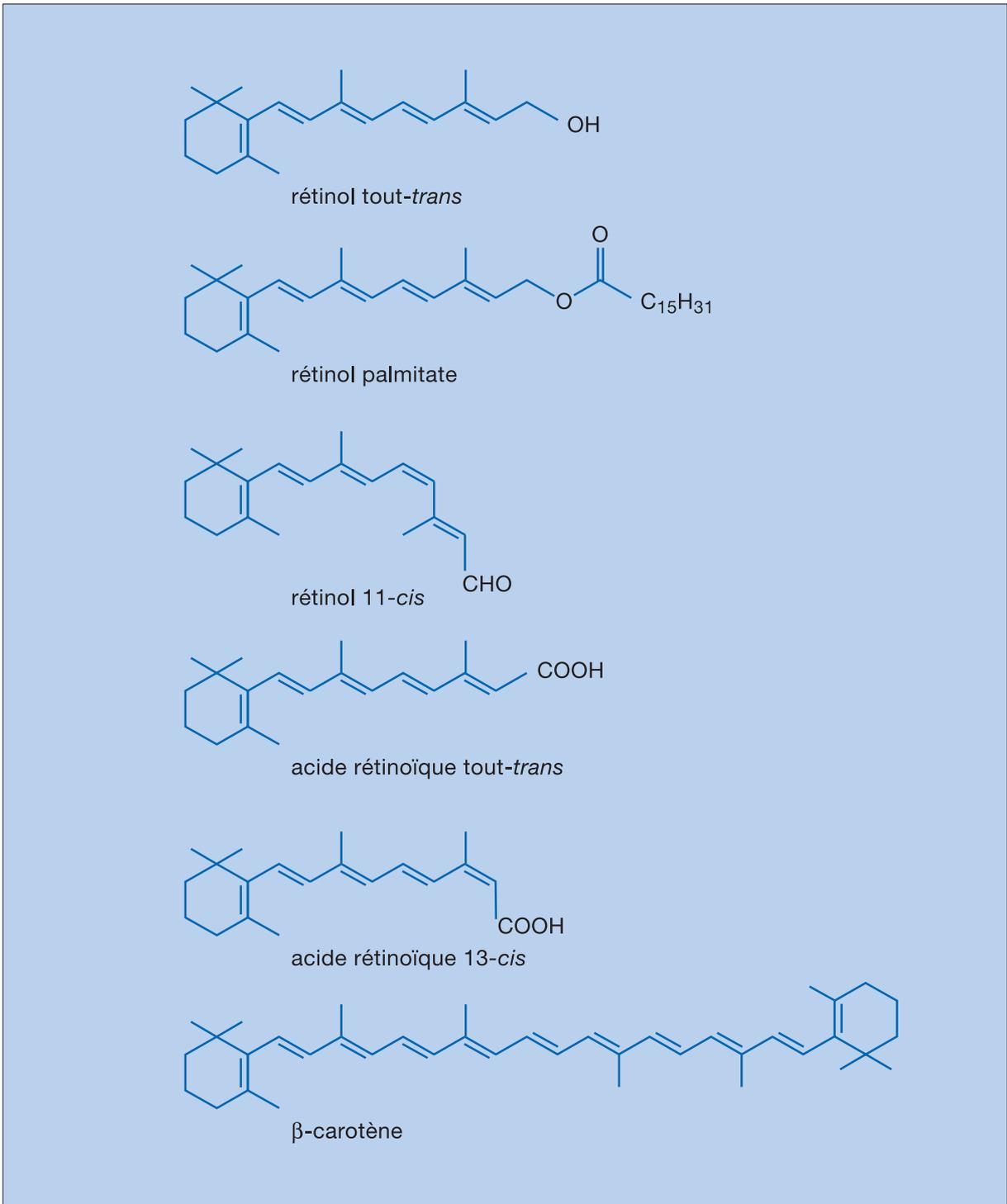


Figure 1 : Structure du β-carotène et des différents rétinoides naturels.

MÉTABOLISME

L'apport alimentaire en vitamine A est réalisé sous deux formes, les esters de rétinol présents dans les produits d'origine animale (huile de foie de poisson, foies d'animaux, œufs) et les caroténoïdes présents dans les végétaux et ayant une activité provitaminique A (β -carotène, β -cryptoxanthine et α -carotène).

Transport

Dans l'organisme, des protéines spécifiques assurent le transport du rétinol et/ou de ses dérivés liposolubles dans un milieu hydrophile, protègent les membranes de la toxicité de la vitamine A et dirigent cette dernière vers ses cibles spécifiques (Wolf, 1991).

On distingue:

- la protéine porteuse plasmatique ou *retinol-binding-protein* (RBP) ;
- les protéines vectrices cellulaires synthétisées par les cellules utilisatrices de vitamine A : la *cellular retinol-binding-protein I et II* (CRBPI et CRBPII), la *cellular retinoic acid-binding-protein* (CRABP), la *cellular retinal-binding-protein* (CRalBP) et le récepteur cellulaire du rétinol dans la rétine *l'interphotoreceptor cellular retinol-binding-protein* (IRBP).

Absorption

20 à 60 % de la ration journalière de vitamine A sont absorbés dans la partie supérieure de l'intestin grêle.

Les esters de rétinyle transformés en rétinol, sous l'action des hydrolases du pancréas et de la bordure en brosse de l'entérocyte, sont incorporés aux micelles lipidiques et absorbés selon un mécanisme actif. Le rétinol ainsi internalisé est capté par la CRBP II localisée dans les cellules intestinales puis trans-estérifié en palmitate par action de la *lecithine retinol acyl transferase* (LRAT) et passe ensuite dans la circulation générale incorporé aux chylomicrons (Blomhoff, 1994).

Les caroténoïdes, après dissolution dans des gouttelettes lipidiques, sont absorbés au niveau de la muqueuse duodénale selon un mécanisme de diffusion passive (Faure *et al.*, 1999).

Distribution

Après absorption intestinale, la vitamine A est captée par la cellule hépatique. En fonction des besoins, le rétinol est stocké dans le foie ou retourne dans la circulation pour être utilisé. Sous l'influence d'un "signal" tel que le taux intracellulaire d'acide rétinoïque ou une concentration élevée en apo RBP, le rétinol est libéré de ses esters et forme un complexe avec la RBP synthétisée à l'intérieur de la cellule hépatique (Ross, 1993). Le complexe formé est excrété dans la circulation et se lie à la transthyrétine (TTR). L'ensemble rétinol-RBP-TTR se fixe sur un récepteur membranaire ; le rétinol est alors internalisé et l'apo RBP libérée perd son affinité pour la TTR.

Au niveau intracellulaire, le rétinol lié à la CRBP suit deux voies distinctes. Une fraction du rétinol subit une série d'oxydations qui conduisent à l'acide rétinoïque, métabolite actif de la vitamine A. Celui-ci, lié à la CRABP, est véhiculé jusqu'à des récepteurs nucléaires et agit au niveau génomique. L'autre fraction est recyclée ; la RBP capte le rétinol aux dépens du complexe rétinol-CRBP et l'ensemble rétinol-RBP subit une exocytose et retourne dans la circulation générale où il pourra être utilisé de nouveau.

Élimination

Une quantité minimale du rétinol est excrétée par le rein. Le rétinol est métabolisé essentiellement par la voie de l'acide rétinoïque ; après oxydation de ce dernier, les métabolites ainsi formés sont glucuroconjugués au niveau du foie et excrétés dans la bile.

Répartition et stockage

Environ 90 % de la vitamine A de l'organisme sont localisés dans le foie, sous forme de rétinyl-esters, majoritairement dans les cellules de Ito qui contiennent aussi la CRBP et les enzymes nécessaires à la synthèse du rétinol (acyl transférase) et à l'hydrolyse des rétinyl-esters (rétinyl-palmitate hydrolase).

Le foie est l'organe le plus riche, mais on retrouve de fortes concentrations de vitamine A dans le rein et dans l'épithélium de la rétine. L'intestin, le pancréas, le poumon, la moelle osseuse, la peau et les organes de reproduction en renferment de plus faibles quantités. La vitamine E est nécessaire au stockage de la vitamine A, aussi bien dans le foie que dans les structures rétinienne ; elle empêcherait la peroxydation lipidique du rétinol.

RÔLES PHYSIOLOGIQUES

Le rôle de la vitamine A dans la vision a été pressenti depuis des millénaires, mais le caractère indispensable de cette vitamine tient au rôle fondamental de l'acide rétinoïque dans la régulation de l'expression du génome.

Mécanismes d'action

Par un mécanisme voisin de celui des hormones stéroïdes, l'acide tout-*trans* rétinoïque et son isomère, 9-*cis*, sont des ligands spécifiques de récepteurs nucléaires spécifiques, les RAR (*retinoic acid receptor*) et les RXR (*retinoic X receptor*). L'acide tout-*trans* rétinoïque se fixe sur les RAR avec une très grande affinité, et ne se fixe sur les RXR qu'à de très fortes concentrations. Le ligand des RXR, le 9-*cis* acide rétinoïque, peut fixer les RAR, mais avec une plus faible affinité. La distribution tissulaire variable des deux types de récepteurs et l'existence de gènes spécifiques aux RAR suggèrent que les récepteurs aux rétinoïdes jouent des rôles distincts.

Après pénétration dans le noyau via les CRABP, l'acide rétinoïque (sous forme *trans*, *9-cis* ou *13-cis*) se lie aux récepteurs nucléaires RAR et RXR. Ces récepteurs se dimérisent et forment des hétérodimères RAR/RXR ou RXR/RAR. Le complexe acide rétinoïque/récepteur RAR ou RXR peut également s'hétérodimériser avec un autre récepteur nucléaire (aux hormones thyroïdiennes, à la vitamine D, etc.). Ces hétérodimères se lient avec une haute affinité à des séquences spécifiques de l'ADN, les RARE (*retinoic acid responsive element*). La fixation de l'hétérodimère sur un RARE déclenche une modification (répression ou stimulation) de la transcription de certains gènes portés par l'ADN. Le récepteur nucléaire agit donc comme un facteur de transcription grâce à sa liaison avec des séquences spécifiques de l'ADN. De cette manière est régulée l'expression de facteurs intervenant en particulier sur la croissance et la différenciation des cellules ou des tissus.

Fonctions

La vitamine A intervient dans de nombreux métabolismes et au niveau d'organes très divers.

La vision

La vision crépusculaire est liée à la présence, dans les cellules en bâtonnets de la rétine, d'un pigment photosensible : la rhodopsine dont la synthèse s'effectue à partir du *11-cis*-rétinal et d'une protéine, l'opsine (Rando, 1994).

La vision des formes et des couleurs fait appel à un mécanisme équivalent grâce à la présence des iodopsines au niveau des cellules en cône de la rétine ; ces pigments sont synthétisés à partir du *11-cis*-rétinal et d'une protéine, la photopsine.

Le rétinol intervient également dans la synthèse des glycoprotéines des cellules calciformes, il est donc indispensable au maintien de l'intégrité de la cornée.

Synthèse des glycoprotéines

Dans les cellules de Sertoli et les cellules calciformes, le rétinol favorise l'incorporation du mannose dans les glycoprotéines (Wolf, 1984). Après phosphorylation, le rétinol est transformé en mannosylrétinylphosphate en présence de guanosyldiphosphomannose et d'une guanosyldiphosphomannose transférase. Il intervient ainsi dans la synthèse de l' α 1-macroglobuline, de la fibronectine et des récepteurs de l'hormone de croissance.

La reproduction

Le rôle essentiel du rétinol au niveau des organes de reproduction semble lié au fait que seul le rétinol peut être internalisé puis transféré vers les cellules cibles où son oxydation conduit à des concentrations efficaces en acide rétinoïque.

Chez l'homme

Le rétinol internalisé dans les cellules testiculaires est indispensable à la spermatogenèse. Le mannosylrétinylphosphate assure la biosynthèse des glycoprotéines spécifiques (SGP1 et SGP2) de la spermatogenèse.

Des études conduites chez les rongeurs ont mis en évidence qu'une carence en vitamine A s'accompagne d'un arrêt de la spermatogenèse et d'une baisse de la sécrétion de la testostérone ; ces troubles disparaissent avec un régime riche en vitamine A ou après une injection de fortes doses d'acide rétinoïque. C'est pourquoi il semble nécessaire d'étudier les effets des thérapeutiques des rétinoïdes sur la fonction testiculaire de l'homme (Livera *et al.*, 2002).

Chez la femme

Le rétinol joue un rôle essentiel dans la croissance et le développement du fœtus en permettant la synthèse de l'acide rétinoïque nécessaire à la différenciation cellulaire. Pendant les 13 dernières semaines de la grossesse, 9 % des réserves maternelles seront utilisées par le fœtus. En cas de statut marginal de la mère, le transport du rétinol est prioritairement effectué vers le fœtus pour que celui-ci ait un apport en vitamine A satisfaisant et ce, grâce à la présence de récepteurs membranaires à la RBP et de CRBP au niveau du placenta (Blomhoff *et al.*, 1992).

Différenciation cellulaire

Ce rôle est dévolu aux dérivés d'oxydation du rétinol, les acides rétinoïques tout-*trans*, 13-*cis* et 9-*cis*. Le maintien des structures et des fonctions des cellules épithéliales (comme les kératinocytes) et des cellules mésenchymateuses (comme les chondrocytes) dépend de l'acide rétinoïque. De plus, cet acide régule la morphogenèse de certains tissus (cœur, poumons, yeux et oreilles) lors du développement embryonnaire.

Immunité

La vitamine A intervient sur l'immunité cellulaire et humorale par l'intermédiaire de l'acide tout-*trans* rétinoïque. Elle stimule la prolifération des lymphocytes et des thymocytes et la synthèse des immunoglobulines par les lymphocytes B. Des études *in vitro* montrent qu'il existe une concentration optimale efficace, des doses faibles sont inopérantes et de fortes doses peuvent inhiber l'effet activateur. Les études épidémiologiques (Semba, 1994) mettent l'accent sur le rôle modulateur de la vitamine A dans l'immunité : la "supplémentation" par la vitamine A d'enfants carencés diminue la mortalité et la morbidité au cours des syndromes infectieux sans toutefois en abaisser la fréquence. Le manque de vitamine A diminue la réponse immunitaire humorale à certains virus (rougeole, sida) et bactéries (diphtérie, tétanos) (Bates, 1995).

La peau

La peau est constituée de l'épiderme : tissu épithélial formé de plusieurs types cellulaires (kératinocytes, mélanocytes, cellules de Langerhans, cellules de Merkel), et du derme : tissu conjonctif formé de protéines fibreuses (collagène, élastine, réticuline) et de fibroblastes.

La vitamine A est nécessaire à la différenciation épidermique et donc à la réépithélialisation ; elle permet le renouvellement des cellules de la peau, mais aussi son élasticité. Par ailleurs, les rétinyl-esters, forme de stockage de la vitamine A dans l'épiderme, ont un rôle photoprotecteur en absorbant les rayons UV (Antille *et al.*, 2003). Récemment, Seite *et al.* (2005) ont étudié les effets de l'application répétée d'un topique associant rétinol et vitamine C, sur l'épiderme et le derme de sujets âgés ou présentant des lésions dues au soleil. Après trois à six mois de traitement, ces

auteurs notent de nettes améliorations sur le plan histologique se traduisant en outre par un épaississement de l'épiderme, une couche cornée plus fine et plus lisse, une diminution du taux de procollagène de type III, une normalisation du taux de procollagène de type I, le rapport type III sur type I redevenant semblable à celui du groupe contrôle.

Les effets de la vitamine A sur la cicatrisation sont mis à profit pour le traitement des plaies dues à la corticothérapie, à la chimiothérapie et aux rayonnements solaires ; elle stimulerait la phase inflammatoire et la prolifération des fibroblastes et favoriserait la synthèse des kératinocytes. Dans les affections cutanées sévères (acné, psoriasis), des doses élevées, environ 100 000 UI par jour ont été préconisées avec un risque d'intoxication chronique (Bollag, 1983). Plus récemment, Alberts *et al.* (2004) ont évalué l'efficacité et l'innocuité de la vitamine A versus placebo dans le traitement des lésions de kératose actinique dues au soleil. Ces auteurs observent une amélioration significative des lésions pour des doses de 50 000 ou 75 000 UI/ jour données pendant un an, sans effets nocifs notables. En dermatologie, dans ces pathologies, les rétinoïdes se sont substitués au rétinol.

Vitamine A et cancers

Le cancer est une maladie multifactorielle faisant intervenir des facteurs génétiques, environnementaux et le comportement alimentaire. Le phénomène de cancérisation, qui fait qu'une cellule normale donne naissance à une population de cellules tumorales, est complexe et se déroule en plusieurs étapes dans lesquelles les radicaux libres sont impliqués.

Il est difficile de séparer vitamine A et rétinoïdes dans les données épidémiologiques où il y a amalgame entre le rôle de la vitamine A, des caroténoïdes et de l'acide rétinoïque. Le mécanisme d'action de la vitamine A et de ses dérivés n'est pas complètement élucidé. La vitamine A ne possède que très peu d'effet antioxydant ou à des doses non physiologiques. En revanche, elle agit de manière très spécifique sur le cycle cellulaire par son métabolite, l'acide rétinoïque, qui manifeste un effet antiprolifératif et un effet inducteur sur la différenciation cellulaire ; cet effet est utilisé en thérapeutique avec les rétinoïdes de synthèse (Fanjul *et al.*, 1994). Le β -carotène est lui un excellent piègeur de l'oxygène singulet et des radicaux peroxy (Di Mascio *et al.*, 1992 ; Mortensen *et al.*, 1997) ; son effet protecteur dans la phase de promotion et/ou de progression de la carcinogenèse a été montré dans de nombreuses études *in vivo*. Depuis plusieurs années, les essais randomisés pour mesurer l'efficacité des vitamines dans la prévention des cancers, se sont multipliés, les protocoles ciblant soit des populations à risques particuliers soit la population générale ; les résultats sont souvent contradictoires. Dans l'étude CARET (*The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial*, Omenn *et al.*, 1996) une incidence plus élevée de cancers bronchiques a été retrouvée dans le groupe recevant l'association rétinol- β -carotène que dans le groupe témoin. Au contraire, l'étude au Linxian (Blot *et al.*, 1993) a mis en évidence une diminution des cancers de l'œsophage et de l'estomac dans le groupe recevant une association β -carotène, vitamine E et sélénium, mais n'a pas retrouvé d'effets bénéfiques pour l'association rétinol-zinc. Dans le cas du cancer de la prostate, Bosetti *et al.* (2004) montrent un effet protecteur du β -carotène mais pas du rétinol.

Si certains résultats de "supplémentation" doivent inciter à la prudence, il ne faut pas rejeter tout rôle favorable des caroténoïdes et de la vitamine A, ou tout au moins d'une alimentation équilibrée. Les dérivés d'oxydation du rétinol (acides rétinoïques) ont fait preuve de leur efficacité, toutefois ce sont des dérivés de synthèse non dépourvus d'effets secondaires et plus proches de véritables médicaments que des vitamines.

EXPLORATION DU STATUT VITAMINIQUE

Le statut en vitamine A peut être apprécié au niveau de l'œil, par la mise en évidence des anomalies de la cornée (taches de Bitot, kératite, atrophie conjonctivale) et par le test d'adaptation à l'obscurité pour diagnostiquer l'héméralopie.

Chez l'homme, le dosage du rétinol et de ses esters peut être réalisé dans le sang et dans le foie. La rétinolémie permet de déceler les carences profondes ou les hypervitaminoses, mais ne permet pas la mise en évidence des états marginaux puisque les réserves hépatiques assurent un taux sérique normal pendant plusieurs mois. Néanmoins, le prélèvement est facilement accessible, les techniques de dosages sont fiables et ces déterminations se prêtent aisément à des études de population. Le dosage des esters de rétinol dans le foie permet d'apprécier les réserves de l'organisme ; par ailleurs, la séparation et la quantification du rétinol libre et de ses esters apportent un complément d'information dans diverses atteintes hépatiques où la répartition des esters est modifiée ; cependant, cet examen nécessite une ponction biopsie hépatique qui présente un caractère invasif et la technique est longue et délicate.

Prélèvement

Le milieu biologique en général préconisé est un prélèvement sanguin, effectué après 12 h de jeûne sur tube sec ou hépariné ; l'étude de l'influence des anticoagulants a montré une baisse significative du rétinol sur plasma citraté (Barreto-Lins, 1988).

Conservation de l'échantillon

La vitamine A dans le sang total ou dans le sérum est stable 24 h à 25 ° C, 4 semaines si le prélèvement est conservé à l'abri de la lumière et à +4 °C. Nous préconisons d'effectuer le prélèvement sous vide, d'entourer le tube par du papier d'aluminium et de le placer dans un récipient refroidi par de la glace jusqu'à son acheminement au laboratoire. Si ce délai est supérieur à 24 h, il est indispensable de centrifuger à froid (+ 4 °C) le prélèvement, de séparer le sérum ou le plasma, de le congeler à -20 °C et de l'expédier dans de la carboglace.

Pour une conservation supérieure à 1 an (2 à 3 ans), il est recommandé de placer les échantillons sous atmosphère de gaz inerte et de les conserver à -80 °C.

Principe de la méthode de dosage

Après précipitation des protéines par l'éthanol pour rompre les cénapses et extraction par l'hexane, la rétinolémie est déterminée par CLHP (Chromatographie Liquide Haute Pression) en phase inversée avec détection spectrophotométrique à 325 nm (Clerc et Delacoux, 1987). Cette méthode

recommandée par la Société française de Biologie Clinique (SFBC) présente une excellente spécificité, une reproductibilité satisfaisante (CV de 4,4 à 4,7 % selon les rétinolémies), une bonne exactitude (récupération de 94,1 à 101,4 %), une limite de détection de 0,025 $\mu\text{mol/l}$ et une linéarité parfaite jusqu'à 15 $\mu\text{mol/l}$, plage de mesure qui couvre largement les variations physiologiques et pathologiques. En pratique, ce dosage est souvent couplé à celui de l' α -tocophérol et des caroténoïdes sériques (Steghens *et al.*, 1997).

Récemment, une méthode de dosage du rétinol sur tache de sang séché, par CLHP avec détection électrochimique, a été développée (Houzé *et al.*, 2004). Cette méthode, dont la limite de détection est de 0,4 $\mu\text{mol/l}$, est tout particulièrement adaptée aux études épidémiologiques dans les pays en voie de développement, car elle réduit les difficultés de l'étape pré-analytique : faible volume de prélèvement, matériel plus simple et stockage aisé des échantillons. Par ailleurs, la différence de concentration en vitamine A entre le sang veineux et le sang capillaire est faible.

Autres approches diagnostiques

Epreuve de charge au rétinol

La rétinolémie est mesurée avant et 5 h après l'absorption par le patient d'une dose de charge en rétinol. L'augmentation de la rétinolémie est d'autant plus importante que le sujet est déplété en vitamine A (Flores *et al.*, 1984). Cette méthode est critiquable car le taux d'absorption de la vitamine A varie chez le sujet sain, d'un individu à l'autre, et selon la nature du repas ingéré. Cette méthode n'est pas utilisable chez les patients atteints de malabsorption ou de maldigestion et en cas de malnutrition protéique ou d'atteinte hépatique, en raison de la concentration de RBP trop faible.

Cytologie d'impression conjonctivale

Ce test consiste à prélever des cellules de la conjonctive sur un papier filtre et à analyser le nombre et l'aspect des cellules après fixation et coloration. Le résultat est considéré comme normal si l'on observe d'importantes plages de mucine, de nombreuses cellules caliciformes et la présence d'un épithélium normal (Fuchs *et al.*, 1994). Cette technique a une valeur prédictive négative intéressante dans un diagnostic d'exclusion d'hypovitaminose A, cependant, on observe des résultats faussement négatifs en présence d'un trachome et/ou d'inflammation.

Valeurs fréquentes et variations physiologiques

Chez l'individu sain, la rétinolémie augmente de la naissance à l'âge adulte ; il en est de même pour la concentration hépatique du rétinol et de ses esters.

Chez le sujet âgé, sans pathologie associée et sans dénutrition, les valeurs usuelles sont identiques à celles de l'adulte.

Les rétinolémies plus basses chez les prématurés que chez les enfants nés à terme pourraient s'expliquer par un défaut de maturation hépatique pour la synthèse de la RBP.

Il n'a pas été montré de rythme circadien ni de rythme saisonnier de la rétinolémie.

Tableau 1 : Valeurs usuelles du rétinol plasmatique déterminé par CLHP (Clerc et Delacoux, 1987 ; Malvy *et al.*, 1993).

Age	Vitamine A $\mu\text{mol/l}$
Nouveau-né à terme	0,45-2,36
Prématuré de 24 à 36 semaines	0,06-1,04
Enfants : 3-5 ans	0,61-1,29
6-8 ans	0,70-1,93
9-11 ans	0,90-2,00
12-13 ans	0,83-2,32
14-16 ans	0,99-2,90
Adultes	1,06-3,26

On définit, en général, l'état du statut nutritionnel en vitamine A en fonction de la rétinolémie.

Rétinolémie	Statut nutritionnel
0,70 à 1,75 $\mu\text{mol/l}$	Satisfaisant
< 0,35 $\mu\text{mol/l}$ = problème de santé publique	Carencé
0,35-0,70 $\mu\text{mol/l}$	Marginal
1,75-3,5 $\mu\text{mol/l}$	Excessif
> 4,50 $\mu\text{mol/l}$	Toxique

La RBP joue un rôle critique dans l'exploration du statut vitaminique A : toute diminution de sa synthèse entraîne celle du rétinol plasmatique ; inversement, le rétinol régule la libération de RBP par le foie et toute carence en vitamine A sera accompagnée d'une diminution de la RBP circulante alors que le taux de synthèse par l'hépatocyte reste normal. Par ailleurs, on observe une diminution de la RBP circulante en cas de malnutrition et dans les états inflammatoires, et une augmentation de celle-ci dans l'insuffisance rénale chronique et les stéatoses hépatiques.

L'OMS recommande donc d'associer aux critères biologiques les signes cliniques et les données nutritionnelles pour diagnostiquer l'état de carence ou l'état marginal.

VARIATIONS PATHOLOGIQUES

Hypovitaminose A

Causes

Dans les pays industrialisés, à la différence des pays en voie de développement, l'état carenciel est rare ; il est associé à des pathologies de dénutrition profonde telles que sida et cancers.

On distingue trois causes d'hypovitaminose A : les carences d'apport, les défauts d'absorption intestinale et les perturbations du stockage liées aux hépatopathies.

La carence d'apport est souvent aggravée par une malnutrition protéino-énergétique.

Les défauts d'absorption ou les malabsorptions des graisses sont des causes fréquentes d'hypovitaminose A : maladie coéliqua, sprue, mucoviscidose ou fibrose kystique chronique du pancréas, atrésie des voies biliaires.

Les hépatopathies telles la cirrhose alcoolique ou posthépatique, l'hépatite chronique active entraînent des syndromes carenciels par défaut de stockage des esters de rétynyle, par déficit de synthèse de la RBP et par défaut de relargage du rétinol.

Le zinc intervient au niveau de la mobilisation de la vitamine A. La déficience en zinc est souvent associée à des teneurs plasmatiques basses en rétinol malgré des réserves hépatiques en vitamine A normales.

Signes cliniques

L'état précarenciel peut être observé sans expression clinique révélatrice d'où la difficulté de le diagnostiquer. L'examen cytologique de l'impression conjonctivale est un bon test d'exclusion.

Chez l'enfant

La carence en vitamine A reste la 1^{ère} cause de cécité infantile dans le monde avec héméralopie (difficulté d'adaptation à l'obscurité par diminution du taux de rhodopsine) puis xérophtalmie et diminution de la transparence de la cornée par atteinte de l'épithélium de la conjonctive. Sans traitement, la carence en vitamine A conduit à une opacité complète de la cornée avec ulcération, à une cécité irréversible, et à la présence de taches de Bitot sur la conjonctive bulbaire.

On observe aussi un retard de croissance explicable d'une part par l'interaction entre les récepteurs nucléaires de la vitamine D et les récepteurs des rétinoïdes et d'autre part par le rôle du pyrophosphate de rétynyle dans la synthèse des récepteurs membranaires à l'hormone de croissance.

En tenant compte du rôle de la vitamine A dans l'immunité, une carence en cette vitamine entraîne une sensibilité accrue aux infections et plus particulièrement aux infections respiratoires liées à la modification de l'épithélium trachéo-bronchique (apparition de bronchiolites, syndrome des membranes hyalines...).

Chez l'adulte

L'état précarentiel se manifeste par une atteinte oculaire avec diminution de la vision crépusculaire, une moindre résistance aux infections et une anorexie.

Une altération cutanée (dessèchement intense de la peau, hyperkératose, kératinisation de la cavité buccale, gorge, nez, et voies respiratoires, atrophie des glandes sébacées et sudorales) est souvent observée mais n'est pas spécifique car ces signes cliniques existent aussi dans les carences en vitamines B.

Une anémie par trouble de l'utilisation des réserves martiales est associée à l'état subcarentiel en vitamine A.

Signes biologiques

Le rétinol plasmatique dans les états de carence est souvent inférieur à $0,70 \mu\text{mol/l}$ (vs $1,06-3,26$) avec un rapport vitamine A/RBP $< 0,80$ et une RBP normale ou diminuée.

Au cours d'une carence en vitamine A, la RBP plasmatique peut diminuer de 50 % et la majorité se trouve sous forme libre plutôt que liée au rétinol.

La diminution de la concentration hépatique en rétinol est la preuve formelle de carence mais cet examen trop invasif est rarement pratiqué. Chez l'adulte, une concentration hépatique inférieure à 70 nmol/g de foie est significative d'une carence profonde.

L'hypervitaminose A

Causes

L'hypervitaminose A est essentiellement due à un excès d'apport par automédication prolongée, mais aussi par consommation importante de foies d'animaux ou d'huile de foie de poisson. Elle peut se rencontrer si la synthèse de RBP est basse (carence protéique, carence en zinc, hépatopathies), le transport du rétinol étant incomplètement assuré. La vitamine A s'accumule dans les tissus et peut être toxique.

Certaines pathologies : glomérulonéphrites, hyperlipémie, diabète, insuffisance rénale chronique, hypothyroïdie peuvent induire une hypervitaminose A chronique.

Signes cliniques

Chez l'adulte, l'intoxication aiguë est causée par l'absorption de doses supérieures à 100 fois les apports quotidiens conseillés. La symptomatologie d'apparition rapide, moins de 8 heures, se traduit par une lassitude, des céphalées, des vertiges, une sécheresse des téguments avec hyperkératose et une diminution de la sécrétion sébacée. Les signes cliniques de l'intoxication chronique sont : asthénie, anorexie, insomnies, nausées, vomissements, diarrhées, signes cutanés (desquamation et prurit, alopecie, œdème des paupières), hépatomégalie avec hypertension portale et fibrose centrolobulaire.

Chez le nourrisson, l'intoxication chronique entraîne une hypertension intracrânienne et le bombement de la fontanelle.

Chez l'enfant, un surdosage entraîne une hyperostose anarchique au niveau de l'os long et une soudure précoce des épiphyses, dues à l'action de la vitamine A sur la croissance et la minéralisation osseuse.

Les signes sont réversibles avec l'arrêt d'apport de vitamine A, à l'exception de l'enfant chez lequel les séquelles osseuses peuvent être irréversibles.

Signes biologiques et cytologiques

Les concentrations plasmatiques de rétinol et de RBP sont augmentées et on retrouve la présence d'esters de rétinol, en particulier du palmitate à des concentrations $> 0,2 \mu\text{mol/l}$.

La teneur du foie en vitamine A est supérieure à 2000 nmol /g.

L'hypervitaminose A entraîne un allongement du temps de saignement, une VS accélérée, une augmentation des transaminases, des phosphatases alcalines et du calcium sérique (Bergman, 1988).

En cytologie, de nombreuses cellules de Ito sont observées dans la biopsie hépatique. À 325 nm, elles émettent une fluorescence bleutée liée à la présence d'esters de rétinol.

La biopsie de peau en microscopie électronique montre une hyperkératose et une atrophie des glandes sébacées.

Hypervitaminose et tératogénèse

La vitamine A possède une action tératogène irréversible sur le fœtus, d'où la recommandation pour la femme enceinte de consommer en quantité modérée les aliments riches en vitamine A et d'éviter les "supplémentations" en vitamine A sans avis médical. Ces apports doivent être égaux ou inférieurs à 1 000 μg , ou 3 300 UI/ jour. De même, pour tout traitement à base de vitamine A ou de ses dérivés, chez une femme en âge de procréer, une contraception efficace est obligatoire et doit être poursuivie au moins un mois après l'arrêt du traitement par l'acide rétinoïque et un an pour les rétinoïdes aromatiques.

Chez le fœtus, la nature et l'intensité des malformations dépendent du stade du développement embryonnaire. Les malformations intéressent le système nerveux, le crâne et le squelette, l'appareil urinaire, et le cœur.

RECHERCHES ACTUELLES

Les recherches actuelles explorent les propriétés du rétinol mais surtout celles de ses précurseurs (le β -carotène) et de ses dérivés (les rétinoïdes). Mais des actions préventives sur les cancers se sont mises en place, en agissant sur les apports nutritionnels, la qualité des aliments (consommation journalière de fruits et légumes riches en caroténoïdes précurseurs de la vitamine A) et sur l'environnement.

Références bibliographiques

- Alberts D, Ranger-Moore J, Einspahr J et al.** (2004). Safety and efficacy of dose-intensive oral vitamin A in subjects with sun-damaged skin. *Clin Cancer Res*, **10** : 1875-1880.
- Antille C, Tran C, Sorg O et al.** (2003). Vitamin A exerts a photoprotective action in skin by absorbing ultraviolet B radiation. *J Invest Dermatol*, **121** : 1163-1167.
- Barreto-Lins MH, Campos FA, Azevedo M, Flores H** (1988). A re-examination of the stability of retinol in blood and serum, and effects of a standardized meal. *Clin Chem*, **34** : 2308-2310.
- Bates CJ** (1995). Vitamin A. *Lancet*, **345** : 31-35.
- Bergman S, O'Mailia J, Krane N, Wallin J** (1988). Vitamin A induced hypercalcemia : response to corticosteroids (case report). *Nephron*, **50** : 362-364.
- Blomhoff R, Green MH, Norum KR** (1992). Vitamin A: physiological and biochemical processing. *Annu Rev Nutr*, **12** : 37-57.
- Blomhoff R** (1994). Transport and metabolism of vitamin A. *Nutr Rev*, **52** : S13-S23.
- Blot WJ, Li JY, Taylor PR et al.** (1993). Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J Natl Cancer Inst*, **85** : 1483-1492.
- Bollag W** (1983). Vitamin A and the retinoids: From nutrition to pharmacotherapy in dermatology and oncology. *Lancet*, **8329** : 860-863.
- Bosetti C, Talamini R, Montella M et al.** (2004). Retinol, carotenoids and the risk of prostate cancer: A case-control study from Italy. *Int J Cancer*, **112** : 689-692.
- Clerc M, Delacoux E** (1987). Dosage de la rétinolémie par chromatographie liquide. *Ann Biol Clin*, **45** : 469-473.
- Di Mascio P, Sundquist AR, Devasagayam TPA, Sies H** (1992). Assay of lycopene and other carotenoids as singlet oxygen quencher. *Methods Enzymol*, **213** : 429-432.
- Fanjul A, Dawson MI, Hobbs PD et al.** (1994). A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation. *Nature*, **372** : 107-111.
- Faure H, Fayol V, Galabert C et al.** (1999). Les caroténoïdes : 1. Métabolisme et physiologie. *Ann Biol Clin*, **57** : 169-183.
- Flores H, Campos F, Araujo RC, Underwood B** (1984). Assessment of marginal vitamin A deficiency in Brazilian children using the relative dose response procedure. *Am J Clin Nutr*, **40** : 1281-1289.
- Fuchs GJ, Ausayakhun S, Ruckphaopunt S et al.** (1994). Relationship between vitamin A deficiency, malnutrition and conjunctival impression cytology. *Am J Clin Nutr*, **60** : 293-298.
- Houzé P, Beltz S, Samba C et al.** (2004). Dosage de la vitamine A sur taches de sang séché par chromatographie liquide haute pression avec détection électrochimique. *Ann Biol Clin*, **62** : 539-546.
- Livera G, Rouiller-Fabre V, Pairault C et al.** (2002). Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. *Reproduction*, **124** : 173-180.
- Malvy D, Burtschy B, Dostalova L, Amedee-Manesme O** (1993). Serum Retinol, β -Carotene, α -Tocopherol and Cholesterol in Healthy French Children. *Int J Epidemiol*, **22** : 237-246.

Mortensen A, Skibsted LH, Sampson J et al. (1997). Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. *FEBS Lett*, **418** : 91-97.

Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD et al. (1996). Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med*, **334** : 1150-1155.

Paganelli GM, Biasco G, Brandi G et al. (1992). Effect of vitamin A, C and E supplementation on rectal cell proliferation in patients with colorectal adenomas. *J Natl Cancer Inst*, **84** : 47-51.

Rando R. Retinoid isomerization reactions in the visual system. In : Blomhoff R (1994). *Vitamin A in health and disease*. Marcel Dekker, New York, 503-529.

Ross C (1993). Overview of retinoid metabolism. *J Nutr*, **123** : 346-350.

Seite S, Bredoux C, Compan D et al. (2005). Histological evaluation of a topically applied retinol-vitamin C combination. *Skin Pharmacol Physiol*, **18** : 81-87.

Semba R (1994). Vitamin A, immunity and infection. *Clin Inf Dis*, **19** : 489-499.

Steghens JP, Van Kappel AL, Riboli E, Colombel C (1997). Simultaneous measurement of seven carotenoids, retinol and α -tocopherol in serum by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*, **694** : 71-81.

Wolf G (1984). Multiple functions of vitamin A. *Physiol Rev*, **64** : 873-936.

Wolf G (1991). The intracellular vitamin A-binding proteins: an overview of their functions. *Nutr Rev*, **49** : 1-12



Caroténoïdes

Henri Faure

STRUCTURE CHIMIQUE - NOMENCLATURE

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles, colorés en jaune à orange et très répandus dans le monde végétal puisqu'on n'en connaît actuellement pas moins de 600. Dans le plasma et les tissus humains, seule une vingtaine d'entre eux est retrouvée à des concentrations détectables par les méthodes analytiques actuelles.

Les caroténoïdes ne sont pas considérés comme des vitamines car, s'ils ne sont pas synthétisables, leur caractère essentiel n'a pas encore été démontré de façon formelle chez l'homme. Cette notion pourrait cependant évoluer, notamment pour la lutéine et la zéaxanthine car le rôle protecteur de ces deux caroténoïdes vis-à-vis de la rétine semble se confirmer.

Classiquement, les caroténoïdes sont formés d'une chaîne en C18 avec doubles et simples liaisons en alternance et portant 4 groupements méthyles ; cette chaîne porte un cycle β -ionone hexagonal partiellement insaturé à chacune de ses extrémités (Bender, 2003 ; Faure *et al.*, 1999). La structure des cycles β -ionones, en particulier, la position de la double liaison, la présence ou non de groupements hydroxyles et l'ouverture de ces cycles, va déterminer la nature du caroténoïde. Les doubles liaisons de la chaîne hydrocarbonée vont par ailleurs créer des isoméries *cis-trans*. La structure des caroténoïdes les plus couramment rencontrés dans le sang est décrite dans la [figure 1](#).

La présence de fonctions alcools sur les cycles β -ionones rend la molécule un peu moins lipophile ; on distingue sur ce principe les xanthophylles moins apolaires, et les carotènes, extrêmement apolaires car ne portant pas de groupement électronégatif.

RÔLE PROVITAMINIQUE A

Le clivage de l' α -carotène, du β -carotène et de la β -cryptoxanthine donne du rétinol, lui-même oxydé essentiellement en rétinol, mais aussi en acide rétinoïque. Cette source représente 25 à 50 % des apports journaliers de vitamine A chez les personnes en bonne santé et mangeant de façon équilibrée. Le clivage des caroténoïdes provitaminique A est réalisé majoritairement par la β - β carotène 15,15' monooxygénase (E.C. 1.14.99.36 ; Leuenberger *et al.*, 2001), anciennement appelée β -carotène 15-15' dioxygénase (ex E.C. 1.13.11.21). Le clivage peut être également asymétrique après action d'un ou plusieurs enzymes ou après attaque radicalaire des caroténoïdes

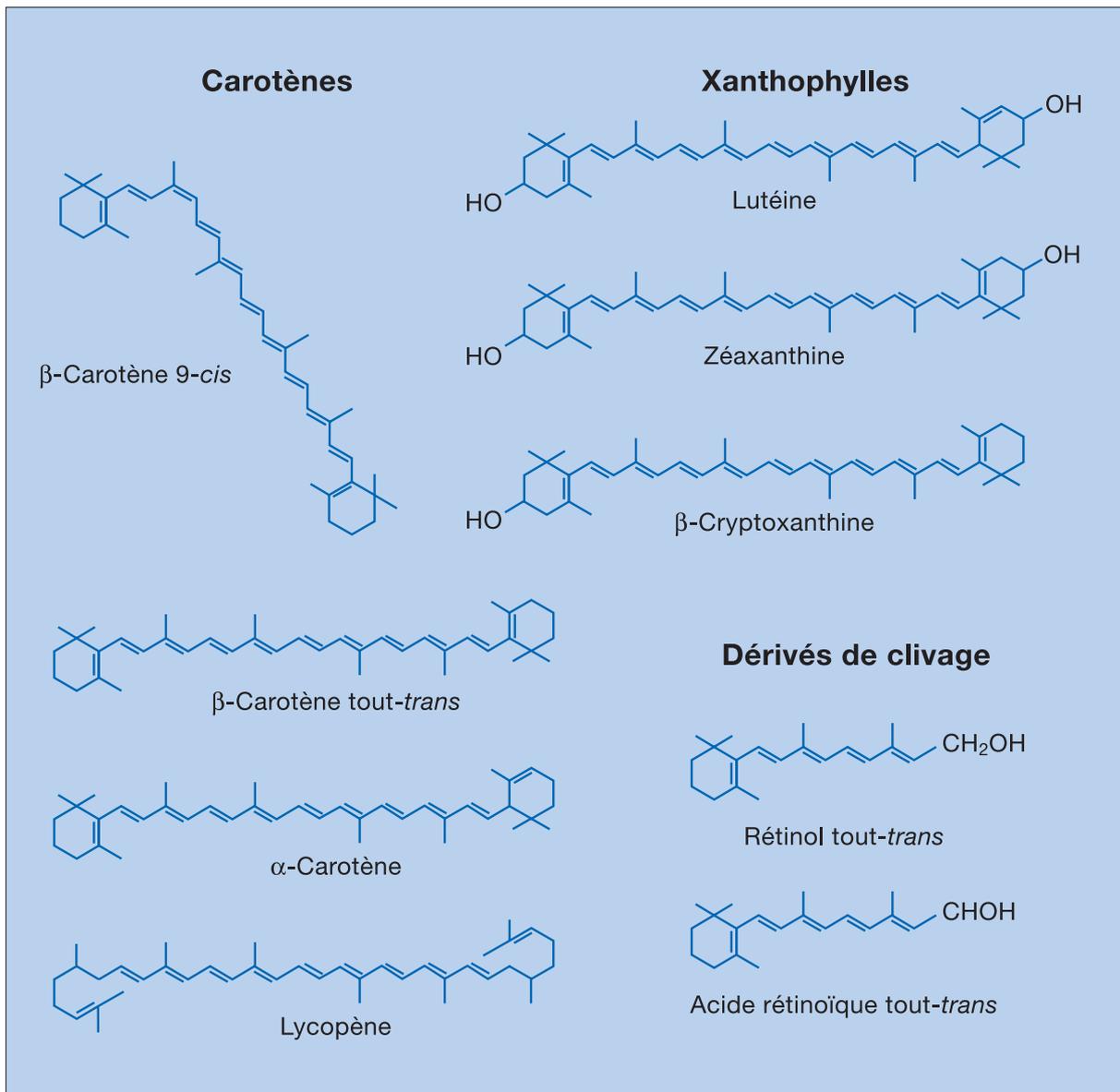


Figure 1 : Structure des principaux caroténoïdes et de leurs dérivés (Borel et al., 2005).

provitamines A. Le clivage asymétrique conduit aussi au rétinol mais avec des rendements plus faibles (Borel et al., 2005).

Le β -carotène est souvent utilisé pour corriger des états subcarenciels en vitamine A. En effet, la vitamine A est potentiellement tératogène et hépatotoxique lorsqu'on l'utilise à doses thérapeutiques ; les caroténoïdes même administrés à des doses supra-nutritionnelles, n'ont eue aucune toxicité (tableau 1).

Théoriquement, une molécule de β -carotène devrait pouvoir donner deux molécules de rétinol. En fait, les cinétiques par isotopes stables montrent qu'il faut entre 6 et 13 β -carotènes pour former un rétinol ou 2 fois plus des autres caroténoïdes. Il existe une très grande variabilité interindividuelle.

Tableau 1 : Équivalences de conversion des caroténoïdes provitaminiques A avec le rétinol (Institute of Medicine, 2000).

1 équivalent activité rétinol (= 1 µg ER)	Rapport Rétinol/Caroténoïde
= 1 µg de rétinol tout- <i>trans</i>	1:1
= 2 µg de tout- <i>trans</i> β-carotène en supplément	1:1
= 12 µg de tout- <i>trans</i> β-carotène alimentaire	6:1
= 24 µg des autres caroténoïdes provitaminiques A	12:1

MÉTABOLISME

Absorption intestinale

Les courbes d'absorption intestinale des caroténoïdes suggèrent, au moins pour certains, des transporteurs cellulaires ; en particulier, on a montré récemment que la lutéine est absorbée à l'aide du *scavenger receptor* de classe B type 1 (SR-B1). Les caroténoïdes sont ensuite incorporés dans les chylomicrons et excrétés dans la lymphe (6 heures après absorption pour le β-carotène) ; une partie est captée par le foie où les caroténoïdes provitaminiques subissent une conversion partielle en vitamine A. La cuisson augmente la biodisponibilité en brisant les structures cellulaires végétales. Une quantité minimale de triglycérides est nécessaire à l'absorption, mais les fibres alimentaires diminuent la biodisponibilité.

Transport, stockage

Les caroténoïdes non convertis en vitamine A, sont incorporés aux VLDL, aux LDL (32 heures après absorption pour le β-carotène), puis ensuite aux HDL (48 heures après absorption) dans certains tissus périphériques. On trouve environ 55 % des caroténoïdes dans les LDL, 31 % dans les HDL, et 14 % dans les VLDL. Mais, les xanthophylles sont plus abondantes dans les HDL, alors que les carotènes sont plus présents dans les LDL. 80 % des caroténoïdes sont stockés dans le tissu adipeux et 10 % dans le foie. La zéaxanthine est présente à très forte concentration dans la macula, et la lutéine dans la rétine.

Le catabolisme et l'élimination des caroténoïdes se font quasi exclusivement par clivage, celui-ci donnant soit de la vitamine A pour les caroténoïdes ayant une activité provitaminique A, soit des apocaroténals.

INTÉRÊT PHYSIOPATHOLOGIQUE - DÉFENSES ANTIOXYDANTES

Les oxygène-singulets $^1\text{O}_2$ sont des espèces réactives de l'oxygène (ROS) non radicalaires. Ils sont produits dans l'organisme par les radiations, les peroxydases, la lipooxygénase, par le *respiratory burst* des polynucléaires, l'eau oxygénée. Ils altèrent les acides nucléiques (et sont donc mutagènes), les lipides, les protéines. Le lycopène, la canthaxanthine, le β -carotène, l'astaxanthine, la lutéine, la zéaxanthine et l' α -carotène ont un pouvoir anti oxygène-singulet décroissant. Le β -carotène inhibe aussi la peroxydation lipidique par blocage des peroxydes. Mais, sous des pressions partielles en oxygène très élevées et non physiologiques, les caroténoïdes peuvent devenir pro-oxydants

PRÉVENTION DES GRANDS PROBLÈMES DE SANTÉ PUBLIQUE ACTUELS

Maladies cardiovasculaires

De nombreuses études épidémiologiques sur l'effet protecteur des caroténoïdes vis-à-vis des maladies cardiovasculaires ont été menées. Lee *et al.* (1999) dans la *Women's Health Study* observent qu'un supplément de 50 mg de β -carotène/j (soit environ 10 fois les apports habituels) n'a aucun effet protecteur sur les maladies cardiovasculaires. Rissanen *et al.* (2003), en Finlande, décrivent que l'épaisseur intima-média est supérieure chez les personnes ayant un statut en lycopène bas. À l'opposé, pour Sesso *et al.* (2004), le risque relatif d'accidents vasculaires cérébraux est de 0,56 pour les personnes dont le lycopène est le plus élevé. D'après Hak *et al.* (2004), les risques relatifs d'accidents vasculaires cérébraux sont plus bas chez les sujets dont les caroténoïdes sont situés dans le quintile supérieur par rapport à ceux dont les caroténoïdes sont dans le quintile inférieur : RR = 0,59 pour l' α -carotène, 0,62 pour le β -carotène et 0,61 pour le lycopène. Les études épidémiologiques concluent majoritairement à un effet bénéfique des caroténoïdes, mais cet effet n'a pas été reproduit par supplémentation. Or, les caroténoïdes sont apportés essentiellement par les fruits et les légumes, et il y a dans ces aliments de nombreuses autres molécules susceptibles de protéger contre les maladies cardiovasculaires : folates, polyphénols, flavonoïdes, vitamine C ; rien ne prouve que les protections observées sont dues non pas aux caroténoïdes, mais à ces autres composés. Il faudrait des supplémentations proches des apports physiologiques, et avec au moins 3 caroténoïdes dont l' α - et le β -carotène, le lycopène, la lutéine.

Cancers

Comme pour les maladies cardio-vasculaires, de nombreuses études ont été menées sur le rôle préventif éventuel des caroténoïdes vis-à-vis de différents cancers. Gann *et al.* (1999) trouvent un risque relatif de 0,56 pour le cancer de la prostate chez les sujets dont le lycopène sérique se situe dans le quintile supérieur. Giovannucci *et al.* (2002) font état d'un risque relatif de 0,84 pour le cancer de la prostate chez les sujets dont les apports de lycopène sont dans le quintile supérieur par rapport à ceux ayant des apports de lycopène dans le quintile inférieur. Enfin, SU.VI.MAX a étudié l'effet de suppléments de 5 mg de β -carotène par jour associé à 120 mg de vitamine E, 30 mg de vitamine C, 100 μ g de sélénium et 20 mg de zing chez 13.000 volontaires pendant 8 années (Hercberg *et al.*, 2004). Cette "supplémentation" diminue l'incidence de tous les cancers chez l'homme, mais seulement chez les sujets dont le β -carotène est bas à l'inclusion. Dans quelques essais randomisés d'intervention, le β -carotène n'est pas toujours apparu comme bénéfique. Albanes *et al.* (1995), dans l'étude ATBC, ont supplémenté de gros fumeurs avec 20 mg de β -carotène par jour (5 fois les apports normaux), ce qui a provoqué une augmentation des cancers du poumon, de la prostate et de l'estomac. Smigel *et al.* (1996), dans l'étude CARET, ont administré des suppléments de 30 mg/j de β -carotène (soit 10 fois les apports normaux) et 25 000 UI (10 fois les apports recommandés) de palmitate de rétinol chez des sujets qui étaient fumeurs ou ayant été au contact de l'amiante. Les promoteurs ont dû stopper cet essai à cause d'un plus grand nombre de cancers chez les sujets supplémentés.

Pour une meilleure approche d'un rôle préventif éventuel des caroténoïdes, il semble souhaitable d'une part de choisir un supplément contenant au moins 3 caroténoïdes, parmi l' α -carotène, le β -carotène, le lycopène, la lutéine, à des doses proches des apports physiologiques pour éviter les problèmes constatés dans les études CARET et ATBC et d'autre part de sélectionner des sujets ayant des taux circulants de caroténoïdes bas. Le lycopène semble le plus actif, surtout sur le cancer de la prostate, mais trop peu d'études de "supplémentation" sont actuellement disponibles pour pouvoir conclure.

Dégénérescence maculaire de la rétine (DMLA)

Depuis environ 10 années, plusieurs travaux ont suggéré que la lutéine et la zéaxanthine peuvent protéger la rétine contre le vieillissement et la dégénérescence. Mares-Perlman *et al.* (2001) décrivent que le risque relatif de DMLA est beaucoup plus faible (RR = 0,1) chez les sujets dont les apports alimentaires en lutéine et zéaxanthine sont dans le quintile supérieur que chez ceux dont les apports sont dans le quintile inférieur. Richer *et al.* (2004), dans une étude de "supplémentation" en double insu consistant à administrer 10 mg de lutéine/j pendant 1 an à des patients atteints de DMLA, trouvent une augmentation de la densité maculaire et une amélioration de tous les paramètres visuels dans le groupe supplémenté. Des études complémentaires sont nécessaires, mais l'effet de la lutéine sur la DMLA semble maintenant démontré.

Malabsorptions - maldigestions

L'abaissement de la teneur du sérum en β -carotène est un signe sensible, bien que non spécifique, de maladie cœliaque. Les patients atteints de mucoviscidose ont également un taux circulant de β -carotène abaissé. La digestion et l'absorption des caroténoïdes nécessitent en effet l'intégrité des fonctions hépatique, pancréatique et intestinale. La Société Française de Biologie Clinique mène actuellement une étude sur l'intérêt du dosage de la caroténémie dans le diagnostic et le suivi de la mucoviscidose, de la maladie cœliaque, des cancers du pancréas, des pancréatectomies et pancréatites chroniques, des obstructions des voies biliaires, des cirrhoses biliaires primitives et des maladies de Crohn. Les résultats préliminaires montrent un abaissement de tous les caroténoïdes notamment chez les patients atteints de mucoviscidose et chez les patients souffrant de maladie de Crohn.

Comme il n'y a pas réellement de contrôle de l'absorption, en l'absence de problème de maldigestion ou de malabsorption, les concentrations plasmatiques en caroténoïdes augmentent quasiment proportionnellement aux quantités ingérées. Les caroténoïdes sont ainsi un bon marqueur de la quantité de fruits et légumes absorbée chaque jour par une personne.

Tableau 2 : Aliments les plus riches en divers caroténoïdes.

α -carotène	carotte, melon, courge
lycopène	tomate, goyave, pastèque, raisin rouge
β -cryptoxanthine	agrumes, pêche, mangue
lutéine, zéaxanthine	courge, légumes verts, maïs
β -carotène	tous les aliments ci-dessus

Caroténodermie

Une caroténodermie spectaculaire mais bénigne apparaît lorsque la concentration des caroténoïdes totaux dosés par HPLC dépasse 5 $\mu\text{mol/l}$ de sérum. Elle est due le plus souvent à un excès d'apport, fréquent chez les enfants.

Les autres causes sont le diabète, les déficits thyroïdiens, l'anorexie mentale, l'insuffisance hépatique ou bien le déficit en β -carotène 15,15'-dioxygénase (ou β - β carotène monoxygénase).

Étapes préanalytiques

Classiquement, les caroténoïdes se dosent sur sérum, mais les plasmas recueillis sur tube hépariné ou EDTA peuvent tout à fait être utilisés. Les caroténoïdes sont tous plus ou moins sensibles à la fois à la lumière - surtout la lumière solaire directe et aux rayons ultraviolets - et aux températures élevées. Une fois le prélèvement sanguin réalisé, il faudra donc centrifuger le sang, recueillir le sérum ou le plasma et congeler dans un délai d'une heure et demie (Gross *et al.*, 1995), à -20 °C ou mieux à -80 °C dans l'attente du dosage.

La conservation de tous les caroténoïdes est parfaite à -20 °C pendant 5 mois. À -80 °C et aux températures inférieures, les échantillons peuvent être conservés pendant plus de deux ans et demi. À -70 °C, le β -carotène est stable pendant environ 15 années (Comstok *et al.*, 1993). Il faut cependant congeler dans des tubes spéciaux pour la congélation, avec de préférence une fermeture à bouchon vissant pour assurer une bonne étanchéité.

Techniques de dosages

Les techniques de dosage des caroténoïdes ont fait l'objet d'une revue précise et documentée dans un article publié par le groupe de travail "caroténoïdes" de la Société Française de Biologie Clinique (Steghens *et al.*, 2000). En pratique, les méthodes de dosage des caroténoïdes sont toutes basées sur la chromatographie liquide à hautes performances et essentiellement deux techniques donnant de bons résultats ont été publiées (Grolier, 1998). Toutes deux nécessitent l'utilisation de l'échinénone comme étalon interne. Ce caroténoïde trouvé chez l'oursin n'est malheureusement pas disponible sur le marché des produits de chimie fine et les laboratoires peuvent s'adresser à des firmes du domaine des vitamines pour s'en procurer. Le dosage sélectif nécessite un système HPLC à gradient équipé d'un détecteur à barrette de diode (*diode array detector* ou *DAD*) pour assurer le maximum de sensibilité de détection pour chacun des caroténoïdes. À cause de la grande sensibilité de la migration des caroténoïdes aux variations de température, un four, de préférence à effet Peltier, est également indispensable au dosage.

La méthode de Steghens (2000), peut être simplifiée, rendue plus fiable et plus économique en n'utilisant qu'une seule colonne de 15 cm remplie de grains de silice de 3 μm au lieu des deux colonnes en série préconisées qui génèrent rapidement des pressions très élevées. La séparation de la lutéine et de la zéaxanthine est améliorée en ajoutant 2 à 3 % d'eau dans la phase A.

En France, moins de 10 laboratoires réalisent la séparation et le dosage sélectifs des caroténoïdes dans le sang en routine et les deux techniques citées ci-dessus sont utilisées en proportions égales. Les coefficients de variation sont cependant élevés à causes des très faibles concentrations dosées : moins d'une micromole par litre si l'on excepte le β -carotène et le lycopène, et avec des coefficients d'absorbance souvent faibles. En particulier, la canthaxantine est rarement dosable car ses concentrations sont si faibles qu'elles ne permettent pas une quantification suffisamment précise. La Société Francophone Vitamines & Biofacteurs* organise un programme annuel

d'assurance qualité pour les vitamines et caroténoïdes ; le NIST** - organisme de référence américain - organise également un contrôle de qualité pour les vitamines liposolubles et les caroténoïdes, mais malheureusement pour un prix élevé. Le NIST commercialise également le sérum de contrôle de qualité certifié 968c, pour les vitamines liposolubles, le *trans* β -carotène et le β -carotène total. Les coefficients de variation vont de 8-10 %, pour le β -carotène, à 30 % ou plus pour la zéaxanthine, l' α -carotène et surtout la canthaxantine.

RÉSULTATS

Chez l'homme, les caroténoïdes sont dosés dans le sérum ou le plasma sanguin, et les concentrations trouvées varient fortement d'un sujet à l'autre car elles dépendent de nombreux facteurs tels que les quantités ingérées, le pourcentage d'absorption très différent d'une personne à l'autre, le sexe, le statut tabagique et la consommation d'alcool. Les fumeurs ont des concentrations sériques plus basses en caroténoïdes, car ils consomment moins d'aliments riches en caroténoïdes, et les radicaux libres contenus dans la fumée de cigarette surconsomment les caroténoïdes corporels.

Les concentrations usuelles, mesurées lors de l'étude SU.VI.MAX, sont récapitulées dans les tableaux 3 et 4. Ces concentrations ne peuvent pas cependant être considérées comme des valeurs normales, d'une part parce que les caroténoïdes ne sont pas des micronutriments essentiels, d'autre part à cause des grandes variations d'apport et d'absorption citées plus haut. L'étude SU.VI.MAX nous apprend d'autre part que 30 à 40 % de la vitamine A est formée à partir des caroténoïdes provitaminiques A, et à ce titre ces derniers jouent donc un rôle nutritionnel important.

Comme l'étape intestinale conditionne en partie les taux sériques des caroténoïdes, toutes les perturbations altérant la digestion et l'absorption retentissent fortement sur les teneurs sanguines en caroténoïdes. On trouvera donc classiquement des taux abaissés dans les mucoviscidoses, les maladies cœliaques - pour lesquelles la chute de la β -caroténémie constitue un signe sensible et assez spécifique - et les maladies de Crohn.

En l'absence de perturbation de la digestion, des taux bas de caroténoïdes sont signes d'une consommation insuffisante de fruits et de légumes qu'elle soit associée ou non à une insuffisance alimentaire plus large. Or l'on sait que les fruits, les légumes doivent être consommés régulièrement pour prévenir nombre de pathologies dont les cancers, les maladies cardio-vasculaires, les problèmes oculaires et plus globalement les problèmes générés par un vieillissement anormal de l'organisme.

* Programme Annuel d'Assurance Qualité SFVB - Att. Henri Faure - DBI Bâtiment B - CHU La Tronche - BP 217 - F38043 Grenoble Cedex 9

** NIST - Jeanice Brown Thomas

Micronutrient Measurement Quality Assurance Program - NIST - 100 Bureau Drive Stop 8390 - Gaithersburg, MD USA

Tableau 3 : Concentrations en caroténoïdes plasmatiques couramment rencontrées chez des hommes non fumeurs et consommant moins de 20 ml d'alcool pur par jour (n = 500).

Toutes concentrations en $\mu\text{mol/l}$	5 ^e percentile	Médiane	95 ^e percentile
Lutéine	0,322	0,709	1,361
Zéaxanthine	0,078	0,173	0,338
β -Cryptoxanthine	0,079	0,227	0,637
Lycopène	0,213	0,635	1,250
α -Carotène	0,104	0,317	0,880
All- <i>trans</i> β -Carotène	0,218	0,767	2,377
Cis β -Carotène total	0,051	0,078	0,166

Tableau 4 : Concentrations en caroténoïdes plasmatiques couramment rencontrées chez les femmes non fumeuses et consommant moins de 20 ml d'alcool pur par jour (n = 500).

Toutes concentrations en $\mu\text{mol/l}$	5 ^e percentile	Médiane	95 ^e percentile
Lutéine	0,327	0,675	1,348
Zéaxanthine	0,085	0,172	0,325
β -Cryptoxanthine	0,082	0,245	0,639
Lycopène	0,184	0,606	1,210
α -Carotène	0,082	0,322	0,891
All- <i>trans</i> β -Carotène	0,196	0,723	2,314
Cis β -Carotène total	0,052	0,075	0,167

Références bibliographiques

- Albanes D, Heinonen OP, Huttunen JK et al.** (1995). Effects of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on cancer incidence in the Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Cancer Prevention Study. *Am J Clin Nutr*, **62(6 Suppl)** : 1427S-1430S.
- Bender DA** (2003). *Nutritional biochemistry of the vitamins*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Borel P, Drai J, Faure H et al.** (2005). Données récentes sur l'absorption et le catabolisme des caroténoïdes. *Ann Biol Clin*, **63** : 165-177
- Comstock GW, Alberg AJ, Helzlsouer KJ** (1993). Reported effects of long-term freezer storage on concentrations of retinol, beta-carotene, and alpha-tocopherol in serum or plasma summarized. *Clin Chem*, **39** : 1075-1078.
- Faure H, Fayol V, Galabert C, Grolier P et al.** (1999). Les caroténoïdes : 1. Métabolisme et physiologie. *Ann Biol Clin*, **57** : 169-183.
- Gann PH, Ma J, Giovannucci E et al.** (1999). Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels: results of a prospective analysis. *Cancer Res*, **59** :1225-1230.
- Giovannucci E, Rimm EB, Liu Y et al.** (2002). A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst*, **94** : 391-398.
- Gross MB, Prouty CB, Jacobs DR** (1995). Stability of carotenoids and α -tocopherol during blood collection and processing procedures. *Clin Chem*, **41** : 943-944.
- Grolier P** (1998). Dosage des caroténoïdes sanguins. In : Le Moël G, Saverot-Dauvergne A, Gousson T, Guéant JL. *Le statut vitaminique*. EM Inter Cachan, 42-48.
- Hak AE, Ma J, Powell CB et al.** (2004). Prospective study of plasma carotenoids and tocopherols in relation to risk of ischemic stroke. *Stroke*, **35** : 1584-1588.
- Hercberg S, Galan P, Preziosi P et al.** (2004). The SU.VI.MAX Study: a randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Arch Intern Med*, **164** : 2335-2342.
- Institute of Medicine** (2000). *Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids*. Washington DC: National Academic Press.
- Lee IM, Cook NR, Manson JE et al.** (1999). Beta-carotene supplementation and incidence of cancer and cardiovascular disease: the Women's Health Study. *J Natl Cancer Inst*, **91** : 2102-2106.
- Leuenberger MG, Engeloch-Jarret C, Woggon WD** (2001). The reaction mechanism of the enzyme-catalyzed central cleavage of beta-carotene to retinal. *Angew Chem Int Ed Engl*, **40** : 2613-2617.
- Mares-Perlman JA, Fisher AI, Klein R et al.** (2001). Lutein and zeaxanthin in the diet and serum and their relation to age-related maculopathy in the third national health and nutrition examination survey. *Am J Epidemiol*, **153** : 424-432.
- Richer S, Stiles W, Statkute L et al.** (2004). Double-masked, placebo-controlled, randomized trial of lutein and antioxidant supplementation in the intervention of atrophic age-related macular degeneration: the Veterans LAST study (Lutein Antioxidant Supplementation Trial). *Optometr*, **75** : 216-230.
- Rissanen TH, Voutilainen S, Nyyssonen K et al.** (2003). Serum lycopene concentrations and carotid atherosclerosis: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Am J Clin Nutr*, **77** : 133-138.

Sesso HD, Buring JE, Norkus EP, Gaziano JM (2004). Plasma lycopene, other carotenoids, and retinol and the risk of cardiovascular disease in women. *Am J Clin Nutr*, **79** : 47-53.

Smigel K (1996). Beta carotene fails to prevent cancer in two major studies; CARET intervention stopped. *J Natl Cancer Inst*, **88** : 145.

Steghens JP, van Kappel AL, Riboli E, Collombel C (1997). Simultaneous measurement of seven carotenoids, retinol and alpha-tocopherol in serum by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **694** : 71-81.

Steghens JP, Lyan B, Le Moel G et al. (2000). Le dosage des caroténoïdes par chromatographie liquide à hautes performances: des difficultés aux solutions. *Ann Biol Clin*, **58** : 327-335.

van Kappel AL, Steghens JP, Zeleniuch-Jacquotte A et al. (2001). Serum carotenoids as biomarkers of fruit and vegetable consumption in the New York Women's Health Study. *Public Health Nutr*, **4** : 829-835.

Vitamine D

L. Richard

DÉFINITION

Structure

La vitamine D est une vitamine liposoluble ayant une double origine : alimentaire et endogène. Sa structure chimique est stéroïdienne mais le noyau B de son cycle cyclopentanophénantrénique est ouvert (sécostéroïde) (figure 1).

On distingue la vitamine D₂ d'origine végétale (ergocalciférol, mm = 396) possédant sur le cycle stéroïdien commun une chaîne latérale insaturée de 9 atomes de carbone et la vitamine D₃ d'origine animale (cholécalférol, mm = 384) avec une chaîne latérale saturée de 8 atomes de carbone.

Ces deux formes de vitamine D ont la même activité biologique qui consiste, pour l'essentiel, à assurer l'homéostasie phosphocalcique et la minéralisation du squelette. La carence vitaminique D provoque le rachitisme chez l'enfant et l'ostéomalacie chez l'adulte.

Métabolisme

Pour exercer une activité métabolique, la vitamine D (vitamines D₂ et D₃) doit subir successivement 2 hydroxylations.

- Dans les microsomes hépatiques, la vitamine D est hydroxylée sur le carbone 25 par une 25-hydroxylase faisant intervenir le cytochrome P450 (Guo *et al.*, 1993). Cette enzyme n'étant pas soumise à un rétrocontrôle, la quantité de 25-hydroxyvitamine D₃ [25(OH)D₃] produite est proportionnelle à la quantité de vitamine D synthétisée ou/et ingérée. La 25(OH)D₃ est la principale forme circulante de réserve en vitamine D ; sa concentration sanguine en est un bon reflet, sa demi vie est longue (20 – 29 jours).
- Dans les mitochondries du tube contourné distal du rein, la 25(OH)D₃ est hydroxylée sur le carbone 1, par une hydroxylase (dépendante du cytochrome P450) en 1,25(OH)₂D₃. Cette synthèse est soumise à un contrôle qui permet d'adapter la concentration circulante de 1,25(OH)₂D₃ aux besoins de l'organisme (Kawashima et Kurokawa, 1986).

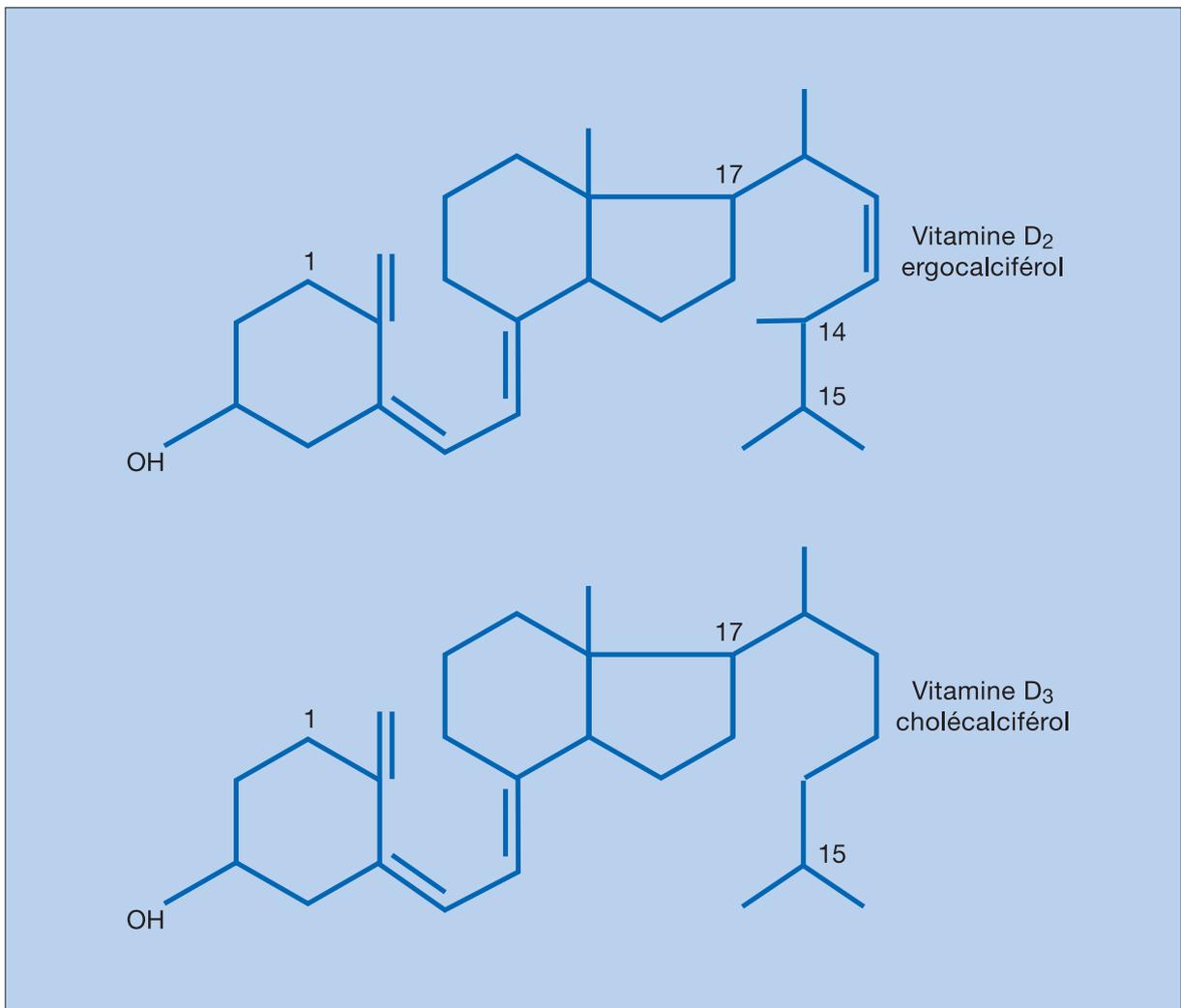


Figure 1 : Formule de la vitamine D₂ et de la vitamine D₃.

La 1,25(OH)₂D₃ est la forme biologiquement active de la vitamine D₃. Elle agit à la manière d'une hormone stéroïdienne sur le métabolisme phosphocalcique et la minéralisation osseuse. Son mécanisme d'action, de type génomique, implique un récepteur nucléaire, une liaison à des séquences d'ADN suivie de l'activation ou de la répression de l'expression de certains gènes codant pour des hormones (parathormone, ostéocalcine), des enzymes et des protéines liant le calcium intracellulaire (Bouillon *et al.*, 1995). Le contrôle de la synthèse de la 1,25(OH)₂D₃ fait intervenir des régulateurs, soit stimulants [la parathormone (le plus important), la calcitonine, l'insuline, l'IGF1, l'hormone de croissance, l'hypocalcémie, l'hypophosphorémie, les œstrogènes], soit inhibiteurs [l'hypercalcémie, la 1,25(OH)₂D₃, les corticoïdes] (Condamine *et al.*, 1994).

La demi vie de la 1,25(OH)₂D₃, qui est inactivée par hydroxylation, est courte (11 à 12 heures).

INTÉRÊT PHYSIOPATHOLOGIQUE

La vitamine D, par l'intermédiaire de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, a un rôle très important dans l'homéostasie phosphocalcique, la minéralisation osseuse, et important sur des fonctions musculaires, immunitaires, sur le système nerveux et la différenciation cellulaire.

Action intestinale de la vitamine D

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimule l'absorption duodénale du calcium grâce à l'ouverture des canaux calciques membranaires. Les malabsorptions proviennent de gastrectomies, de résections intestinales étendues, de maladie cœliaque.

Au niveau du rein

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimule la réabsorption du phosphore et du calcium filtré (pour 1 % seulement). L'insuffisance rénale, le syndrome néphrotique et les tubulopathies peuvent entraîner des lésions osseuses (Hollis *et al.*, 1996).

Action osseuse de la vitamine D

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ favorise la minéralisation de l'os et du cartilage de croissance par plusieurs mécanismes : élévation de la concentration extracellulaire du calcium et des phosphates grâce à son action sur l'intestin et le rein, réduction de la résorption osseuse en inhibant la synthèse et la sécrétion de la parathormone, contrôle de l'activité des ostéoblastes et des chondrocytes, et, enfin, augmentation de la synthèse de la phosphatase alcaline osseuse, du collagène du type I, de l'ostéocalcine et de l'ostéopontine.

En dehors de ces effets sur l'intestin, le rein et le squelette, la vitamine D stimule la différenciation des myoblastes ; on observe en effet une faiblesse musculaire, parfois des myasthénies chez les sujets carencés en vitamine D.

SOURCES ET APPORT DE VITAMINE D

30 à 40 % des besoins quotidiens proviennent de sources alimentaires (poissons, viandes, oeufs, foie) (**tableau 1**) (Hercberg *et al.*, 1994).

La plus grande partie des besoins de l'homme en vitamine D (60 à 70 %) sont couverts par la synthèse du cholécalciférol dans la peau. La vitamine D₃ est produite à partir du cholestérol par les cellules profondes de l'épiderme sous l'action des rayons UV (290 à 315 nm) qui photolysent le 7-déhydrocholestérol en pré-vitamine D₃. Cette synthèse est réduite chez les personnes âgées et les sujets à peau très pigmentée (Holick, 1986).

Tableau 1 : Sources alimentaires de vitamine D.

	µg de vitamine D pour 100g
Huile de foie de morue	250-750
Poissons gras	2,5-25
Jaunes d'œuf	2-12
Foie	0,2-2,5
Lait entier	0,01-0,12
Beurre	0,3-2,5
Fromages	0,2-0,5

Apports quotidiens conseillés.

	µg / jour
Nourrissons	10
Enfants	
1 à 3 ans	10
4 à 12 ans	5
13 à 19 ans	5
Adultes	5
Personnes âgées	10
Grossesse / allaitement	10

Les vitamines D₂ et D₃ et leurs métabolites sont stables à condition d'être conservés à l'abri de la lumière et de l'oxygène. Les besoins en vitamine D (10 µg/jour ou 400 UI/j) sont normalement couverts par la production cutanée.

La vitamine D, d'origine alimentaire, absorbée par l'intestin grêle avec les acides gras libres et les monoglycérides grâce aux sels biliaires, et la vitamine D₃, d'origine endogène, sont transportées (ainsi que leurs métabolites) dans le sang par une protéine porteuse spécifique : la *vitamin D binding protein* (DBP) (Haddad, 1995).

La vitamine D n'est pas stockée dans le foie mais dans les tissus adipeux et le muscle sous forme de 25(OH)D₃.

DOSAGE

Étape pré-analytique

L'échantillon de sang est recueilli dans un tube sec ou hépariné, les gels de séparation sont à éviter. La centrifugation doit être pratiquée à froid, il faut conserver le sérum ou le plasma à -20 °C si le dosage est différé.

Intérêt du dosage

Vitamines D₃ et D₂

Leur dosage est d'un intérêt limité, car il ne permet pas d'apprécier les réserves en vitamine D, leur hydroxylation étant très rapide.

25(OH)D₃ et 25(OH)D₂

Le dosage de ces deux métabolites permet d'évaluer indirectement les réserves en vitamine D. Il a une grande utilité car il permet de déceler une carence ou une surcharge en vitamine D et cela pendant un laps de temps important en raison de la demi-vie longue de la 25(OH)D₃. La plupart des techniques de dosage ne distinguent pas la 25(OH)D₂ de la 25(OH)D₃, ce qui a d'ailleurs peu d'importance puisque ces deux métabolites ont le même effet physiologique. Il importe cependant de prendre en compte les concentrations de la 25(OH)D₃ et de la 25(OH)D₂ pour le cas où le patient est supplémenté en vitamine D₂ ; une technique dosant les deux métabolites séparément sera alors recommandée. Seule la chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à un détecteur UV ou à la spectrométrie de masse rend cette séparation possible. En l'absence de "supplémentation" thérapeutique en vitamine D₂ (Ex : Stérogyl®), la concentration en 25(OH)D₂ est très faible (inférieur à 5 µg/ml).

1,25(OH)₂D₃ et 1,25(OH)₂D₂

La production de ces métabolites dihydroxylés étant étroitement contrôlée, leur dosage dans le sang ne renseigne pas sur l'état de carence ou de surcharge en vitamine D. Il permet cependant d'apprécier l'adaptation de la synthèse de la 1,25(OH)₂D₃ aux besoins en calcium et en phosphates et de mettre en évidence un défaut de synthèse de la 1 α -hydroxylase dans les rachitismes pseudocarentiels de type 1.

Techniques de dosage de 25(OH)D₃, de 25(OH)D₂ et de 1,25(OH)₂D₃

Quelle que soit leur nature, toutes les techniques doivent, en principe comporter 3 étapes :

- une extraction des dérivés de la vitamine D.
- une purification des métabolites à doser (cette étape est parfois exclue).
- le dosage proprement dit.

La première étape, indispensable, fait intervenir soit des solvants organiques, soit des cartouches de silice. La deuxième étape, qui améliore la reproductibilité et la précision de la méthode, fait appel à la chromatographie liquide. Il existe plusieurs types de dosage pour la 25(OH)D₃ et la 1,25(OH)₂D₃ :

- Radio compétition (RCA).
- Dosage par radiorécepteurs (RRA).
- Radio-immunologie (RIA).
- Chimiluminescence.
- Dosage par immuno-enzymologie (ELISA).
- Chromatographie liquide (HPLC).

Les différentes caractéristiques de chaque technique sont résumées dans le [tableau 2](#).

Hormis l'HPLC, toutes les techniques font appel au principe de la compétition entre le métabolite de l'essai et le même métabolite marqué vis-à-vis soit d'une protéine de liaison soit d'un anticorps spécifique.

Le traceur est du ³H pour les techniques RCA, RRA, de l'¹²⁵I pour la RIA, de l'ester d'acridinium lié à un anticorps anti DBP en chimiluminescence et un ensemble biotine, avidine, peroxydase triméthylbenzidine (TNB) pour la technique ELISA.

Le signal final - radioactivité, pourcentage de fluorescence, intensité de la coloration du substrat (TNB) pour la technique ELISA - est inversement proportionnel à la concentration de 25(OH)D₃ ou de 1,25(OH)₂D₃ dans l'échantillon.

Tableau 2 : Techniques de dosage de la 25(OH)D₃ et de la 1,25(OH)₂D₃.

	RCA	RRA	RIA		Chimi-luminescence	Immuno-enzymologie	HPLC
	25(OH)D ₃	1,25(OH) ₂ D ₃	25(OH)D ₃	1,25(OH) ₂ D ₃	25(OH)D ₃	25(OH)D ₃	25(OH)D ₃
Prise d'essai (µl)	50-100	350-1000	50	1000	20	25	500-1000
Présence d'une extraction	oui	oui	oui	oui	oui	non	oui
Présence d'une purification	inconstante	oui	inconstante	oui	non	non	oui
Protéine de liaison	DBP	Récepteur cellulaire	Ac anti 25(OH)D ₃	Ac anti 1,25(OH) ₂ D ₃	DBP	Ac anti 25(OH)D ₃ fixés dans les puits des µplaques	
Traceur	³ H	³ H	¹²⁵ I	¹²⁵ I	Ester d'acridimum fixé sur 1Ac anti DBP	Avidine-peroxydase/TMB	
Durée du dosage	≥3 H	≥3 H	3-4 H	1 H	3 H	3 H	3 H
Limite de détection	2 µg/l	2 ng/l	2 µg/l	2ng/l	5 µg/l	5 µg/l	2 µg/l
C.V. (%) inter essai	3-5	< 15	8-15	15-20	< 10	< 10	< 10
Spécificité	25(OH)D ₃ 100%	1,25(OH) ₂ D ₃ 100%	25(OH)D ₃ 100%	1,25(OH) ₂ D ₃ 100%	25(OH)D ₃ 100%	25(OH)D ₃ 100% 25(OH)D ₂ 75%	Séparation de la 25(OH)D ₃ et de la 25(OH)D ₂
Pourcentage de croisement	25(OH)D ₂ 75%	1,25(OH) ₂ D ₂ 100%	25(OH)D ₂ 75%	1,25(OH) ₂ D ₂ 75%	25(OH)D ₂ 100%	24, 25(OH)D ₃ 100%	

La technique de chimiluminescence est automatisée sur deux appareils : l'ADVANTAGE (Nichols) et le LIAISON (Diasorin). Mais d'autres automates sont actuellement en cours d'évaluation (Immulite).

La méthode chromatographique fait appel à un appareillage HPLC classique (pompe isocratique, détecteur UV) ; la longueur d'onde utilisée est de 265 nm. Les performances analytiques résumées sur le tableau 2 montrent que les méthodes les plus sensibles sont la RCA, le RRA, la RIA et l'HPLC (Bertelloni *et al.*, 1993 ; Bouillon *et al.*, 1980 ; Kumar, 1986).

Seule l'HPLC (UV et spectrométrie de masse) permet la séparation complète des 25(OH)D₃ et 25(OH)D₂ ; les autres techniques ont un pourcentage de croisement entre ces deux métabolites de 75 à 100 % (Dabek *et al.*, 1981).

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les variations physiologiques

Les concentrations physiologiques de la vitamine D et de ses métabolites dans le sérum ou le plasma figurent dans le [tableau 3](#).

Tableau 3 : Concentration physiologique de la vitamine D et de ses principaux métabolites.

	Concentration (µg/l)
Vitamine D	1-5
25(OH)D ₃	10-50
25(OH)D ₂	< 5
24, 25(OH) ₂ D ₃	1-4
1,25(OH) ₂ D ₃	0,02-0,05

La concentration de 25(OH)D₃ (10-50 µg/l) varie en fonction de l'ensoleillement ; elle est maximale en été (20-50 µg/l) et minimale en hiver (10-30 µg/l). En revanche, la concentration de 1,25(OH)₂D₃ varie très peu. La concentration physiologique de la 25(OH)D₂ est très faible (<5 µg/l). On parle d'une carence en 25(OH)D₃ en dessous de la concentration de 5 µg/l. On estime actuellement qu'une concentration supérieure à 20µg/l est souhaitable car, au-dessous, il y a augmentation de la sécrétion de parathormone.

Les variations pathologiques

Les carences

Les carences en vitamine D entraînent :

- le rachitisme chez l'enfant, caractérisé par des déformations osseuses avec retard de l'ossification, des troubles de la marche (faiblesse musculaire) et des tétanies.

- l'ostéomalacie, chez l'adulte, dont les symptômes sont des douleurs osseuses (transparence et fissures osseuses visibles à la radio) et des douleurs musculaires (myopathie proximale prédominante aux membres inférieurs).

Des signes biologiques accompagnent cette carence : calcémie normale ou basse, phosphorémie abaissée, augmentation des phosphatases alcalines osseuses sanguines. La parathormone circulante tend à maintenir une calcémie normale au prix d'une déminéralisation osseuse. La carence en vitamine D résulte d'une diminution de synthèse cutanée (principale source de la vitamine D de l'organisme) et d'apport alimentaire insuffisant (diminution d'absorption).

Il existe des populations à risque : les enfants en période de croissance, les femmes enceintes pendant les mois d'automne et d'hiver, les personnes âgées, les sujets souffrant de pathologies biliaires et pancréatiques, les insuffisants rénaux, les dialysés, les hypothyroïdiens, les alcooliques. Il existe deux maladies héréditaires concernant le métabolisme de la vitamine D : le rachitisme pseudocarentiel de type I causé par un défaut d'activité de la 1 α -hydroxylase rénale s'accompagnant d'une diminution de la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ plasmatique et le rachitisme pseudo carentiel de type II qui entraîne une résistance à l'action de la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ due à une anomalie des récepteurs cellulaires.

Vitamine D et surdosage

L'intoxication par la vitamine D (au cours d'une "supplémentation" généralement) peut entraîner des effets secondaires graves. Les signes généraux sont digestifs, ostéo-articulaires, hydroélectriques et rénaux. Si l'intoxication persiste, il se produit une lithiase rénale. La concentration sanguine de 25(OH)D $_3$ est alors supérieure à 100 mg/l.

LES RECHERCHES ACTUELLES SUR LA VITAMINE D

Elles s'orientent sur des voies diverses :

- Prévention des fractures du col fémoral chez les personnes âgées. L'ostéomalacie due à une carence en vitamine D s'ajoute à l'ostéoporose physiologique et constitue un facteur de fragilisation osseuse. Les personnes ayant présenté une fracture du col du fémur ont un statut vitaminique D inférieur à celui des témoins. Une "supplémentation" par la vitamine D (800 UI/j) et le calcium diminuerait le nombre de fractures de 30 % (Chapuis *et al.*, 1992).

- Vitamine D et cancers : pour le cancer du sein, la présence de récepteurs de la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ est corrélée à une survie plus longue. Un taux de 25(OH)D $_3$ supérieur à 20 μ g/l est associé à un risque 3 fois moindre du cancer du colon (Lind *et al.*, 1997). D'autre part, la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ s'est montrée efficace dans le traitement du psoriasis et des analogues de la vitamine D ont montré des activités immunosuppressives (Lowe *et al.*, 1992).

Références bibliographiques

- Bertelloni S, Baroncelli GI, Benedetti U et al.** (1993). Commercial kits for 1,25-dihydroxyvitamin D compared with a liquid chromatographic assay. *Clin Chem*, **39** : 1086-1088.
- Bouillon R, De Moor P, Baggolini EG et al.** (1980). A radioimmunoassay for 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Clin Chem*, **26** : 562-567.
- Bouillon R, Okamura WH, Norman AW** (1995). Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev*, **16** : 200-257.
- Chapuy MC, Arlot ME, Duboeuf F et al.** (1992). Vitamin D₃ and calcium to prevent hip fractures in elderly women. *N Engl J Med*, **327** : 1637-1642.
- Condamine L, Menea C, Vrtovnik F et al.** (1994). Local action of phosphate depletion and insulin-like growth factor 1 on in vitro production of 1,25 dihydroxyvitamin D by cultured mammalian kidney cells. *J Clin Invest*, **94** : 1673-1679.
- Dabek JT, Härkönen M, Wahlroos O et al.** (1981). Assay for plasma 25-hydroxyvitamin D₂ and 25-hydroxyvitamin D₃ by "high-performance" liquid chromatography. *Clin Chem*, **27** : 1346-1351.
- Guo YD, Strugnell S, Back DW, Jones G** (1993). Transfected human liver cytochrome P-450 hydroxylates vitamin D analogs at different side-chain positions. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90** : 8668-8672.
- Haddad JG** (1995). Plasma vitamin D-Binding protein (Gc-globulin): multiple tasks. *J Steroid Biochem Molec Biol*, **53** : 579-582.
- Hercberg S, Preziosi P, Galan P et al.** (1994). Vitamin D status of a healthy French population: dietary intakes and biochemical markers. *Int J Vit Nutr Res*, **64** : 220-232.
- Holick MF** (1986). Vitamin D requirements for the elderly. *Clin Nutr*, **5** : 121-129.
- Hollis BW, Kamerud JK, Kurkowski A et al.** (1996). Quantification of circulating 1,25-dihydroxyvitamin D by radioimmunoassay with an 125 I-labeled tracer. *Clin Chem*, **42** : 586-592.
- Kawashima H, Kurokawa K** (1986). Metabolism and sites of action of vitamin D in the kidney. *Kidney Int*, **29** : 98-107.
- Kumar R** (1986). The metabolism and mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Kidney Int*, **30** : 93-103.
- Lind C, Chen J, Byrjalsen I** (1997). Enzyme immunoassay for measuring 25-hydroxyvitamin D₃ in serum. *Clin Chem*, **43** : 943-949.
- Lowe KE, Maiyar AC, Norman AW** (1992). Vitamin D-mediated gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Exp* ; **2** : 65-109.

Vitamine E

Claude-Louis Léger, Marie-Annette Carbonneau, Gilles Fouret

DÉFINITION DE LA VITAMINE E

La vitamine E ([figure 1](#)) est constituée d'une famille de molécules appelées vitamères dont les caractéristiques générales sont représentées par :

- La présence d'un noyau 6-hydroxy-chromane (ou 6-chromanol), dont la méthyl-substitution sur les carbones C5, C7 et C8 définit la nature du vitamère (α , β , γ et δ). Le groupement hydroxyle en C6 est responsable des propriétés antioxydantes (réductrices) physiologiques de la vitamine. Celles-ci sont modulées par la méthyl-substitution du noyau chromanol. L'oxydation du chromanol est responsable des propriétés antioxydantes de la vitamine E. Elle résulte du transfert d'un seul électron, donne naissance au radical chromanoxyle et est aisément réversible¹.
- L'existence d'une chaîne latérale à 16 atomes de carbone, de structure isoprénique, sur le carbone C2 du noyau chromanol. Cette chaîne est saturée ou insaturée, caractérisant ainsi, respectivement, la famille des tocophérols et celle des tocotriénols. Elle est responsable de la lipophilicité de la molécule. Lorsqu'elle est saturée, trois centres d'asymétrie apparaissent (C2, C4', C8'), déterminant la stéréochimie de la molécule.
- Les vitamères α et γ sont les deux vitamères naturels les plus communément rencontrés. Ils sont dans la configuration stéréochimique *RRR* (ce qui signifie que les trois atomes de carbone asymétrique sont en configuration *R*). Mais il existe théoriquement 8 stéréo-isomères pour chaque vitamère, de sorte que 32 structures différentes de vitamine E peuvent être obtenues par synthèse organique. Chacune de ces structures a été caractérisée soit par son activité vitaminique E, elle-même définie par référence au pouvoir anti-abortif chez la rate gestante, par son activité antioxydante ([tableaux 1 et 2](#)). Parmi l'ensemble des vitamères, l'activité vitaminique la plus élevée appartient à l' α -tocophérol² dans la configuration stéréochimique *RRR*, que l'on note *RRR- α -tocophérol*. Si l'activité antioxydante dépend de la méthyl-substitution, elle ne dépend pas en revanche de la stéréochimie de la molécule.

1. À ne pas confondre avec l'oxydation bi-électronique irréversible (voir plus loin).

2. Dénommé également d- α -tocophérol ; cette nomenclature est encore d'utilisation courante, mais elle est moins précise car elle ne fait référence qu'à la configuration stéréochimique du carbone asymétrique en C2. Ainsi, l' α -tocophérol de synthèse est le dl- α -tocophérol.

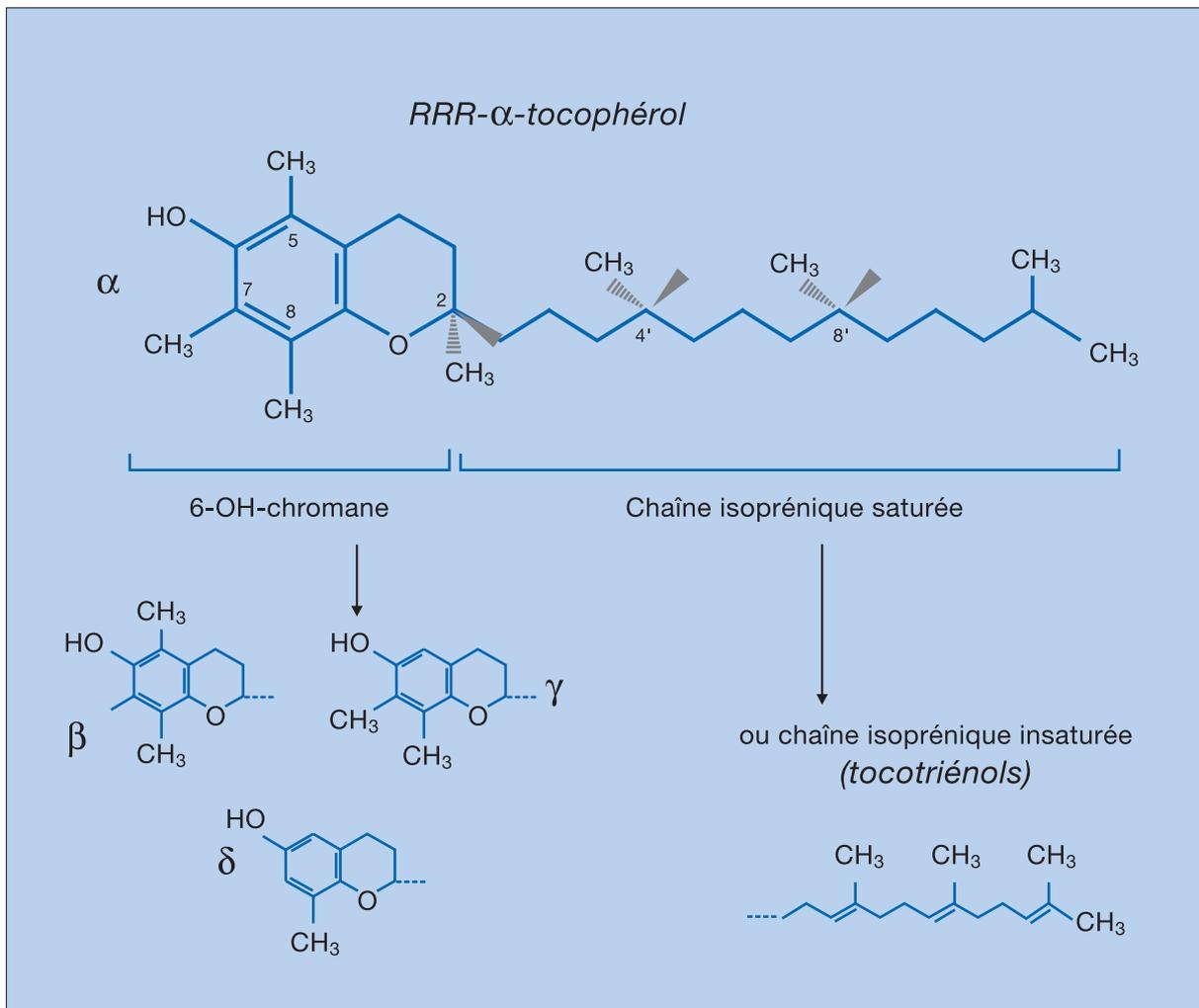


Figure 1 : Structures chimiques du *RRR- α -tocophérol* et des différents vitamères.

La découverte de la vitamine E à l'Université de Berkeley est liée à la mise en évidence de son activité biologique dans certains phénomènes liés à la reproduction (action anti-abortive chez la rate, altération de l'épithélium séminifère chez le rat). Elle fait l'objet d'une première publication en 1922 par H. Evans et K. Bishop. Les propriétés antioxydantes de la vitamine E sont découvertes plus tard et sont à l'origine d'un grand nombre de travaux depuis la première publication en 1952. Elle est reconnue comme constituant essentiel dans la nutrition de l'homme en 1968 (Anonyme, 1968). C'est au début des années 1980 que seront révélées les propriétés cellulo-régulatrices de la vitamine E (Corwin et Shloss, 1980), et l'idée s'est fait jour progressivement que ces propriétés (ou certaines d'entre elles) ne relevaient pas des propriétés antioxydantes de la vitamine (Chatelain *et al.*, 1993). Dans ce contexte, il est intéressant de noter que les tocophérols et tocotriénols ont été récemment impliqués dans l'induction de l'expression de certains gènes (Landes *et al.*, 2003).

Tableau 1 : Activité biologique, fondée sur les propriétés antiabortives chez la rate gestante, de 1 mg de chaque forme de vitamine E, exprimée par référence à l'Unité Internationale (UI) ou à l'unité RRR- α -Tocophérol-Equivalent (TE).

Formes naturelles			Formes synthétiques		
	TE ^{a,b,c}	UI ^{a,b,c}		TE ^d	UI ^d
RRR- α -T* ^e	1	1,49	RRS- α -T ^e	0,9	1,34
RRR- β -T	0,5	0,75	RSS- α -T	0,73	1,09
RRR- γ -T	0,1	0,15	RSR- α -T	0,57	0,85
RRR- δ -T	0,03	0,05	SRR- α -T	0,31	0,46
R- α -T3**	0,3	0,45	SSR- α -T	0,21	0,31
R- β -T3	0,05	0,08	SRS- α -T	0,37	0,55
R- γ -T3	0,01	0,015	SSS- α -T	0,74	1,1
R- δ -T3	nd	nd [§]	<i>tout-rac-α-T</i>	0,74	1,1
			<i>tout-rac-α-T-acétate</i>	0,67	1

* T = tocophérol; # Les propriétés antioxydantes sont identiques pour tous les stéréoisomères, elles ne dépendent que de la structure du noyau chromane ; ** T3 = tocotriénol ; § non déterminé.

Pour les références suivantes correspondant aux indices : ^a Bunyan *et al.*, 1961 ; ^b Tan, 1989 ; ^c Kamal-Eldin et Appelqvist, 1996 ; ^d Weiser et Vecchi, 1982, se reporter à Léger, 2000b.

Tableau 2 : Comparaison des propriétés antioxydantes et de quelques activités biologiques des vitamères naturels de la vitamine E (TE rend compte des propriétés anti-abortives chez la rate).

Propriétés :	RRR- α -T	RRR- β -T	RRR- γ -T	RRR- δ -T
Antioxydantes ^a	1	0,44	0,47	0,1
Antioxydantes ^b	1	0,71	0,68	0,28
Antioxydantes ^c	1	0,89	nd	nd
Antioxydantes ^d	1	0,54	0,50	0,47
Anti-abortive (TE)	1	0,5	0,1	0,03
Anti-hémolytique ^e	1	0,25	0,18	0,03
Augmentation de la production de PGI ₂ ^f	1	0,88	0,96	0,88
Anti-prolifératives ^g	1	0	0,82	0,82

Pour les références suivantes correspondant aux indices : ^a Mukai *et al.*, 1986 ; ^b Burton et Ingold, 1981 ; ^c Pryor *et al.*, 1993 ; ^d Niki *et al.*, 1986 ; ^e Century et Horwitt, 1965 ; ^f Tran et Chan, 1990 ; ^g Chatelain *et al.*, 1993 ; se reporter à Léger, 2000b.

MÉTABOLISME

Il est généralement admis que la part de la vitamine E absorbée par l'épithélium intestinal chez l'homme représente 50 à 70 % du total ingéré (Kayden et Traber, 1993) et est étroitement liée à la digestion et à l'absorption des lipides. Les malabsorptions lipidiques chroniques (mucoviscidose, cholestases, α - β -lipoprotéïnémie et, plus généralement, dysfonctionnement intestinal) conduisent à des situations de carence. L'absorption des lipides par l'entérocyte est précédée, dans la lumière intestinale, par une première étape d'émulsification et une seconde étape de mise en solution micellaire lipase et sels biliaires dépendantes. Il a été montré que la taille des globules d'émulsion n'influe pas sur l'absorption de la vitamine E, mais que la présence d'une phase micellaire dans la lumière intestinale est nécessaire, soulignant ainsi le rôle important des sels biliaires et de la lipase pancréatique dans l'absorption de cette vitamine. En cas d'apports élevés (voir plus loin), une excrétion biliaire de la vitamine E a été mise en évidence. Après passage à travers l'entérocyte, la vitamine E est exportée dans la circulation avec les chylomicrons. Il ne semble pas exister de mécanismes de sélection entre les différentes formes de vitamine E au cours de l'ensemble de ces étapes.

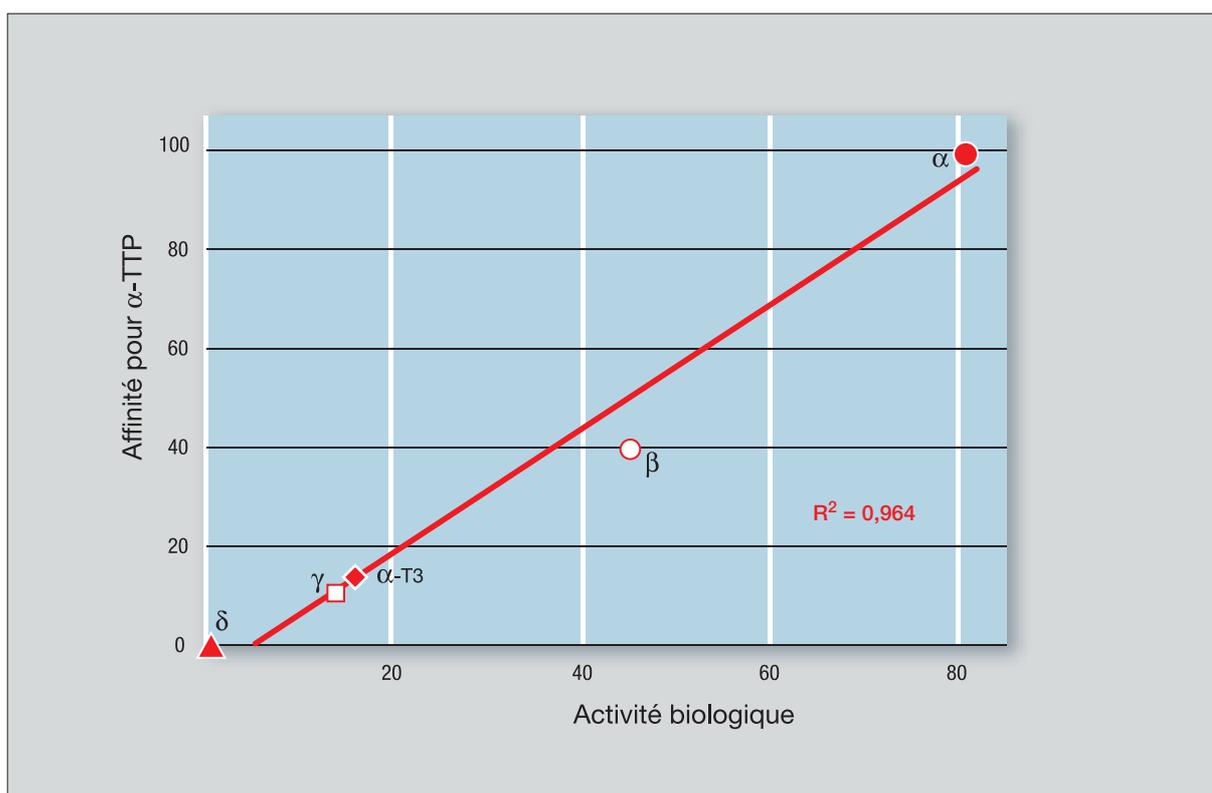
L'âge pourrait avoir une influence négative sur la biodisponibilité de la vitamine E. Il affecterait le transport lipoprotéique post-entérocytaire de la vitamine (Borel *et al.*, 1997). La lipoprotéine lipase (LPL), une autre enzyme impliquée dans l'hydrolyse extracellulaire systémique des triglycérides et favorisant la captation des acides gras par la cellule, s'est avérée nécessaire au transfert de la vitamine E dans la cellule (Traber *et al.*, 1985). La LPL ne joue cependant ce rôle que sous sa forme liée à la surface cellulaire, soulignant ainsi l'action défavorable d'un traitement hépariné sur la biodisponibilité cellulaire de la vitamine E. La protéine plasmatique de transfert des phospholipides (la *phospholipid transfer protein* ou PLTP) assure également le transfert de molécules d' α -tocophérol des HDL vers les LDL oxydées ainsi que leur transfert vers l'endothélium des vaisseaux (Desrumaux *et al.*, 1999) et le cerveau (Desrumaux *et al.*, 2005).

L'utilisation de molécules deutérées a permis de montrer que, pour un même apport de chacun des stéréoisomères, des quantités doubles de *RRR*- α -tocophérol circulent dans le sang, suggérant ainsi que le stéréoisomère naturel a une biodisponibilité deux fois supérieure à celle des autres stéréoisomères (Burton *et al.*, 1998). Un tel phénomène de sélection favorisant la circulation de l'isomère naturel de l' α -tocophérol avait été observé antérieurement et avait été attribué à la présence dans le foie d'une protéine se liant à l' α -tocophérol (Traber *et al.*, 1993). L'affinité sélective de cette protéine pour le stéréo-isomère *RRR* a été ultérieurement confirmée. Dénommée depuis "protéine de transfert de l' α -tocophérol" (*α -tocopherol transfer protein* ou α -TTP), cette protéine incorpore préférentiellement le *RRR*- α -tocophérol dans les VLDL exportées par le foie. L' α -TTP assure une rétention sélective et l'homéostasie systémique de l'isomère naturel (Kayden et Traber, 1993). Les porteurs d'une anomalie du gène de l' α -TTP affectant la fonctionnalité de la protéine (Ouahchi *et al.*, 1995) ont des niveaux très faibles, voire indétectables, de vitamine E plasmatique dans des conditions normales d'apport alimentaire (Traber *et al.*, 1993). Cette anomalie génétique est responsable d'une forme de carence inexpliquée pendant longtemps,

dénommée "carence idiopathique familiale isolée en vitamine E", désignée aujourd'hui sous le nom de "ataxie avec déficience isolée en vitamine E" (*ataxia with isolated vitamin E deficiency* ou AVED). Des résultats suggèrent que l'activité vitaminique (selon la définition internationale) est directement liée à l'affinité des différentes formes de vitamine E pour l' α -TTP (figure 2).

Les autres formes de l'isomère naturel de l' α -tocophérol, moins retenues, se retrouvent dans la bile ou dans l'urine, mais, dans ce cas, sous forme de métabolites oxydés (Traber *et al.*, 1998). Ces formes urinaires sont pour l'essentiel : 1) l'acide tocophéronique et la tocophéronolactone (appelés métabolites de Simon), et 2) des formes dont la chaîne latérale est ω - et β -oxydée, donnant naissance successivement aux formes carboxyméthylhexyl-hydroxychromane, carboxyméthylbutyl-hydroxychromane et carboxyéthyl-hydroxychromane (figure 3). Ces données prouvent que l' α -TTP hépatique joue un rôle central dans le métabolisme de la vitamine E. Elles suggèrent également que ces métabolites pourraient jouer le rôle de biomarqueurs du statut vitaminique E. Cette hypothèse donne lieu à un large débat, abordant des aspects aussi bien théorique que pratique. L' α -TTP a été également localisée au niveau du cerveau, de l'utérus et du placenta où son rôle de transporteur pourrait être important. Sa présence en particulier au niveau des cellules trophoblastiques (Kaempf-Rotzol *et al.*, 2003) est susceptible d'expliquer le passage placentaire préférentiel du *RRR*- α -tocophérol (Acuff *et al.*, 1998).

Figure 2 : Relation directe entre l'affinité des vitamines α , β , γ , δ de la vitamine E pour l' α -TTP et leur activité biologique selon la définition internationale.



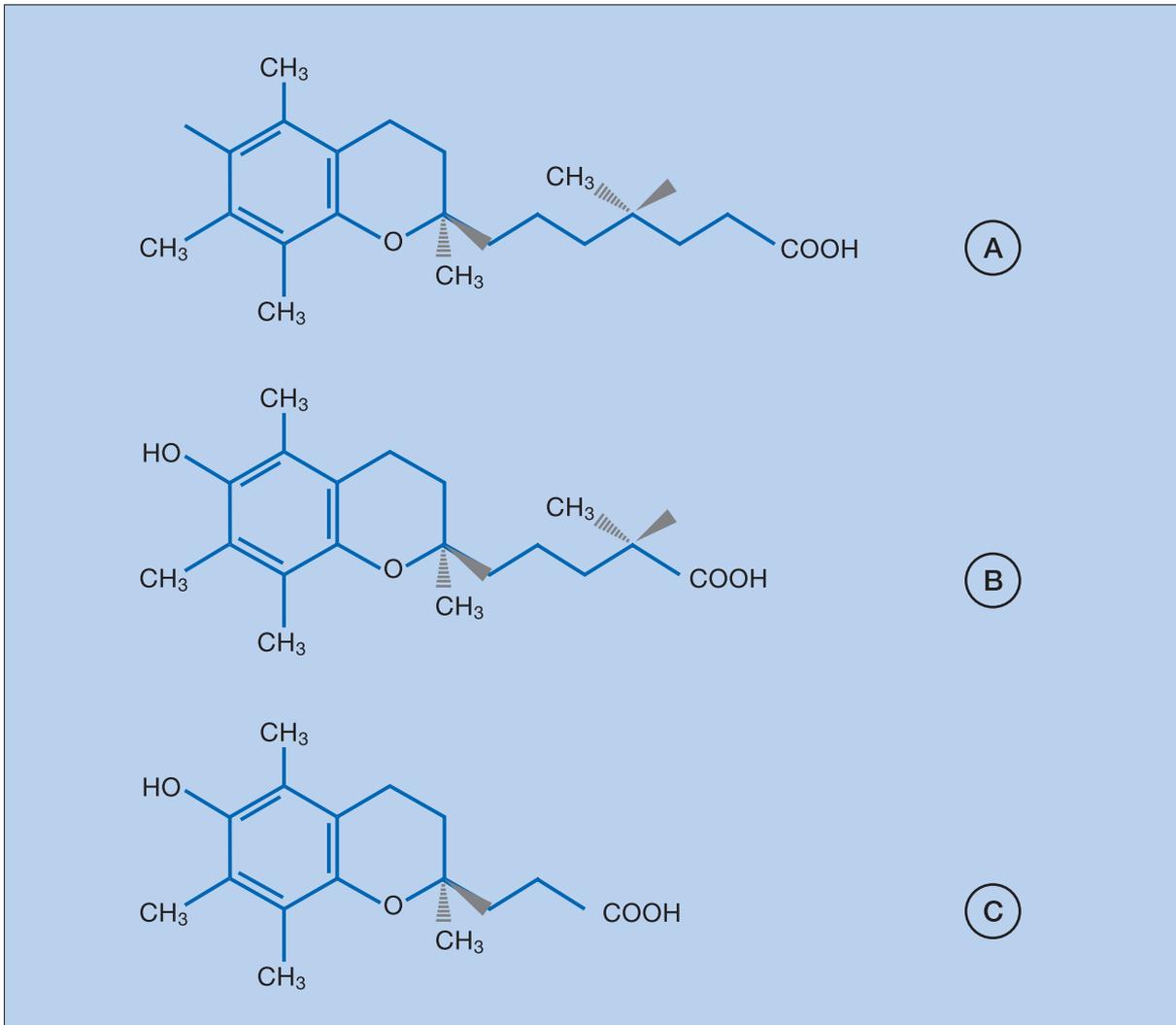


Figure 3 : Structures issues de la β -oxydation de la chaîne latérale de l' α -tocophérol : successivement et de haut en bas l' α -2-[6'-carboxy-4'-métylhexyl]-6-hydroxy-chromane (A), l' α -2-[4'-carboxy-4'-métylbutyl]-6-hydroxy-chromane (B) et l' α -2-[2'-carboxyéthyl]-6-hydroxy-chromane (C) (d'après Brigelius-Flohé *et al.*, 2002).

D'autres protéines liant l' α -tocophérol existent. Parmi celles-ci, la mieux connue est l' *α -tocopherol-associated protein* (ou TAP) (Zimmer *et al.*, 2000). Elle est ubiquitaire, assurerait le transport intracellulaire des formes de tocophérols circulants, donc principalement celui de l' α -tocophérol, mais pourrait avoir d'autres rôles, comme celui de récepteur nucléaire par exemple. Nous verrons plus loin que d'autres récepteurs nucléaires peuvent se lier à différents vitamères de la vitamine E.

D'un point de vue général, l'existence de systèmes de reconnaissance et de sauvegarde du *RRR*- α -tocophérol témoigne que ce vitamère est probablement plus complètement intégré dans le métabolisme et la physiologie de la cellule.

RÔLE PHYSIOLOGIQUE

La vitamine E protège *in vivo* les structures sensibles à l'oxydation : les lipides, essentiellement sous forme condensée (dans les membranes et les lipoprotéines) (Léger *et al.*, 1992), les bases nucléotidiques de l'ADN (Duthie *et al.*, 1996) et des protéines (Poulin *et al.*, 1996).

Dans ce mécanisme de protection, la vitamine E (α -TOH) est oxydée sous une forme régénérable, la forme radicalaire chromane-6-oxyle α -TO \cdot , par les espèces moléculaires oxydées préalablement formées, par exemple les radicaux acyl peroxydes. Ce qui fait l'une des particularités importantes de la vitamine E, c'est la nature physiologiquement régénérable de α -TO \cdot . Celle-ci entre en effet dans une chaîne de réactions de régénération qui fait intervenir une autre vitamine, la vitamine C (ascorbate), qui, une fois oxydée par suite de la régénération de α -TO \cdot en α -TOH, est elle-même régénérée par la déhydro-ascorbate réductase en présence du glutathion réduit et/ou de l'acide dihydrolipoïque comme intermédiaires d'oxydo-réduction, et de la glucose-6-phosphate-deshydrogénase comme pourvoyeur terminal d'éléments réducteurs (NADPH) (Chan *et al.*, 1999 ; Stoyanovsky *et al.*, 1999). Dans son rôle régénérateur, la vitamine C pourrait être partiellement remplacée par certains antioxydants d'origine alimentaire capables de réduire l' α -TO \cdot (c'est le cas par exemple de composés polyphénoliques, mais pas celui du β -carotène).

L'abstraction d'un atome d'hydrogène sur un carbone bis-allylique - étape d'initiation de la lipoperoxydation - par l' α -TO \cdot peut être considérée comme impossible dans les conditions *in vivo* (Léger, 2000a). Ceci signifie que la vitamine E a fort peu de chance d'exercer un rôle pro-oxydant chez un sujet normal.

Il est nécessaire de rappeler que l'isomérisation (en particulier en C2) des vitamines n'influe pas sur le pouvoir antioxydant. Ceci a été montré *in vitro* et indirectement *in vivo* par la mesure des dérivés quinoniques (Kiyose *et al.*, 1999).

L' α -tocophérol est également capable de piéger l'anion peroxy-nitrite, un agent oxydant puissant dont la formation par la paroi vasculaire est importante tout au long du processus aboutissant à la lésion athérosclérotique. Le γ -tocophérol prend le relais de l' α -tocophérol lorsque celui-ci a été entièrement nitré (Goss *et al.*, 1999).

La vitamine E est utilisée dans différentes situations qui impliquent un stress oxydant : pathologiques (pour les thérapies curatives, voir plus loin), environnementales (protection des structures de la peau). Son rôle est souvent évoqué dans la prévention de pathologies évolutives. Son rôle préventif dans le cancer n'est pas établi, bien que son action bénéfique ait été mentionnée dans le cancer de la prostate (Gey, 1998). L'action pro-apoptotique de formes oxydées (tocophéryl quinones) fait l'objet de recherches actives. Le rôle préventif de la vitamine E dans les maladies neurodégénératives est également sous investigation. Nous avons mentionné plus haut le rôle de différentes protéines de transport de la vitamine E dans le cerveau (PLTP, α -TTP). Le polymorphisme génétique de ces protéines devra être mieux connu afin d'établir si certaines mutations sont à risque (facteurs prédisposants). C'est dans le domaine de la prévention cardiovasculaire que l'on a accumulé le plus de données. Parmi celles-ci il faut rappeler : l'action antioxydante de la vitamine E sur les LDL, la prévention de la formation de LDL oxydées (les lipoprotéines les plus athérogènes), l'effet inhibiteur de la vitamine E sur la flambée oxydative des globules blancs productrice d'agents

oxydant les LDL (l'anion superoxyde par exemple) - cet effet inhibiteur étant considérablement augmenté lorsque la vitamine E est transportée par des LDL - , l'effet inhibiteur sur l'expression de protéines d'adhésion ou de récepteurs impliqués dans le processus aboutissant à la formation des stries lipidiques et de la plaque athéromateuse. Cependant, les nombreuses études d'intervention n'ont pas permis de confirmer l'intérêt qu'avait suscité la vitamine E à travers ces résultats. Il demeure que l'action préventive de la vitamine E vis-à-vis de l'athérosclérose dépend probablement de deux facteurs non pris en compte dans ces études lors de l'inclusion des sujets dans le protocole clinique : le statut vitaminique E et le stade préclinique du processus athéromateux (Léger, 2000a).

Outre son action antioxydante directe, la vitamine E joue de nombreux rôles qui ne s'expliquent pas par une action antioxydante (Azzi et Stocker, 2000). Elle est par exemple capable d'inhiber l'activité de la protéine kinase C. Cette inhibition a été montrée sur un grand nombre de cellules *in vitro*, mais également *in vivo*, et elle a de nombreuses conséquences du fait du rôle pléiotrope de cette protéine. Dans les monocytes, elle entraîne une diminution de la phosphorylation d'une sous-unité protéique cytosolique de la NADPH oxydase, empêche la translocation de cette sous-unité et, par conséquent, l'assemblage de la forme active de la NADPH oxydase (Cachia *et al.*, 1998). Il en résulte une inhibition de la production d'anion superoxyde qui peut atteindre 80 %. L' α -tocophérol a une action anti-proliférative *in vitro*, une action inhibitrice sur l'expression de récepteurs, de protéines d'adhésion et chimiotactiques, sur la production de cytokines pro-inflammatoires ou de l'allergie (pour une revue, voir Brigelius-Flohé *et al.*, 2002). Les autres vitamines à activité antioxydante comparable (β et γ) ne présentent pas ces types d'action, ou leur action est très faible, ou bien encore leur action est sans proportionnalité avec l'effet antioxydant, prouvant qu'une part des propriétés de la vitamine E ne peut s'expliquer par une action antioxydante.

Les interactions de l' α -tocophérol avec les protéines de transfert et/ou de transport font partie des actions " non-antioxydantes " de la vitamine.

Il existe une autre protéine capable de lier certains vitamines de tocophérol et de tocotriénol. Il s'agit du récepteur nucléaire PXR. L' α - et le γ -tocophérol se sont en effet révélés capables, via PXR, d'activer l'expression d'enzymes à P450 (CYP) responsables de l' ω -oxydation des chaînes latérales de la vitamine E, étape initiatrice de leur β -oxydation. Le γ -tocotriénol est le plus actif dans le système étudié. Ces résultats pourraient en partie expliquer la métabolisation plus active des vitamines "non α " et l'existence d'interaction dans la métabolisation de la vitamine E et de certains médicaments. À titre d'exemple la rifampicine induit l'expression du gène de CYP3A (Waxman, 1999) et stimule la production du métabolite α -carboxyéthylchromanol à partir de l' α -tocophérol de synthèse (le mélange des 8 isomères), mais non à partir de la forme naturelle *RRR*- α -tocophérol.

Apport nutritionnel conseillé et limite de sécurité

L'apport nutritionnel conseillé s'appuie sur la définition du besoin nutritionnel moyen (Martin, 2001). Pour la vitamine E, il est de 12 Unités Tocophérol-Equivalent ou mg de TE (UTE, 1 mg de *RRR*- α -tocophérol, voir [tableau 1](#)), soit 18 Unités Internationales (UI), chez l'adolescent et l'adulte. Il est également de 12 mg TE pour la femme enceinte. Un ANC plus élevé pour les

personnes âgées pourrait être proposé (jusqu'à 50 UTE), mais aucune valeur unique précise n'a été arrêtée à ce jour. Pour la population jeune, il est de 4 UTE pour le nourrisson, 6 UTE pour l'enfant de 1 à 3 ans, de 7,5 UTE de 4 à 6 ans, de 9 UTE de 7 à 9 ans et de 11 UTE de 10 à 12 ans. Enfin, la limite de sécurité (en anglais "*tolerable upper intake level*") a été fixée par le SCF (*Scientific Committee on Food*) de la Commission Européenne à 300 UTE/j. Elle est de 100 mg pour la tranche d'âge 1-3 ans, 120 mg pour les 4-6 ans, 160 mg pour les 7-10 ans, 220 mg pour les 11-14 ans et 260 mg pour les 15-17 ans.

La vitamine E en tant qu'additif alimentaire

En bref, la réglementation européenne reconnaît 4 types de tocophérols dénommés, dans la numérotation de la CEE : E 306 [extraits d'origine naturelle riches en tocophérols (teneur supérieure ou égale à 34 % de tocophérols totaux), E307 (α -tocophérol de synthèse), E308 (γ -tocophérol de synthèse), et E309 (δ -tocophérol de synthèse), entre 96 et 97 % de pureté. Les doses admissibles sont, à titre d'exemple : 0,3 g/kg dans les margarines de bonne qualité et les beurres allégés, et 1g/kg dans les huiles (Chazan, 1992).

EXPLORATION DU STATUT VITAMINIQUE – DOSAGES

Le SCF considère que l'apport moyen journalier, exprimé en mg de Tocophérol-Equivalent, varie de 7 à 15, suivant les pays (population française non incluse), le plus élevé se trouvant en Allemagne et le plus faible au Royaume-Uni. En France, l'apport médian est de 11 mg/j d'après l'étude SU.VI.MAX. Plus de 30 % des Français consomment moins de 8 mg/j (Martin, 2001). D'après des études anciennes, la consommation des moins de 18 ans et des plus de 65 ans pourrait être faible.

L'exploration du statut vitaminique E repose essentiellement sur la mesure des teneurs plasmatiques circulantes. La teneur moyenne plasmatique en α -tocophérol se situe entre 30 et 32 mmol/L d'après l'étude SU.VI.MAX., soit 13 à 14 mg/l. Elle est largement supérieure à la valeur considérée comme évocatrice d'une déficience légère, estimée généralement à 6 mg/l. La carence en vitamine E doit être considérée comme exceptionnelle dans la population générale française (hors situations pathologiques). Les apports alimentaires (hors compléments alimentaires) en vitamine E ne sont pas corrélés à la teneur plasmatique. En revanche, des apports sous formes de compléments allant jusqu'à des valeurs de 300 mg/j entraînent une augmentation de la teneur en tocophérol circulante dépendante de la dose (Carbonneau *et al.*, 1998).

D'autres marqueurs de consommation peuvent être utilisés (globules rouges, polymorphonucléaires, plaquettes, LDL), mais les données sont peu nombreuses et les valeurs de référence ne font pas l'objet d'un consensus. Les dosages sont tributaires de protocoles plus complexes et souvent plus coûteux. Pour la teneur en vitamine E des LDL, des dosages effectués dans différents pays montrent que le rapport molaire vitamine E/apo B (qui évalue le nombre de molécules de vitamine par particule de LDL) le plus fréquent se situe entre 6 et 9. Il semble que des

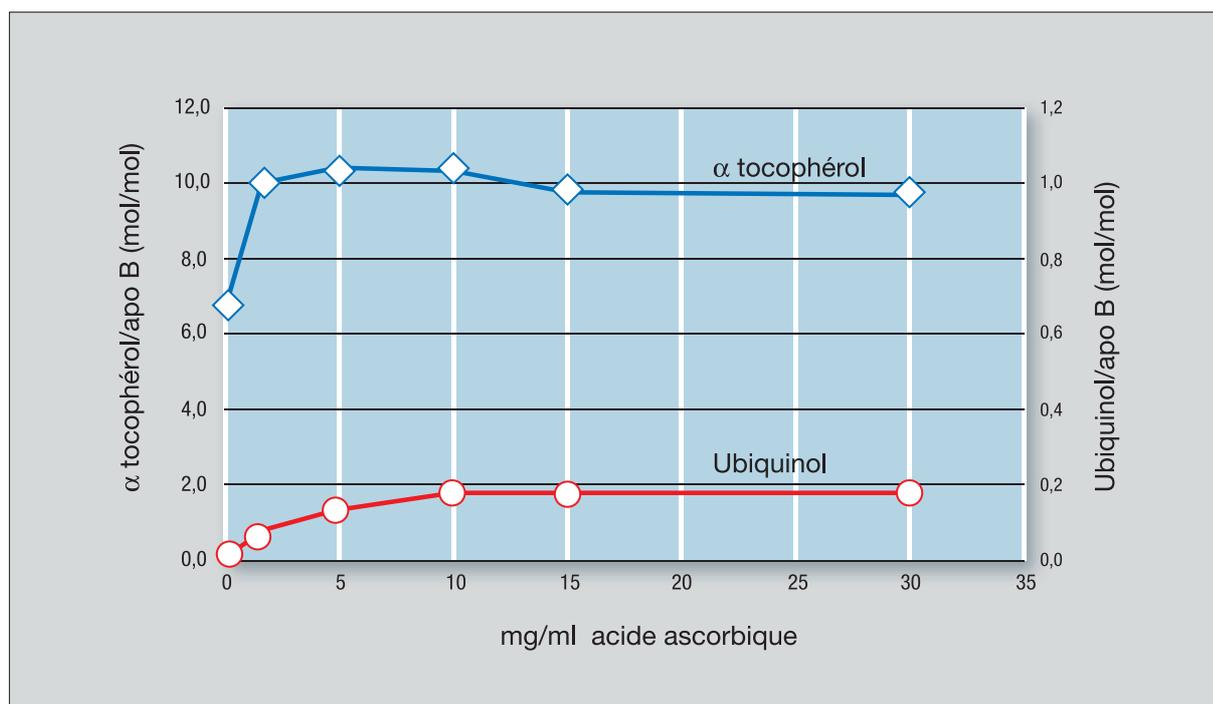
populations méditerranéennes puissent atteindre des rapports plus élevés (Carbonneau *et al.*, 2002). Il faut aussi remarquer que certaines habitudes alimentaires (une consommation fréquente d'huile de maïs ou de soja par exemple) nécessitent la prise en compte du γ -tocophérol circulant, en plus de l' α -tocophérol.

Les étapes pré-analytiques

Les étapes pré-analytiques doivent prioritairement prendre en compte le caractère oxydable des molécules de tocophérol. Le BHT ou, mieux l'acide ascorbique, doivent être conseillés. Il est possible de les utiliser, respectivement, en solution éthanolique à 30 mg/l ou à 10 g/l pour des concentrations finales dans l'extrait de l'ordre de 15 mg/l et 5 g/l. Dans le cas de l'utilisation de l'acide ascorbique, cette teneur a été retenue après différents essais (la [figure 4](#) rapporte les résultats d'essais effectués sur une préparation de LDL).

À titre d'exemple, voici un protocole couramment pratiqué au laboratoire (on pourra se reporter à Cachia *et al.*, 1995). Le sang du sujet prélevé sur tube hépariné (ou sur EDTA) est centrifugé à 3 000 xg pendant 10 min. Le plasma est prélevé dans le tube. Deux cents μ l (la quantité minimale nécessaire est 100 μ l) sont placés dans un volume identique d'une solution d'acide ascorbique à 10 mg/ml, l'étalon interne (par exemple, le δ -tocophérol ou l'acétate d' α -tocophérol) en solution éthanolique est ajouté. De l'éthanol permet de compléter le volume à 600 μ l. L'extraction est

Figure 4 : Quantités de vitamine E (α -tocophérol) et d'ubiquinol retrouvées dans une lipoparticule de LDL (exprimées en mole/mole d'apo B) en fonction de la concentration de la solution d'acide ascorbique ajoutée avant extraction : 1 volume de solution pour 1 volume de préparation de LDL issue de l'ultracentrifugation. Vitamine E : échelle de gauche, losanges. Ubiquinol : échelle de droite, ronds.



effectuée à l'aide d'un mélange hexane/acétate d'éthyle (75 : 25, v/v), après agitation, un repos de 10 min, puis centrifugation à 4 000 x g. L'acétate d'éthyle améliore l'extraction du γ -tocophérol. Le même protocole peut être utilisé pour les LDL en partant de 100 μ l de préparation. La dernière étape comporte une évaporation à sec sous azote des solvants et une reprise des échantillons dans un volume adéquat de méthanol. Cette solution éthanolique ne doit pas être conservée plus d'une semaine à -18°C , plus de 15 j à -30°C et plus de 6 mois à -80°C .

Les techniques de dosage et leurs performances techniques

Les techniques de dosages nécessitent une étape préalable de séparation des molécules représentatives de la vitamine E. La méthode de séparation la plus courante aujourd'hui est la chromatographie liquide haute performance (CLHP). Lorsque les 4 vitamines de tocophérol doivent être dosées séparément (ceci correspond également au cas où l' α -tocophérol et le γ -tocophérol doivent être évalués simultanément), il sera nécessaire d'utiliser une colonne de silice (par exemple Si Ultraspher, longueur/diamètre : 250 mm/10 mm). Cette colonne permet également de séparer les quatre vitamines de tocotriénol. Si l' α -tocophérol seul doit être dosé, il sera possible d'orienter son choix vers les colonnes à phase inverse (Hypersil C18 par exemple). L'élution isocratique peut être préférée pour des raisons pratiques et de gain de temps (équilibre de la phase stationnaire de la colonne inutile). Dans le cas d'une colonne de silice, il sera possible de choisir par exemple le mélange iso-octane/méthyltertobutyléther (MTBE) 92,5 : 7,5 (v/v), et dans le cas d'une colonne à phase inverse le mélange méthanol/eau, 97 : 3 (v/v).

Des colonnes "chirales" ayant la capacité de séparer les isomères *RRR*- α -tocophérol et *SRR*- α -tocophérol sont disponibles aujourd'hui (Kiyose *et al.*, 1999).

Plusieurs types de détecteur sont couramment utilisés : un détecteur UV à 292 nm (avec un $\epsilon_{\lambda} = 3525 \text{ mole}^{-1}$), un fluorimètre (excitation à 290 nm, émission entre 317 et 345 nm), un détecteur électrochimique (potentiel fixé à +0,95 V pour tenir compte du potentiel d'oxydation plus élevé du δ -tocophérol dans le cas où il est utilisé comme standard interne, mais des potentiels plus bas peuvent également être utilisés). Lorsque cela sera possible, la fluorimétrie et l'électrochimie seront préférées en raison de leur spécificité. Ce sont également les méthodes de détection les plus sensibles. Il est possible d'augmenter la sensibilité en réduisant le diamètre des colonnes. On choisira par exemple des colonnes dont le diamètre est inférieur à 4,5 mm.

VARIATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES

Dans le chapitre "Métabolisme" plusieurs situations physiopathologiques ont été évoquées dans lesquelles une carence en vitamine E est impliquée : une malabsorption lipidique chronique de différentes origines, un défaut de LPL ou de fixation de la LPL à la surface des cellules, l'AVED et le défaut d' α -TTP fonctionnelle. On trouvera dans le [tableau 3](#) quelques exemples de teneurs en vitamine E plasmatique dans différentes situations pathologiques.

Il faut rappeler que la carence en vitamine E se manifeste cliniquement par des signes hématologiques (hémolyse), neuromusculaires et ophtalmologiques (constituant le syndrome neurodégénératif). Ces carences sont rares dans la population. De tels tableaux cliniques nécessitent des doses d'apport qui dépassent la limite de sécurité. Elles peuvent aller de 200 mg à 1,5 g TE. Elles s'inscrivent dans un contexte thérapeutique précis et non dans celui d'une alimentation journalière.

Bien d'autres situations de déficience peuvent être citées, de gravité moindre, mais s'inscrivant également dans un contexte thérapeutique et justifiant ainsi des doses d'apport élevées. C'est le cas de l'anémie hémolytique du nouveau-né prématuré (apports : 10 à 20 mg/kg/j), des pathologies du prématuré occasionnées par l'oxygénothérapie (apports : 100 mg/kg/j), de la fibroplasie rétrolentale (Hittner *et al.*, 1981), et des patients hémodialysés chroniques (350 mg/j) (Cristol *et al.*, 1997). En revanche, la "supplémentation" de la femme enceinte dans le but d'augmenter préventivement le niveau plasmatique de la vitamine E chez le fœtus et le nouveau-né s'est avérée sans effet (Léger *et al.*, 1998).

Le statut vitamérique K doit être impérativement surveillé dans les cas d'apports élevés en vitamine E, car ces apports agissent négativement sur les propriétés pro-coagulantes de la vitamine K. Booth *et al.* (2004) ont par exemple montré que des doses de 1 g/j de vitamine E ont une action antagoniste vis-à-vis de la vitamine K chez des sujets ne prenant pas d'anticoagulants oraux. Par ailleurs, les anticoagulants oraux sont souvent des antagonistes de la vitamine K (AVK). Leur prise potentialise donc les effets de doses élevées de vitamine E. Les risques hémorragiques se trouvent augmentés. Cette potentialisation s'explique en partie par le fait que les AVK, comme les apports élevés de vitamine E, bloquent la régénération de la forme quinone de la vitamine K en sa forme quinol, rendant ainsi la vitamine K inactive. Par ailleurs, des doses élevées de vitamine E conduisent à l'apparition de la forme tocophéryl-quinone, qui pourrait être capable de bloquer une enzyme intervenant dans le contrôle de la coagulation, la γ -carboxylase. Des doses élevées de vitamine E réduisent également l'activité de la cyclo-oxygénase, donc la synthèse de thromboxane A₂, la coagulation thromboxane-dépendante, les facteurs II et VII de la coagulation. Dans ce cas, la vitamine E est donc capable de potentialiser les effets anticoagulants de l'aspirine. L'ensemble de ces observations indique qu'il est impératif de porter une attention toute particulière aux risques hémorragiques en cas de prise simultanée de doses élevées de vitamine E, d'AVK ou d'aspirine. Par suite de l'exposition à ces risques, une vitaminothérapie E au long cours rend nécessaire un suivi fonctionnel de la coagulation et de la mesure d'un temps de prothrombine. Il faut même recommander, comme le fait le SCF, la cessation des prises élevées de vitamine E dans les 15 jours précédant ou suivant une intervention chirurgicale.

Tableau 3 : Teneurs du plasma en vitamine E dans différentes situations pathologiques, comparées à celles rencontrées chez des sujets sains^a.

Type de situation pathologique	Concentrations plasmatiques (mg/l)
Sujets sains	
Adultes	9,5
Nouveau-né (à terme)	4,0
Nouveau-né (prématuré)	2,6
Sujets malnutris	
Enfants en malnutrition protéino-énergétique	3,0
Pathologies entéro-pathiques	
Anomalies congénitales des voies biliaires	< 1,0
Abétalipoprotéïnémie	< 1,0
Maladie cœliaque	3,2
Pancréatite chronique	4,0
Colite ulcéreuse	2,4
Mucoviscidose	2,3
Pathologies hémolytiques	
Béta-thalassémie majeure	4,2
Drépanocytose	6,2
Ictère hémolytique dû à une sphérocytose héréditaire	5,2
Autres pathologies	
Maladie de Gaucher (sévère)	0,8
Maladie de Gaucher (chronique)	3,5

^a Valeurs extraites de Machlin LJ, in *Handbook of Vitamins*, 2^{ème} édition, Marcel Dekker, New York, Basel.

Références bibliographiques

- Acuff RV, Dunworth RG, Webb LW, Lane JR** (1998). Transport of deuterium-labeled tocopherols during pregnancy. *Am J Clin Nutr*, **67** : 459-464.
- Anonyme** (1968). *Recommended dietary allowances*, 7th ed. Vitamin E. National Research Council, National Academic Press, Washington DC, 27-29.
- Azzi A, Stocker A** (2000). Vitamin E: non-antioxidant roles. *Prog Lipid Res*, **39** : 231-255.
- Booth SL, Golly I, Sackeck JM et al.** (2004). Effect of vitamin E supplementation on vitamin K status in adults with normal coagulation status. *Am J Clin Nutr*, **80** :143-148.
- Borel P, Mekki N, Boirie Y, Partier A et al.** (1997). Postprandial chylomicron and plasma vitamin E responses in healthy older subjects compared with younger ones. *Eur J Clin Invest*, **27** : 812-821.
- Brigelius-Flohé R, Kelly FJ, Salonen JT et al.** (2002). The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr*, **76** : 703-716.
- Burton GW, Traber MG, Acuff RV et al.** (1998). Human plasma and tissue α -tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. *Am J Clin Nutr*, **67** : 669-684.
- Cachia O, Léger CL, Boulot P et al.** (1995). Red blood cell vitamin E concentrations in fetuses are related to but lower than those in mothers during gestation. *Am J Obstet Gynecol*, **173** : 42-51.
- Cachia O, El Benna J, Pedrucci E et al.** (1998). α -tocopherol inhibits the respiratory burst in human monocytes. Attenuation of p47^{phox} membrane translocation and phosphorylation. *J Biol Chem*, **49** : 32801-32805.
- Carbonneau MA, Léger CL, Descomps B et al.** (1998). Improvement in the antioxidant status of plasma and LDL in subjects receiving a red wine phenolic mixture. *J Amer Oil Chem Soc*, **75** : 235-240.
- Carbonneau MA, Cartron E, Léger CL et al.** (2002). New insight on the relationship between LDL composition, associated proteins, oxidative resistance and preparation procedure. *Free Rad Res*, **36** : 127-142.
- Chan AC, Chow CK, Chiu D** (1999). Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. *Proc Soc Exp Biol Med*, **222** : 274-282.
- Chatelain E, Boscoboinik DO, Bartoli GM et al.** (1993). Inhibition of smooth muscle cell proliferation and protein kinase C activity by tocopherols and tocotrienols. *Biochim Biophys Acta*, **1176** : 83-89.
- Chazan JB.** Les sources alimentaires de tocophérols. In : C.L Léger (1992). *Vitamine E, tocophérols et composés apparentés : propriétés antioxygène et rôle biologique, sources alimentaires*. Polytechnica, Paris.
- Corwin LM, Shloss J** (1980). Influence of vitamin E on the mitogenic response of murine lymphoid cells. *J Nutr*, **110** : 916-923.
- Cristol JP, Bosc JY, Badiou S et al.** (1997). Erythropoietin and oxidative stress in haemodialysis: beneficial effects of vitamin E supplementation. *Nephrol Dial Transplant*, **12** : 2312-2317.
- Desrumaux C, Deckert V, Athias A et al.** (1999). Plasma phospholipid transfer protein prevents vascular endothelium dysfunction by delivering alpha-tocopherol to endothelial cells. *FASEB J*, **13** : 883-892.
- Desrumaux C, Risold PY, Schroeder H et al.** (2005). Phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency reduces brain vitamin E content and increases anxiety in mice. *FASEB J*, **19** : 296-297.
- Duthie SJ, Ma A, Ross MA, Collins AR** (1996). Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res*, **56** : 1291-1295.
- Gey KF** (1998). Vitamin E plus vitamin C and interacting conutrients required for optimal health. A critical and constructive review of epidemiology and supplementation data regarding cardiovascular disease and cancer. *Biofactors*, **7** : 113-174.

- Goss SPA, Hogg N, Kalyanaraman B** (1999). The effect of α -tocopherol on the nitration of γ -tocopherol by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys*, **363** : 333-340.
- Hittner HM, Godio LB, Rudolph AJ et al.** (1981). Retrolental fibroplasia. Efficacy of vitamin E in a double blind clinical study of preterm infants. *N Engl J Med*, **305** : 1365-1371.
- Kaempf-Rotzoll DE, Horiguchi M, Hashiguchi K et al.** (2003). Human placental trophoblast cells express α -tocopherol transfer protein. *Placenta*, **24** : 439-444.
- Kayden HJ, Traber MG** (1993). Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. *J Lipid Res*, **34** : 343-358.
- Kiyose C, Kaneko K, Muramatsu R et al.** (1999). Simultaneous determination of *RRR* - and *SRR* - α -tocopherols and their quinones in rat plasma and tissues by using chiral high-performance liquid chromatography. *Lipids*, **34** : 415-422.
- Landes N, Pfluger P, Kluth D et al.** (2003). Vitamin E activates gene expression via the pregnane X receptor. *Biochem Pharmacol*, **65** : 269-273.
- Léger CL** (2000a). La vitamine E et la prévention cardiovasculaire. *Ann Biol Clin*, **58** : 527-540.
- Léger CL** (2000b). La vitamine E : état actuel des connaissances, rôle dans la prévention cardiovasculaire, biodisponibilité. *OCL*, **7** : 258-265.
- Léger C.** *Vitamine E, tocophérols et composés apparentés : propriétés antioxygène et rôle biologique, sources alimentaires*. Polytechnica, Paris, 1992.
- Léger CL, Dumontier C, Fouret G et al.** (1998). A short term supplementation of pregnant women before delivery does not improve significantly the vitamin E status of neonates - Low efficiency of the vitamin E placental transfer. *Internat J Vit Nutr Res*, **68** : 203-209.
- Martin A.** *Apports nutritionnels conseillés pour la population française*. 3ème édition. Editions Tec & Doc, Londres - Paris - New York, 2001.
- Ouahchi K, Arita M, Kayden H et al.** (1995). Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the alpha-tocopherol transfer protein. *Nat Genet*, **9** : 141-145.
- Poulin JE, Cover C, Gustafson MR, Kay MB** (1996). Vitamin E prevents oxidative modification of brain and lymphocyte band 3 proteins during aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93** : 5600-5603.
- Stoyanovsky DA, Goldman R, Darrow RM et al.** (1995). Endogenous ascorbate regenerates vitamin E in the retina directly and in combination with exogenous dihydrolipoic acid. *Curr Eye Res*, **14** : 181-189.
- Traber MG, Olivecrona T, Kayden HJ** (1985). Bovine milk lipoprotein lipase transfers tocopherol to human fibroblasts during triglyceride hydrolysis *in vitro*. *J Clin Invest*, **75** : 1729-1734.
- Traber MG, Sokol RJ, Kohlschütter A et al.** (1993). Impaired discrimination between stereoisomers of α -tocopherol in patients with familial isolated vitamin E deficiency. *J Lipid Res*, **34** : 201-210.
- Traber MG, Elsner A, Brigelius-Flohé R** (1998). Synthetic as compared with natural vitamin E is preferentially excreted as α -CEHC in human urine: studies using deuterated α -tocopheryl acetates. *FEBS Lett*, **437** : 145-148.
- Waxman DJ** (1999). P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys*, **369** : 11-23.
- Zimmer S, Stocker A, Sarbolouki MN et al.** (2000). A novel human tocopherol-associated protein: cloning, *in vitro* expression, and characterization. *J Biol Chem*, **275** : 25672-25680.



Vitamine K

Fathi Moussa, Monique Pressac

DÉFINITION

Le terme "vitamine K" (VK) désigne un groupe de substances liposolubles, dérivant toutes du noyau 2 méthyl-1,4-naphtoquinone ([figure 1](#)). Il existe en fait deux formes naturelles et plusieurs formes synthétiques de vitamines K. Les formes naturelles sont représentées par la vitamine K₁ (phylloquinone ou phytoménadione), d'origine végétale, donc exogène, et les vitamines K₂, ou ménaquinones (MK-n), d'origine animale ou bactérienne (flore intestinale) et qui sont principalement d'origine endogène. Les ménaquinones se distinguent de la VK₁ par leur chaîne latérale formée d'unités isoprényles en nombre variable ([figure 1](#)). Les ménaquinones d'origine bactérienne en possèdent 4 à 13.

La vitamine K₃, ou ménadione, désigne le noyau 2-méthyl-1,4-naphtoquinone ([figure 1](#)). La ménadione n'a jamais été isolée dans la nature, mais elle est biologiquement active. Son activité est liée au fait que les bactéries peuvent l'utiliser comme substrat pour synthétiser des ménaquinones. Elle est de ce fait considérée comme une provitamine.

Les autres formes de vitamines K sont des dérivés de la ménadione, obtenus par synthèse organique.

INTÉRÊT PHYSIOPATHOLOGIQUE

La vitamine K est le cofacteur d'une carboxylase catalysant la gamma-carboxylation post-traductionnelle de nombreuses protéines, dites vitamine K-dépendantes ([figure 2](#)).

La vitamine K intervient ainsi dans la gamma-carboxylation de six protéines de la cascade de la coagulation sanguine : les facteurs II, VII, IX et X, impliqués dans les processus de formation de la thrombine et les protéines C et S, impliquées dans les processus d'inhibition de cette même enzyme. Ce rôle est donc essentiel, puisqu'il s'exerce à deux niveaux : l'initiation et l'arrêt de la formation du caillot. Chez les patients traités par les antagonistes de la vitamine K, ces protéines sont normalement synthétisées par le foie, mais leur maturation est défectueuse. Ces protéines immatures, ou des-gamma-carboxyprotéines ou PIVKA (de l'anglo-saxon : *Proteins Induced by Vitamin K Absence or Antagonist*), sont non fonctionnelles puisqu'elles sont déficientes en Gla.

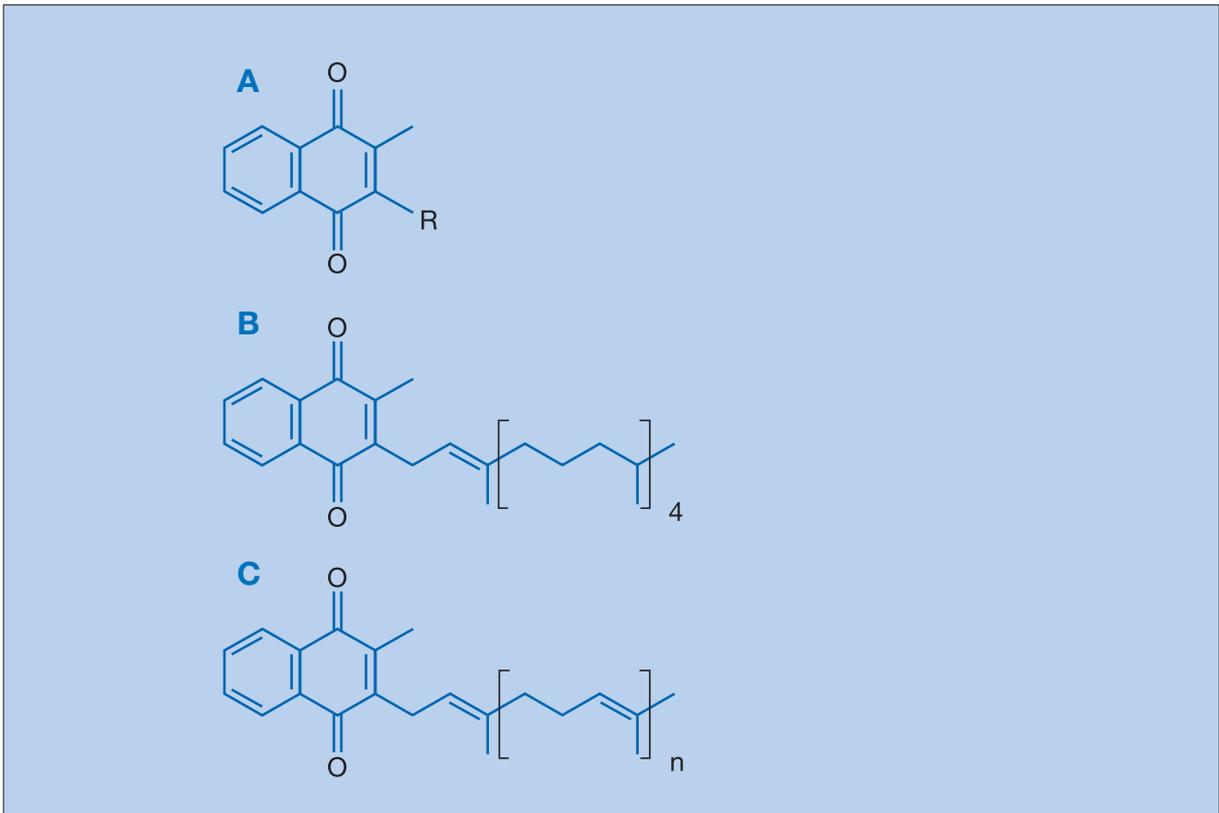


Figure 1 : (A) Vitamines K synthétiques ; Vitamine K₃ ou Ménadione (R = H) ; (B) Vitamine K₁ ou Phylloquinone ; (C) Vitamine K₂ ou Ménaquinone-n.

En effet, sans Gla en nombre suffisant, ces protéines sont incapables de lier les ions calcium qui leur servent de ponts lors de la fixation sur les phospholipides membranaires. La mise en évidence de des-gamma-carboxyprotéines dans la circulation sanguine est sans doute le moyen le plus sûr de diagnostiquer une hypovitaminose K, sans préjuger de l'étiologie.

D'autres protéines contenant des restes gamma-carboxyglutamyles (Gla) sont présentes dans tous les tissus sains et pathologiques où un processus de captation du calcium est impliqué. C'est ainsi qu'on les retrouve dans le sang, le tissu vasculaire, le foie, les reins, la rate, le tissu osseux, les dents, la peau, le placenta et les organes sexuels, ainsi que dans les calculs rénaux, les plaques d'athérome, les nodules de calcifications ectopiques, etc. Cependant, le rôle exact de la plupart de ces protéines reste obscur.

Ainsi, en dehors de son rôle classique dans les processus de coagulation, la VK exerce, de toute évidence, d'autres fonctions qui restent à préciser, notamment dans les processus impliquant la captation du calcium.

Le foie humain contient un mélange de VK₁ et de MK-n. Les MK-n représenteraient, environ 90 % des réserves hépatiques. Les premières ménaquinones identifiées dans cet organe sont : MK-7, MK-8, MK-9, MK-10 et MK-11 ainsi que les formes réduites MK-9(H₂), MK-9(H₄), MK-10(H₂) et MK-10(H₄). La MK-7 et la phylloquinone seraient les formes les plus importantes sur le plan quantitatif.

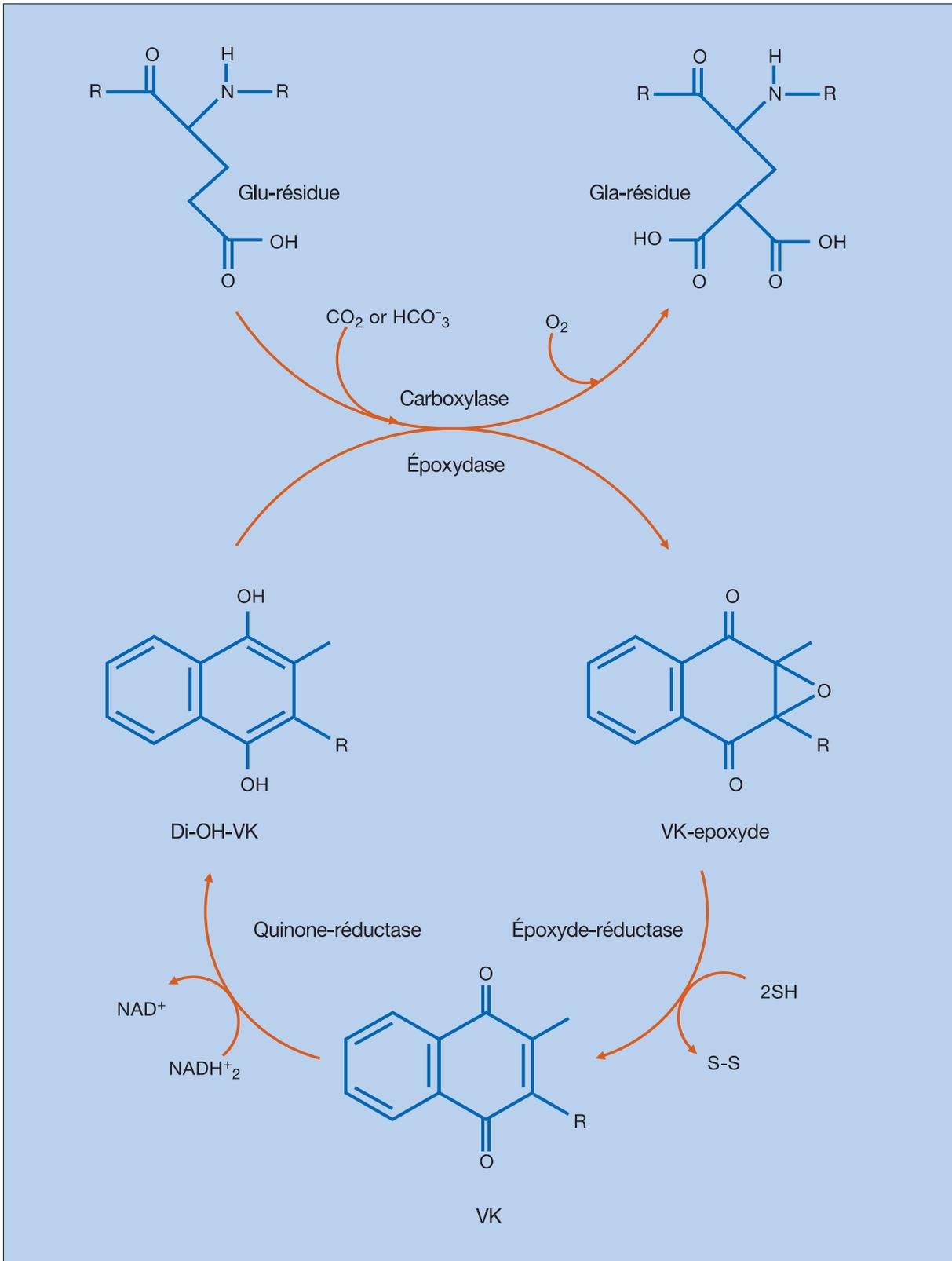


Figure 2 : Cycle de la vitamine K.

Le foie d'un adulte normal renfermerait environ 5 ng/g de phylloquinone. Très labile, cette réserve pourrait chuter à 25 % de sa valeur initiale en trois jours, lors d'une restriction vitaminique sévère.

Les apports, actuellement recommandés par les organismes officiels, sont de 1 µg/kg/jour. Les carences d'origine alimentaires étant exceptionnelles, il est raisonnable d'en déduire que les apports alimentaires couvrent largement les besoins, du moins dans les pays développés. Cependant, ces besoins ont été estimés pour maintenir une hémostasie normale. Ils seraient insuffisants pour le maintien d'un métabolisme osseux normal.

Chez le nouveau-né nourri exclusivement au sein, plusieurs facteurs concourent à aggraver le risque d'une hypovitaminose K :

- le passage trans-placentaire de cette vitamine est très limité ;
- le lait de femme est relativement pauvre en vitamine K ;
- les apports endogènes sont inexistants avant la colonisation du tube digestif par la flore bactérienne.

Ces facteurs sont autant d'arguments pour supplémenter systématiquement tous les nouveau-nés à la naissance. Bien que controversés, les besoins en vitamine K chez le nouveau-né sont estimés à environ 10 µg/kg/jour.

Chez l'homme, la pathologie associée à la vitamine K est liée à un état de carence. Les manifestations cliniques s'expriment alors dans le cadre d'un syndrome hémorragique, sans caractéristiques spécifiques.

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que la baisse de la densité osseuse ainsi que les risques de fractures chez le sujet âgé étaient souvent associés à une carence en VK₁ et en MK-n. Cependant, les résultats de ces études restent controversés, à l'heure actuelle.

Le diagnostic biologique d'une hypovitaminose K est habituellement fondé sur la mise en évidence d'un déficit en facteurs de l'hémostasie vitamine K-dépendants, pouvant être corrigé par un apport de vitamine (test de Kohler). Cependant, ce type de diagnostic est peu sensible et, en dehors des défauts d'apport ou d'absorption, n'apporte aucune information sur le plan étiologique. Le diagnostic étiologique évolue actuellement vers l'exploration de paramètres plus spécifiques, dont le dosage de la VK₁ sérique (forme circulante majeure) et de son métabolite VK₁-époxyde.

ÉTAPE PRÉ-ANALYTIQUE

La vitamine K₁ peut être dosée dans le sérum ou le plasma, indépendamment de la nature de l'anticoagulant utilisé. Il est nécessaire de prélever le sang avant toute administration de vitamine K ou de toute préparation susceptible de contenir de la vitamine K. Les méthodes de dosage les plus performantes nécessitent 1 ml de sang veineux ou plus, si une hypovitaminose K est suspectée.

La vitamine K est stable à l'air, mais elle est instable à la lumière. Le sérum ou le plasma peut être conservé à l'abri de la lumière pendant, au moins 48 heures à 20-25 °C, une semaine à + 4 °C et plusieurs mois à - 20 °C.

LES TECHNIQUES DE DOSAGES ET LEURS PERFORMANCES

Il n'existe pas de technique de référence pour mesurer la phylloquinonémie. Les techniques les plus performantes, du point de vue spécificité et sensibilité, pour mesurer la phylloquinonémie utilisent deux étapes chromatographiques. La détection repose sur les propriétés de fluorescence du noyau naphthoquinone à l'état réduit.

Il existe, cependant, un programme international de contrôle de qualité, coordonné par le centre de référence de l'hémophilie de Londres "*The Centre for Thrombosis and Haemostasis (Haemophilia Reference Center) St Thomas' Hospital, London*". L'objectif de ce programme est d'aboutir à la standardisation des techniques de dosage de la vitaminémie K et à l'élaboration d'une technique de référence.

Techniques de dosage utilisées

Les techniques les plus fiables comportent 3 étapes

- **Etape 1 : extraction liquide-liquide** des fractions lipidiques du sérum ou du plasma après incorporation de l'étalon interne (homologue structural de la phylloquinone) et précipitation des protéines ;
- **Etape 2 : purification des fractions contenant la vitamine K₁ et l'étalon interne** par chromatographie d'adsorption sur gel de silice hydrophile. Classiquement effectuée par chromatographie liquide haute performance (CLHP) utilisant une colonne semi-préparative (9 mm de diamètre interne), cette étape peut être aussi réalisée par simple extraction liquide-solide pour les prises d'essai inférieures à 100 µl ;
- **Etape 3 : dosage de la VK₁ par CLHP** à polarité de phase inversée couplée à une détection fluorométrique, après réduction coulométrique en sortie de colonne.

La même technique peut être utilisée pour doser la vitamine K₁-époxyde éventuellement présente dans l'échantillon. Elle a aussi été utilisée pour doser la vitamine K₁ dans d'autres milieux tels que les préparations lipidiques injectables ou les aliments.

Le même principe de dosage peut être adopté pour la mesure de la vitamine K₁ et des ménaquinones tissulaires.

Performances techniques

Cette technique de dosage est hautement spécifique : elle utilise la double séparation chromatographique et repose sur 2 propriétés caractéristiques du noyau naphthoquinone : l'échange d'électrons et la fluorescence naturelle. Le mode de détection utilisé est très sensible : la limite de détection est de 5 pg de vitamine K₁ en solution pure (pour un rapport signal/bruit de fond = 3). La limite de quantification varie en fonction de la prise d'essai : 500 ng/l pour 100 µl, 100 ng/l pour 500 µl et 50 ng/l pour 1000 µl.

La méthode est linéaire jusqu'à 1000 ng/l de vitamine K₁ et le rendement d'extraction après la première étape chromatographique est supérieur à 70 % quelle que soit la concentration en cette vitamine.

La précision de ces techniques exprimée en terme de CV varie en fonction du niveau de concentration : 5 à 9 % pour la répétabilité et de 7 à 13 % pour la reproductibilité,

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Variations physiologiques

Chez les sujets sains, aucune différence en fonction de l'âge et du sexe n'a été observée pour la phylloquinonémie. Les concentrations sériques sont en fait étroitement liées au régime alimentaire. En effet, les réserves de l'organisme en phylloquinone sont très limitées.

Chez les personnes âgées, la carence en vitamine K serait très fréquente, notamment chez les sujets atteints d'ostéoporose (Hodges *et al.*, 1993).

Chez le nouveau-né, la carence serait la règle, notamment en cas d'allaitement maternel exclusif.

Valeurs usuelles en fonction de l'âge et du sexe

Chez l'adulte sain, la phylloquinonémie est en général inférieure à 1 ng/ml.

A notre connaissance, une seule étude a été réalisée en France chez 82 enfants vivant dans la région parisienne et âgés de 1 à 6 ans. Les valeurs fréquentes de la trans-phylloquinonémie chez ces enfants varient de 0,040 à 0,880 ng/ml (médiane = 0,175 ng/ml). Des résultats comparables ont été obtenus, depuis, en Belgique et au Royaume Uni.

La médiane des concentrations de VK₁ dans les sangs de cordons de 27 nouveau-nés à terme de la région parisienne, déterminée à l'aide de la technique recommandée, est de 0,05 ng/ml (0,02 à 0,38 ng/l).

Le dosage des ménaquinones relève du domaine de la recherche spécialisée. Si les MK lourdes (n = 9 à 13) ne sont présentes que dans le foie, les MK-4, 6, 7, 8 et 9 sont retrouvées dans d'autres organes. La concentration de la MK₄ serait même supérieure à celle de la VK₁ dans plusieurs organes. Cependant, malgré la prépondérance des MK-n à chaîne longue dans le foie, celles-ci ne sont pas retrouvées dans le sang où seules les formes légères sont détectées à l'état de traces.

Variations pathologiques

Les déficits enzymatiques, liés à une mutation du système carboxylase-époxydase (transmission autosomique récessive) ou de l'époxyde-réductase sont rares. Ils se traduisent par un déficit combiné des facteurs de l'hémostase vitamine K-dépendants. L'activité coagulante de ces facteurs

est, dès lors, inférieure à 1% de la normale, tandis que les autres protéines plasmatiques sont normales. Les doses massives de vitamine K, administrées quotidiennement par voie intramusculaire, ne permettent pas dans le cas d'une mutation du système carboxylase-époxydase, de normaliser l'activité des différents facteurs, mais elles permettent dans tous les cas d'éviter les accidents hémorragiques graves.

Les déficits enzymatiques du cycle de la vitamine K étant extrêmement rares, une hypovitaminose K a, schématiquement, trois étiologies possibles : les défauts d'apport, les défauts d'absorption et les déficits d'origine toxique.

Les défauts d'apport sont souvent associés, soit à une diminution de la synthèse endogène suite à un traitement antibactérien au long cours, soit à une alimentation parentérale exclusive non supplémentée en vitamine K.

Les défauts d'absorption sont observés dans diverses circonstances telles que les syndromes de malabsorption (résection intestinale, colite ulcéreuse, iléite, entérocolite, sprue, maladie cœliaque etc.), la mucoviscidose, l'hypermotilité intestinale, lors des diarrhées ; les défauts d'excrétion biliaire (obstructions des voies biliaires, fistules biliaires, atrésie des voies biliaires), les parasitoses intestinales, etc.

Les carences d'origine toxique peuvent siéger à deux niveaux : 1- au niveau intestinal : la cholestyramine inhibe l'absorption des vitamines K ; 2- au niveau tissulaire : les anticoagulants de la classe des antagonistes de la vitamine K inhibent le cycle de la gamma-carboxylation. D'autres molécules agiraient par compétition au niveau du cycle de la gamma-carboxylation, cependant, leur action souvent soupçonnée n'est toujours pas démontrée. Parmi ces molécules, les vitamines A et E (lors des surdosages) et certains antibiotiques de la classe des céphalosporines ont été citées. Enfin, chez la femme enceinte, l'administration d'anticonvulsivants, notamment phénobarbital et diphénylhydantoïnes, a été impliquée dans la survenue de la maladie hémorragique du nouveau-né.

Chez l'enfant et l'adulte, aucune anomalie liée à un état de surcharge en vitamine K n'a été rapportée. Chez le nouveau-né, les vitamines K synthétiques ont été rendues responsables d'anémie hémolytique sévère. De même, chez les patients porteurs d'un déficit en glucose 6 phosphate déshydrogénase ou en glutathion peroxydase, les vitamines synthétiques sont susceptibles de provoquer des hyperhémolyses.

Diagnostic biologique d'une hypovitaminose K

La valeur diagnostique d'une phylloquinonémie isolée reste très discutée. Le diagnostic biologique d'une carence en vitamine K nécessite l'exploration d'autres paramètres, tels que la des-gamma-carboxyprothrombine (DCP), la des-gamma-carboxy-ostéocalcine (DCO) et le métabolite VK₁-époxyde.

Lors d'une carence profonde, le diagnostic de certitude repose sur la mise en évidence d'un déficit en facteurs de l'hémostase vitamine K-dépendants corrigible par l'administration de vitamine K (test de Koller).

Lors de carences modérées, les tests classiques de coagulation peuvent rester normaux. Le diagnostic de certitude peut reposer alors sur les arguments suivants :

- Phylloquinonémie < 100 ng/l.
- Présence de DCP ou DCO (La DCO étant plus sensible que la DCP).
- Normalisation de ces paramètres, après administration de vitamine K.

Ces tests sont nécessaires au diagnostic positif d'une hypovitaminose K, mais ils n'apportent aucun renseignement étiologique.

Devant un diagnostic positif, l'étiologie d'une carence peut être établie par deux moyens :

- 1-** détermination des concentrations sériques de la phylloquinone et de son métabolite VK₁-époxyde ;
- 2-** essais de correction des troubles observés par l'administration de VK₁.

Trois situations peuvent, schématiquement, se présenter :

- 1-** le dérivé époxyde est non détecté et la phylloquinonémie est diminuée ou effondrée : il s'agit d'un défaut d'apport, ou d'un état de malabsorption, que l'on peut différencier par l'administration de vitamine K, par voie orale ou intramusculaire.
- 2-** la phylloquinonémie est normale ou légèrement augmentée tandis que son métabolite VK₁-époxyde est augmenté : il s'agit alors d'un déficit d'origine toxique ou d'un déficit enzymatique du cycle de la vitamine K. Dans les deux cas, le déficit peut être corrigé par l'administration massive de vitamine K₁, mais la forme époxyde reste augmentée dans le cas du déficit enzymatique.
- 3-** la phylloquinonémie est normale ou légèrement augmentée, son métabolite VK₁-époxyde est indétectable, et l'administration de VK₁ est inefficace : il s'agit probablement d'une maladie génétique portant sur le système enzymatique carboxylase-époxydase, qu'il faut confirmer par l'étude, *in vitro* de l'activité enzymatique.

Enfin, il faut signaler que certains cas d'hépatocarcinome sont accompagnés d'une augmentation des concentrations circulantes de la DCP, réfractaire à l'apport de vitamine K.

L'ÉTAT DE LA RECHERCHE ACTUELLE

Les recherches actuelles ont pour but d'élucider le rôle exact de la vitamine K dans les processus impliquant la captation du calcium, autres que ceux de la coagulation. Par exemple, plusieurs études épidémiologiques sont menées à travers le monde pour tenter de préciser le rôle de cette vitamine dans les processus de la minéralisation osseuse.

Tableau 1 : Teneurs en VK₁ (pour 100 g d'aliment) de quelques aliments, habituellement consommés en Amérique du Nord (d'après Booth *et al.* 1995).

< 0,1 µg	0,1 à 1,0 µg	1 à 10 µg	10 à 100 µg	100 à 1000 µg
côte de porc	steak de boeuf	fromage	haricot	brocoli
orange	lait de vache	chocolat	concombre	choux de bruxelle
pamplemousse	saumon fumé	oeufs	chou rouge	chou vert
flocon de maïs	yaourt	carotte	chou-fleur	laitue
	riz	courgette	reine-claude	persil
	spaghetti	tomate	huile d'olive	huile de soja
	melon	raisin		épinard
	mangue	datte		
	pomme de terre	piment		
	avocat	pêche		
	banane	nectarine		

Références bibliographiques

- Booth SL, Sadowski JA, Pennington JAT** (1995). Phylloquinone (vitamine K1) content of foods in the US Food and Drug Administration's total Diet Study. *J Agric Food Chem*, **43** : 1574-1579.
- Hodges SJ, Vergnaud P, Akesson K, Obrant K, Delmas PD** (1993) Circulating levels of vitamin K1 and K2 are decreased in elderly women with hip fracture. *J Bone Miner Res*, **8** : 1241-1245.
- Kalkwarf HJ, Houry JC, Bean J, Elliot JG** (2004). Vitamin K, bone turnover, and bone mass in girls. *Am J Clin Nutr*. **80** : 1075-80.
- Lambert WE, De Leenheer AP. Vitamin K.** In : De Leenheer AP, Lambert WE, Nelis HJ (1992). Modern chromatographic analysis of vitamins. Marcel Dekker Inc, New York, 197-233.
- Moussa F, Dufour L, Aymard P** (1989). Determination of trans-phyloquinone in children's serum. *Clin Chem*, **5** : 874-878.
- Moussa F, Girardet JP, Tounian P et al.** (1992). Teneur en Vitamine K1 (VK1) du lait de mère et des aliments lactés diététique (ALD) pour nourrissons (abstract). *Ann Biol Clin*, **50** : 493.
- Moussa F, Depasse F, Lompert V et al.** (1994). Quantitative analysis of phyloquinone in intravenous fat emulsions and soybean oil by HPLC. *J Chromolog A*, **664** : 189-194.
- Moussa. F** (1998). La vitamine K. In : Le statut vitaminique : physiopathologie, exploration biologique et intérêt clinique. Collection Explorations fonctionnelles humaines. Editions Médicales internationales. 137-174.
- Rishavy MA, Pudota BN, Hallgren KW et al.** (2004). A new model for vitamin K-dependent carboxylation: the catalytic base that deprotonates vitamin K hydroquinone is not Cys but an activated amine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**:13732-13737.
- Shearer MJ, Bach A, Kholmeier M** (1992). Chemistry, nutritional sources, tissue distribution and metabolism of vitamin K with special reference to bone health. *J Nutr*, **126** : 1181S-1186S.
- Sokoll LJ, Booth SL, O' Brien ME et al.** (1997). Changes in serum osteocalcin, plasma phyloquinone and urinary γ -carboxyglutamic acid in response to altered intakes of dietary phyloquinone in human subjects. *Am J Clin Nutr*, **65** : 779-784.
- Vermeer C** (1990). Gamma-carboxyglutamate-containing proteins and vitamin K-dependent carboxylase. *Biochem J*, **266** : 625-636.

Vitamine B₁

Agnès Dauvergne - Anne Galinier

La thiamine, ou vitamine B₁, fut la première substance isolée contenant une fonction amine et indispensable à la vie, d'où le terme de "vitamine" proposé par Funk en 1911. Le syndrome des mangeurs de riz ou "béribéri" fut décrit dès 2600 avant J.C. En 1885, grâce à la perspicacité de l'amiral japonais Takaki, une cause nutritionnelle est associée au syndrome polynévritique observé. Les observations de Eijkmann en 1890 et celles de Grijns en 1901 mettent en cause une substance présente dans la cuticule du riz, qui fut par la suite isolée par Funk.

DÉFINITION

Structure et propriétés physico-chimiques

La détermination de la structure de la thiamine et sa synthèse furent réalisées en 1936. Sa structure comprend deux hétérocycles : un noyau pyrimidique substitué (amino-4 méthyl-2 pyrimidine) et un noyau thiazole substitué {(hydroxy-2 éthyl)-5 -4 thiazole}, reliés par un pont méthylène qui constitue la partie fragile de la molécule et explique sa thermolabilité (Figure 1).

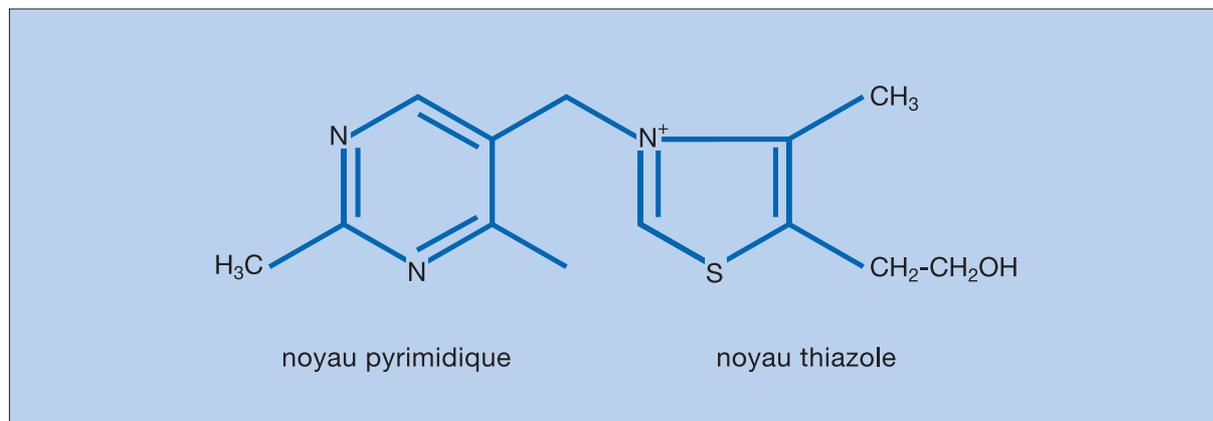


Figure 1 : Structure de la thiamine.

La molécule possède une fonction soufrée (*thia*) et une fonction amine d'où le nom de thiamine, appellation recommandée pour désigner la vitamine B₁. La fonction alcool primaire portée par le C-5 du noyau thiazole permet, par des réactions de phosphorylation enzymatique, la synthèse des esters mono-, di- et triphosphoriques, formes actives de la thiamine sur le plan métabolique.

La forme synthétique, le chlorhydrate de thiamine, est une poudre blanche soluble dans l'eau et le glycérol et insoluble dans le diéthyléther et le chloroforme. La thiamine est stable en solution aqueuse à pH 2-4 mais peu stable, voire instable, à des pH neutres ou alcalins. Par oxydation en milieu alcalin, la thiamine est transformée en thiochrome possédant une fluorescence mise à profit pour son dosage. Les esters phosphoriques donnent aussi des formes thiochromes.

Fonction

Seuls les esters di- et triphosphoriques de la thiamine ont un rôle métabolique connu. Le thiamine diphosphate (TDP) intervient comme coenzyme de nombreux systèmes enzymatiques et le thiamine triphosphate (TTP) a une fonction de neuromédiateur. Une action antioxydante de la thiamine a été mise en évidence *in vitro*, lui attribuant un rôle protecteur dans la peroxydation lipidique (Lukienko *et al.*, 2000).

Thiamine et régulation enzymatique

Les enzymes thiamine-dépendantes sont impliquées dans le métabolisme du glucose et dans le cycle de Krebs (Kern *et al.*, 1997).

La réaction de transcétolisation cytoplasmique est une étape clé de la voie des pentoses ; la transcétolase, ou TK (EC 2.2.1.1), catalyse le transfert des groupes glycoaldehydes des cétooses sur les aldoses, en présence de TDP et de Mg²⁺. La TK permet la régénération de NADPH₂, contribuant ainsi au maintien des équivalents réducteurs nécessaires à la synthèse des lipides, à la production de glutathion réduit et probablement à la synthèse et au transport des neurotransmetteurs (Lavoie *et al.*, 1995 ; Martin *et al.*, 1993). D'autre part, elle concourt par l'intermédiaire du ribose 5-P à la synthèse des acides nucléiques.

La décarboxylation des acides α -cétoniques (acide pyruvique, acide α -cétoglutarique, α -cétoacides provenant d'acides aminés ramifiés) est réalisée par des complexes multienzymatiques. Ces complexes comportent entre autre une décarboxylase dont le cofacteur est le TDP [la pyruvate deshydrogénase ou PDH, (EC 1.2.4.1) ; l' α -cétoglutarate deshydrogénase ou KGDH, (EC 1.2.4.2) et les décarboxylases de la valine, de la leucine et de l'isoleucine]. Ainsi, une carence cellulaire en TDP entraîne une diminution de la production d'ATP et une accumulation de lactate, ces deux phénomènes contribuant à la mort cellulaire et, en particulier, la mort neuronale.

Toutes ces enzymes thiamine-dépendantes ont une affinité différente pour le TDP mitochondrial, ce qui permet en cas de carence en thiamine de préserver les réactions les plus productrices d'énergie (Blair *et al.*, 1999).

Le TDP a aussi un rôle régulateur sur l'expression des gènes codant pour les apoenzymes de la TK et de la PDH (Pekovich *et al.*, 1998 ; Rodriguez-Melendez, 2002).

Thiamine et neuromodulation

La vitamine B₁, uniquement sous sa forme de TTP, se comporte comme un modulateur des canaux chlore présents au niveau du cerveau.

Métabolisme

Chez l'homme, les besoins en thiamine sont couverts par l'alimentation. La vitamine B₁ est présente sous forme de thiamine libre dans les végétaux et sous forme phosphorylée liée aux protéines dans les produits animaux.

La thiamine est absorbée au niveau du duodénum et du grêle selon un processus de transport actif saturable ATP - et sodium - dépendant. À l'intérieur de la cellule intestinale, la thiamine subit des réactions de phosphorylation et de déphosphorylation couplée à l'absorption. Un phénomène de diffusion passive intervient pour des concentrations supérieures à 2 μ M lorsque le transport actif est saturé. Les tanins diminuent cette absorption.

La thiamine est captée rapidement par les cellules, où elle est transformée en sa forme active, le TDP ; ce dernier peut à son tour être phosphorylé en TTP qui, dans certains tissus représentent 10% de la vitamine B₁. L'ensemble de l'organisme contient 25 mg de vitamine B₁ dont moins de 25% sous forme de thiamine libre ; il n'existe pas de stockage, même en cas d'excès d'apport. Les organes les plus riches sont le cœur, le rein, le foie et le cerveau. Au cours d'un régime carencé, le cerveau est le dernier tissu à perdre ses réserves.

La thiamine est éliminée par voie rénale sous forme libre ou après dégradation. On retrouve dans les selles la thiamine synthétisée par la flore bactérienne en aval du site d'absorption.

EXPLORATION BIOLOGIQUE

Le statut thiaminique peut être évalué selon deux approches complémentaires : (1) le dosage de la thiamine et de ses esters phosphoriques dans les érythrocytes ou dans le sang total par Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP) et (2) la détermination de l'activité transcétolasique érythrocytaire. Les méthodes de dosage des métabolites accumulés en excès à l'état basal ou après surcharge en glucose sont actuellement abandonnées.

Procédure pré-analytique

Le prélèvement de sang est recueilli sur héparinate de lithium avant l'instauration de toute vitaminothérapie. Le tube doit être rapidement centrifugé (3500 g, 4 °C) et, après avoir éliminé le plasma et la couche leucocytaire, le culot globulaire est analysé immédiatement ou congelé à -20 °C.

Pour une analyse sur le sang total, 500 µl de sang prélevé sur héparinate de lithium sont directement congelés à -20 °C jusqu'à analyse.

Dosage de la thiamine et des esters phosphoriques

Dans les érythrocytes

Les culots érythrocytaires hémolysés par congélation sont déprotéinisés par addition d'acide trichloroacétique. Après centrifugation, le surnageant est purifié dans un premier temps par du diéthyléther puis par de l'hexane. La séparation de la thiamine non phosphorylée et de ses esters phosphoriques se fait par CLHP selon un mode isocratique. Les concentrations étant très faibles, on utilise une détection fluorimétrique. Par oxydation post-colonne à l'aide d'une solution aqueuse de ferricyanure de potassium dans la soude 3M, on obtient des formes thiochromes très fluorescentes (λ_{ex} : 365 nm ; $\lambda_{\text{ém}}$: 435 nm). La limite de détection est voisine de 1 nM pour chacun des composés et la limite de linéarité est supérieure à 1000 nM.

Les coefficients de variation intra- et inter-séries obtenus pour l'analyse d'échantillons de sujets normaux sont respectivement de 2,6 et 6,5 % pour la thiamine, 5,2 et 6,1 % pour le TMP, 3,5 et 3,8 % pour le TDP et 8,8 et 11,5 % pour le TTP (Hervé *et al.*, 1994).

Dans le sang total

Les 500 µl de sang total décongelés sont traités avec de l'acide chlorhydrique et de l'acide perchlorique. Après centrifugation, le surnageant est oxydé de la même manière que pour le dosage à partir des érythrocytes. La détection fluorimétrique par CLHP est également réalisée dans les mêmes conditions que celles pour le dosage dans les érythrocytes. La [figure 2](#) est un exemple de chromatogramme obtenu. Ces techniques permettent d'évaluer d'une manière sensible et spécifique le statut thiaminique mais également d'objectiver une anomalie de phosphorylation de la thiamine. Les échantillons traités sont stables plusieurs semaines à -20 °C et plusieurs mois à -80 °C.

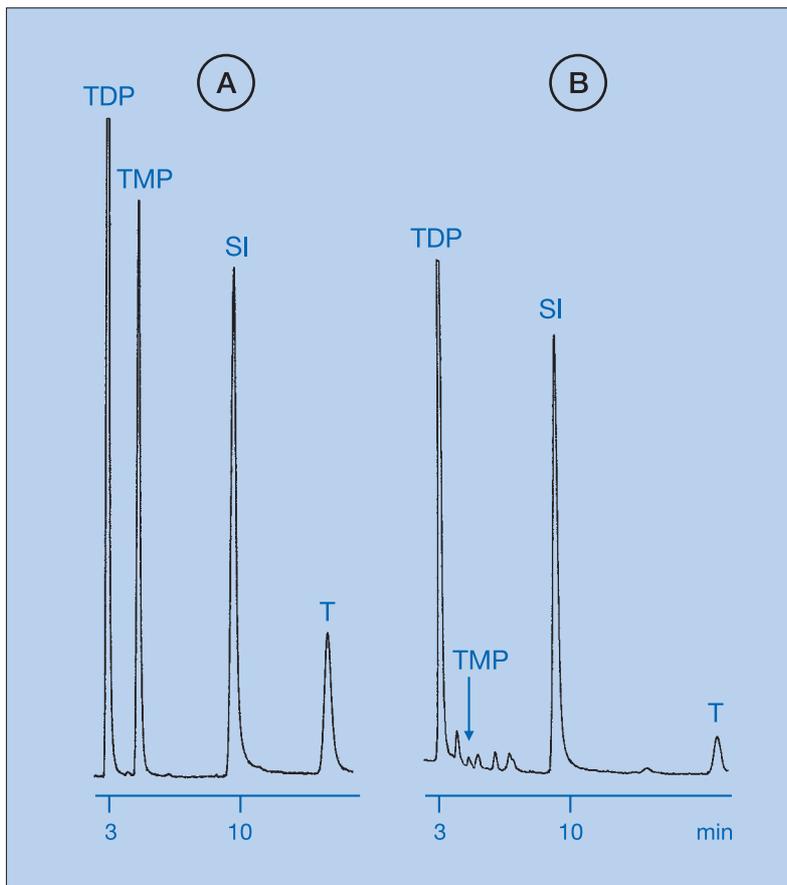


Figure 2 : Chromatogrammes d'un dosage par CLHP de TDP (ester diphosphorique de la thiamine), TMP (ester monophosphorique de la thiamine), T (thiamine libre) en présence d'un standard interne (SI) à partir d'une solution de standards externes (A) et de sang total (B).

Détermination de l'activité transcétolasique érythrocytaire

Le principe du test repose sur la mesure du sédoheptulose 7-phosphate formé à partir du xylulose 5-phosphate, réaction catalysée par la transcétolase érythrocytaire, enzyme dont le cofacteur est le TDP (Delacoux *et al.*, 1980). Le xylulose 5-phosphate est obtenu à partir du ribose 5-phosphate par l'action de deux enzymes érythrocytaires non vitamine B₁ dépendantes et dont l'activité n'est pas limitante. La réaction est réalisée en tampon phosphate et en présence de Mg²⁺ et le produit formé est mesuré selon la technique de Dische. Parallèlement à la mesure de cette activité TK spontanée, l'augmentation de cette même activité en présence d'un substrat supplémenté en TDP permet d'apprécier le degré de saturation de la transcétolase ou "effet TDP" et réalise ainsi un test *in vitro* d'efficacité d'une vitaminothérapie. La limite de détection est de 4 U/L et les coefficients de variation intra- et inter-séries obtenus pour l'analyse d'échantillons de sujets normaux sont inférieurs à 4%.

Contrôle de qualité

Il n'existe pas de contrôle de qualité inter-laboratoire pour le dosage de la vitamine B₁. La société Chromsystems commercialise des échantillons lyophilisés obtenus à partir de sang total humain, garantis à deux concentrations différentes (Level I et Level II) qui permettent d'évaluer le dosage en CLHP de la TDP et de la thiamine libre.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Valeurs physiologiques et variations

L'étude d'érythrocytes et d'échantillons de sang total de sujets normaux a permis d'établir les valeurs de référence présentées [tableau 1](#) ; aucune variation liée au sexe n'a été mise en évidence.

Tableau 1 : Valeurs de référence des indicateurs du statut en vitamine B₁.

	Érythrocytes	Sang total
Ester triphosphorique de la thiamine : TTP (nmol/l)	0-20	-
Ester diphosphorique de la thiamine : TDP (nmol/l)	120-230	88-118
Ester monophosphorique de la thiamine : TMP (nmol/l)	0-5	2-6
Thiamine libre (nmol/l)	0-10	4-10
Thiamine totale (nmol/l)	126-250	-
Transcétolase (activité à 37 °C, U/l)	123-206	-
Effet TDP (%)	0-20	-

Ces deux approches du statut thiaminique fournissent des résultats cohérents, une carence en vitamine B₁ est objectivée d'une part, par une baisse du TDP et de la thiamine totale, d'autre part, par une activité transcétolasique basse ou normale mais associée à un effet TDP élevé, ce dernier reflétant bien le degré de saturation de l'enzyme par son coenzyme et ceci malgré l'hétérogénéité de la transcétolase érythrocytaire.

Variations pathologiques

Etats de carence

De part l'implication de la thiamine dans la synthèse des neurotransmetteurs et dans le métabolisme énergétique de la cellule, on observe lors d'une carence en cette vitamine une diminution de l'ATP et une accumulation de lactate contribuant à la mort cellulaire, en particulier neuronale (Bettendorff *et al.*, 1995 ; Singleton *et al.*, 2001).

La première description d'avitaminose B₁ correspond au tableau clinique du béribéri, qui dans sa forme typique est caractérisée par des atteintes du système nerveux et des atteintes cardiovasculaires, mais des formes dissociées existent. Le béribéri cardiaque comprend trois signes majeurs : vasodilatation périphérique, insuffisance cardiaque globale, rétention hydrosodée, auxquels est souvent associée une tachycardie. Cette pathologie cardiovasculaire peut évoluer sur un mode chronique ou aigu avec alors un risque vital par collapsus cardiovasculaire. Les atteintes du système nerveux peuvent se traduire par des neuropathies périphériques (troubles de la sensibilité, de la motricité et des réflexes) et/ou une encéphalopathie de Gayet Wernicke associant

des troubles oculomoteurs, une atteinte cérébelleuse avec trouble de l'équilibre et désorientation temporo-spatiale. En l'absence de traitement, l'évolution est irréversible vers un syndrome de Korsakoff caractérisé par une amnésie antérograde et rétrograde (Verstichel, 2000).

Les sujets à risque de carence en thiamine présentent généralement une malabsorption associée ou non à une exacerbation des besoins :

- L'alcoolisme chronique est une cause majeure de carence en vitamine B₁, la fréquence de cette carence peut dépasser 30 % (Hervé *et al.*, 1995). Cette carence vitaminique est à la fois quantitative par déficit d'apport et anomalie de l'absorption intestinale, mais également qualitative par anomalies du métabolisme hépatique de la vitamine B₁ : inhibition de la phosphorylation de la thiamine en TDP induite par l'alcool, augmentation des besoins puisque le TDP est le coenzyme de l'alcool déshydrogénase (ADH) et le principal métabolite de l'alcool, l'acétaldéhyde, rend l'apoptanscétolase instable (Martin *et al.*, 1993). Lors d'une étude de supplémentation chez 107 sujets en cours de désintoxication alcoolique, Ambrose *et al.* (2001) observent que l'apport de thiamine ne semble pas avoir d'effet direct sur la mémoire elle-même mais améliore les temps de réponse aux tests utilisés, cette amélioration étant par ailleurs dose-dépendante.
- Les sujets âgés sont potentiellement à risque de carence en TDP s'ils sont atteints de malabsorption intestinale, si leur apport en thiamine est insuffisant, si l'augmentation de leur clairance rénale entraîne une perte de thiamine.
- L'administration prolongée de diurétiques (furosémide) augmente l'élimination urinaire de thiamine, ce qui peut aggraver l'insuffisance cardiaque pour laquelle le diurétique était prescrit (Suter et Vetter, 2000).
- La carence en thiamine peut être une complication de la chirurgie gastrique pour le traitement de cancers, d'ulcères ou d'obésité morbide. Plusieurs cas de polyneuropathies, de béribéri ou d'encéphalopathies de Gayet-Wernicke ont été décrits ces dernières années, incitant à un meilleur suivi de ces patients et à une supplémentation (Cirignotta *et al.*, 2000 ; Iwase *et al.*, 2002 ; Koike *et al.*, 2004). L'intervalle de temps séparant l'intervention chirurgicale des premiers signes cliniques peut varier de quelques mois à plusieurs années comme dans le cas clinique présenté plus loin.
- Lors de pathologies infectieuses chroniques, telles que le SIDA, les besoins en thiamine sont augmentés.
- L'incidence de la carence en thiamine est élevée au cours de la grossesse, pouvant atteindre 40%. Les vomissements, qui peuvent accompagner le premier trimestre de la grossesse, sont un facteur supplémentaire de carence en vitamine B₁, ces femmes pouvant présenter des signes d'encéphalopathie de Gayet-Wernicke (Tesfaye *et al.*, 1998 ; Togay-Isikay *et al.*, 2001). Par ailleurs, pour Baker *et al.* (2000), 50 % d'une population de femmes présentant un diabète gestationnel ont un statut thiaminique déficient. Une supplémentation en thiamine semble favoriser la croissance intra-utérine, alors que le traitement du diabète augmente la proportion d'enfants nés avec un faible poids. Une étude de supplémentation sur 886 femmes HIV, au cours de leur grossesse, a montré le rôle favorable, sur la croissance postnatale des enfants, d'un complexe vitaminique associant les vitamines du groupe B, dont la thiamine, aux vitamines C et E (Villamor *et al.*, 2005).
- Les perfusions de soluté glucosé (chez le dialysé, l'alcoolique chronique ou au cours d'une réanimation) doivent s'accompagner d'apport en vitamine B₁ (Hung *et al.*, 2001).

- Dans les pays en voie de développement, la consommation de riz poli ou d'aliments riches en thiaminase (Luxemburger *et al.*, 2003 ; Soukaloun *et al.*, 2003) peut être à l'origine d'une carence. Dans les pays industrialisés, des cas d'encéphalopathies et/ou de cardiomyopathies ont été décrits lors de nutrition parentérale exclusive en néonatalogie (Thauvin-Robinet *et al.*, 2004) ou chez des nouveaux-nés nourris exclusivement avec du lait en poudre à base de soja (Fattal-Valevski *et al.*, 2005).

Etats de surcharge

Il n'existe pas d'état de surcharge en dehors de la vitaminothérapie ; la vitamine B₁ est réputée pour être non toxique.

L'ÉTAT DE LA RECHERCHE ACTUELLE

Le métabolisme de la thiamine et l'implication de ses esters phosphorylés restent très étudiés dans le cadre de l'alcoolisme et des pathologies neurologiques associés à une carence en vitamine B₁. Il fait également l'objet d'attention particulière dans le cadre des situations de stress oxydant ou de cancer d'origine iatrogène.

Dossier clinique

Un homme de 65 ans ayant comme principal antécédent une gastro-jéjunostomie (il y a 20 ans) dans les suites d'une œsophagectomie pour adénocarcinome présente une perte de poids de 5kg, une asthénie, un œdème pétéchial douloureux étendu des jambes, une polyneuropathie périphérique. Le bilan cardio-pulmonaire montre une dilatation des cavités droites (échocardiographie) et une hypertension pulmonaire capillaire avec un index cardiaque augmenté à 8,4 l/min/m² (cathétérisme droit), sans signe d'embolie pulmonaire (scanner thoracique et scintigraphie pulmonaire), mais s'accompagnant d'une gastrite superficielle chronique (gastroscopie) et d'un épaissement modéré de la paroi jéjunale (scanner abdominal). Le traitement par corticoïde puis anti-inflammatoire non stéroïdien reste inefficace. Secondairement, un bilan biologique vitaminiq ue est réalisé et montre un déficit majeur dans le sang total en coenzyme thiaminique (TDP) (<10 nmol/l) et en thiamine libre (0 nmol/l). Le profil biologique des autres vitamines explorées (B₆, B₉, B₁₂ et C) est normal. Un apport en thiamine est instauré, initialement en intramusculaire (500 mg/ jour, 2 jours) poursuivi oralement (1000 mg/jour). Après 1 mois de supplémentation, une franche amélioration clinique est observée tant sur le plan cardiaque que pulmonaire, alors que la polyneuropathie sensitivomotrice est conservée. Ainsi, même après plusieurs années d'un acte chirurgical pouvant entraîner une diminution de la biodisponibilité en thiamine, il est possible de diagnostiquer une neuropathie avec un retentissement cardiaque thiamine dépendant (Astudillo *et al.*, 2003).

Références bibliographiques

- Ambrose ML, Bowden SC, Whelan G** (2001). Thiamin treatment and working memory function of alcohol-dependent people: preliminary findings. *Alcohol Clin Exp Res*, **25** : 112-116.
- Astudillo L, Degano B, Madaule S et al.** (2003). Development of beriberi heart disease 20 years after gastrojejunostomy. *Am J Med*, **115** : 157-158.
- Bakker SJ, ter Maaten JC, Gans RO** (2000). Thiamine supplementation to prevent induction of low birth weight by conventional therapy for gestational diabetes mellitus. *Med Hypotheses*, **55** : 88-90.
- Bettendorff L, Goessens G, Sluse F** (1995). Thiamine deficiency in cultured neuroblastoma cells: effect on mitochondrial function and peripheral benzodiazepine receptors. *J Neurochem*, **64** : 2013-2021.
- Blair PV, Kobayashi R, Edwards HM et al.** (1999). Dietary thiamin level influences levels of its diphosphate form and thiamin dependent enzymic activities of rat liver. *J Nutr*, **129** : 641-648.
- Cirignotta F, Manconi M, Mondini S et al.** (2000). Wernicke-Korsakoff encephalopathy and polyneuropathy after gastroplasty for morbid obesity. *Arch Neurol*, **57** : 1356-1359.
- Delacoux E, Sancho J, Evstigneeff T et al.** (1980). Détermination de l'activité de la transcétolase érythrocytaire. *Clin Chim Acta*, **108** : 483-486.
- Fattal-Valevski A, Kesler A, Sela BA et al.** (2005). Outbreak of life-threatening thiamine deficiency in infants in Israel caused by a defective soy-based formula. *Pediatrics*, **115** : 233-238.
- Hervé C, Beyne P, Delacoux E** (1994). Determination of thiamine and its phosphate esters in human erythrocytes by high-performance liquid chromatography with isocratic elution. *J Chromatogr B*, **653** : 217-220.
- Hervé C, Beyne P, Lettéron P, Delacoux E** (1995). Comparison of erythrocyte transketolase activity with thiamine and thiamine phosphates esters levels in chronic alcoholic patients. *Clin Chim Acta*, **234** : 91-100.
- Hung SC, Hung SH, Tarng DC et al.** (2001). Thiamine deficiency and unexplained encephalopathy in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *Am J Kidney Dis*, **38** : 941-947.
- Iwase K, Higaki J, Yoon HE et al.** (2002). Reduced thiamine (vitamin B1) levels following gastrectomy for gastric cancer. *Gastric Cancer*, **5** : 77-82.
- Kern D, Kern G, Neef H et al.** (1997). How thiamine diphosphate is activated in enzymes. *Science*, **275** : 67-70.
- Koike H, Iijima M, Mori K et al.** (2004). Postgastrectomy polyneuropathy with thiamine deficiency is identical to beriberi neuropathy. *Nutrition*, **20** : 961-966.
- Lavoie J, Butterworth RF** (1995). Reduced activities of thiamine-dependent enzymes in brains of alcoholics in the absence of Wernicke's encephalopathy. *Alcohol Clin Exp Res*, **19** : 1073-1077.
- Lukienko PI, Mel'nichenko NG, Zverinskii IV, Zabrodskaya SV** (2000). Antioxidant properties of thiamine. *Bull Exp Biol Med*, **130** : 874-876.
- Luxemburger C, White NJ, ter Kuile F et al.** (2003). Beri-beri: the major cause of infant mortality in Karen refugees. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **97** : 251-255.
- Martin PR, Mc Cool BA, Singleton CK** (1993). Genetic sensitivity to thiamine deficiency and development of alcoholic organic brain disease. *Alcohol Clin Exp Res*, **17** : 31-37.

- Pekovich SR, Martin PR, Singleton CK** (1998). Thiamine deficiency decreases steady-state transketolase and pyruvate dehydrogenase but not alpha-ketoglutarate dehydrogenase mRNA levels in three human cell types. *J Nutr*, **128** : 683-687.
- Rodriguez-Melendez R** (2002). Importance of water-soluble vitamins as regulatory factors of genetic expression. *Rev Invest Clin*, **54** : 77-83.
- Singleton CK, Martin PR** (2001). Molecular mechanisms of thiamine utilization. *Curr Mol Med*, **1** : 197-207.
- Soukaloun D, Kounnavong S, Pengdy B et al.** (2003). Dietary and socio-economic factors associated with beriberi in breastfed Lao infants. *Ann Trop Paediatr*, **23** : 181-186.
- Suter PM, Vetter W** (2000). Diuretics and vitamin B₁: are diuretics a risk factor for thiamine malnutrition? *Nutr Rev*, **58** : 319-323.
- Tesfaye S, Achari V, Yang YC et al.** (1998). Pregnant, vomiting, and going blind. *Lancet*, **352** : 1594.
- Thauvin-Robinet C, Faivre L, Barbier ML et al.** (2004). Severe lactic acidosis and acute thiamin deficiency: a report of 11 neonates with unsupplemented total parenteral nutrition. *J Inherit Metab Dis*, **27** : 700-704.
- Togay-Isikay C, Yigit A, Mutluer N** (2001). Wernicke's encephalopathy due to hyperemesis gravidarum: an under-recognised condition. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, **41** : 453-456.
- Verstichel P** (2000). Korsakoff amnesia syndrome. *Presse Med*, **29** : 1670-1676.
- Villamor E, Saathoff E, Bosch RJ et al.** (2005). Vitamin supplementation of HIV-infected women improves postnatal child growth. *Am J Clin Nutr*, **81** : 880-888.

Vitamine B₂

Anne Galinier - Dominique Bonnefont-Rousselot

DÉFINITION

Biochimie

La riboflavine (7,8-diméthyl-10-ribityl-isoalloxazine), ou vitamine B₂, est une vitamine hydrosoluble présente dans une grande variété d'aliments. Initialement isolée du lait, sa dénomination première a été lactochrome. Elle cristallise sous forme de cristaux jaune orangés. Elle est relativement stable à la chaleur, mais se trouve rapidement dégradée à la lumière (Figure 1).

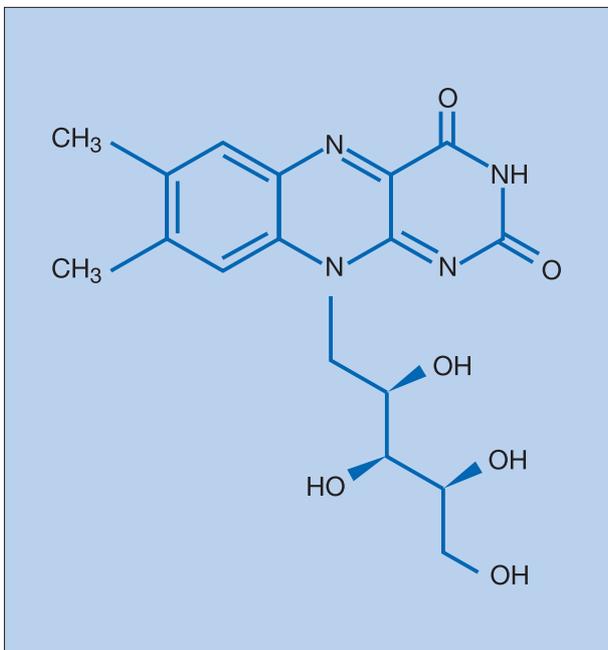


Figure 1 : Structure de la riboflavine.

Fonction

Sa plus importante fonction biologique est de participer à des réactions redox, ses formes actives étant le flavine adénine dinucléotide (FAD) et le flavine adénine mononucléotide (FMN), coenzymes d'oxydoréduction et transporteurs d'électrons. Ces derniers jouent notamment un rôle dans la transformation de la vitamine B₆ et de l'acide folique en leurs formes actives respectives, et dans la conversion du tryptophane en acide nicotinique (ou vitamine B₃). Le FAD est un cofacteur nécessaire à l'activité glutathion réductase et donc au cycle du glutathion, ce qui fait que la vitamine B₂ participe aux défenses antioxydantes. Les interrelations entre riboflavine et coenzymes flaviniques sont présentées dans la [figure 2](#).

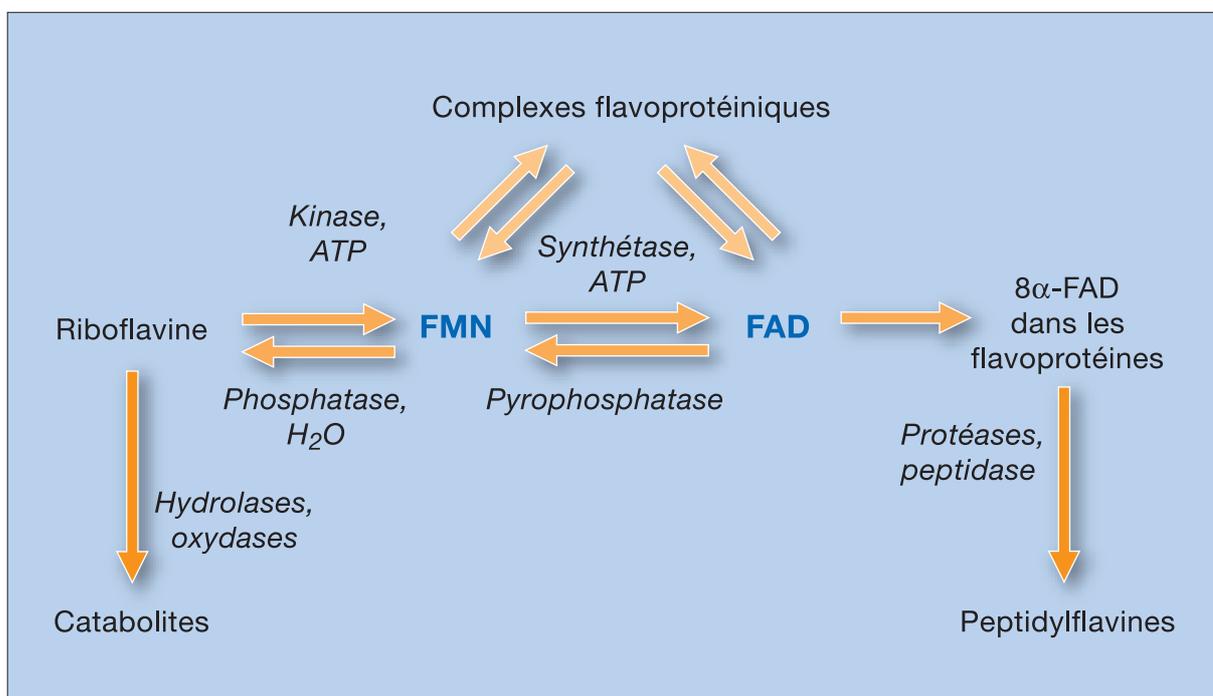


Figure 2 : Interrelations entre riboflavine et coenzymes flaviniques (d'après McCormick, 2003).

Métabolisme

Les sources alimentaires de riboflavine sont essentiellement le lait et les produits laitiers, correspondant par exemple, au Royaume Uni et selon l'âge, à 27-51 % de l'apport quotidien (Powers, 2003). Les céréales, les viandes et les poissons gras sont aussi de bonnes sources de riboflavine, de même que certains fruits et légumes (Powers, 2003). Dans les aliments, une petite quantité de la vitamine B₂ est présente sous forme de riboflavine "libre" ou liée à des protéines (surtout dans le lait et les œufs), mais la majorité est retrouvée sous forme de FAD et une petite proportion sous forme de FMN. Le FAD et le FMN sont liés aux enzymes de façon non covalente. Lorsqu'ils sont liés de façon covalente, ils ne sont pas disponibles pour l'absorption (McCormick, 1972). Un prérequis à l'absorption de la riboflavine alimentaire est l'hydrolyse du FAD et du FMN en riboflavine, catalysée par des phosphatases au niveau de la bordure en brosse des entérocytes.

L'absorption a ensuite lieu essentiellement dans le proche intestin grêle, grâce à un processus de transport actif saturable (jusqu'à environ 30 mg de riboflavine par repas) (McCormick, 1989). La riboflavine libre est captée par les entérocytes et subit une phosphorylation catalysée par une flavokinase cytosolique (EC 2.7.1.26) pour conduire au FMN, dont la majorité est ensuite convertie en FAD par une FAD synthétase (EC 2.7.7.2.) Des phosphatases non spécifiques agissent sur les flavines intracellulaires pour permettre leur transport à travers la membrane basolatérale. La riboflavine peut entrer dans le compartiment plasmatique à partir de l'intestin grêle sous forme libre ou sous forme de FMN.

Dans le plasma, la riboflavine est transportée par l'albumine et certaines immunoglobulines, qui peuvent par ailleurs aussi lier les coenzymes flaviniques (Innis *et al.*, 1986). Pendant la grossesse, des protéines spécifiques assurent le transport de la riboflavine. Dans les tissus, la riboflavine est presque entièrement sous forme liée à des enzymes ; les formes non liées sont rapidement hydrolysées en riboflavine libre qui diffuse à partir des cellules et est excrétée. La phosphorylation intracellulaire de la riboflavine est par conséquent une forme de piégeage métabolique permettant l'homéostasie de la riboflavine (Gastaldi *et al.*, 2000).

La prise alimentaire de riboflavine en excès conduit à une excrétion urinaire sous forme de riboflavine ou de métabolites (7-hydroxyméthylriboflavine, lumiflavine). Certains de ces métabolites urinaires sont aussi le reflet de l'activité bactérienne dans le tractus gastrointestinal (Chastaing et McCormick, 1987).

INTÉRÊT PHYSIOPATHOLOGIQUE

La déficience en riboflavine est endémique dans les pays manquant de produits laitiers et de viande (Boisvert *et al.*, 1993). Une relation très claire entre le statut en riboflavine et la consommation de lait a pu être mise en évidence, notamment dans l'étude anglaise "*National Diet and Nutrition Survey*" (Gregory et Lowe, 2000). Or, la consommation de lait a tendance à diminuer de façon régulière (*National Food Survey*, 2000), l'apport en riboflavine étant partiellement compensé par la consommation de céréales, mais ceci dépend des habitudes alimentaires propres à chaque pays (Preziosi *et al.*, 1999).

Bien que l'alimentation de l'adulte en France apporte une quantité de vitamine B₂ suffisante pour répondre aux besoins quotidiens, les résultats de l'enquête du Val-de-Marne (Herberg *et al.*, 1991) montrent néanmoins que 8 à 31 % des adultes ont un statut en vitamine B₂ déficient.

La meilleure méthode pour évaluer le statut en riboflavine n'est pas l'évaluation de l'excrétion urinaire de ce composé (méthode trop peu sensible en cas d'apports faibles), mais la stimulation de la glutathion réductase érythrocytaire FAD-dépendante (EC 1.6.4.2.) *in vitro* (Boisvert *et al.*, 1993). La différence est toutefois faible entre les prises associées à une déficience biochimique (< 0,5 mg) et celles associées à une saturation tissulaire (> 1,0 mg) chez l'adulte (Lo, 1985).

Fonctions de la riboflavine et conséquences d'apports insuffisants

La riboflavine joue un rôle dans les métabolismes intermédiaires, le développement foetal, l'hématopoïèse, le développement gastro-intestinal, la neurodégénérescence et la neuropathie périphérique, le cancer, les maladies cardiovasculaires et la vision. Les recherches en terme de santé publique pourraient donc s'orienter en particulier vers l'importance de la riboflavine en tant que facteur de la protection vis-à-vis des maladies cardiovasculaires, des cancers, mais également de la vision (Powers, 2003).

Rôle dans les métabolismes intermédiaires

La riboflavine participe à plusieurs réactions redox par le biais des cofacteurs FMN et FAD qui sont des transporteurs d'électrons. La plupart des flavoprotéines utilisent le FAD comme cofacteur. Par conséquent, un apport insuffisant de riboflavine devrait conduire à des perturbations au niveau des étapes du métabolisme intermédiaire, mais il est parfois difficile de mettre en évidence de véritables blocages métaboliques. Chez l'homme, des erreurs innées du métabolisme lipidique conduisant à une élimination d'acides organiques dans l'urine se sont révélées sensibles à des doses pharmacologiques de riboflavine (Gregerson *et al.*, 1986). Ceci est à mettre en relation avec le fait que la β -oxydation des acides gras fait intervenir des flavines en tant qu'accepteurs d'électrons. En revanche, il n'a pas pu être montré d'association entre une déplétion transitoire en riboflavine associée à la photothérapie chez des nouveaux-nés et une modification mesurable de la β -oxydation des acides gras à longue chaîne (Parson et Dias, 1990). De même, il n'a pas été possible, par la mesure de la β -oxydation des acides gras chez des enfants prématurés présentant une déficience en riboflavine, de détecter un effet de la supplémentation en riboflavine (Patterson *et al.*, 1989). En relation avec l'implication de la riboflavine dans les métabolismes intermédiaires, il semble que des apports supplémentaires en riboflavine soient nécessaires chez les sujets pratiquant une activité physique modérée (Manore, 2000).

Rôle dans le développement foetal

Chez l'homme, le déficit en riboflavine, associé au déficit d'autres vitamines, a pu être impliqué dans l'étiologie du "bec-de-lièvre" chez deux enfants nés d'une mère présentant un syndrome de malabsorption (Faron *et al.*, 2001).

Rôle dans l'hématopoïèse

Des travaux récents suggèrent des mécanismes par lesquels le déficit en riboflavine pourrait interférer avec la prise en charge du fer et donc influencer sur le statut hématologique. En effet, la mobilisation du fer à partir de la ferritine intracellulaire est un processus réducteur. Les flavines réduites peuvent exercer leur pouvoir réducteur et par conséquent mobiliser le fer dans un grand nombre de tissus (Crichton *et al.*, 1975). C'est ainsi que, chez l'animal, les tissus de rats ayant été nourris avec un régime déficient en riboflavine sont moins efficaces pour mobiliser le fer de la ferritine que les tissus d'animaux témoins (Powers *et al.*, 1983). Par ailleurs, il semble que le statut en riboflavine puisse influencer sur l'absorption du fer (Buzina *et al.*, 1979). Le mécanisme mis en jeu n'a pas été élucidé, mais une étude montre que des suppléments de riboflavine augmentent la

concentration d'hémoglobine circulante, ce qui suggère que l'amélioration du statut en riboflavine aurait un effet sur l'absorption du fer ou sur sa mobilisation à partir des formes de stockage (Fairweather-Tait *et al.*, 1992).

Rôle dans le développement gastro-intestinal

La maturation de la fonction gastro-intestinale au moment du sevrage est en partie régulée par les modifications de la composition du régime. Chez le rat sevré, l'absence de riboflavine dans le régime conduit à des modifications morphologiques et cinétiques des cellules du tractus gastro-intestinal, dont certaines seront irréversibles même après correction du déficit en riboflavine (Yates *et al.*, 2001). De tels effets pourraient se produire *in utero* si les mères sont déficientes en riboflavine pendant la grossesse, ce qui est le cas dans plusieurs pays en voie de développement (Powers, 2003).

Rôle dans la neurodégénérescence et la neuropathie périphérique

Des symptômes de neurodégénérescence et de neuropathie périphérique ont été décrits dans plusieurs études lors d'une déficience en riboflavine, et ceci chez plusieurs espèces (poule, pigeon). Cependant, peu d'informations sont disponibles chez l'homme (Leshner, 1981). Il semble que le déficit en riboflavine puisse contribuer à la physiopathologie de certaines maladies mentales, en raison du rôle de la riboflavine dans le métabolisme de la thyroxine (Sterner et Price, 1973).

Rôle dans le cancer

Le rôle de la riboflavine est complexe, certaines études indiquant que la déficience en riboflavine accroît le risque de cancer, alors que d'autres lui attribuent un rôle favorable en présence de certains carcinogènes (Qiao, 1989 ; Rivlin, 1973) ; ceci est notamment lié au fait que certains carcinogènes sont métabolisés par des enzymes dépendantes de flavines, la riboflavine serait alors susceptible de potentialiser ou de réduire les effets des carcinogènes (Webster *et al.*, 1996). Quelques études ont pu mettre en évidence une relation entre cancer de l'œsophage et régimes pauvres en riboflavine (Foy et Kondi, 1984). Inversement, une supplémentation pendant 5 ans par l'association riboflavine-acide nicotinique a permis d'en réduire l'incidence en Chine, dans le Linxian, province à haute prévalence de ce cancer (Blot *et al.*, 1993). Par ailleurs, la déficience en riboflavine a aussi été impliquée en tant que facteur de risque pour la dysplasie du col de l'utérus, précurseur d'un état cancéreux (Lui *et al.*, 1993).

Rôle dans les maladies cardiovasculaires

La dihydroriboflavine, produite à partir de la riboflavine par la flavine réductase NADPH-dépendante (EC 1.5.1.30), se comporte comme un agent réducteur et donc potentiellement comme un agent antioxydant. Certains travaux montrent que la riboflavine pourrait avoir des effets protecteurs contre les dégâts tissulaires produits par l'ischémie-reperfusion, effets partiellement médiés par la flavine réductase (Mack *et al.*, 1995). Par ailleurs, la riboflavine pourrait jouer un rôle sur les concentrations circulantes d'homocystéine, facteur de risque potentiel sur le plan cardiovasculaire (Boushey *et al.*, 1995). L'homocystéine est métabolisée selon 2 voies : la transsulfuration dépendante de la vitamine B₆, et la reméthylation en méthionine dépendante de la vitamine B₁₂, des folates et de la riboflavine.

Le FAD est le cofacteur de la méthylène tétrahydrofolate réductase (EC 1.7.99.5), enzyme qui métabolise le tétrahydrofolate en 5-méthyltétrahydrofolate, le coenzyme indispensable à la méthylation de l'homocystéine. La riboflavine a été reconnue comme modulateur des concentrations plasmatiques d'homocystéine (Jacques *et al.*, 2001), en particulier chez les sujets porteurs de la mutation 677C→T de la méthylène tétrahydrofolate réductase, mutation commune associée chez les homozygotes à des concentrations élevées d'homocystéine (Hustad *et al.*, 2000).

Rôle dans la vision

Une relation a été évoquée entre la déficience en riboflavine et la cataracte survenant chez les sujets âgés, sans que toutefois le mécanisme en soit élucidé (Prchal *et al.*, 1978). Des photorécepteurs dépendant de la riboflavine et jouant un rôle dans l'adaptation de la vision nocturne, ont été découverts au niveau de la rétine (Miyamota et Sançar, 1998).

EXPLORATION BIOLOGIQUE

L'évaluation du statut en vitamine B₂ fait appel à des dosages dans le sang, le plasma ou l'urine de la concentration totale en vitamine B₂ ou des différents vitamères (riboflavine, FMN ou FAD), mais également à la mesure de l'activité de la glutathion réductase érythrocytaire (Nielsen, 1992)

Techniques de dosage de la concentration totale en vitamine B₂

Fluorimétrie directe

Les flavines ont une fluorescence naturelle (λ d'excitation 450 nm, λ d'émission 520-530 nm). Cette technique est sensible mais peu spécifique (interférences avec la fluorescence d'autres molécules).

Techniques microbiologiques et protozoologiques

Ces techniques sensibles, mais non spécifiques, sont fondées sur la mesure de l'action de la vitamine B₂ sur la croissance d'une souche bactérienne (Sançar, 1978) ou sur une culture de protozoaire.

Dosage séparé de chaque composé flavinique par méthodes chromatographiques

De nombreuses techniques chromatographiques peuvent être utilisées (par échange d'ions, par affinité, par exclusion), cependant la chromatographie liquide haute performance (CLHP) est actuellement recommandée.

La technique proposée est décrite par Aguesse *et al.* (1996). Il s'agit d'une technique CLHP d'appariement d'ions en phase inversée couplée à une détection fluorimétrique.

Conditions de prélèvement

Le sang est prélevé sur EDTA, immédiatement placé à +4 °C et à l'abri de la lumière, et centrifugé le plus rapidement possible (10 min, 1500 g, +4 °C). Le sang total (avant centrifugation) et/ou le plasma sont conservés à -20 °C et doivent être analysés dans un délai de 2 mois.

Conditions d'extraction

Les protéines des échantillons sont précipitées en mélangeant 500 µl de plasma avec 100 µl d'acide trichloroacétique (TCA) à 50 % ou 200 µl de sang total avec 300 µl de TCA à 20 %. La totalité du surnageant obtenu après 1 min d'agitation et 10 min de centrifugation à 2400 g est délipidée avec 2,5 ml de diéthyléther après agitation pendant 1 min et centrifugation pendant 10 min à 2400 g. Le sous-nageant alors obtenu est également délipidé en totalité par 2,5 ml de n-hexane après agitation 1 min et centrifugation pendant 10 min à 2400 g. 100 µl du sous-nageant obtenu sont injectés dans la colonne.

Conditions chromatographiques

- Colonne : silice greffée, 4,6 x 250 mm, 5 µm (de type Phenomenex Ultremex™)
- Précolonne : Hypersil ODS, 4,6 x 20 mm
- Phase mobile : mélange d'acétonitrile/eau 15-85 v/v, avec 0,1 M de phosphate acide monopotassique (KH₂PO₄) et 0,1 M d'acide décanesulfonique, ajusté à pH 2,6 avec de l'acide ortho-phosphorique.
- Éluion isocratique, à température ambiante, débit 0,8 ml/min
- Détection fluorimétrique : λ d'excitation 456 nm, λ d'émission 512 nm
- Calibration : les solutions mères aqueuses de FAD (1 mM), FMN (1 mM) et riboflavine (0,1 mM) sont stables 3 mois conservées à -20 °C. Les solutions de travail sont préparées extemporanément ; leur concentration est déterminée après équilibration à la température ambiante en mesurant l'absorbance à différentes longueurs d'onde. Pour le FAD, les absorptions molaires à 263, 375 et 450 nm sont respectivement de 38000, 9300 et 11300 l.mol⁻¹.cm⁻¹. Pour le FMN et la riboflavine, les absorptions molaires à 266, 373 et 450 nm sont respectivement de 32500, 10600 et 12500 l.mol⁻¹.cm⁻¹. Elles sont ensuite traitées comme un échantillon (extraction).
- Étalonnage : Des pools de plasma et d'hémolysat de sang total surchargés avec des quantités croissantes de FAD, FMN et riboflavine et traités comme les échantillons servent à établir la gamme d'étalonnage.

Chromatogramme : Le temps d'analyse est de 10 min (Figure 3).

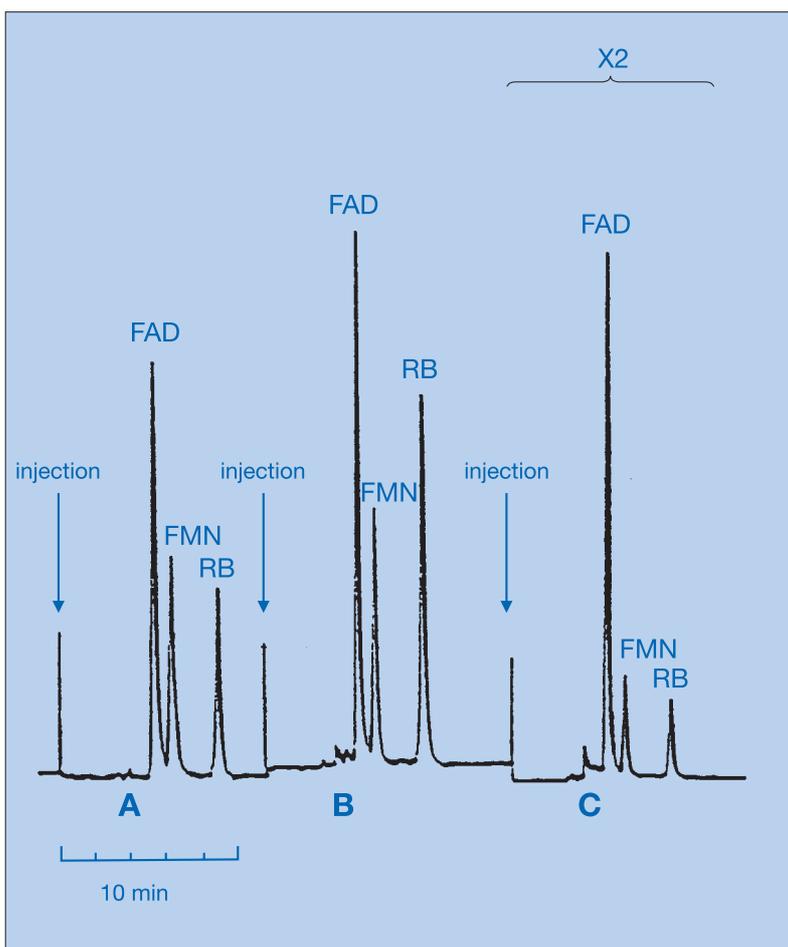


Figure 3 : Chromatogrammes d'un dosage en CLHP de FAD, FMN et riboflavine (RB) à partir d'une solution de standards externes (A), de sang total (B) et de plasma (C).

Validation technique

Les critères de performance de la technique sont présentés dans le tableau suivant :

	FAD	FMN	Riboflavine
Limite de détection	1,5 nM	0,9 nM	1,1 nM
Limite supérieure de linéarité	500 nM	200 nM	100 nM
Répetabilité CV (%) n=5			
Pool de plasma (concentration basse)	2,2	5,4	2,3
Pool de plasma (concentration normale)	1,1	3,4	1,7
Pool de plasma (concentration haute)	2,6	3,3	3,7
Reproductibilité CV (%) n=5			
Pool de plasma (concentration basse)	3,1	3,6	2,6
Pool de plasma (concentration normale)	2,2	2,5	3,3
Pool de plasma (concentration haute)	2,8	2,4	3,4

Contrôle de qualité

Il n'existe pas de contrôle de qualité inter-laboratoire pour le dosage de la vitamine B₂. La société Chromsystems® commercialise des échantillons lyophilisés obtenus à partir de sang total humain, garantis à deux concentrations différentes (Level I et Level II) qui permettent d'évaluer le dosage en CLHP du FAD, du FMN et de la riboflavine.

Evaluation de l'activité de la glutathion réductase érythrocytaire (EGR)

L'activité d'enzymes érythrocytaires FAD dépendantes, telle la glutathion réductase, peut être évaluée. Cette activité est mesurée avant (activité basale) et après apport de FAD (activité saturée). Ce test garde tout son intérêt pour évaluer l'état nutritionnel en vitamine B₂. Le rapport activité saturée sur activité basale est d'autant plus élevé que le déficit est sévère.

Le FAD, cofacteur de l'EGR, stimule l'activité de la glutathion réductase érythrocytaire NADPH,H⁺ dépendante, qui réduit le glutathion oxydé en glutathion réduit. En présence d'un excès de NADPH,H⁺ dans un hémolysat érythrocytaire et de glutathion oxydé comme substrat, l'activité de l'EGR est déterminée *in vitro* avec et sans ajout de FAD. L'indice d'activation est déterminé par le rapport activité saturée sur activité basale. La technique peut être automatisée et utilisée en microméthode (Turnham et Rathakette, 1982). Trois ml de sang prélevé sur héparinate de lithium doivent être traités par 0,75 ml d'une solution stabilisante (acide citrique 7,3 g, citrate de sodium 22 g, D-glucose 24,5 g, eau distillée qsp 1000 ml). Conservé à 4 °C, le prélèvement traité doit être analysé dans les 8 jours qui suivent.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Valeurs physiologiques et variations

Le tableau suivant rend compte des concentrations physiologiques retrouvées dans les différents liquides biologiques habituellement explorés par CLHP.

	FAD	FMN	Riboflavine
Plasma	34,9 ± 7,00 µg/l 44,67 ± 8,96 nM	5,6 ± 0,98 µg/l 12,32 ± 2,16 nM	7,62 ± 1,37 µg/l 20,27 ± 3,64 nM
Sang total	108 ± 18 µg/l 138 ± 23 nM		
Urines			36–349 µg/g créatinine

L'activité de l'EGR est utilisée pour l'évaluation de l'état nutritionnel en riboflavine. Chez les sujets normaux, le coefficient d'activation de l'EGR est inférieur à 1,30. Les sujets déficients en vitamine B₂ ont une valeur supérieure à 1,30.

Le dosage plasmatique des flavines est le reflet des apports récents en vitamine B₂, alors que le dosage dans les globules rouges est en rapport avec le pool intracellulaire. Le rythme nyctéméral influence légèrement les valeurs sanguines en riboflavine, alors que le rythme saisonnier est sans effet.

Le dosage urinaire est un indice de carence si la riboflavinurie est inférieure à 27 µg/g de créatinine. Mais le niveau de l'excrétion urinaire de la riboflavine varie chez un même individu indépendamment du statut en riboflavine et est influencé par l'activité physique.

Variations pathologiques

Hypovitaminose B₂

Les résultats de l'étude Val-de-Marne ont montré que 8 à 31 % des adultes ont un statut en vitamine B₂ déficient, avec un indice d'activité EGR supérieur à 1,52. Les signes de carence n'apparaissent qu'après trois à quatre mois d'apports nutritionnels très faibles. Les symptômes sont alors frustrés et non spécifiques car souvent associés à des carences poly-vitaminiques. On peut décrire :

- Des signes cutanéomuqueux : dermatite séborrhéique de la face (ailes du nez, bouche, oreilles, sourcils) ; lèvres lisses, brillantes, rouges et sèches (chéilite, perlèche) ; langue rouge pourpre, lisse avec atrophie des papilles (glossite) ou noirâtre ; hyperpigmentation et prurit génital (scrotal ou vulvaire).
- Des signes oculaires : larmoiement, photophobie, hypervascularisation de la conjonctive, infection et opacification de la cornée et cataracte présénile.

Lors de carences expérimentales (régimes carencés, ou apport de galactoflavine-antagoniste de la riboflavine), il a été observé des atteintes hépatiques, une excrétion urinaire d'acides organiques, une action tératogène chez l'animal. Chez l'homme, il est décrit une anémie sévère, normochrome, normocytaire, arégénérative avec réticulopénie et neuropathie périphérique lentement réversible après administration de riboflavine et arrêt de galactoflavine.

Dans les pays en voie de développement, la carence en vitamine B₂ est associée à une malnutrition protéino-énergétique très souvent compliquée d'une malabsorption liée à une parasitose persistante.

Dans les pays industrialisés, les carences en vitamine B₂ apparaissent lors de malabsorption, de besoins accrus, de régimes hypocaloriques non équilibrés. On définit ainsi des groupes ou situations physiopathologiques à risque :

- Les alcooliques chroniques, chez lesquels sont associées une insuffisance des apports avec malnutrition protéino-énergétique et une diminution de la biodisponibilité de la riboflavine ; de plus, l'alcool inhibe la FAD et FMN pyrophosphatase.
- Une malabsorption chronique lors d'atrésie des voies biliaires chez l'enfant.
- Une carence d'apport chez la femme âgée sans dénutrition.
- Une excrétion urinaire accrue en vitamine B₂ chez le diabétique.
- Une diminution de synthèse de FMN lors d'hypothyroïdie.
- Une nutrition parentérale exclusive non supplémentée en vitamine B₂.
- Une perte accrue de vitamine B₂ lors d'une hémodialyse.

- Les végétariens stricts.
- La destruction de la riboflavine lors d'un traitement par photothérapie.
- Un traitement au long cours par les œstro-progestatifs.
- Des besoins accrus chez la femme enceinte et allaitante.

Des interférences médicamenteuses avec le métabolisme de la vitamine B₂ ont été décrites :

- Les anticholinergiques retardent la vidange gastrique et ralentissent le transit ce qui entraîne une augmentation de l'absorption de la vitamine B₂.
- L'acide borique augmente la fuite urinaire de la riboflavine.
- Certains métaux (cuivre, fer, zinc) et médicaments (théophylline, tétracyclines) sont chélateurs de la riboflavine.

Les déficits enzymatiques héréditaires touchant le métabolisme de la vitamine B₂ sont peu fréquents (Saudubray, 1987). Il est décrit des déficits mono-enzymatiques qui touchent les déshydrogénases (isovaléryl CoA-, glutamyl CoA- et acyl CoA- déshydrogénases). Les déficits poly-enzymatiques concernent la totalité des acyl-CoA déshydrogénases FAD dépendantes, associées ou non à une excrétion urinaire des acides organiques. Les manifestations cliniques rencontrées sont les suivantes :

- Atteinte hépatique avec stéatose, hépatomégalie qui s'accompagnent de coma hyperglycémique, de troubles de la conscience, de convulsions voire de mort subite.
- Retentissement musculaire, tardif chez l'enfant, l'adolescent ou l'adulte avec une impotence progressive associée à des crampes et à une intolérance à l'effort musculaire. Il est décrit une atteinte du muscle cardiaque.

Hypervitaminose B₂

La faible solubilité de la riboflavine, son absorption intestinale limitée et l'absence de compartiment de stockage limite les risques de surdosage en vitamine B₂. Elle peut être prescrite en prophylaxie chez les individus à risque ou en traitement à doses plus importantes dans les maladies héréditaires ou en dermatologie.

Détection biologique des carences

Un dosage de FAD érythrocytaire inférieur à 100µg/l de globule rouges (128 nM), un dosage urinaire de riboflavine inférieur à 27µg/g de créatinine, un coefficient d'activité de la EGR supérieur à 1,30 orientent vers une carence.

Dans le cadre d'une suspicion de déficit enzymatique héréditaire, il peut être utile de réaliser un dosage des acides organiques urinaires.

L'ÉTAT DE LA RECHERCHE ACTUELLE

Les coenzymes flaviniques, impliqués dans de nombreuses voies métaboliques, sont explorés dans le métabolisme mitochondrial, pour une meilleure connaissance des conséquences et des traitements possibles des déficits enzymatiques vitamine B₂-dépendants. Leur photosensibilité est également évaluée dans l'utilisation de certains médicaments à visée carcinologique.

Références bibliographiques

- Aguesse S, Moussa F, Aymard P** (1996). Dosage de la vitamine B₂ dans les sérums pédiatriques par CLHP. In : XX^{ème} Colloque de Biologie Prospective. Symposium satellite : Vitamines et Biofacteurs. Nancy.
- Blot WJ, Li JY, Taylor PR, et al.** (1993). Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations ; cancer incidence and disease-specific mortality in the general population. *J Natl Cancer Inst*, **85** : 1483-1492.
- Boisvert WA, Mendoza I, Castenada C et al.** (1993). Riboflavin requirement of healthy elderly humans and its relationship to the macronutrient composition of the diet. *J Nutr* , **123** : 915-925.
- Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG** (1995). A quantitative assessment of plasma homocysteine and risk for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA*, **274** : 1049-1057.
- Buzina R, Jusic M, Milanovic N et al.** (1979). The effects of riboflavin administration on iron metabolism parameters in a school-going population. *Int J Vitam Nutr Res*, **49** : 136-143.
- Chastain JL, McCormick DB** (1987). Flavin catabolites: identification and quantitation in human urine. *Am J Clin Nutr*, **46** : 830-834.
- Crichton RR, Roman FR, Wauters M** (1975). Reductive mobilisation of ferritin iron by reduced nicotinamide adenine dinucleotide via flavin mononucleotide. *Biochem Soc Trans*, **3** : 946-948.
- EC Scientific Committee for Food Report** (1993). 31st series. *Nutrient and energy intake for the European Community*. Luxembourg : Directorate-General, Industry.
- Fairweather-Tait SJ, Powers HJ, Minski MJ, et al** (1992). Riboflavin deficiency and iron absorption in adult Gambian men. *Ann Nutr Metab*, **36** : 34-40.
- Faron G, Drouin R, Pedneault L et al.** (2001). Recurrent cleft lip and palate in sibs of a patient with malabsorption syndrome, probably caused by hypovitaminosis A associated with folic acid and riboflavin deficiencies. *Teratology*, **63** : 161-163.
- Foy H, Kondi A** (1984). The vulnerable oesophagus: riboflavin deficiency and squamous cell dysplasia of the skin and the oesophagus. *J Natl Cancer Inst*, **72** : 941-948.
- Gastaldi G, Ferrari G, Verri A et al.** (2000). Riboflavin phosphorylation is the crucial event in riboflavin transport by isolated rat enterocytes. *J Nutr*, **130** : 2556-2561.
- Gregerson N, Christensen MF, Christensen E, Kolvraa S** (1986). Riboflavin-responsive multiple acyl CoA dehydrogenation deficiency. *Acta Paediatr Scand*, **75** : 676-680.
- Gregory J, Lowe S** (2000). *National Diet and Nutrition Survey of young people aged 4-18 years*. London : The Stationary Office.
- Hercberg S, Preziosi P, Galan P et al.** (1991). Apports nutritionnels d'un échantillon représentatif de la population du Val-de-Marne ; III. Apport en minéraux et vitamines. *Rev Epidemiol Santé Publique*, **39** : 245-261.
- Hustad S, Ueland PM, Vollset SE et al.** (2000). Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine: effect modification by the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Clin Chem*, **46** : 1065-1071.
- Innis WS, McCormick DB, Merrill AH Jr.** (1986). Variations in riboflavin binding by human plasma: identification of immunoglobulins as the major proteins responsible. *Biochem Med*, **34** : 151-165.

- Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW et al.** (2001). Determinants of plasma homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr*, **73** : 613-621.
- Leshner RT** (1981). Riboflavin deficiency – a reversible neurodegenerative disease. *Ann Neurol*, **10** : 294-295.
- Lo CS** (1985). Riboflavin status of adolescent southern Chinese: riboflavin saturation studies. *Hum Nutr Clin Nutr*, **39C** : 297-301.
- Lui T, Soong SJ, Wilson NP et al.** (1993). A case-control study of nutritional factors and cervical dysplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **2** : 525-530.
- Mack C, Hulquist DE, Schlafer M** (1995). Myocardial flavin reductase and riboflavin: a potential role in decreasing reoxygenation injury. *Biochem Biophys Res Commun*, **212** : 35-40.
- Manore MM** (2000). Effect of physical activity on thiamine, riboflavin, and vitamin B-6 requirements. *Am J Clin Nutr*, **72** : 598S-606S.
- McCormick DB** (1972). The fate of riboflavin in the mammal. *Nutr Rev*, **30** : 75-79.
- McCormick DB** (1989). Two interconnected B vitamins: riboflavin and pyridoxine. *Physiol Rev*, **69** : 1170-1198.
- McCormick DB** (2003). Metabolism of vitamins in microbes and mammals. *Biochem Biophys Res Commun*, **312** : 97-101.
- Miyamota Y, Sancar A** (1998). Vitamin B2 based blue photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95** : 6097-6102.
- National Food Survey.** *Annual report on food expenditure, consumption and nutrient intakes.* (2000) London: The Stationery Office.
- Nielsen P.** Flavins. In : De Leenher AP, Lambert WE, Nilis HJ (1992). *Modern chromatographic analysis of vitamins.* Chromatographic Science Series. Marcel Dekker Inc, New York, **60** : 355-398.
- Parson HG, Dias VC** (1990). Intramitochondrial fatty acid metabolism: riboflavin deficiency and energy production. *Biochem Cell Biol*, **69** : 490-497.
- Patterson B, Bates CJ, Halliday D, Lucas A** (1989). 1-¹³C-octanoate oxidation, energy expenditure and vitamin B₂ supplement in premature infants. *Acta Paediatr*, **78** : 780-781.
- Powers HJ, Bates CJ, Duerden JM** (1983). Effects of riboflavin deficiency in rats on some aspects of iron metabolism. *Int J Vitam Nutr Res*, **53** : 371-376.
- Powers HJ** (2003). Riboflavin (vitamin B2) and health. *Am J Clin Nutr*, **77** : 1352-1360.
- Prchal JT, Conrad ME, Skalka HW** (1978). Association of presenile cataracts with heterozygosity for galactosaemic states and with riboflavin deficiency. *Lancet*, **1** : 12-13.
- Preziosi P, Galan P, Deheeger M et al.** (1999). Breakfast type, daily nutrient intakes and vitamin and mineral status of French children, adolescents and adults. *J Am Coll Nutr*, **18** : 171-178.
- Qiao CH** (1989). Mechanisms of riboflavin deficiency facilitating carcinogenesis of N-nitrosamine – effect on carcinogen-metabolising enzymes. *Zhonghua Zhong Lin Za Zhi*, **11** : 322-325.
- Rivlin RS** (1973). Riboflavin and cancer: a review. *Cancer Res*, **3** : 1977-1986.
- Sancar DVS** (1978). Plasma levels of folate, ascorbate, vitamin B6 and riboflavin in children. *Int J Vitam Nutr Res*, **48** : 140-144.

Saudubray JM. Riboflavine. In : Munnich A, Ogier H, Saudubray JM (1987). *Les vitamines. Aspects métaboliques, génétiques, nutritionnels et thérapeutiques*. Masson, Paris, 143-169.

Sternier RT, Price WR (1973). Restricted riboflavin: within-subject behavioural effects in humans. *Am J Clin Nutr*, **26** : 150-160.

Thurnham DI, Rathakette P (1982). Incubation of NAD(P)H2: glutathione oxidoreductase (EC 1.6.4.2) with flavin adenine dinucleotide for maximal stimulation in the measurement of riboflavin status. *Br J Nutr*, **48** : 459-466.

Webster RP, Gawde MD, Bhattacharya RK (1996). Modulation of carcinogen-induced damage and repair enzyme activity by riboflavin. *Cancer Lett*, **98** : 129-135.

Yates CA, Evans GS, Powers HJ (2001). Riboflavin deficiency: early effects on post weaning development of the duodenum in rats. *Br J Nutr*, **86** : 593-599.



Niacine

Isabelle Garcia - Jocelyne Draï

L'acide nicotinique fut identifié par Huber en 1867 comme produit d'oxydation de la nicotine, mais son rôle vitaminique dans la pellagre ne fut reconnu que beaucoup plus tard. La pellagre était connue depuis le 18^e siècle en Europe du Sud et aux Etats-Unis sous le nom de "mal de la rose", et était associée à la consommation de maïs. Le terme de pellagre fut introduit en 1771 par Frapolli et vient de l'italien *pelle* (peau) et *agra* (rugueuse).

En 1915, Goldberg montre que la pellagre n'est pas une maladie transmissible, et il émet l'hypothèse que ce syndrome pourrait être dû à une carence nutritionnelle.

En 1937, Elvehjem met en évidence l'effet curatif d'un extrait de foie sur la "maladie de la langue noire" du chien, maladie analogue à la pellagre humaine. Il isole à partir du foie le nicotinamide identifié comme le composé actif contre la pellagre, le *Pellagra Preventing Factor*, ou vitamine PP.

En 1945, on démontre qu'un régime riche en tryptophane peut guérir la pellagre. Quelques années plus tard, la synthèse endogène de l'acide nicotinique à partir du tryptophane est confirmée.

Entre 1950 et 1960, Altschul et Herman (1955) mettent en évidence l'action hypolipémiante de l'acide nicotinique par augmentation des processus oxydatifs (le nicotinamide est inactif).

En 1980, le rôle de la vitamine PP dans l'ADP-ribosylation des protéines est mis en évidence.

DÉFINITION DE LA VITAMINE

Nomenclature

Le terme "vitamine PP" regroupe deux formes (figure 1) :

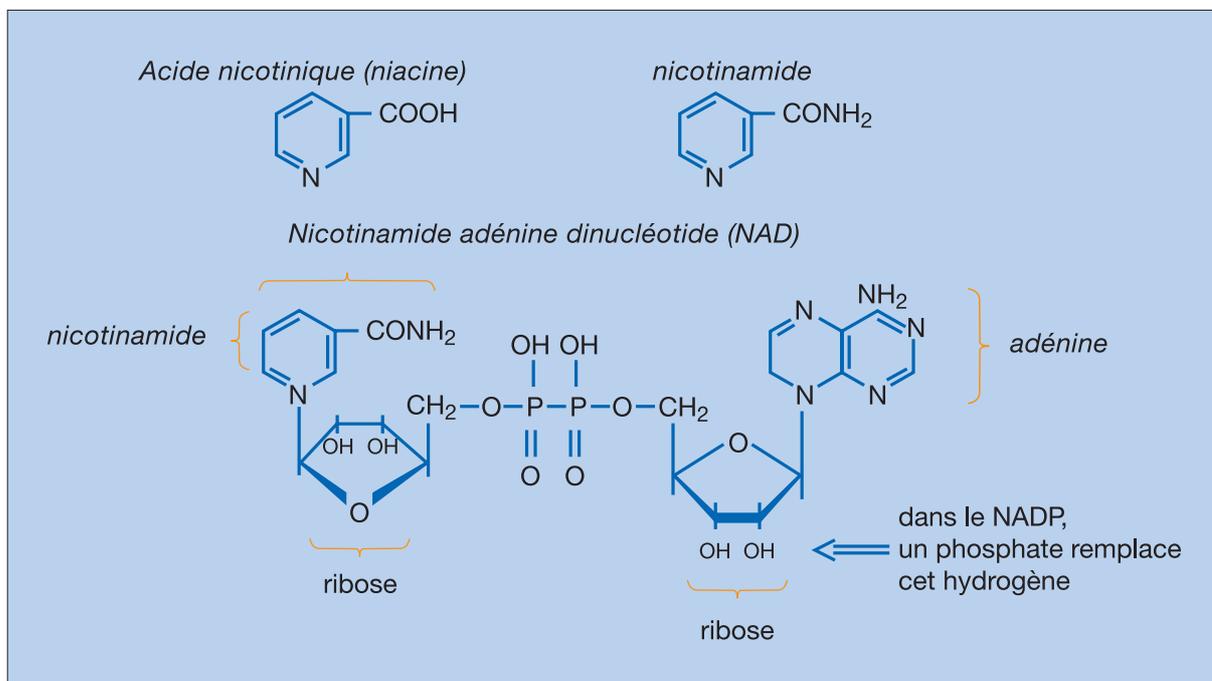


Figure 1 : Acide nicotinique et ses dérivés.

- L'acide nicotinique ($C_6 H_5 O_2 N$, PM = 123,11) ou acide pyridine-3-carboxylique.
- Le nicotinamide, amide de l'acide nicotinique ($C_6 H_6 O N_2$, PM = 122,13).

Le nicotinamide est le précurseur de deux dérivés importants :

- Le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) ($C_{21} H_{27} O_{14} N_7 P_2$, PM= 663,4)
- Le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP) ($C_{21} H_{28} O_{17} N_7 P_3$, PM=743,44).

Propriétés physico-chimiques

L'acide nicotinique se présente sous forme de cristaux aiguilletés, incolores et stables à l'air. Il est soluble dans l'eau (1 g/60ml) et l'éthanol (1 g/80 ml) et insoluble dans le diéthyléther. Une solution aqueuse d'acide nicotinique peut être autoclavée pendant 10 min à 120 °C, sans décomposition. Le coefficient d'absorption moléculaire est de $2800 M^{-1} cm^{-1}$ à 260 nm en solution dans un tampon phosphate de potassium 50 mM, pH 7,0. En présence de chloramine T, la niacine donne, avec le cyanure de potassium un complexe coloré : c'est la réaction de König (1904).

Le nicotinamide se présente sous forme de cristaux aiguilletés, incolores. Il est soluble dans l'eau (1g/ml), l'éthanol (1g/1,5 ml) et le glycérol (1g/10ml). Le nicotinamide est soluble dans l'acétone, le chloroforme et le butanol, mais il n'est que légèrement soluble dans le diéthyléther et le benzène.

En solution aqueuse, il peut être autoclavé pendant 10 min à 120°C, sans décomposition. Le coefficient d'absorption moléculaire est de $3300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 260 nm en solution dans l'eau. L'acide nicotinique et le nicotinamide sont stables à la lumière et résistent aux oxydations.

SOURCES

Sources

La niacine est présente dans tous les aliments, mais elle est particulièrement abondante dans les viandes, les poissons, les levures et les champignons. Dans les céréales, et en particulier dans le maïs, la vitamine PP est sous forme d'un glycoside de l'acide nicotinique, la niacytine. Seule une partie de celle-ci est hydrolysée par l'acide gastrique, le reste n'est pas biodisponible.

Une synthèse endogène est possible à partir d'un acide aminé, le tryptophane. Les végétaliens qui ne consomment jamais aucun produit d'origine animale peuvent, de ce fait, ne pas couvrir leurs propres besoins.

Unités

L'expression "équivalent niacine" tient compte des deux formes de vitamines PP et de la synthèse endogène à partir du tryptophane.

Un équivalent niacine (EN) =

- 1 mg d'acide nicotinique
- 1 mg d'amide nicotinique
- 60 mg de tryptophane.

MÉTABOLISME

Absorption

L'absorption intestinale de la niacine est rapide, saturable, sodium-dépendante. Aux concentrations basses, l'acide nicotinique et le nicotinamide sont absorbés par un mécanisme spécifique de type facilité. Aux fortes concentrations, il existe une diffusion passive.

Distribution

L'acide nicotinique plasmatique est rapidement capté par les globules rouges et le foie (figure 3), et transformé en coenzymes actifs : le NAD et le NADP. Le rapport acide nicotinique érythrocytaire/acide nicotinique plasmatique est d'environ 110/1.

Une glycohydrolase peut transformer le NAD ou le NADP cellulaire en nicotinamide, qui repasse dans la circulation sanguine. Le nicotinamide est capté par les tissus qui effectuent leur propre synthèse de NAD et NADP.

On trouve de la vitamine PP sous forme de NAD et NADP dans tous les tissus, mais surtout dans le foie, qui en contient environ 65 mg chez l'homme adulte normal.

Catabolisme

Le catabolisme du NAD et du NADP conduit au nicotinamide qui est ensuite méthylé au niveau du foie. Le N¹-méthylnicotinamide est éliminé par le rein ou oxydé par le foie en méthylpyridone carboxamide. Le catabolisme de l'acide nicotinique conduit soit au nicotinamide, soit à l'acide nicotinique qui sont également éliminés par voie rénale.

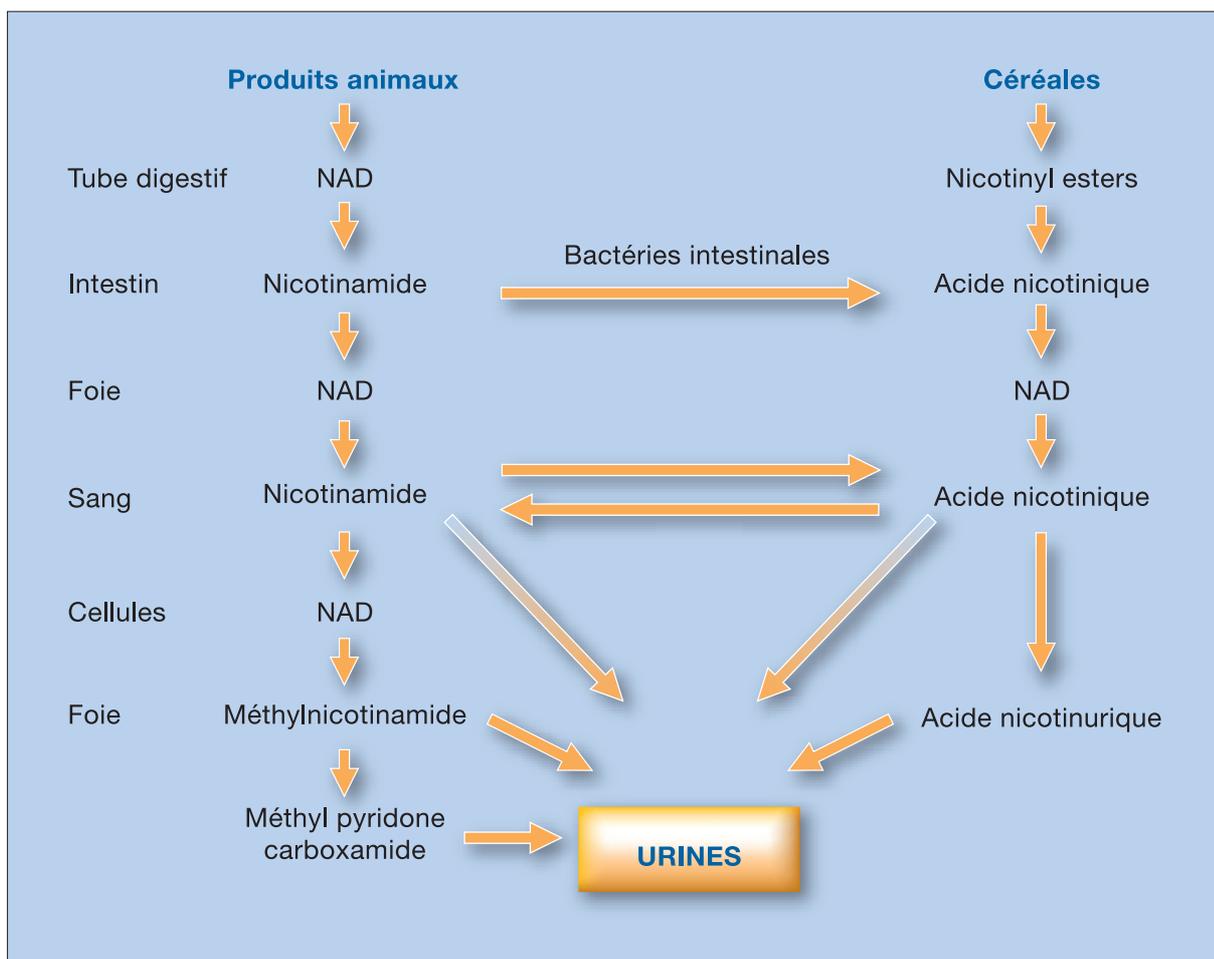


Figure 3 : Métabolisme de la niacine

Élimination

Dans le rein se produisent deux phénomènes :

- Une excrétion tubulaire active du catabolite essentiel de la niacine, le N¹-méthylnicotinamide médié par un transporteur spécifique sans possibilité de réabsorption ;
- Un système de réabsorption propre à la niacine, saturable, sélectif, inhibé par les analogues structuraux, d'affinité élevée et sodium dépendant (Figure 3).

PHYSIOLOGIE

À l'échelon moléculaire

Rôle dans les réactions d'oxydoréduction

L'activation de la niacine conduit au NAD et au NADP. NAD et NADP fonctionnent comme des accepteurs d'hydrogène dans les réactions d'oxydation et comme des donneurs d'hydrogène dans les réactions de réduction. NAD et NADP ne sont pas à proprement parler des coenzymes, ils sont des cosubstrats des enzymes auxquels ils sont associés.

NAD et NADP sont impliqués dans toutes les réactions d'oxydoréduction de l'organisme. Le composant nicotinamide sert de transporteur transitoire d'un ion hydrure, qui est enzymatiquement retiré d'une molécule de substrat par l'action de déshydrogénases.

La concentration totale de NAD et NADH dans les tissus est d'environ 10^{-5} M ; celle de NADP est 10 fois plus faible.

- Le NAD est surtout mitochondrial : c'est l'accepteur d'hydrogène dans les grandes réactions d'oxydation productrices d'énergie de l'organisme (glycolyse, lipolyse, cycle de KREBS). Le NADH₂ produit, cède de l'hydrogène à la chaîne de peroxydation oxydative mitochondriale avec production d'ATP, d'H₂O, et régénération de NAD.
- Le NADP est surtout cytoplasmique, c'est un grand donneur d'hydrogène dans les réactions de synthèse consommatrices d'énergie comme la synthèse des acides gras. Le NADPH₂, oxydé en NADP dans ses réactions, doit être à nouveau réduit. Cette recharge en hydrogène a lieu dans la voie des pentoses phosphates.
- NAD et NADP peuvent se transformer l'un en l'autre grâce à une transphosphatase. Ceci permet à l'organisme de garder un équilibre entre réactions productrices d'énergie et réactions consommatrices d'énergie (Figure 4).

ADP-ribosylation

Le NAD est un substrat pour les réactions d'ADP-ribosylation (Rawling *et al.*, 1996). La poly-ADP-ribose - polymérase, présente dans le noyau cellulaire, catalyse le transfert d'ADP-ribose du NAD sur des polymères liés à des récepteurs protéiques. Ces protéines sont impliquées dans la réplication et la réparation de l'ADN.

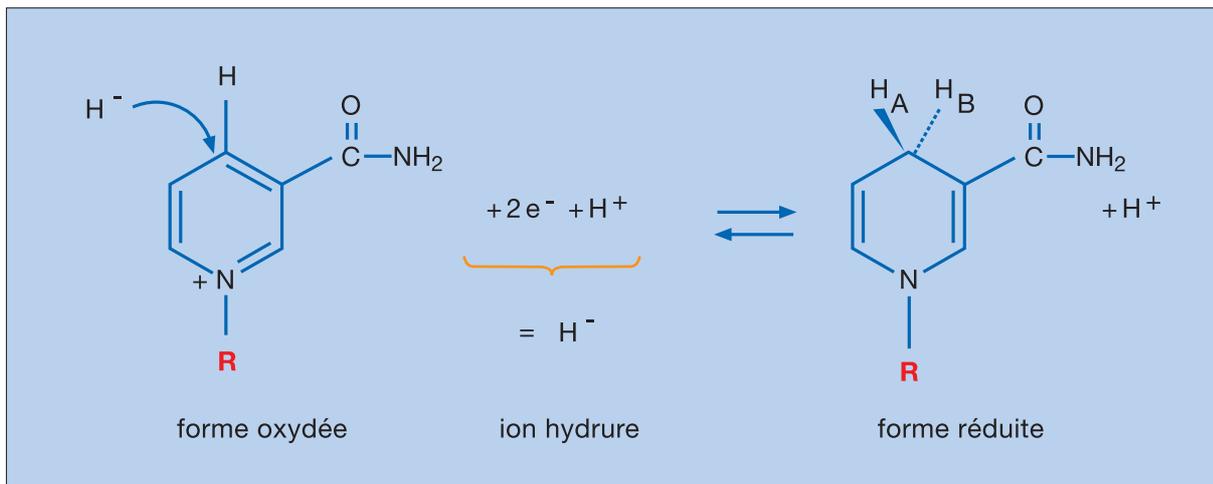


Figure 4 : Forme oxydée et forme réduite.

R = adénine dinucléotide pour NAD et R = dinucléotide phosphate pour NADP.

Au niveau de l'organisme entier

Activité vitaminique

Aux doses nutritionnelles, l'acide nicotinique et le nicotinamide ont les mêmes effets biochimiques sur la pellagre, et les syndromes de malnutrition associés ou non à des affections chroniques comme le syndrome d'immunodéficience acquise, l'alcoolisme chronique, la maladie de Crohn, le carcinoïde du grêle.

Propriétés pharmacologiques

C'est essentiellement l'acide nicotinique qui présente des activités pharmacologiques.

Action hypolipémiante

Elle se manifeste principalement par trois actions :

- Action hypotriglycéridémiante (Figge *et al.*, 1988) :

Baisse de la lipolyse dans le tissu adipeux entraînant une diminution du pool d'acides gras libres disponible pour la biosynthèse hépatique des VLDL. Une diminution de la taille de ces particules est aussi observée.

- Action hypocholestérolémiante due à une diminution du taux des LDL.
- Augmentation du taux des HDL par action régulatrice sur l'expression des gènes des apoprotéines (Staels *et al.*, 1996).

Cette action hypolipémiante a une efficacité reconnue sur les coronaropathies, en association avec d'autres hypocholestérolémiants (Gardner, 1996 ; Gray *et al.*, 1994 ; Hodis, 1995). On dispose maintenant de formes retard administrées en association avec des statines (Rubenfire *et al.*, 2004).

Action vasodilatatrice

Cette action vasodilatatrice périphérique est transitoire. Elle peut éventuellement se manifester très rapidement sous forme de rushs cutanés.

Protection contre le cancer

La niacine, en modulant les phénomènes d'ADP-ribosylation, jouerait un rôle dans la réplication et la réparation de l'ADN (Herceg et Wang, 1999 ; Jacobson *et al.*, 1995).

Protection contre l'infection HIV

Plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse que l'infection par le virus HIV induirait une déplétion en niacine et par conséquent en tryptophane. Le traitement de ces patients par la niacine agirait comme un "AIDS preventive factor" (Murray, 1999 ; Murray *et al.*, 2001 ; Pontes Monteiro *et al.*, 2004).

Vitamine PP et schizophrénie

Des études actuelles sont en cours, sur le rôle de la niacine dans la schizophrénie. La forte production endogène d'hallucinogènes méthylés chez les schizophrènes pourrait entraîner une déplétion en nicotinamide en favorisant sa méthylation et son excrétion urinaire. On a émis l'hypothèse que la schizophrénie correspondrait à une déficience en NAD de certains territoires cérébraux, cependant l'administration de niacine chez les schizophrènes donne des résultats contradictoires (Smesny *et al.*, 2004).

EXPLORATION : MÉTHODES ANALYTIQUES

Paramètres accessibles à l'analyse

Dosages sanguins

On peut mesurer l'acide nicotinique et le nicotinamide dans le sang total et le plasma mais, à l'état physiologique basal, ils n'existent qu'en très faible quantité.

Dosages urinaires

Chez l'homme, les principaux métabolites présents dans l'urine sont le N¹-méthylnicotinamide (NMN), le N¹-méthyl-2-pyridone-5-carboxamide (2-py) et le N¹-méthyl-4-pyridone-3-carboxamide (4-py).

Dosages

Dosage par méthode microbiologique

Ces méthodes utilisent des micro-organismes comme *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014), (Fayol, 1993), dont la croissance est NAD dépendante. Elles sont sensibles mais dosent ensemble l'acide nicotinique et le nicotinamide dans une zone de concentration très étroite et avec des rendements très faibles.

Dosage par chromatographie liquide haute performance (CLHP)

Dosage de l'acide nicotinique dans le plasma.

La méthode présentée est celle décrite par Takikawa *et al.* (1982) ; elle comporte une séparation de l'acide nicotinique et de ses dérivés par CLHP sur résine échangeuse de cations et une détection à 260 nm.

- **Réactifs**

L'acide nicotinique et l'acide nicotinurique sont vendus par Sigma®, (USA). Le nicotinamide et l'acide quinaldique proviennent de chez Wako Pure Chemicals®.

- **Préparation de l'échantillon**

0,5 ml de plasma sont additionnés de 0,5 ml d'eau distillée et 3 ml d'acétone et agités sur un agitateur vortex. Après centrifugation à 1500 g pendant 10 minutes, 3 ml de surnageant sont transférés dans un tube en verre à bouchon rodé contenant 3 ml de chloroforme. Le mélange est agité pendant 5 minutes puis centrifugé à 1500 g pendant 5 minutes. 500 µl de la phase aqueuse sont acidifiés avec 0,1 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N, puis évaporés à sec dans un évaporateur rotatif à 60 °C pendant 30 minutes. Après addition de 200 µl de méthanol au résidu, le solvant est évaporé sous vide. Puis on ajoute 200 µl d'étalon interne (acide quinaldique) en solution dans l'éthanol (4 µg/ml). Après centrifugation à 3500 g pendant 10 minutes, 150 µl de surnageant sont évaporés à sec. Le résidu est dissous dans 50 µl d'eau distillée et 20 µl de la solution sont injectés dans le système CLHP. Pour des concentrations en acide nicotinique supérieures à 2 µg/ml, le plasma est dilué dans l'eau distillée.

- **Conditions chromatographiques**

On utilise un système chromatographique comportant une pompe CLHP, une vanne d'injection de 1 µl à 2,0 ml, et un détecteur UV multi longueurs d'ondes. La phase stationnaire est une colonne échangeuse de cations (Zipax SCX, 25-37 µm, 50 cm x 2,1 mm, I.D., Du Pont De Nemours). La colonne est maintenue à 45 °C. La phase mobile est un tampon phosphate 0,02 M [NaH₂PO₄ - H₃PO₄, 65 : 35, pH : 2,6]. Le débit est fixé à 1,0 ml/min (pression correspondant approximativement à 30 kg/cm²). La détection UV est effectuée à 260 nm.

- **Calibration**

On utilise des solutions aqueuses d'acide nicotinique à 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,8 ; 1,2 ; 1,6 et 2,0 µg/ml.

- **Performances analytiques de la méthode**

Le coefficient de variation pour une concentration en acide nicotinique de 0,5 µg/ml est de 3,05 %. La limite de détection est de 0,05 µg/ml. Cette méthode n'est pas assez sensible pour doser l'acide nicotinique endogène plasmatique, mais elle permet de suivre un traitement à l'acide nicotinique.

Dosage des principaux métabolites de l'acide nicotinique, de l'acide nicotinurique et du nicotinamide dans le plasma.

La préparation de l'échantillon est la même que pour le dosage de l'acide nicotinique. Les conditions chromatographiques sont identiques sauf la composition de la phase mobile : tampon phosphate 0,02 M [(NaH₂PO₄ - H₃PO₄, 78 : 22 (pH : 2,8)]. Les solutions standards contiennent 0,5, 1, 2, 3, 4 et 5 µg/ml d'acide nicotinurique et 1, 2, 4, 6, 8 et 10 µg/ml de nicotinamide.

Dosage simultané du nicotinamide et de ses principaux métabolites, le N¹-méthyl-2-pyridone-5-carboxamide (2-py) et le N¹-méthyl-4-pyridone-3-carboxamide (4-py) dans l'urine

- **Principe**

Ces composés sont séparés sur colonne échangeuse d'ions après extraction par le diéthyléther en milieu alcalin (Shibata *et al.*, 1988).

- **Réactifs**

Le N¹-méthylnicotinamide est disponible chez Sigma® (USA). Le 2-py est préparé par synthèse par action de la N¹-méthylnicotinamide oxydase sur le N¹-méthylnicotinamide. L'isonicotinamide (utilisé comme étalon interne) et le nicotinamide sont distribués par Wako® (Japon).

- **Prélèvements**

Les urines sont recueillies dans un flacon contenant 0,5 ml de toluène et 1,0 ml d'acide chlorhydrique 1 M et sont conservées à -25 °C.

- **Extraction**

À 1 ml d'urine, ajouter 1,2 g de carbonate de potassium. Refroidir dans la glace et ajouter 5 ml de diéthyléther. Ramener à 25 °C. Bien mélanger pendant 5 minutes. Centrifuger à 600 g pendant une minute et recueillir le diéthyléther. Répéter cette opération 3 fois. Mélanger les phases de diéthyléther recueillies, évaporer à sec. Ajouter 0,5 ml d'eau et filtrer sur filtre Millipore 0,45 µm. Injecter 5 à 10 µl de cet extrait dans le système CLHP.

- **Conditions chromatographiques**

Système chromatographique : une pompe CLHP avec un système d'injection Rheodyne modèle 7125, une colonne 7- ODS-L (250 mm x 4,6 mm T.D., particules 7 µm) et un détecteur UV.

Phase mobile : Phosphate monopotassique 10 mM (96 : 4, v/v) ; débit 1,0 ml/min ; détection à 260 nm ; température de la colonne : 25 ± 1 °C. Etalon interne : isonicotinamide.

- **Performances analytiques**

Pour le 4-py, la courbe d'étalonnage est linéaire de 2 pmol (304 pg) à 5 nmol (760 ng). La limite de détection pour le 4-py et le 2-py est de 2 pmol (304 pg) avec un rapport signal-bruit de 5 : 1. Le rendement est égal à 97,9 % pour le 4-py à une concentration de 200 nmol/ml d'urine (n=5).

Dosage du N¹-méthylnicotinamide dans le plasma et l'urine

- **Principe**

Le N¹-méthylnicotinamide (NMN) est dosé par CLHP après condensation avec l'acétophénone qui donne une fluorescence facilement détectable.

- **Réactifs**

1-méthylnicotinamide (SIGMA®), nicotinamide (FLUKA®).

Le N¹ éthylnicotinamide, utilisé comme un étalon interne, est synthétisé à partir du nicotinamide selon la méthode de Hirayama *et al.* (1985).

- **Préparation de l'échantillon**

Le plasma est déprotéinisé par l'acide trichloracétique à 20 % et l'urine est diluée au 1/10 dans l'acide chlorhydrique 10⁻⁴M.

La dérivatisation comprend une condensation du méthylnicotinamide avec l'acétophénone dans la soude à 0 °C, suivie d'une déshydratation dans l'acide formique au bain-marie à 100 °C. Il se forme un composé fluorescent, le 1,6-naphthyridine.

- **Conditions chromatographiques**

Le composé fluorescent obtenu est soumis à une analyse chromatographique liquide haute pression en phase inverse sur colonne C18 5 µm (250 x 4 mm I.D.).

La phase mobile comprend de l'heptane sulfonate de sodium 0,01 M, 0,5 % de triéthylamine, 22 % d'acétonitrile ajusté à pH 3,2 par l'acide orthophosphorique. Elle est délivrée isocraquement.

Le N-méthylnicotinamide et le N-éthylnicotinamide sont détectés respectivement à 7,8 et 10 minutes en spectrofluorométrie (excitation à 366 nm et émission à 418 nm).

- **Performances analytiques**

La courbe de calibration est linéaire jusqu'à 109 ng.ml⁻¹ pour le plasma et 15,7 µg.ml⁻¹ pour l'urine. Des essais intra- et interséries sur des échantillons de plasma à des concentrations de 10,5 et 90 ng/ml donnent des coefficients de variations inférieurs à 3,3 %.

VARIATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES

Valeurs physiologiques

Plasma

L'acide nicotinique étant très rapidement capté par les globules rouges et le foie pour y être transformé en NAD et NADP, il n'existe, à l'état libre dans le plasma, qu'en très faible quantité, inférieure à 0,05 µg/ml. En revanche, l'utilisation de l'acide nicotinique en thérapeutique peut être suivie au niveau sanguin : l'administration per os de 1 gramme d'acide nicotinique donne un pic sérique de 15 à 30 mg.

Urines

Lors d'un apport nutritionnel normal, l'excrétion urinaire des principaux métabolites est la suivante (Shibata et Shimono, 1985) :

nicotinamide :	non détectable à l'état basal
N ¹ méthylnicotinamide :	31 ± 12 µmol/jour
2-py :	60 ± 27 µmol/jour
4-py :	7 ± 3 µmol/jour

Variations physiologiques

Au cours de la grossesse, on observe une augmentation de la synthèse endogène de niacine à partir du tryptophane, due à l'augmentation de l'activité de la tryptophane pyrrolase hépatique sous l'effet inducteur des œstrogènes ainsi qu'une excrétion urinaire accrue de cette vitamine.

Variations pathologiques

Etats de carence

La Pellagre

Tableau clinique

Les manifestations cliniques débutent par des signes généraux non spécifiques, asthénie, anorexie, amaigrissement, vertiges, céphalées, accompagnés de troubles psychiques.

Puis apparaissent des symptômes plus spécifiques qui sont :

- Une dermite : c'est la manifestation la plus typique de la maladie. Il s'agit d'un érythème douloureux, siégeant au niveau des parties découvertes du corps : visage, cou, extrémités des membres. La peau, œdématisée dans un premier temps, se desquame et devient brunâtre, sèche, rugueuse et atrophique ;
- Des signes digestifs : il existe une inflammation chronique des muqueuses tout le long du tube digestif ;
- Une stomatite : la muqueuse buccale est de couleur rouge carmin, parfois parsemée d'érosions aphtoïdes ;
- Une glossite : la langue est œdématisée de couleur rouge, toujours douloureuse et les papilles sont atrophiées ou parfois hypertrophiées ;
- Une gastralgie, une diarrhée chronique parfois sanglante ;
- Des troubles neuropsychiques : Il s'agit de troubles non spécifiques, fatigabilité, céphalées, psychose et hallucinations.

Schématiquement, le tableau clinique de pellagre comporte les "trois D" : dermite, diarrhée, démence. Non soignée, cette maladie peut être mortelle.

Étiologie

L'étiologie de la pellagre est complexe. La carence en vitamine PP est l'un des principaux facteurs responsables de ce syndrome, mais s'y ajoutent les déficits en tryptophane et en vitamine B₆ nécessaires à la synthèse endogène de la niacine (Van den Berg, 1997).

Dans les pays en voie de développement, la pellagre sévit dans les populations où l'alimentation est presque exclusivement constituée de céréales : maïs, surtout en Afrique, mais aussi le millet en Inde. Dans le maïs, l'acide nicotinique est bloqué dans un complexe nicotinyle ester qui résiste à l'action des sucs digestifs. Le millet est une céréale riche en leucine dont la dégradation nécessite la présence de niacine.

Dans les pays industrialisés, les signes cliniques de carence en vitamine PP surviennent plutôt dans certaines circonstances particulières.

• **En association avec certaines pathologies chroniques :**

- L'alcoolisme (Shinpo et Fukazawa, 1993) : on observe des signes de carence en vitamine PP, chez 20 à 30 % des alcooliques chroniques, du fait d'une malnutrition entraînant une diminution des apports en tryptophane et en vitamines du groupe B. De plus, le catabolisme de l'alcool consomme deux déshydrogénases NAD-dépendantes, ce qui provoque une augmentation des besoins en NAD ;
- Le carcinoïde du grêle : dans certaines tumeurs carcinoïdes, le tryptophane est préférentiellement (60 %) transformé en sérotonine, au détriment de la synthèse endogène de niacine ;

- La maladie de Crohn (Abu-Qurshin *et al.*, 1997) ;
- Le syndrome d'immunodéficience acquise (Tang *et al.*, 1996) ;
- Le vieillissement : 10 % des personnes âgées présentent des tableaux de multicarences en vitamines associés à une carence protéique (La Rue *et al.*, 1997).

- **En cas d'interactions médicamenteuses :**

Des carences en niacine peuvent être induites par la prise de certains médicaments :

- L'isoniazide (hydrazide de l'acide isonicotinique ou INH, Rimifon®), présente, outre son action antituberculeuse, une activité métabolique indésirable due à la formation, avec le phosphate de pyridoxal, d'un complexe inactif dépourvu d'activité vitaminique B₆. Il en résulte un blocage de la synthèse de l'acide nicotinique à partir du tryptophane par inhibition de la cinuréninase, enzyme pyridoxinodépendante (Guilland et Lequeu, 1992) ;
- D'autres hydrazides, comme la carbidopa utilisée dans le traitement de la maladie de Parkinson, ont une action similaire à l'isoniazide. Les malades traités par ces substances doivent être considérés comme exposés au risque de carence en vitamine PP et traités comme tels à titre préventif.

Maladie de Hartnup

La maladie héréditaire du tryptophane ou maladie de Hartnup (Levy, 1995) : c'est une maladie héréditaire, autosomique récessive, caractérisée par une anomalie du transport à travers les membranes épithéliales rénales et intestinales, des acides aminés monocarboxylés, dont le tryptophane. On observe une diminution de l'absorption intestinale du tryptophane et une augmentation massive de son excrétion urinaire conduisant à un déficit profond responsable d'un défaut de synthèse endogène de niacine et donc d'une pellagre associée à un état de dénutrition.

Etats de surcharge

Il n'y a pas de stockage de la niacine : l'organisme dispose de suffisamment de voies métaboliques permettant d'éliminer la vitamine PP en excès.

Intolérance et toxicité

Nicotinamide

Aux doses nutritionnelles (300 à 500 mg/jour) et par voie orale, le nicotinamide n'est pas toxique. En revanche, par voie veineuse, il ne faut pas dépasser la dose de 25 mg à cause des risques de choc anaphylactique.

Acide nicotinique

Il est plus toxique que le nicotinamide. Utilisé aux doses thérapeutiques comme hypolipémiant (2 à 6 g/24 heures) il peut entraîner des effets secondaires gênants :

- Vasodilatation cutanée dans les parties supérieures du corps et pigmentations cutanées ;
- Troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhées, poussées d'ulcère duodénal) ;
- A forte dose, le risque d'hépto-toxicité est important (Winter et Boyer, 1973) avec cholestase, fibrose portale et nécrose parenchymateuse ;
- En utilisation prolongée, il faut surveiller la glycémie, l'uricémie, les transaminases, et les phosphates alcalines.

STRATÉGIE DIAGNOSTIQUE

Diagnostic clinique

Se référer au paragraphe "Variations physiopathologiques, Etats de carence" (voir pages précédentes).

Diagnostic biologique

Dosages sanguins

Les dosages sanguins d'acide nicotinique et de nicotinamide ne présentent pas beaucoup d'intérêt, car il n'existe pas de parallélisme avec l'apparition des signes cliniques.

Dosages urinaires

L'excrétion urinaire de N¹-méthylnicotinamide est un bon marqueur du statut nutritionnel en niacine. En cas de carence, l'excrétion urinaire de ce métabolite descend en dessous de 0,8 mg/24 heures. Le résultat peut également être exprimé par gramme de créatinine, mais il varie avec l'âge, ou sous forme d'un ratio méthylpyridone carboxamide/méthylnicotinamide, mais celui-ci est très dépendant des apports protéiques.

Explorations fonctionnelles

On peut sensibiliser cette exploration en utilisant des tests de charge.

Epreuve de charge en nicotinamide

On administre une dose de 50 à 200 mg de nicotinamide par voie orale. Un sujet normal excrète 20 à 60 % de la dose administrée sous forme de métabolites dans les urines de 24 heures (dont 5 à 15 % sous forme de N¹-méthylnicotinamide et 40 % sous forme de N¹-méthyl-2-pyridone-5-carboxamide). Chez le sujet carencé, l'excrétion est plus faible.

Epreuve de charge en tryptophane

On administre une dose de 2 à 5 g de tryptophane par voie orale. Celui-ci est immédiatement utilisé pour la synthèse de niacine. Chez le sujet normal, on observe une augmentation de l'excrétion urinaire de N¹-méthylnicotinamide. Chez le sujet carencé, l'excrétion urinaire de N¹-méthylnicotinamide augmente peu.

CONCLUSION

La niacine occupe une place à part parmi les vitamines, à plus d'un titre. De par l'existence d'une synthèse endogène à partir du tryptophane, elle n'est pas une vitamine *stricto sensu*. L'apport exogène demeure cependant prépondérant. Elle présente des propriétés pharmacologiques originales, très différentes de son action en tant que vitamine.

Enfin, en tant que précurseur du NAD et du NADP, elle joue un rôle capital dans l'organisme mais son *turn over* extrêmement rapide rend son statut difficile à appréhender.

Références bibliographiques

- Abu-Qurshin R, Naschitz JE, Zuckermann E et al.** (1997). Crohn's disease associated with pellagra and increased excretion of 5-hydroxyindolacetic acid. *Am J Med Sci*, **313** : 111-113.
- Altschul R, Herman IH** (1955). Influence of nicotinic acid on serum cholesterol in man. *Arch Biochem Biophys*, **51** : 308-309.
- Fayol V.** Vitamine PP. In : Encyclop. Med. Chir. (1993). *Endocrinologie-Nutrition*. Editions Techniques, Paris, 10.544-A-10, 1-3.
- Figge HL, Figge J, Souney PF et al.** (1988). Nicotinic acid: a review of its clinical use in the treatment of lipid disorders. *Pharmacotherapy*, **8** : 287-294.
- Garcia I.** Niacine. In : Le Moël G, Saverot-Dauvergne A, Gousson T, Guéant JL (1998). *Le statut vitaminique*. EM Inter, Paris, 223-236.
- Gardner SF, Schneider EF, Granberry MC, Carter IR** (1996). Combination therapy with low-dose lovastatin and niacin is as effective as higher-dose lovastatin. *Pharmacotherapy*, **16** : 419-423.
- Gray DR, Morgan T, Chretien SD, Kashyap ML** (1994). Efficacy and safety of controlled-release niacin in dyslipoproteinemic veterans. *Ann Intern Med*, **121** : 252-258.
- Guilland JC.** Vitamine PP (B3 ou niacine). In : Martin A (2001). *Apports nutritionnels conseillés pour la population française*. Tec & Doc, Paris, 191-194.
- Guilland JC, Lequeu B** (1992). *Les vitamines : du nutriment au médicament*. Editions Médicales Internationales, Paris.
- Herceg A, Wang ZQ** (1999). Failure of poly (ADP-Ribose) polymerase cleavage by caspases leads to induction of necrosis and enhanced apoptosis. *Mol Cell Biol*, **19** : 5124-5133.
- Hodis HN** (1995). Reversibility of atherosclerosis-evolving perspectives from two arterial imaging clinical trials: the cholesterol lowering atherosclerosis regression study and the monitored atherosclerosis regression study. *J Cardiovasc Pharmacol*, **25** : S25-S31.
- Hiramaya D, Yoshida K, Uda K et al.** (1985). High-performance liquid chromatographic determination of N1-alkylnicotinamide in urine. *Anal Biochem*, **147** : 108-113.
- Jacobson EL, Dame AJ, Pyrek JS, Jacobson MK** (1995). Evaluating the role of niacin in human carcinogenesis. *Biochimie*, **77** : 394-398.
- Le Grusse J, Watier B.** Vitamine PP-Niacine. In : (1993). *Les vitamines : données biochimiques, nutritionnelles et cliniques*. Centre d'étude et d'information sur les vitamines. Laboratoires Roche Nicholas SA, Neuilly sur Seine, 163-181.
- La Rue A, Koehler KM, Wayne SJ et al.** (1997). Nutritional status and cognitive functioning in a normally aging sample: a 6-y reassessment. *Am J Clin Nur*, **65** : 20-29.
- Levy HL.** Hartnup disorder. In : Schriver CHR, Beaudet AL., Sly WJ, Valle D (1995). *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Mc Graw-Hill, Inc. 7^e ed., 3629-3642.
- Murray MF** (1999). Niacin as a potential AIDS preventive factor. *Medical Hypotheses*, **53** : 375-379.
- Murray MF, Langan M, MacGregor RR** (2001). Increased plasma tryptophan in HIV-infected patients treated with pharmacologic doses of nicotinamide. *Nutrition*, **17** : 654-656.

- Pontes Monteiro J, Ferreira da Cunha D, Correia Filho D et al.** (2004). Niacin metabolite excretion in alcoholic pellagra and AIDS patients with and without diarrhea. *Nutrition*, **20** : 778-782.
- Rawling JM, Apsimon MM, Kirkland JB** (1996). Lung poly (ADP-Ribose) and NAD⁺ concentrations during hyperoxia and niacin deficiency in the Fischer-344 rat. *Free Radic Biol Med*, **20** : 865-871.
- Rubensfire M et al.** (2004). Safety and compliance with once-daily niacin extended-release/lovastatin as initial therapy in the Impact of Medical Subspecialty on Patient Compliance to treatment (IMPACT) study. *Am J Cardiol*, **94** : 306-311.
- Shiba TK, Shimada H, Konto T** (1996). Effects of feeding tryptophan-limiting diets on the conversion ratio of tryptophan to niacin in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **60** : 1660-1666.
- Shibata K, Shimono T.** Nicotinic acid and nicotinamide. In : De Leenher AP, Lambert WE and De Ruyter MGM (1985). *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*. Chromatographic Sciences Series, vol 30 : Dekker M, New-York, Basel, 285-317.
- Shibata K, Kawada T, Iwai K** (1988). Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N1-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N1-methyl-4-pyridone-3-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, **424** : 23-28.
- Shibata K, Kondo T, Marugami M, Umezawa C** (1996). Increased conversion ratio of tryptophan to niacin by the administration of clofibrate, a hypolipidemic drug, to rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **60** : 1455-1459.
- Shinpo K, Fukazawa T** (1993). A case of alcoholism presenting pellagra and hypokaliemic myopathy. *Rinsho Shinkeigaku*, **33** : 1175-1178.
- Smesny S, Rosburg T, Klemm S et al.** (2004). The influence of age and gender on niacin skin test results-implications for the use as a biochemical marker in schizophrenia. *J Psychiatr Res*, **38** : 537-543.
- Staels B, Van Tol A, Fruchart JC** (1996). Effects of hypolipidemic drugs on the expression of genes involved in high density lipoprotein metabolism in the rat. *Isr J Med Sci*, **32** : 490-498.
- Takikawa K, Miyazaki K, Arita T** (1982). High-performance liquid chromatographic determination of nicotinic acid and its metabolites, nicotinuric acid and nicotinamide, in plasma. *J Chromatogr*, **233** : 343-348.
- Tang AM, Graham NM, Saah AJ** (1996). Effects of micronutrient intake on survival in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Am J Epidemiol*, **143** : 1244-1256.
- Van den Berg H** (1997). Bioavailability of niacin. *Eur J Clin Nutr*, **51** : S64-65.
- Winter SL, Boyer JL** (1973). Hepatic toxicity of large doses of vitamin B₃, (nicotinamide). *New Engl J Med*, **289** : 1180-1182.

Acide pantothénique : Vitamine B₅

Isabelle Cuvelier

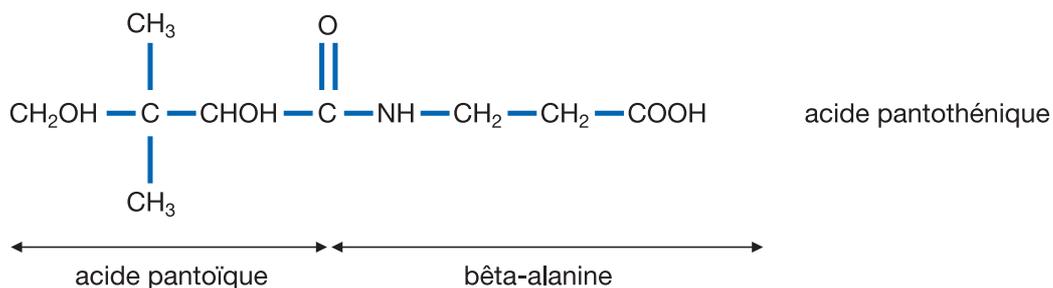
En 1933, William *et al.* extraient de tissus animaux et végétaux une substance hydrosoluble nécessaire à la croissance de *Saccharomyces cerevisiae*. Du fait de son caractère ubiquitaire, ils lui donnent le nom d'acide pantothénique (du grec *pantother*, "de toutes parts"). En 1939, la relation entre maladie pellagroïde du poulet et acide pantothénique est prouvée. C'est en 1947 que l'acide pantothénique est identifié comme l'un des composants du coenzyme A (CoA).

Une autre forme active est ensuite mise en évidence : l'*Acyl Carrier Protein* (ACP) dont le rôle est essentiel dans la synthèse des acides gras.

C'est seulement en 1976 que Fry démontre chez l'homme les conséquences métaboliques d'une carence en acide pantothénique.

STRUCTURE CHIMIQUE ET NOMENCLATURE

L'acide pantothénique a une structure linéaire ; il résulte de la combinaison d'une molécule de bêta-alanine et d'une molécule d'acide pantoïque et dérive d'une provitamine, le panthénol, forme alcool de cette vitamine.



Seule la forme dextrogyre possède une activité vitaminique.

La vitamine B₅ se présente comme un liquide jaune clair, visqueux, soluble dans l'eau et dans l'alcool. Les sels se présentent sous forme de poudre blanche, très solubles dans l'eau, stables aussi bien au contact de l'oxygène de l'air qu'à la lumière. Le pantothénol utilisé en dermatologie est une huile soluble dans l'alcool et stable en milieu acide.

MÉTABOLISME

À dose physiologique, l'acide pantothénique est absorbé par la muqueuse du grêle par un mécanisme actif, sodium-dépendant. À dose supraphysiologique, l'absorption de l'acide pantothénique met en jeu un mécanisme de diffusion passive. Dans les aliments, avant d'être absorbé, le coenzyme A doit être hydrolysé en acide pantothénique.

Dans le sang, l'acide pantothénique circule dans le plasma sous forme libre mais l'immense majorité de la vitamine B₅ se trouve à l'intérieur des globules rouges sous forme de coenzyme A. L'acide pantothénique libre est capté par les cellules qui assurent leur propre synthèse de coenzyme A et d'ACP, ces éléments ne pouvant franchir les membranes cellulaires. Toutes les cellules peuvent synthétiser du CoA à partir de l'acide pantothénique. Ce coenzyme se trouve au niveau de la mitochondrie sous forme d'acétyl-coenzyme A, qui ne peut franchir la barrière mitochondriale.

Les concentrations tissulaires de coenzyme A varient beaucoup d'un organe à l'autre et selon l'état nutritionnel. L'accumulation et la répartition de la vitamine B₅ sont sous contrôle hormonal.

Tableau 1 : Teneurs des différents tissus en coenzyme A.

	Concentration en µg/g
Foie	136
Reins	99
Cœur	78
Cerveau	68
Muscles	53

L'élimination de la vitamine se fait par voie urinaire essentiellement sous forme libre, les quantités éliminées étant proches de celles ingérées quotidiennement.

Après filtration glomérulaire, l'acide pantothénique subit une réabsorption tubulaire partielle, selon un mécanisme sodium-dépendant spécifique. Une faible proportion, totalement oxydée, serait éliminée par voie pulmonaire sous forme de CO₂

Au cours d'une alimentation pauvre en vitamine B₅, l'excrétion urinaire peut dépasser l'apport journalier et entraîner un état précairenciel (Fox et Linkswiler, 1961).

La demi-vie de l'acide pantothénique est inconnue.

SOURCES ET APPORTS

L'acide pantothénique se trouve dans la plupart des aliments aussi bien d'origine animale que végétale. On suppose que les viandes, les poissons et les œufs fournissent l'essentiel de la vitamine.

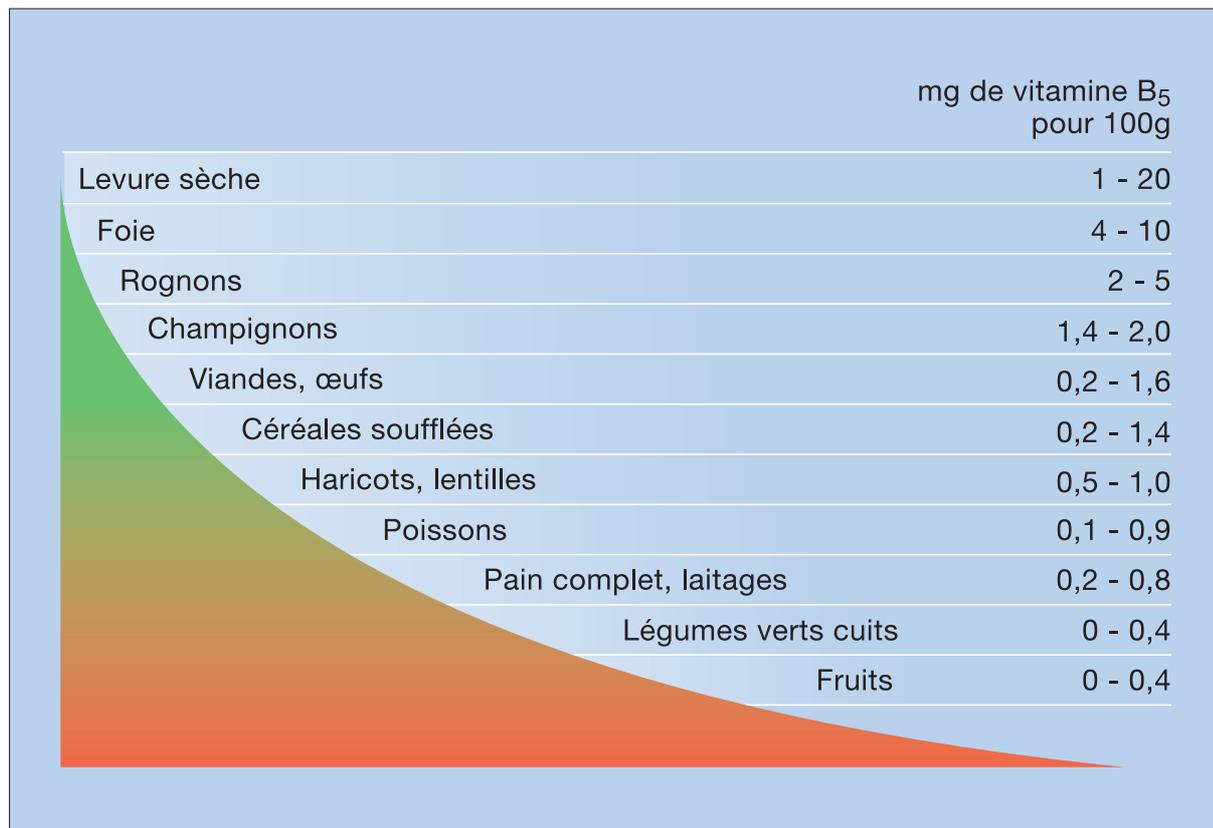


Figure 1 : Sources alimentaires de vitamine B₅.

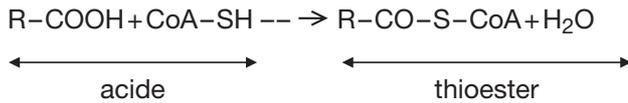
Les pertes dues à la transformation des aliments, leur cuisson ou leur stockage ne sont pas négligeables : 20 à 40 % disparaîtraient durant la cuisson des aliments. Cependant, la vitamine B₅ étant présente dans de nombreux aliments de consommation courante, il est exceptionnel de trouver des états purs de carence sauf en cas de malnutrition sévère. En réalité, le statut vitaminique est très peu étudié dans les enquêtes alimentaires d'autant qu'une telle évaluation est délicate ; la situation des populations n'est peut être pas aussi satisfaisante que supposé. Les rares études américaines montrent une absorption quotidienne de 7 mg/jour, ce chiffre moyen recouvrant certainement une vaste étendue d'apports.

Les besoins en acide pantothénique sont accrus par le stress, l'alcool, le diabète insulino-dépendant ainsi que pendant la grossesse.

PHYSIOLOGIE

Les formes biologiquement actives de la vitamine B₅ sont le coenzyme A (CoA) et l'*Acyl Carrier Protein* (ACP), tous deux transporteurs de radicaux acyles (R-COO⁻).

Entre les groupes thiols (SH-) de ces molécules et un acide organique (R-COOH), se forme un thioester activé selon la réaction :



Puis, un transfert sur l'ACP :



Rôle du coenzyme A

Intermédiaires métaboliques

Le coenzyme A entre dans la composition de plusieurs intermédiaires métaboliques : l'acétyl-CoA, le propionyl-CoA, le succinyl-CoA et le malonyl-CoA.

• Acétyl-coenzyme A

Il est le plus important car c'est un véritable carrefour du métabolisme cellulaire. Il provient essentiellement des glucides, acides gras et acides aminés.

Trois sources principales coexistent :

- la dégradation du glucose, par l'intermédiaire du pyruvate. Cette réaction implique également les vitamines B₁ et PP.
- la dégradation des acides gras par la β-oxydation qui, à chaque tour de l'hélice de Lynen, produit un acétyl-coenzyme A et un acide gras avec deux atomes de carbone en moins et ce, jusqu'à dégradation complète.
- la dégradation des acides aminés comme le tryptophane, la leucine, l'isoleucine et la lysine.

- Cycle de Krebs

Le premier devenir de l'acétyl-CoA est d'entrer dans le cycle de Krebs pour la production d'énergie selon la réaction : oxaloacétate + acétyl - CoA → citrate + CoA-SH

- Participation à plusieurs synthèses :

Synthèse de l'acétylcholine à partir de la choline.

Synthèse du malonyl-CoA, point de départ de la synthèse des acides gras

Synthèse de l'acétyl-CoA point de départ de la cétogenèse et de la synthèse du cholestérol.

• Propionyl-Coenzyme A

Il provient de la dégradation des acides gras à nombre impair de carbone et rejoint la chaîne métabolique du succinyl coenzyme A.

- **Succinyl-Coenzyme A**

Il s'agit d'un intermédiaire du cycle de Krebs qui participe également à la synthèse de l'hémoglobine conjointement à la vitamine B₆.

Rôle de l'ACP (Acyl Carrier Protein)

L'ACP fait partie d'un complexe enzymatique : l'acide gras synthase, qui comprend sept enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras au niveau cytoplasmique.

L'ensemble de ces réactions enzymatiques aboutit à la formation d'un acide gras à quatre atomes de carbone : l'acide butyrique. Chaque série de six réactions conduit à l'allongement de la chaîne de deux atomes de carbone pour synthétiser l'acide palmitique qui sera libéré par la septième enzyme.

MÉTHODES D'EXPLORATION

Acide pantothénique libre et total

L'exploration biologique du statut en vitamine B₅ n'est pas très développée, les carences étant très peu fréquentes. Les études du statut vitaminiq ue utilisent le plus souvent le dosage de la vitamine libre urinaire associé au dosage dans les érythrocytes et le sang total de l'acide pantothénique libre et lié.

Il est nécessaire de pouvoir travailler sur divers liquides biologiques comme le sang total, les urines mais aussi le lait ou même sur des extraits tissulaires et plusieurs techniques ont été adaptées.

La faible stabilité de la molécule à la chaleur demande une congélation rapide des prélèvements à -20 °C après préparation : centrifugation, préparation des culots globulaires... effectués de préférence dans une enceinte réfrigérée.

Hydrolyse enzymatique

Afin de mesurer l'acide pantothénique total mais également la forme libre, il est nécessaire de réaliser au préalable une hydrolyse qui ne peut qu'être enzymatique, la molécule étant très instable en présence d'acides ou de bases fortes.

Cette hydrolyse peut avoir lieu en milieu alcalin, en présence le plus souvent de phosphatase alcaline d'intestin de veau (Morton, 1955) et de pantéthéinase (Wittwer *et al.*, 1983).

En milieu acide, il est possible d'utiliser d'autres enzymes mais leur activité est beaucoup moins spécifique. De même, peuvent être mises à profit les activités hydrolytiques endogènes des tissus. C'est ainsi que dès 1962 Hatane observe que la simple incubation du sang total 48 h à 37 °C permet la libération de 60 % de son contenu en acide pantothénique. En 1989, Wittwer *et al.* montrent que la pantéthéinase plasmatique endogène suffit à libérer la vitamine B₅ de ses liaisons au sein de l'hémolysat.

Technique microbiologique de dosage

Cette technique permet de doser l'acide pantothénique dans les milieux biologiques et dans les produits alimentaires. Elle fait appel à *Lactobacillus plantarum* ; le protocole de Fidanza (1991) lui octroie une excellente spécificité et une bonne sensibilité (de l'ordre de 50 µg/l), ce qui permet de doser les formes libres dans de faibles quantités d'échantillons. Cependant, sa reproductibilité est médiocre (CV > 17 %) et le délai technique important.

Dosages radio-immunologiques et de type ELISA

Des dosages radio-immunologiques furent décrites par Walsh *et al.*, en 1979 et en 1981 ; des techniques de type ELISA furent décrites par Morris *et al.* en 1988 et par Gonthier *et al.* en 1998. Ces techniques sont toutes basées sur le même principe : la compétition par des anticorps spécifiques de l'acide pantothénique entre la vitamine B₅ de l'échantillon et une vitamine B₅ soit radio-marquée soit fixée sur un support solide. Les résultats semblent concorder avec ceux de la technique microbiologique, mais rien ne peut garantir leur spécificité en raison de la possibilité de réactions croisées principalement sur les matrices alimentaires. De plus, ces méthodes présentent des inconvénients sur le plan pratique : usage de radio-isotopes et acquisition d'antisérums non disponibles dans le commerce.

Méthodes colorimétriques et fluorimétriques

Elles sont nombreuses : formation d'un sel de l'acide hydroxamique puis d'un complexe coloré en présence d'ions ferriques qui sera mesuré par photométrie (Bergmann, 1952) mais aussi réaction de la bêta-alanine avec différents réactifs (Crokaert, 1949 ; Szalkowski *et al.*, 1951). Toutes ces réactions manquent de spécificité.

Méthodes chromatographiques et électrophorétiques

Elles sont peu développées en raison des propriétés physiques particulières de l'acide pantothénique : molécule peu volatile, non fluorescente et absorbant peu dans le domaine ultra violet.

Schreiner *et al.* (2003) décrivent une méthode par électrophorèse capillaire et Sadecka *et al.* (2003) une méthode par isotachophorèse. Cependant, ces deux équipes n'ont analysé que des produits alimentaires complémentés.

La chromatographie liquide haute performance couplée à une détection UV est d'utilisation limitée en raison de sa sensibilité insuffisante dans le cas du plasma et des urines. Cependant, Pakin (2004) propose un mode de dérivation de l'acide pantothénique en un composé fluorescent avant une technique de CLHP couplée à la fluorimétrie.

Coenzyme A et dérivés

Le dosage du CoA et de ses dérivés présente l'avantage de donner une information fonctionnelle sur le métabolisme cellulaire. Ceci reste toutefois du domaine de la recherche clinique.

Les premières techniques décrites sont enzymatiques (Garland *et al.*, 1965 ; Knights et Drew, 1988) et restent toujours d'actualité. Cependant, l'exploration chromatographique (Corkey *et al.*, 1981 ; Hosokawa *et al.*, 1986) permet d'accéder à l'ensemble des esters du coenzyme A.

VARIATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES

Variations physiologiques

L'exploration du statut biologique de la vitamine B₅ n'est que peu utilisée puisque les carences sont rares.

Dans le sang total, la concentration normale de l'acide pantothénique varie de 1 à 2 mg/l. Un résultat inférieur à 1 mg/l pourrait signer un déficit d'apport, mais le dosage sanguin n'est pas un bon index d'état de carence. Le dosage dans les urines lui est préféré, puisque l'excrétion urinaire journalière est corrélée aux apports alimentaires estimés (Cohenour et Calloway, 1972 ; Eissenstat *et al.*, 1986).

- **Femme enceinte au troisième trimestre de la grossesse**

Des concentrations sanguines basses sont rapportées chez la femme enceinte au troisième trimestre de la grossesse.

- **Intoxication alcoolique**

On note une diminution de la concentration circulante et de l'élimination urinaire de la vitamine B₅ en cas d'intoxication alcoolique. Bonjour, en 1980, relie cette diminution à un déficit d'apport chez des sujets malnutris de façon chronique. Mais, il n'exclut pas un problème métabolique spécifiquement lié à l'ingestion d'alcool qui pourrait être une diminution de la conversion de l'acide pantothénique en coenzyme A (Israël et Smith, 1987).

- **Traitements par l'acide valproïque**

Au cours des traitements par l'acide valproïque, Thurston et Hauhart (1993a) démontrent chez le rat une chute du contenu hépatique en CoASH et en acétyl-CoA. Selon ces mêmes auteurs (1993b), cette carence serait à l'origine d'une importante perturbation du métabolisme des acides gras susceptible de majorer le risque de malformations fœtales. Chez les femmes enceintes, une "supplémentation" par la vitamine B₅ pourrait prévenir d'éventuelles malformations fœtales.

Carence

Physiopathologie

L'acide pantothénique étant une vitamine ubiquitaire, les états de carence sont exceptionnels et jamais purs.

Ils ne résultent que d'une diminution des apports alimentaires et ce, de façon globale et importante, telle que lors d'une famine dans les pays en voie de développement.

Dans les pays industrialisés, on n'observe pas de signes cliniques de carence. Cependant, la nutrition parentérale non supplémentée peut être une situation de diminution importante des apports.

Enfin, il n'existe pas de maladie héréditaire du métabolisme de l'acide pantothénique ou du coenzyme A probablement parce que ces anomalies ne sont pas compatibles avec la vie.

Les carences expérimentales sont cependant aisées à créer par un régime dépourvu de vitamine B₅ associé à un antagoniste de cette vitamine : l'acide oméga-méthylpantothénique (Bean *et al.*, 1955).

Clinique

Les symptômes de carence apparaissent après deux à trois semaines de régime et sont principalement :

- des signes généraux : asthénie.
- des signes digestifs : nausée, vomissements et douleurs abdominales. On observe souvent une duodénite avec ulcères gastro-duodénaux.
- des signes cutanés : alopecie et ulcérations.
- des signes neurologiques : céphalées, dépression, paresthésies, douleurs et brûlures des extrémités.
- des troubles cardio-vasculaires inconstants : arythmie, hypotension orthostatique.
- des troubles infectieux tels qu'angine, rhinopharyngite.

Sur le plan biologique, des anomalies ont été décrites au cours des carences expérimentales (Bean *et al.*, 1951 ; Hodges *et al.*, 1958) :

- diminution de l'excrétion urinaire d'acide pantothénique.
- diminution de l'excrétion urinaire de potassium.
- augmentation de la vitesse de sédimentation.
- diminution des gamma globulines.

Chez l'animal, une diminution des taux circulants des lipides neutres et du cholestérol estérifié a été observée (Carter et Hockaday, 1962) ; mais, celle-ci n'a pas été retrouvée chez l'homme. Cependant, on a pu retrouver une anomalie du métabolisme des acides gras (Matsumoto *et al.*, 1991) avec apparition d'un syndrome de Reye biologique : hypoglycémie, hyper-ammoniémie et augmentation des acides lactique et pyruvique.

Epidémiologie

→ Intoxication alcoolique

La diminution de la concentration sérique et urinaire de l'acide pantothénique chez les alcooliques peut être rapportée à un déficit d'apport consécutif à la malnutrition chronique. Cependant, Bonjour (1980) n'exclut pas l'existence d'un problème métabolique lié spécifiquement à l'ingestion d'alcool. Des études expérimentales menées par Israël et Smith (1987) montrent chez le rat une diminution de l'acide pantothénique et de CoA dans le myocarde lors de l'ingestion chronique d'éthanol.

→ Déficit en vitamine B₁₂

→ Traitement par l'acide valproïque

L'hépatotoxicité de l'acide valproïque est connue et pourrait être due à la diminution du taux de l'acétyl-CoA intrahépatique (Thurston et Hauhart, 1993 a). De même, cette carence entraînerait une forte perturbation du métabolisme des acides gras avec majoration du risque de malformations fœtales (Thurston et Hauhart, 1993 b). Chez les femmes enceintes traitées par acide valproïque, une supplémentation en acide pantothénique diminuerait ce risque.

TRAITEMENT

Traitement curatif

Dans les grandes dénutritions et particulièrement dans le syndrome des pieds brûlants, la vitamine B₅ est administrée à la dose de 300 à 500 mg/j en association avec d'autres vitamines.

Traitement préventif

Une alimentation suffisante suffit à couvrir les besoins en vitamine B₅. Cependant, une nutrition parentérale non supplémentée peut réaliser une situation de carence d'apport. La dose recommandée est alors d'environ 0,2 mg/kg/ jour chez l'adulte.

Autres indications

- ***Polyarthrite rhumatoïde***

Dans la polyarthrite rhumatoïde, l'utilisation de fortes doses d'acide pantothénique n'a pas de retentissement sur l'évolution de la maladie mais permet de diminuer la symptomatologie fonctionnelle : raideur matinale, douleur, impotence.

- ***Troubles trophiques des ongles***

En dermatologie, on utilise l'acide pantothénique dans les alopécies diffuses associé à la biotine et dans les troubles trophiques des ongles.

- ***Inflammations chroniques des voies respiratoires supérieures***

La vitamine B₅ est utilisée dans les inflammations chroniques des voies respiratoires supérieures.

- ***Troubles paresthésiques des extrémités***

On peut la prescrire dans le cas de troubles paresthésiques des extrémités, pour ses propriétés cicatrisantes.

L'acide pantothénique n'est pas toxique. Cependant des doses très élevées peuvent entraîner des diarrhées.

Références bibliographiques

- Bean WB, Hodges RE, Daum K** (1955). Pantothenic acid deficiency induced in human subjects. *J Clin Invest*, **34** : 1073-1084.
- Bergmann F** (1952). Colorimetric determination of amides as hydroxamic acids. *Anal Chem*, **24** : 1367-1369.
- Bonjour JP** (1980). Vitamins and alcoholism. V. Riboflavin, VI. Niacin, VII. Pantothenic acid and VIII. Biotin *Int J Vitam Nutr Res*, **50** : 425-440.
- Carter CW, Hockaday TD** (1962). Liver lipids and ketone-body formation in rats deficient in pantothenate. *Biochem J*, **84** : 275-280.
- Cohenour SH, Calloway DH** (1972). Blood, urine, and dietary pantothenic acid levels of pregnant teenagers. *Am J Clin Nutr*, **25** : 512-517.
- Corkey BE, Brandt M, Williams RJ et al.** (1981). Assay of short-chain acyl coenzyme A intermediates in tissue extracts by high pressure liquid chromatography. *Anal Biochem*, **118** : 30-41.
- Crokaert R** (1949). Chemical determination of pantothenic acid. *Bull Soc Chim Biol*, **31** : 903-907.
- Fidanza MD** (1991). Nutritional status assessment. Chapman et Hall, London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras
- Eissenstat BR, Wyse W, Hansen RG et al.** (1986). Pantothenic acid status of adolescents. *Am J Clin Nutr*, **44** : 931-937.
- Fox HM, Linkswiler H** (1961). Pantothenic acid excretion on three levels of intake. *J Nutr*, **75** : 451-454.
- Garland PB, Shepherd D, Yates DW** (1965). Steady-state concentrations of coenzyme A, acetyl-coenzyme A, and long chain fatty acyl coenzyme A in rat-liver mitochondria oxidizing palmitate. *Biochem J*, **97** : 587-594.
- Gonthier A, Boullanger P, Fayol V, Hartmann DJ** (1998,a). Developpement of an ELISA for pantothenic acid (Vitamin B₅) for application in the nutrition and biological fields. *J Immunoass*, **19** : 167-194
- Gonthier A, Fayol V, Viollet J, Hartmann DJ** (1998,b). Determination of pantothenic acid in foods: influence of the extraction method. *Food Chem*, **63** : 287-294.
- Hodges RE, Ohlson MA, Bean WB** (1958). Pantothenic acid deficiency in man. *J Clin Invest*, **37** : 1642-1656.
- Hosokawa Y, Shimomura Y, Harris RA, Ozawa T** (1986). Determination of short-chain acylcoenzyme A esters by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, **153** : 45-49.
- Israel BC, Smith CM** (1987). Effects of acute and chronic ethanol ingestion on pantothenate and CoA status of rats. *J Nutr*, **117** : 443-451.
- Knights KM, Drew R** (1988). A radioisotopic assay of picomolar concentrations of coenzyme A in liver tissue. *Anal Biochem*, **168** : 94-99.
- Le Grusse J, Watier B** (1993). Les vitamines, données biochimiques, nutritionnelles et cliniques - *Centre d'études et d'information sur les vitamines*. Neuilly sur Seine.
- Matsumoto M, Kuhara T, Inoue Y et al.** (1991). Abnormal fatty acid metabolism in patients in hopantenate therapy during clinical episodes. *J Chromatogr*, **562** : 139-145.
- Morris H, Finglas P, Faulks R, Morgan M** (1988). The developpement of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the analysis of pantothenic acid acids and analogs. Part I. Production of antibodies and establishment of ELISA systems. *J Micronutr Anal*, **4** : 33-45.

Morton RK (1955). The substrate specificity and inhibition of alkaline phosphatases of cow's milk and calf intestinal mucosa . *Biochem J*, **61** : 232-240.

Pakin C. Le dosage de vitamines du groupe B (acide pantothénique et cobalamines) dans les aliments après isolement chromatographique et détection fluorimétrique. Thèse pour le grade de docteur des universités, Strasbourg, 2004

Sadecka J, Karasova G, Polonsky J (2003). Determination of pantothenic acid in food by capillary isotachopheresis. *Eur Food Res Technol*, **216** : 440-444.

Schreiner M, Razzazi E, Luf W (2003). Determination of water soluble vitamins in soft drinks and vitamin supplements using capillary electrophoresis. *Nahrung/Food*, **47**: 243-247.

Szalkowski CR, Mader WJ, Frediani HA (1951). Chemical determination of calcium pantothenate. *Cereal Chem*, **20** : 218-225.

Thurston JH, Hauhart RE (1993a). Reversal of the adverse chronic effects of the unsaturated derivative of valproic acid-2-n-propyl-4-pentenoic acid on ketogenesis and liver coenzymeA metabolism by a single injection of pantothenate, carnitine and acetylcysteine in developing mice. *Pediatr Res*, **33** : 72-76.

Thurston JH, Hauhart RE (1993b). Vitamins to prevent neural-tube defects. *N Engl J Med*, **328** : 1641-1642.

Walsh JH, Wyse B, Hansen G (1979). A comparison of microbiological and radioimmunoassay methods for the determination of pantothenic acid in foods. *J Food Biochem*, **3** : 175-189.

Walsh JH, Wyse B, Hansen G (1981). Pantothenic acid content of 75 processed and cooked foods. *J Am Diet Assoc*, **78** : 140-144.

Wittwer C, Burkhard D, Ririe K et al. (1983). Purification and properties of a pantothenic acid-hydrolyzing enzyme from pig kidney. *J Biol Chem*, **258** : 9733-9738.

Vitamine B₆

Jocelyne Draï, Isabelle Garcia

En 1934, György découvre, dans un extrait de levure, un facteur permettant de guérir une dermatite pellagroïde du rat et lui donne le nom de vitamine B₆.

STRUCTURE CHIMIQUE ET PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES

Structure chimique et nomenclature

Le terme "vitamine B₆" regroupe différentes substances, toutes dérivées de la 3-hydroxy-2-méthylpyridine. Celles-ci se distinguent par le groupement R1 situé en position 4, qui peut être alcool [pyridoxol ou pyridoxine (PN)], aldéhyde [pyridoxal (PL)] ou amine [pyridoxamine (PM)] ; ces substances sont rapidement interconvertibles. La formule brute de la pyridoxine est C₈H₁₁O₃N, son poids moléculaire de 169 (Figure 1).

Les trois formes vitaminiques peuvent être phosphorylées en position 5 en donnant le phosphate de pyridoxine (PNP), le phosphate de pyridoxal (PLP) et le phosphate de pyridoxamine (PMP). On reconnaît au phosphate de pyridoxal un rôle métabolique important lié à son activité en tant que coenzyme, le PMP étant plutôt une forme de stockage.

L'acide 4-pyridoxique (4-PA), le principal catabolite de la vitamine B₆, correspond à la forme carbazone obtenue par la liaison entre la fonction carboxylique en C4 et la chaîne hydroxyméthyle en C5.

Propriétés physicochimiques

Les molécules du groupe de la vitamine B₆ sont des poudres cristallines blanches ou sensiblement blanches, facilement solubles dans l'eau (sauf l'acide 4-pyridoxique), peu solubles dans l'éthanol, pratiquement insolubles dans le diéthyléther et le chloroforme.

Les solutions aqueuses sont transparentes et incolores, excepté les solutions de phosphate de pyridoxal (PLP) qui sont jaunes et peu stables en milieu neutre ou alcalin (Hervé, 1998).

Ces molécules sont dégradées par la lumière.

Les différentes formes – PL, PM et PN, et les formes phosphorylées correspondantes – présentent en milieu chlorhydrique à 0,1 M un spectre UV dont le maximum d'absorption se situe vers 290 nm.

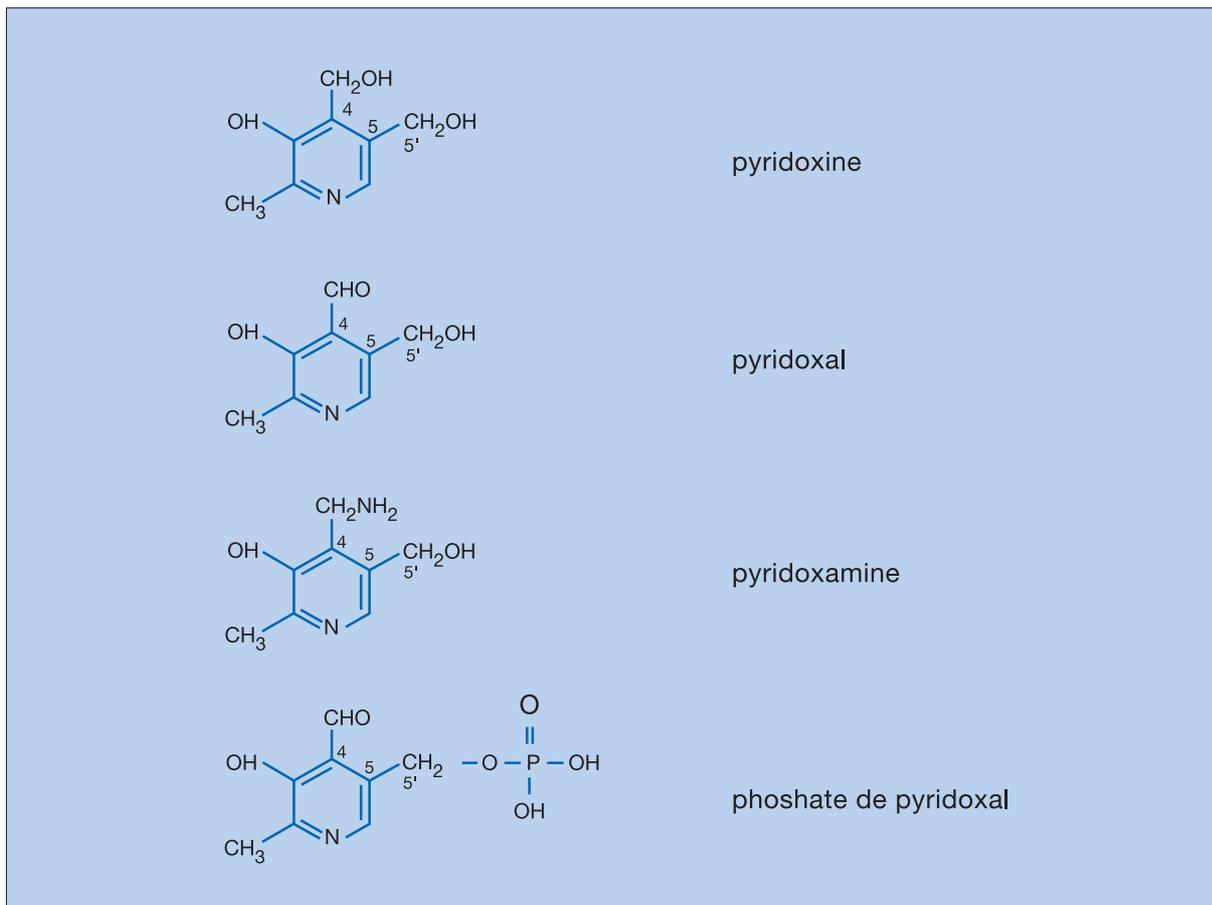


Figure 1 : Structure chimique des formes vitaminiques B₆.

Les spectres à pH 7 montrent pour PN, PM, PNP et PMP deux *maximums* d'absorption à 253 et 325 nm, tandis que PL et PLP absorbent de façon spécifique à 390 nm.

Les propriétés de fluorescence des différentes formes vitaminiques B₆ ont été utilisées pour le dosage par CLHP de la vitamine B₆. Cette fluorescence est importante en milieu peu acide à neutre, ainsi qu'en milieu très basique pour PL, PN et PNP, PM et PMP. Pour augmenter cette fluorescence, l'adjonction de différentes molécules chimiques a été utilisée. Le produit de condensation entre la PN et le 2,6 dibromo-quinone-4-chlorimide ou le 2,6-dichloroquinone-4-chlorimide absorbe à 650 nm.

D'autres produits de condensation fluorescents peuvent être aussi obtenus par adjonction de cyanure de potassium, de métabisulfite de sodium ou d'un semicarbazide.

Absorption

La vitamine B₆ est présente dans l'alimentation sous les trois formes (alcool, aldéhyde ou amine) phosphorylées ou non, en grande partie liée aux protéines et aux glucides.

La vitamine B₆ est libérée des protéines alimentaires et les formes phosphorylées sont hydrolysées par une phosphatase intestinale avant d'être absorbées au niveau du jéjunum proximal. La forme glycoside est absorbée directement ou après hydrolyse partielle par une glucosidase intestinale.

Les trois formes (PL, PN, PM) pénètrent dans l'entérocyte par un mécanisme de diffusion passive non saturable où elles subissent des réactions de phosphorylation suivies de réactions de déphosphorylation avant de quitter la cellule intestinale pour gagner la circulation portale jusqu'au foie (figure 2). La vitamine B₆ synthétisée par la flore colique n'est pratiquement pas absorbée.

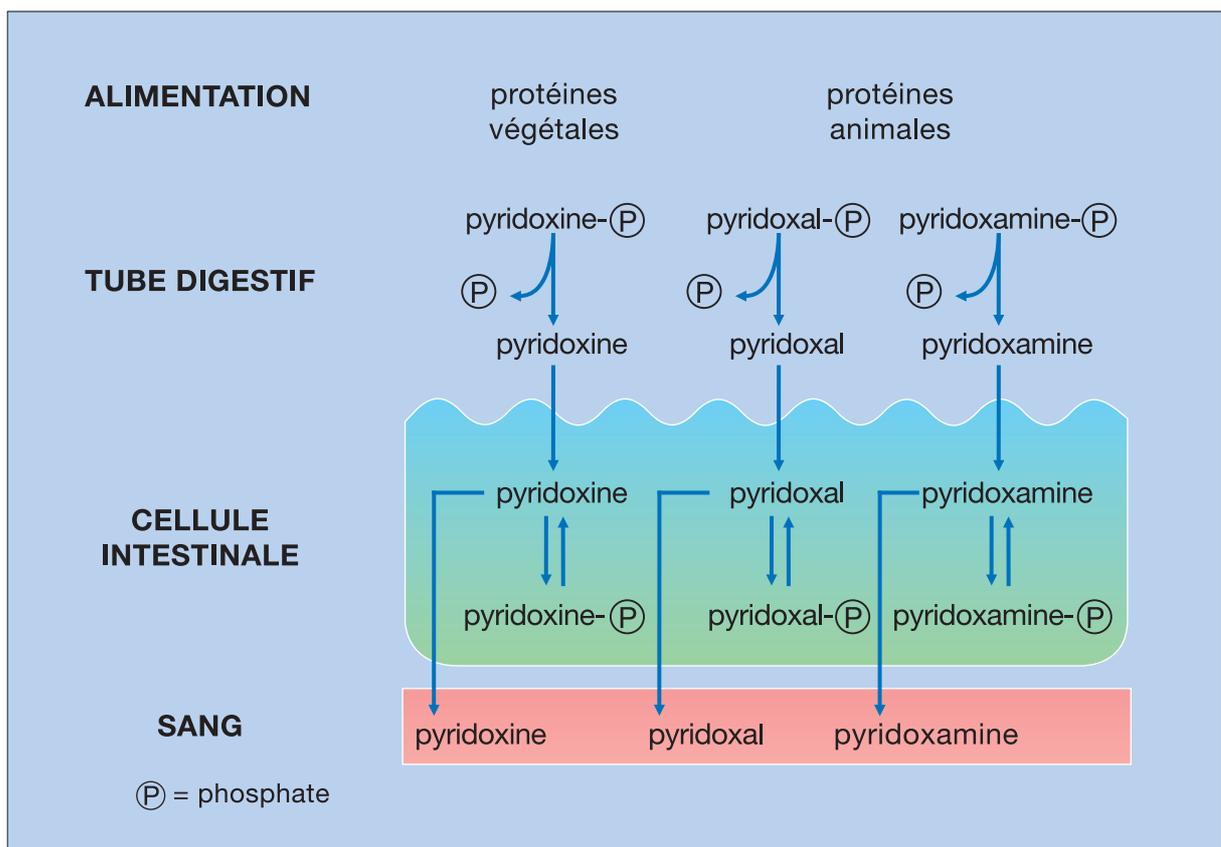


Figure 2 : Absorption de la vitamine B₆ (d'après Le Grusse et Watier, 1995).

Métabolisme

Les 3 formes vitaminiques (PN, PL, PM) pénètrent dans la cellule hépatique par diffusion passive puis sont transformées en phosphate de pyridoxal (PLP), le coenzyme actif. Cette transformation a lieu d'une part sous l'action de la pyridoxal kinase, qui permet la phosphorylation au niveau de tous les tissus, et d'autre part sous l'action de la pyridoxine oxydase, qui catalyse la transformation du phosphate de pyridoxine et du phosphate de pyridoxamine en phosphate de pyridoxal. Cette dernière enzyme, FMN dépendante, est présente essentiellement au niveau hépatique, expliquant le rôle central du foie dans le métabolisme de la vitamine B₆ (Figure 3).

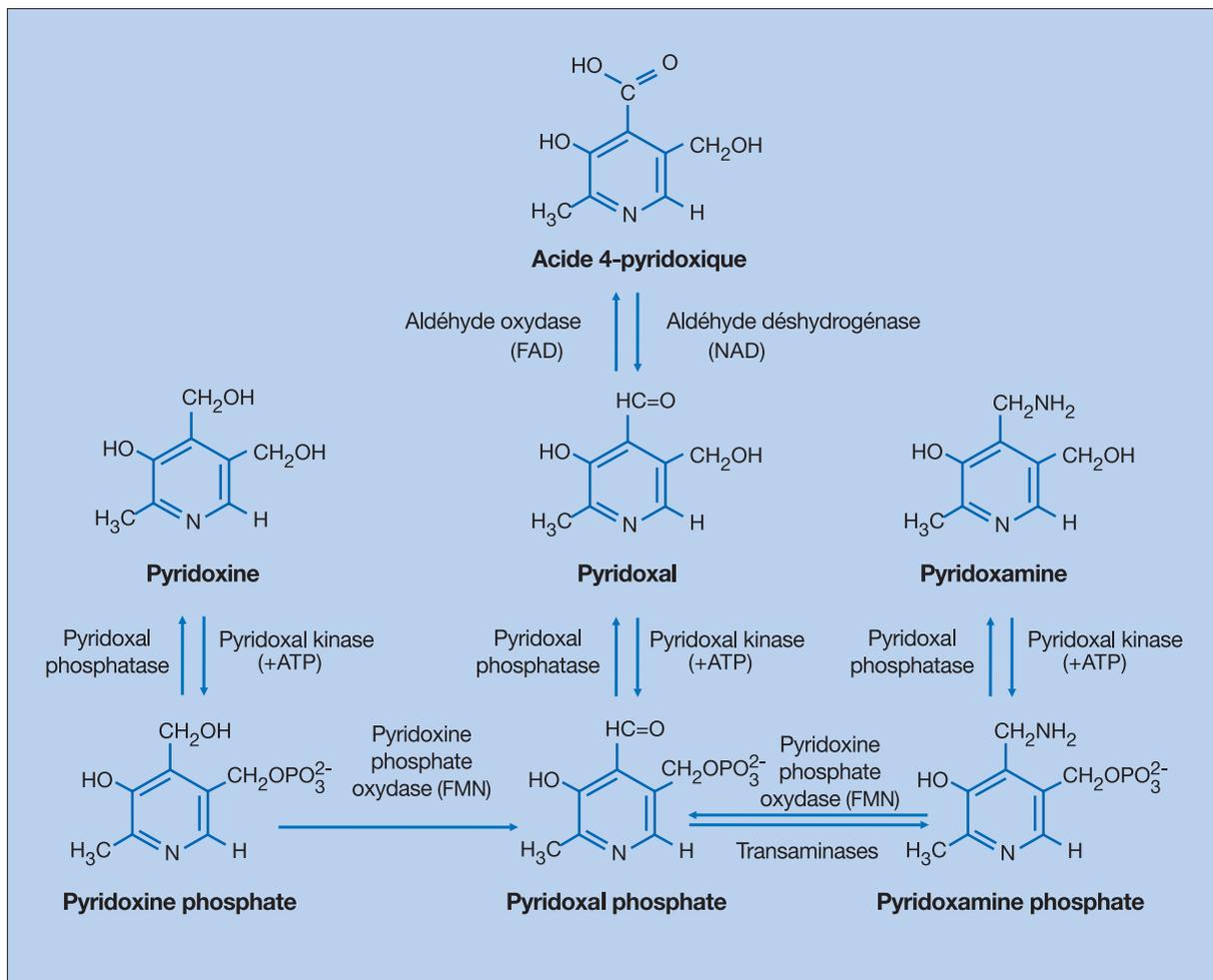


Figure 3 : Interconversion des différentes formes de la vitamine B₆.

Distribution

Dans le sang, la vitamine B₆ est retrouvée sous forme de phosphate de pyridoxal au niveau plasmatique (54 %) liée à l'albumine et au niveau des érythrocytes liée à l'hémoglobine (Figure 4).

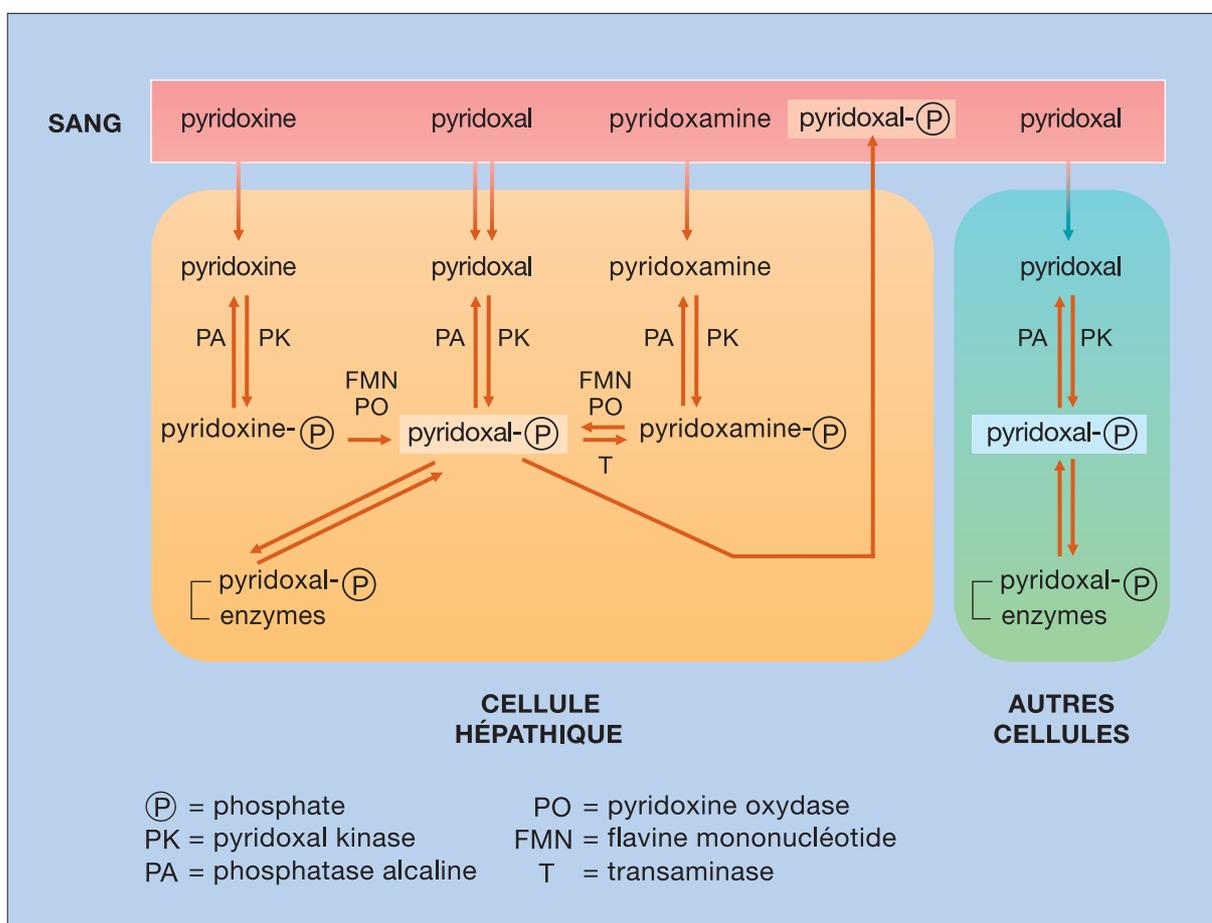


Figure 4 : Distribution de la vitamine B₆ (Le Grusse et Watier, 1995)

Du foie, la vitamine B₆ diffuse vers tous les tissus. Elle est essentiellement présente au niveau du cerveau, des reins, de la rate, et au niveau du muscle sous forme de phosphate de pyridoxal lié à la glycogène phosphorylase.

Élimination

La vitamine B₆, hydrosoluble, est éliminée par voie urinaire après transformation en acide 4-pyridoxique dans le foie et le rein. On trouve également dans les urines du pyridoxal en très faible quantité.

RÔLES FONCTIONNELS ET INTÉRÊT PHYSIOPATHOLOGIQUE

La vitamine B₆, sous ses formes phosphate de pyridoxal et phosphate de pyridoxamine, intervient en tant que cofacteur enzymatique dans de nombreuses réactions biochimiques, et en tant que régulateur de l'expression génique.

Le coenzyme est présent sous forme de groupement prosthétique fixé à de nombreuses enzymes intervenant dans le métabolisme des aminoacides.

Mécanisme d'action

Les réactions enzymatiques faisant intervenir le phosphate de pyridoxal comme coenzyme se réalisent en 3 étapes successives (Figure 5) :

- Formation d'une base de Schiff (aldimine) entre la fonction aldéhyde (-CHO) en C4 de la vitamine B₆ et le résidu lysine spécifique du site actif de l'enzyme. Le phosphate de pyridoxal forme de la même façon une imine (aldimine ou base de Schiff) en liant sa fonction aldéhyde en C4 avec la fonction amine des acides aminés.
- Cette imine va subir une rupture au niveau du carbone α avec formation d'une imine transitionnelle.
- Puis l'imine transitionnelle est hydrolysée en libérant le produit de la réaction avec régénération du phosphate de pyridoxal (PLP).

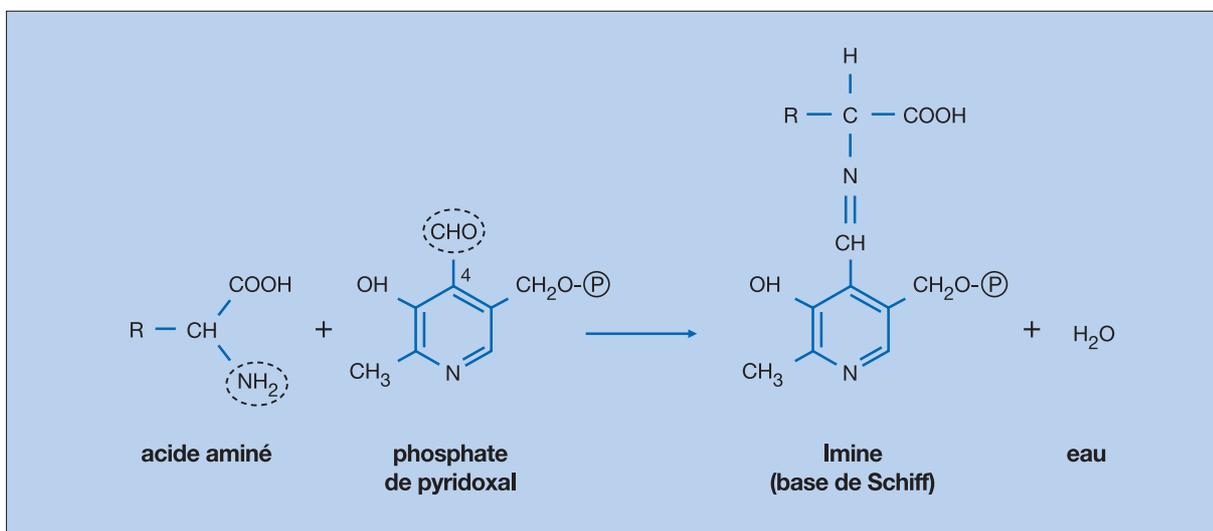


Figure 5 : Formation de la base de Schiff

Enzymes PLP dépendantes

Transaminases

Les transaminases catalysent l'interconversion des acides aminés en oxo-acides par transfert d'un groupe NH_2 . La transamination s'effectue selon la réaction suivante (Figure 6) :

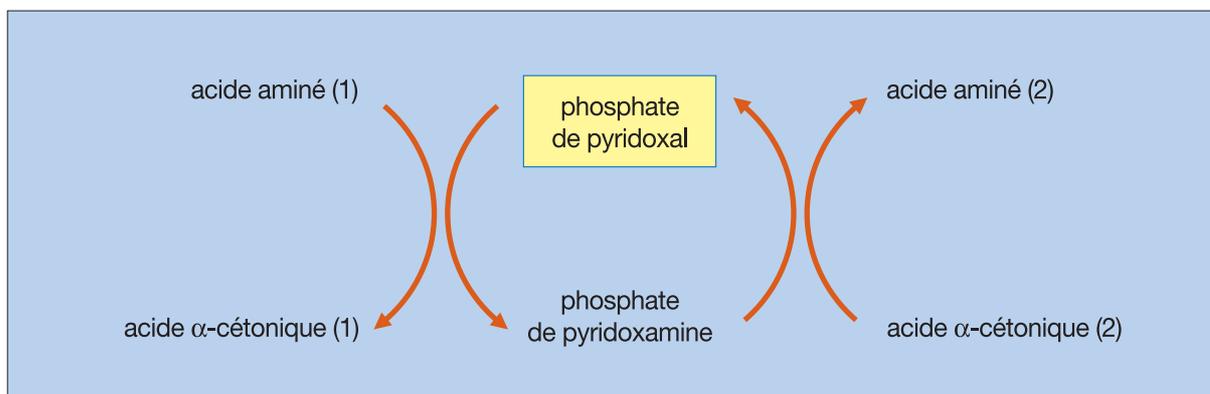


Figure 6 : Réaction de transamination (d'après Le Grusse et Watier, 1995).

Tous les acides aminés, à l'exception de la lysine, peuvent subir une transamination réversible - le rôle de donneur de NH_2 étant assuré le plus souvent par l'acide glutamique, l'acide aspartique ou l'alanine. Deux transaminases sont particulièrement importantes, la transaminase glutamate pyruvate (TGP), ou alanine aminotransférase (ALAT), et la transaminase glutamate oxaloacétate (TGO), ou aspartate aminotransférase (ASAT). La TGP est abondante dans le foie et la TGO dans le myocarde ; leurs taux plasmatiques augmentent en cas de nécrose de ces tissus. Ces réactions de transamination sont réversibles et essentielles dans le métabolisme des acides aminés. Elles participent aussi à la synthèse des glucides (néoglucogenèse) par l'intermédiaire des acides aminés glycoformateurs.

Déshydratases

Elles catalysent la déshydratation des acides aminés, première réaction d'un processus complexe qui conduit à la désamination des acides aminés (exemple : transformation de la sérine en acide pyruvique).

Transsulfurases

Ces enzymes assurent le transfert d'un groupement thiol (SH). Elles interviennent entre autre dans le métabolisme de l'homocystéine.

Le phosphate de pyridoxal joue le rôle de coenzyme dans la transformation de l'homocystéine en cystathionine sous l'influence de la cystathionine β - synthase (CBS) et dans la transformation de la cystathionine en cystéine sous l'influence de la cystathionase (Figure 7).

L'homocystinurie, maladie héréditaire, est caractérisée biochimiquement par une élévation de l'homocystéine et de la méthionine dans le plasma et par une diminution de la cystéine, conséquences d'un déficit en cystathionine β -synthase. Cliniquement, on observe des thromboses qui seraient la conséquence de l'accumulation d'homocystéine dans les cellules endothéliales.

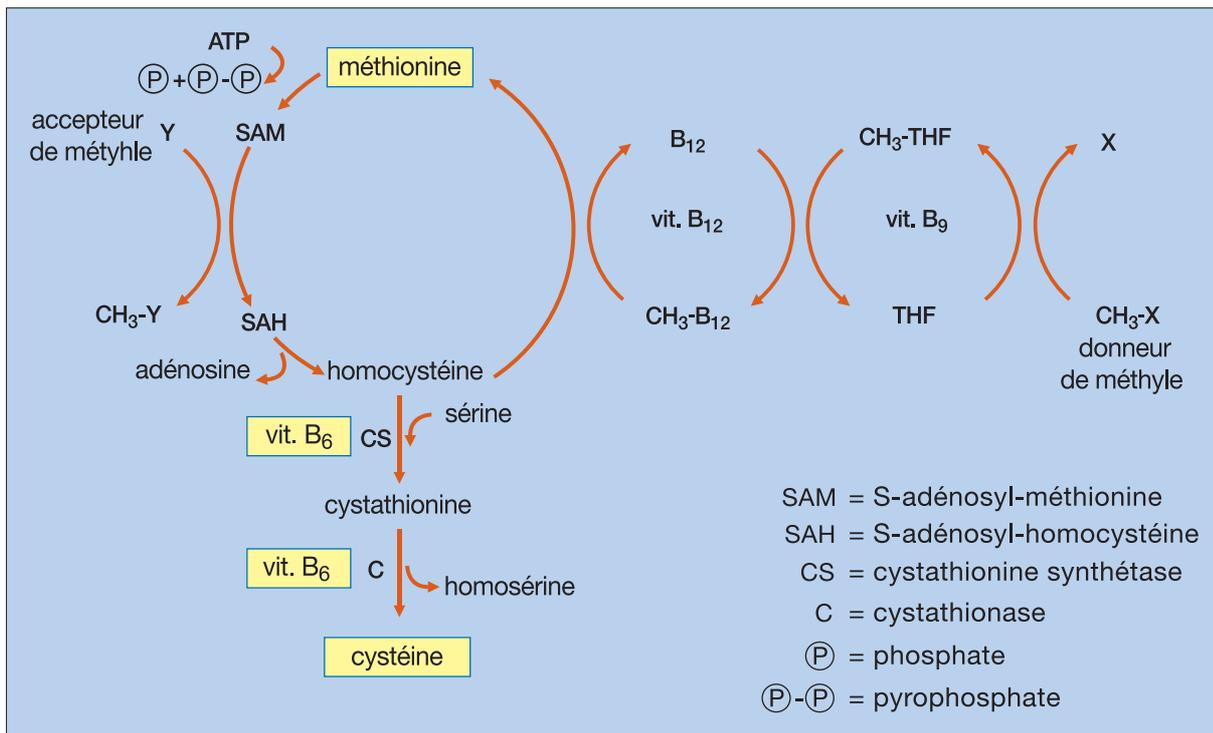


Figure 7 : Métabolisme de l'homocystéine.

La supplémentation en vitamine B₆ ainsi que celle en acide folique, en vitamine B₁₂ et bétaine, abaissent l'homocystéinémie. La vitamine B₆ aurait, au moins partiellement, un effet protecteur vis-à-vis du développement des lésions athéromateuses chez les malades ayant une hyperhomocystéinémie modérée (Bor *et al.*, 2003 ; Mc Cully *et al.*, 2004 ; Vermeulen *et al.*, 2000).

Décarboxylases

Elles agissent selon la réaction générale suivante (Figure 8) :

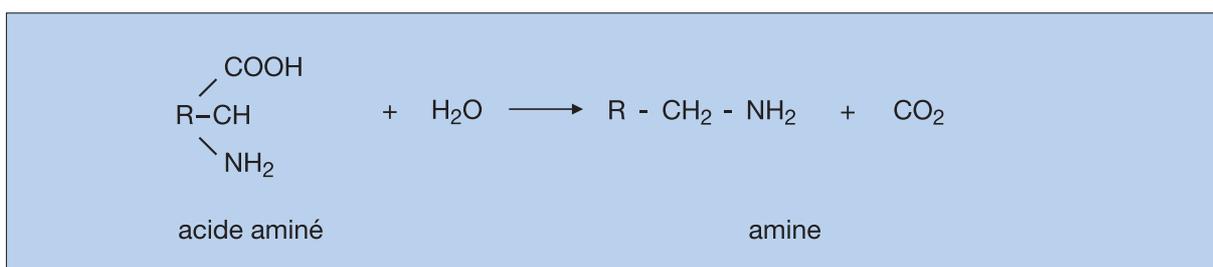


Figure 8 : Réaction de décarboxylation (d'après Le Grusse et Watier, 1995).

On peut citer plusieurs exemples de décarboxylations :

- Décarboxylation de l'histidine en histamine.
- Décarboxylation des acides aminés aromatiques jouant un rôle essentiel dans la biosynthèse de certains neuromédiateurs : dihydroxyphénylalanine décarboxylée en dopamine, tyrosine en tyramine, 5-hydroxytryptophane en sérotonine.
- Décarboxylation de l'acide glutamique en GABA.

Transférases

Les transférases vitamine B₆ - dépendantes catalysent la transformation de la sérine et de la thréonine en glycofolate. Exemple : conversion de la sérine en glycine sous l'action de la sérine hydroxyméthyl transférase en présence de phosphate de pyridoxal et de tétrahydrofolate qui joue le rôle d'échangeur de groupement monocarboné.

Synthétases

Le phosphate de pyridoxal est le coenzyme de la delta aminolévulinate synthétase, enzyme assurant la condensation de la glycine et du succinyl-CoA pour former l'acide delta-aminolévulinique, étape limitante dans la synthèse des porphyrines et donc de l'hème. Ceci explique l'effet favorable de la vitamine B₆ dans le traitement de certaines anémies.

Autres enzymes

Désamination oxydative : métabolisme de la lysine

Le pyridoxal phosphate est, avec le cuivre, le cofacteur de la lysyl oxydase qui catalyse, en présence d'oxygène, la désamination oxydative des résidus lysine et hydroxylysine incorporés dans la tropoélastine et le tropocollagène. Une déficience en vitamine B₆, peut par ce mécanisme, conduire à une altération de la matrice osseuse.

La cinuréninase et la 3-hydroxycinurénine transaminase

Ces enzymes B₆ dépendantes interviennent dans le métabolisme du tryptophane, par la voie métabolique qui aboutit à la synthèse endogène du NAD.

Cette réaction a été à la base du test de surcharge en tryptophane qui explorait la carence en vitamine B₆.

Une déficience en vitamine B₆ altère le métabolisme du tryptophane et s'accompagne d'une augmentation de l'élimination urinaire d'acide xanthurénique. L'augmentation de la concentration de 3-hydroxycinurénine dans le cerveau en cas de déficience en vitamine B₆ serait, au moins partiellement, à l'origine des troubles neurologiques observés.

La glycogène phosphorylase

Cette enzyme intervient dans le métabolisme du glycogène, surtout au niveau des cellules musculaires.

Les racémases

Elles assurent la transformation d'un acide aminé de la forme L en forme D. Ces enzymes sont présentes chez les bactéries.

Autres fonctions

Transporteur cytosolique et transporteur des hormones stéroïdiennes, le pyridoxal 5'-phosphate réduirait l'effet nucléaire des glucocorticoïdes.

À dose élevée, la vitamine B₆ aurait une légère action hypocoagulante et augmenterait l'élimination du fer en agissant comme chélateur.

Le pyridoxal phosphate s'opposerait également à l'agrégation plaquettaire provoquée par l'adénosine diphosphate.

En conclusion, le phosphate de pyridoxal, coenzyme indispensable à de nombreuses enzymes, intervient dans de multiples réactions métaboliques dans tous les tissus de l'organisme.

APPORT ET STATUT NUTRITIONNEL

Sources alimentaires

La vitamine B₆ est présente dans de nombreux aliments. On la retrouve en concentrations élevées dans la levure et le germe de blé. Dans l'alimentation classique, elle est surtout apportée par les viandes, les poissons et le foie. Les produits laitiers et les céréales, les fruits et légumes, en contiennent de plus faibles quantités.

Carence

La carence spontanée franche est rarement observée dans nos pays industrialisés, mais l'apport alimentaire serait, chez beaucoup d'individus, suboptimal avec des signes de carence fruste. Les symptômes de déficience en vitamine B₆ sont de types divers :

- Neuropsychiques : fatigue, apathie, insomnie, états dépressifs avec troubles du métabolisme du tryptophane conduisant à une élimination majorée d'acide xanthurénique dans l'urine et neuropathies périphériques.
- Dermatologiques : glossite, stomatite.
- Hématologiques : rarement anémie hypochrome avec hypersidérémie, ainsi que des anomalies de l'immunité cellulaire et humorale.
- Métaboliques : augmentation de la synthèse d'acide oxalique. En cas de carence en vitamine B₆, l'acide glyoxylique n'est plus converti en glycine par transamination mais oxydé en acide oxalique.

EXPLORATION DU STATUT VITAMINIQUE

Le statut vitamérique B₆ est exploré dans les circonstances suivantes :

- Pour évaluer l'état nutritionnel et suivre le bénéfice d'une "supplémentation".
- Pour expliquer des perturbations biologiques lorsqu'une anomalie du métabolisme de la vitamine B₆ ou d'une enzymopathie congénitale est mise en cause.
- Dans le cadre d'études épidémiologiques.

On utilise soit des méthodes directes, qui mesurent le niveau des différents vitamères circulants et des méthodes indirectes, fonctionnelles réalisées *in vivo* ou *in vitro*, et qui évaluent la fonction vitamérique.

Méthodes fonctionnelles

Ces tests sont les plus anciens. Ils ont été développés car la mesure directe des vitamines n'était pas possible en raison de leur concentration très faible.

Méthodes enzymatiques

On mesure l'activité d'enzymes vitamine B₆ dépendantes, telles que les transaminases TGO et TGP, avant et après addition de vitamine B₆. En présence d'un excès de coenzyme (PLP) et d'un substrat (acide aminé) on mesure la quantité de substrat disparu ou celle du produit de réaction qui est apparu.

Épreuve de charge en tryptophane

Le métabolisme du tryptophane est régulé par des enzymes vitamine B₆ dépendantes. On mesure l'élimination urinaire d'acide xanthurénique après charge en tryptophane.

En cas de carence en vitamine B₆, le catabolisme du tryptophane est bloqué au niveau d'une enzyme PLP dépendante, la cinuréninase, ce qui entraîne une accumulation du métabolite situé en amont, l'acide xanthurénique. Le déficit en vitamine B₆ a un retentissement plus important sur la cinuréninase que sur les transaminases. On observe une élimination urinaire d'acide xanthurénique supérieure à 20 mg/24 h après absorption de 2 à 5 g de tryptophane.

Test de charge en méthionine avec mesure de la cystathionurie

Ce test est réservé à la recherche.

Test de charge en vitamine B₆

Il serait plus susceptible de mettre en évidence une carence tissulaire en vitamine B₆ que le dosage isolé de la vitamine B₆ circulante, trop dépendant des apports récents en cette vitamine.

Mesures directes des différents vitamines

Différentes techniques CLHP ont été proposées pour doser les différentes formes de la vitamine B₆ dans le sérum, le plasma ou les érythrocytes.

Étapes pré-analytiques

Les dosages sont réalisés sur sang prélevé sur EDTA, sur héparine ou sur tube sec.

Après centrifugation à + 4 °C, le plasma, le sérum ou les globules rouges sont séparés rapidement et congelés à -20 °C. Si le dosage est réalisé sur sang total, de la même manière, il sera congelé à -20 °C. Il est recommandé de ne pas exposer le tube de sang à la lumière.

Les échantillons congelés à -20 °C sont stables pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois (Borschel *et al.*, 1987 ; Ocké *et al.*, 1995).

Techniques de dosage

L'utilisation de techniques CLHP a permis d'identifier, avec succès, la vitamine B₆ et les différents vitamères dans le sang, le plasma et le sérum. La détection fluorimétrique a presque exclusivement été utilisée en CLHP du fait de sa sélectivité et de sa haute sensibilité. Bien que la plupart des formes de la vitamine B₆ et de ses métabolites présentent une fluorescence suffisante pour une détection par technique CLHP, la fluorescence naturelle du PLP trop faible explique le développement de nombreuses méthodes de dérivation chimique qui ont pour but d'amplifier cette fluorescence. La plupart des méthodes de dérivation amplifient la fluorescence de la fonction aldéhyde présente en position 4. Rybak *et al.* (2005) insistent sur la nécessité d'utiliser un standard de référence et sur la validation d'une méthode de référence associant dilution isotopique et CLHP couplée à la spectrométrie de masse.

Dès 1983, Coburn et Mahuren réalisent la détermination de la vitamine B₆ dans les érythrocytes par une technique CLHP échangeuse de cations, avec introduction post-colonne de chlorite plutôt que de cyanure pour oxyder le PLP en un composé plus fluorescent, l'acide 4-pyridoxique 5-phosphate (4-PAP).

En 2004, Rybak et Pfeiffer décrivent une technique utilisant une dérivation post-colonne pour la détermination du PLP et du 4-PA dans le sérum par une technique CLHP en phase inverse avec détection fluorimétrique. Nous allons développer cette technique.

Les échantillons sériques ou plasmatiques et les calibrateurs aqueux (conservés dans des flacons en verre ambré) subissent le même traitement pré-analytique. La gamme de calibration de 2 à 100 nmol/l est préparée extemporanément.

La précipitation des protéines est réalisée par l'addition à + 4 °C d'acide métaphosphorique, puis l'extraction est réalisée par adjonction de dichlorométhane.

La phase aqueuse supérieure est récupérée et injectée sur chromatographe CLHP. La fluorescence est mesurée suite à une excitation à 325 nm et une émission à 425 nm.

Les composés sont séparés sur une colonne C18 Hypersil BDS équipée d'une précolonne C18 maintenue à 35 °C. Les phases mobiles sont les suivantes : tampon phosphate 50 mM (pH 3,1) contenant de l'acétonitrile et du méthanol. Pour augmenter la fluorescence du PLP, une solution aqueuse à 2 g/l de chlorite de sodium (NaClO₂) est introduite à la sortie de la colonne. L'efflux est ensuite passé dans une colonne placée dans un manchon chauffé à 75 °C avant l'arrivée au détecteur fluorimétrique.

Performances analytiques

Dans ces conditions opératoires, les temps de rétention pour le PLP et le 4-PA sont respectivement de 3,2 et 5,6 min. Le temps de rétention noté pour le PL est de 2,7 min.

Bien que la concentration de 100 nmol/l soit choisie comme point supérieur pour la courbe de calibration, cette méthode est linéaire jusqu'à 1 000 nmol/l pour le PLP et jusqu'à 3 000 nmol/l pour le 4-PA (Rybak et Pfeiffer, 2004). La limite de détection est de 0,3 nmol/l pour le PLP et le 4-PA.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Variations physiologiques

Les valeurs usuelles rapportées dans la littérature sont très différentes selon les auteurs. Pour certains auteurs, le statut vitaminique des femmes est moins favorable que celui des hommes, mais ceci reste très discuté. On note une diminution des réserves vitaminiques avec l'âge.

Les valeurs observées par Rybak et Pfeiffer (2004) chez 303 patients, tout âge et sexe confondus, vont de 7,6 à 1260 nmol/l (moyenne géométrique = 42,4 nmol/l) pour le PLP et de 6,2 à 3140 nmol/l (moyenne géométrique = 27,3 nmol/l) pour l'acide pyridoxique.

Dans l'étude Suvimax, les valeurs moyennes (\pm écart-type) de la teneur du plasma en PLP sont pour les hommes : $56,2 \pm 36,6$ nmol/l ($n = 616$) et pour les femmes : $59,9 \pm 70,9$ nmol/l ($n = 678$) (Guilland *et al.*, 2001).

Il semble que la valeur de 10 nmol/l pour le phosphate de pyridoxal corresponde à un risque élevé de développer des signes cliniques de déficience en vitamine B₆ et que la limite de 30 nmol/l permette d'écarter une carence en vitamine B₆ (Leklem, 1990).

Chez la femme enceinte, du fait du rôle de la vitamine B₆ dans le métabolisme des protéines et des interférences éventuelles des hormones sexuelles, entre le début et la fin de la grossesse, on note une diminution du phosphate de pyridoxal plasmatique de 10 nmol/l (Guilland *et al.*, 2001).

Variations pathologiques

La vitamine B₆ est présente dans de nombreux aliments, cependant des carences d'apports peuvent se rencontrer dans les pays en voie de développement mais elles s'inscrivent dans des tableaux de déficits nutritionnels multiples. Les carences par déficit d'apport sont rares dans nos pays industrialisés. Mais d'autres manifestations cliniques, telles que les malabsorptions intestinales ou les interactions médicamenteuses peuvent expliquer les déficiences retrouvées dans certains groupes de populations :

- L'alcoolisme chronique : alimentation déséquilibrée, malabsorption due à la pathologie gastro-intestinale, diminution de la synthèse de coenzyme actif (inhibition de la pyridoxine kinase). Augmentation du catabolisme due à la surconsommation d'alcool.
- L'hémodialyse : perturbation du métabolisme de la vitamine B₆ (diminution de la synthèse du coenzyme actif par inhibition de la pyridoxine kinase) et augmentation du catabolisme.
- Les enfants de faible poids à la naissance et présentant un score d'Apgar abaissé montrent des déficits en vitamine B₆ (Schuster *et al.*, 1981).
- La grossesse et l'allaitement : augmentation des besoins et induction hormonale des enzymes maternelles.
- Le tabagisme : les fumeurs présentent des taux faibles de vitamine B₆.

- Les maladies héréditaires du métabolisme, vitamine B₆-dépendantes :
 - L'homocystinurie : déficit en cystathionine synthétase.
 - La cystathionurie : déficit en cystathionase.
 - L'hyperornithinémie : déficit en ornithine amino transférase.
 - L'acidurie xanthurénique : déficit en cinuréninase.
 - Les lithiases oxaliques.
 - Les convulsions du nourrisson pyridoxino-dépendantes ; c'est le cas des convulsions vitaminosensibles : la prise en charge rapide permet d'éviter l'évolution vers une encéphalopathie épileptogène (Bednarek, 2004).
 - Les anémies hypochromes pyridoxino-sensibles.
- Les carences retrouvées dans différentes pathologies : maladie coéliqua, psychoses, paranoïa et schizophrénie, épilepsie, rectocolite hémorragique, lithiase rénale, allaitement.
- Interférences médicamenteuses.

Diverses interactions entre la vitamine B₆ et des médicaments ont été décrites. Les deux principales concernent l'isoniazide et la L-Dopa. L'isoniazide se combine au phosphate de pyridoxal pour donner une hydrazone inactive et ces malades développant neuropathie et pellagre ont besoin de recevoir une supplémentation en vitamine B₆.

La vitamine B₆ inactive la L-Dopa au niveau périphérique et au niveau central.

On a trouvé une interférence de la vitamine B₆ avec d'autres médicaments, tels que la pénicillamine, la cyclosérine et certains contraceptifs oraux.

Surcharges

La vitamine B₆ étant hydrosoluble est peu toxique car il n'y a pas de stockage ; cependant une pyridoxinothérapie prolongée à forte dose entraînera des signes neurologiques sensoriels et moteurs et des perturbations mnésiques. Plusieurs publications ont décrit que des doses de 200 mg/j, et même de 50 mg/j, pouvaient être neurotoxiques. Le Conseil Supérieur d' Hygiène Publique de France a fixé une dose limite de sécurité, en plus des apports alimentaires, à 5 mg/j (Guilland *et al.*, 2001).

RECHERCHES ACTUELLES

Le rôle de la vitamine B₆ est mis en avant dans le domaine de l'immunité, de l'asthme, et du risque cardiovasculaire.

L'immunité

Les carences en vitamine B₆ entraînent des modifications de l'immunité humorale et cellulaire : diminution du nombre de lymphocytes, du taux d'IL2 et de la réponse aux mitogènes. Des études de "supplémentation" sont en cours.

Les maladies neurologiques

L'épilepsie pyridoxino-dépendante : le défaut biochimique reste inconnu chez ces patients, le transport et le métabolisme de la vitamine B₆ sont normaux, mais il semblerait y avoir une anomalie de la glutamate décarboxylase (GAD), enzyme dépendante de la pyridoxine. Y a-t-il altération de la liaison pyridoxine - GAD ou anomalie du transport intracérébral de la vitamine B₆ ?

Les maladies cardiovasculaires

La vitamine B₆ est indispensable à la synthèse de la cystéine à partir de l'homocystéine ; or, en cas de carence en vitamine B₆ on assiste à une accumulation d'homocystéine, dont le rôle reste discuté en tant que facteur de risque indépendant de maladies cardiovasculaires.

Des études épidémiologiques de suppléments en vitamines B₆, B₁₂ et B₉ pour diminuer l'hyperhomocystéinémie de différentes catégories de patients (patients souffrant de pathologies occlusives, diabétiques, dialysés, personnes âgées) sont en cours (Vermeulen *et al.*, 2000).

Cancérogenèse

Un dérivé de la vitamine B₆ (adénosine N – diéthylthioéther-N1-pyridoxamine – 5 α -phosphate) est synthétisé par les cellules tumorales. Des concentrations élevées de ce dérivé de la vitamine B₆ ont été retrouvées dans le sérum de patients présentant des tumeurs ou des métastases, permettant de lui accorder un rôle de marqueur (Leklem, 1990).

Interaction avec différentes molécules

Enfin, la vitamine B₆ serait impliquée dans différents systèmes, en particulier du fait de son interaction avec les récepteurs de stéroïdes. De plus, le pyridoxal modifie l'affinité des chaînes de l'hémoglobine pour l'oxygène. De manière générale, le phosphate de pyridoxal module l'activité de nombreuses enzymes et augmenterait ou diminuerait l'activité de ces enzymes.

Références bibliographiques

- Bednarek N.** Convulsions vitamino-sensibles. *In* : Congrès de la SFEIM, *Vitamines et Biofacteurs* (2004), FIAP Jean Monnet, Paris.
- Bor MV, Refsum H, Bisp MR et al.** (2003). Plasma vitamin B₆ vitamers before and after oral vitamin B₆ treatment: a randomized placebo-controlled study. *Clin Chem*, **49** : 155-161.
- Borschel MW, Kirksey A, Hamaker BR** (1987). A micromethod for determination of plasma pyridoxal phosphate and its use in assessment of storage stability of the vitamer. *J Ped Gastroenterol Nutr*, **6** : 409-413.
- Coburn SP, Mahuren JD** (1983). A versatile cation-exchange procedure of measuring the seven major forms of vitamin B₆ in biological samples. *Anal Biochem*, **129** : 310-317.
- Guilland JC, Lemoine A, Potier de Courcy G, Christidès JP.** Vitamine B₆. *In* : Martin A (2001). *Apports nutritionnels conseillés pour la population française*. Tec & Doc, Paris, 196.
- Hervé C.** Vitamine B₆. *In* : Le Moël G, Dauvergne A, Gousson T, Guéant JL (1998). *Le statut vitaminique, physiopathologie, exploration biologique et intérêt clinique*. EM Inter, Cachan, 259-273.
- Le Grusse J, Watier B** (1995). *Les vitamines – Données biochimiques nutritionnelles et cliniques*, Centre d'Etude et d'Information sur les Vitamines, 197.
- Leklem JE** (1990). Vitamin B₆: a status report. *J Nutr*, **120** : 1503-1507.
- Lemoine A, Bouillot P, Cirette B, Mirabel D.** Pyridoxine (vitamine B₆). *In* : Siest G, Henry J, Schiele F (1990). *Références en biologie clinique*. Elsevier, Paris, 531-549.
- McCully KS** (2004). Homocysteine, vitamins, and prevention of vascular disease. *Mil Med*, **169** : 325-329.
- Ocké MC, Schrijver J, Obermann-De Boer GL et al.** (1995). Stability of blood (pro) vitamins during four years of storage at -20°C: consequences for epidemiologic research. *J Clin Epidemiol*, **48** : 1077-1085.
- Rybak ME, Pfeiffer CM** (2004). Clinical analysis of vitamin B₆ determination of pyridoxal 5'-phosphate and 4-pyridoxic acid in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with chlorite postcolumn derivatization. *Anal Biochem*, **333** : 336-344.
- Rybak ME, Jain RB, Pfeiffer CM** (2005). Clinical vitamin B₆ analysis: An interlaboratory comparison of pyridoxal 5' – phosphate measurements in serum. *Clin Chem*, **51** : 1223-1231.
- Schuster K, Bailey LB, Mahan CS** (1981). Vitamin B₆ status of low-income adolescent and adult pregnant women and the condition of their infants at birth. *Am J Clin Nutr*, **34** : 1731-1735.
- Vermeulen EGJ, Stehouwer CDA, Twisk JWR et al.** (2000). Effect of homocysteine-lowering treatment with folic acid plus vitamin B₆ on progression of subclinical atherosclerosis: a randomised, placebo controlled trial. *The Lancet*, **355** : 517-522.

Biotine : Vitamine B₈

Isabelle Cuvelier

La biotine, encore appelée vitamine H (de "*Haut*", la peau en allemand car sa carence génère des troubles cutanés), est aussi dénommée vitamine B₈ du fait de son appartenance au groupe des vitamines B.

La découverte de ses premiers effets date de 1916 lorsque Bateman constate qu'un régime riche en blancs d'œufs crus en tant qu'unique apport protéique est toxique chez le rat. En 1927, un syndrome spécifique est mis en évidence - la maladie du blanc d'œuf cru - qui se caractérise par des troubles neuromusculaires, des lésions cutanées importantes et une chute des poils. C'est en 1931 que Gyorgyi émet l'hypothèse d'une carence vitaminique. Il donne au facteur nutritionnel, dont l'absence est à l'origine des troubles observés, le nom de vitamine H.

Durant la même période, différents facteurs de croissance des levures sont mis en évidence ; ils sont appelés suivant les auteurs : bios, coenzyme R ou biotine.

Par la suite, il sera démontré que ces facteurs - bios, coenzyme R, biotine et vitamine H - sont une seule et même substance dont la synthèse est effectuée dès 1942. Elle prend ensuite le nom de vitamine B₈ lorsque l'on montre son appartenance aux vitamines du groupe B.

Dans les années 70, les fonctions de la biotine seront étudiées : on démontre alors que le déficit multiple en carboxylases provoque une maladie génétique vitamino-dépendante, curable par la biotine. En 1981, Munich *et al.* confirment l'existence d'anomalies génétiques et montrent l'efficacité de la "supplémentation" par des doses élevées de biotine puis, en 1983, Wolf émet l'hypothèse que le déficit tardif des carboxylases provient d'une insuffisance d'activité de la biotine.

STRUCTURE CHIMIQUE NOMENCLATURE

La biotine est formée de la fusion de deux cycles : un cycle imidazolidine et un cycle tétrahydrothiophène sur lesquels est branchée une chaîne d'acides valériques déterminant des formes alpha et bêta. Il en existe huit isomères dont seule la forme dextrogyre possède une activité vitaminique (**Figure 1**).

Cette vitamine se présente sous forme d'une poudre cristalline et blanche. Elle est hydrosoluble ; cependant, sa solubilité est plus importante dans les solutions basiques que dans l'eau. Elle est peu soluble dans les solvants organiques.

La biotine est stable à la chaleur, ainsi qu'en solution aqueuse. Par contre, elle est rapidement dégradée par l'oxygène et les rayons ultraviolets.

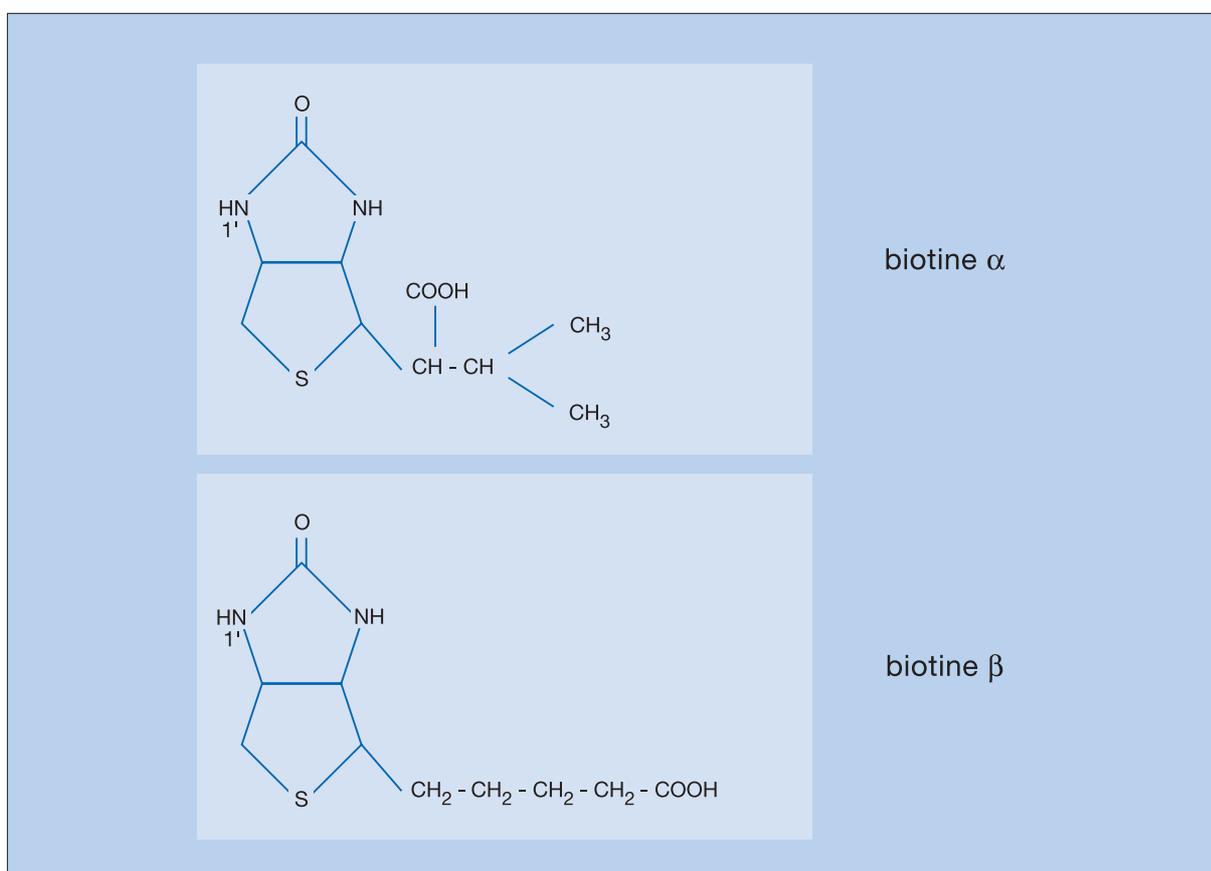


Figure 1 : Structure de la biotine

MÉTABOLISME

La vitamine B₈ provient de deux sources : l'alimentation et la synthèse par la flore intestinale sans que l'on connaisse exactement l'importance de cette dernière. Dans les aliments, la biotine est sous formes libre et liée ; cependant, la plus grande partie de cette vitamine se trouve liée aux protéines de la viande et des céréales par un résidu lysine.

La biotine-lysine est prise en charge par une enzyme pancréatique, la biotinidase qui est nécessaire à la libération de la vitamine. Cette enzyme sert d'ailleurs aussi de transporteur dans le plasma avec deux sites de fixation de la biotine.

La vitamine B₈ libre est absorbée au niveau intestinal par un phénomène actif, sodium-dépendant et saturable, mais également par un phénomène de diffusion passive. Elle est ensuite distribuée dans pratiquement tous les tissus avec une préférence pour le foie, mais également dans les muscles et les reins.

Les réserves hépatiques sont peu mobilisables ; dans les autres organes, la biotine est activée grâce à une molécule d'ATP en biotiny-AMP, seul capable de jouer un rôle de coenzyme. Ce biotiny AMP se fixe ensuite sur un résidu lysine au sein d'une chaîne d'acides aminés toujours constante alanine-méthionine-lysine-méthionine pour donner une holoenzyme. C'est elle qui sera dégradée d'abord par des endopeptidases puis par la biotinidase pour régénérer de la biotine libre, réutilisable par la cellule (Figure 2).

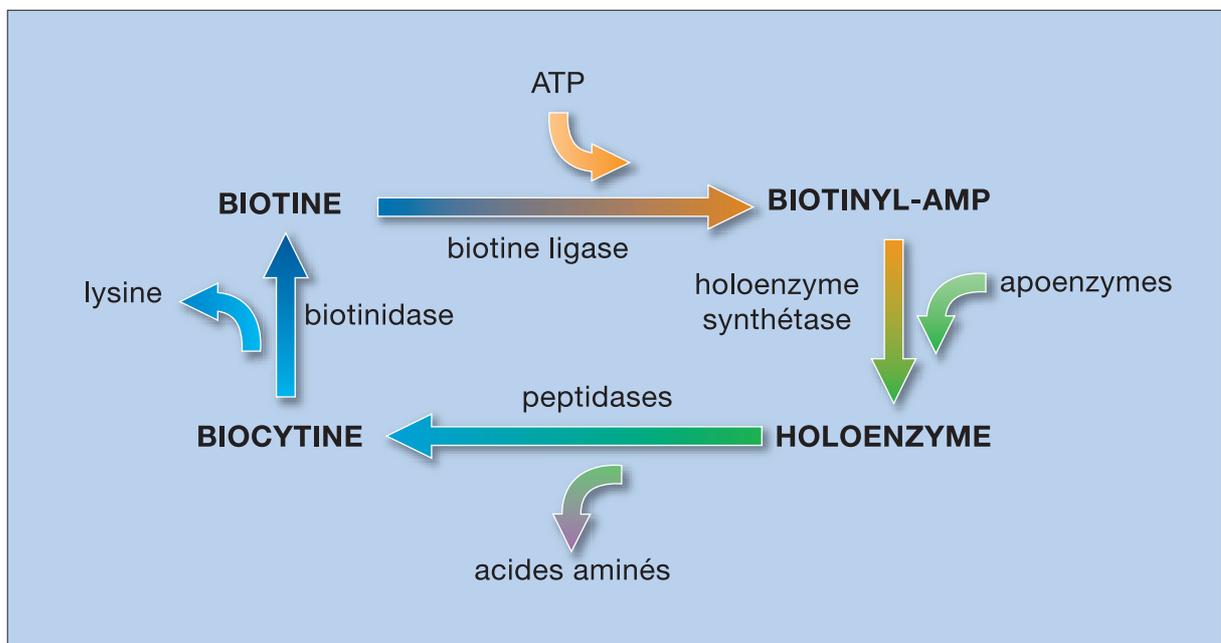


Figure 2 : Métabolisme cellulaire de la biotine

La biotine est ensuite éliminée sous forme libre en majorité par les urines (élimination d'environ 50 µg/24h, soit 200 nmol/24h) ; urines dans lesquelles on retrouve également quelques métabolites. Une élimination fécale existe, qui concerne principalement la vitamine issue de la sécrétion bactérienne mais également un peu de la fraction alimentaire non absorbée.

Le taux plasmatique de biotine totale (libre et liée) est de 0,24 à 0,60 µg/l (1,0 à 2,5 nmol/l) et sa demi-vie est de 1 h 50 mn (Bitsch *et al.*, 1989).

SOURCES ET APPORTS

La plupart des tissus animaux et végétaux contiennent de la biotine (Figure 3).

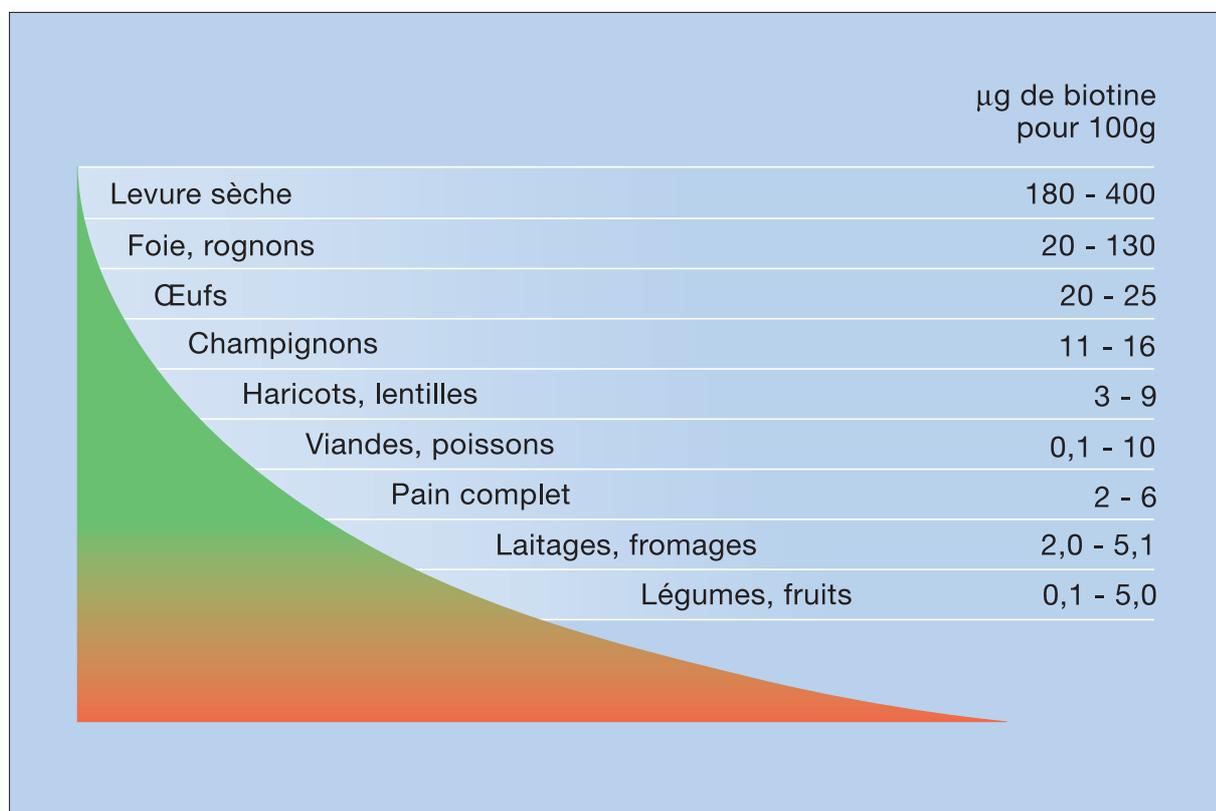


Figure 3 : Sources alimentaires de biotine

Les déficits par carence alimentaire sont donc rares et les carences d'apport s'intègrent dans des déficits nutritionnels multiples. Par contre, il faut noter que la cuisson à l'eau au cours de la préparation des aliments fait disparaître 10 à 40 % de la biotine alimentaire.

PHYSIOLOGIE

La biotine est le coenzyme des carboxylases. Ces enzymes catalysent la fixation de CO_2 sur différents substrats qui jouent un rôle fondamental dans l'assimilation des glucides, des lipides et des protéines. Il s'agit de réactions de carboxylation ou de transcarboxylation (Figure 4).

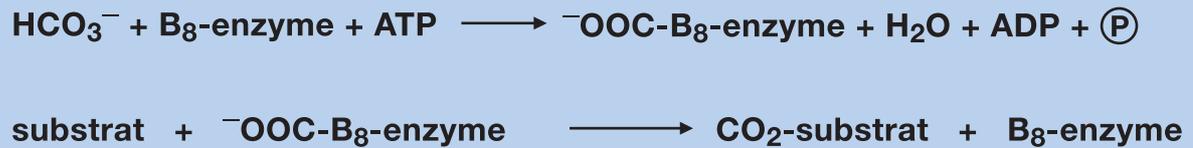


Figure 4 : Réaction de carboxylation biotine-dépendante

HCO_3^- est le donneur de CO_2 dans les réactions de carboxylation, il est remplacé par un acétyl-CoA dans les réactions de transcarboxylation.

Quatre enzymes sont biotine-dépendantes et la participation de la vitamine B_8 à leur activité lui permet de jouer un rôle important dans différents métabolismes :

- Production d'énergie à partir du glucose mais aussi des acides aminés branchés (leucine, isoleucine, valine) :
 - Pyruvate carboxylase : elle catalyse la réaction pyruvate \rightarrow oxaloacétate, réaction importante dans le métabolisme des glucides puisque l'oxaloacétate participe à la synthèse du glucose par néoglucogenèse.
 - Propionyl-CoA carboxylase : elle catalyse la réaction propionyl-CoA \rightarrow méthylmalonyl-CoA qui rejoint le cycle de Krebs après transformation en succinate et assure ainsi la fourniture d'énergie.
 - Bêta-méthylcrotonyl-CoA carboxylase qui catalyse la réaction : bêta-méthylcrotonyl-CoA \rightarrow bêta-méthylglutaconyl-CoA. Ce dernier, après transformation en acétyl-CoA, participera au cycle de Krebs, mais aussi à la synthèse des acides gras et du cholestérol.
- Synthèse des acides gras :
 - Acétyl-CoA carboxylase, enzyme cytoplasmique qui catalyse la réaction acétyl-CoA \rightarrow malonyl-CoA.
 - Bêta-méthylcrotonyl-CoA carboxylase.
- Action de la testostérone sur la synthèse des protéines dans les testicules.

MÉTHODES D'EXPLORATION

Dosages directs

Les dosages de la biotine aussi bien au niveau du sérum que des urines peuvent être réalisés par différentes techniques (en 1992, Gaudry et Ploux ont répertorié plus de 50 méthodes de dosage). Les dosages doivent être effectués à jeun, en dehors de toute prise de biotine.

La fragilité de la vitamine B₈ demande une conservation des échantillons à – 20 °C, la stabilité étant alors de 18 mois. De plus, la sensibilité de la biotine aux rayons ultra-violetts suggère de conserver les prélèvements à l'abri de la lumière jusqu'à l'analyse.

La technique microbiologique, longtemps employée, est considérée comme la technique de référence. Plusieurs germes sont utilisés, outre *Lactobacillus plantarum* : *Ochromonas danica*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Lactobacillus casei* (Fayol, 1998). La technique consiste à observer la pousse du germe à 37 °C avec une lecture à 595 nm. Cette technique présente l'avantage d'être utilisable dans le cas du sérum mais aussi dans le cas des produits agroalimentaires. De plus, elle présente une grande sensibilité (jusqu'à 0,01 µg/l, soit 0,04 nmol/l), une grande simplicité et un coût en réactifs faible. Cependant, elle ne peut pas être utilisée chez les patients traités par antibiotiques du fait de l'inhibition de la croissance du germe. De plus, elle nécessite de lourdes manipulations, non automatisables.

Des techniques d'HPLC ont été décrites utilisant la détection fluorimétrique et permettant de séparer la biotine et son métabolite, la biocytine (Przyjazny *et al.*, 1993 ; Stein *et al.*, 1992).

À l'heure actuelle, des méthodes utilisant l'avidine, molécule pour laquelle la biotine possède une forte affinité, ont été développées. Ainsi, Sanghvi *et al.* (1982) ont décrit une technique isotopique utilisant la biotine marquée au tritium et une séparation des formes libres et liées par des filtres de nitrocellulose. Cette technique permet une bonne sensibilité autorisant les mesures dans le plasma mais aussi dans l'urine.

Harthé et Claustrat (2003) ont décrit une méthode radio-isotopique par compétition utilisant de la streptavidine marquée à l'iode 125, donnant des valeurs usuelles de 0,10 à 0,40 µg/l (0,45 à 1,60 nmol/l). Cette technique présente l'avantage de se faire en une seule étape et demande un faible volume d'échantillon. De plus, elle permet de ne mesurer que la biotine (forme active) alors que toutes les techniques utilisant l'avidine mesurent en même temps les métabolites.

Un test ELISA a également été développé utilisant des microplaques sensibilisées à l'avidine et une révélation colorimétrique. Il s'agit actuellement de la technique la plus utilisée. Kendall *et al.* (1983) ont développé un dosage immunoenzymatique dont la sensibilité est augmentée par la formation de complexe avidine-biotine.

De façon globale, la biotine doit être supérieure à 0,24 µg/l (1,0 nmol/l) pour éliminer un état de déficience ; une carence sera évoquée pour des taux < 0,12 µg/l (0,5 nmol/l).

Explorations fonctionnelles

Les résultats du dosage de la biotine sont soumis à de grandes variations et reflètent assez mal les états de carence. Il est souvent plus facile de mettre en évidence les conséquences métaboliques du déficit des carboxylases par 2 types d'investigation :

- La recherche d'acidose métabolique avec cétose, par mesure des gaz du sang et des corps cétoniques.
- La mesure des conséquences métaboliques du blocage de la pyruvate décarboxylase, première des enzymes à exprimer le déficit du fait de sa forte affinité pour la biotine. Ceci est effectué par une mesure des éléments accumulés en amont : pyruvate, lactate, ammoniémie mais aussi lysine, proline et citrulline. Dans les urines, on observe l'augmentation de l'acide propionique en rapport avec le blocage de la propionyl-CoA carboxylase ainsi que de l'acide méthylcrotonique.

Tests complémentaires pour le diagnostic de la carence

Classiquement, ils sont de 4 types :

- Dosage des carboxylases leucocytaires *in vitro*.
- Dosage de l'activité biotinidase plasmatique.
- Mesure de la clairance de la biotine permettant d'évaluer la fuite rénale.
- Dosage de la vitamine après administration orale d'une dose de charge croissante permettant de mettre en évidence une anomalie de l'absorption intestinale.

Signes cliniques de la carence

Au cours d'une carence expérimentale, qui nécessite l'utilisation d'une substance antagoniste telle que l'avidine contenue dans le blanc d'œuf cru, les signes de carence apparaissent après 3 à 4 semaines chez l'adulte :

- Signes généraux : asthénie, anorexie, amaigrissement.
- Signes cutanéomuqueux associés souvent à une surinfection par *Candida* :
 - au niveau de la peau : dermatite érythématosquameuse, rashes cutanés.
 - au niveau des phanères : onyxis et périonyxis, rareté des cils et des sourcils.
 - au niveau des muqueuses : chéilite, glossite, kératoconjonctivite.
- Signes neuropsychiatriques : dépression, hallucinations, somnolence, paresthésies localisées associées à des douleurs musculaires.
- Signes digestifs : nausées, vomissements, stéatose hépatique.

Chez l'enfant, en plus de tous ces signes, peuvent se développer un retard psychomoteur, une ataxie et des convulsions. Les crises d'acidose métabolique avec cétose peuvent entraîner des troubles de la conscience et un coma.

Epidémiologie de la carence

La carence en vitamine B₈ est exceptionnelle chez l'homme. Elle résulte de trois mécanismes principaux :

- diminution d'apport,
- diminution de l'absorption,
- anomalie génétique.

Une carence d'apport s'inscrit probablement dans les déficits nutritionnels multiples des pays en voie de développement.

Dans les pays industrialisés, la carence en biotine se retrouve principalement dans deux circonstances :

- La nutrition parentérale non supplémentée : dans ce cas, les signes cliniques peuvent apparaître chez l'homme dans un délai de six mois à 3 ans, le délai est réduit de moitié chez les enfants.
- Les maladies héréditaires du métabolisme (Munich *et al.*, 1981). Au nombre de deux, ce sont des maladies de transmission autosomique récessive :
 - Déficit en holocarboxylase synthétase, enzyme qui fixe la biotine aux carboxylases. Il s'installe de manière aiguë dans la période néonatale. La biotine est à un taux normal mais inefficace puisqu'il n'y a pas de fixation enzyme-biotine.
 - Déficit en biotinidase, d'installation plus lente, elle montre une biotinémie basse car la vitamine alimentaire ne peut être rendue disponible à l'absorption intestinale.

Ces deux pathologies présentent les mêmes signes cliniques ; leur mode d'installation et leur profil biologique sont différents mais surtout, le déficit en biotinidase demandera une dose curative moins importante de vitamine B₈ que le déficit en holocarboxylase synthétase.

D'autres causes beaucoup moins fréquentes de carences en biotine ont été décrites :

- La dermite des enfants nourris au sein, probablement une carence d'apport due à un lait pauvre en biotine. Le lait maternel est beaucoup moins riche en biotine que le lait de vache, mais il existe de grandes variations interindividuelles.
- L'hémodialyse, au cours de laquelle ont été observées des encéphalopathies curables à la biotine mais dont les mécanismes restent encore incertains.
- La grossesse : la biotine diminue au cours de la grossesse et atteint son minimum à la naissance.
- Les traitements antiépileptiques : on constate une diminution de la vitamine B₈ chez 75 % des sujets traités, certainement par inhibition compétitive de l'absorption intestinale.
- L'alcoolisme chronique entraîne une diminution de la biotine aussi bien au niveau plasmatique qu'hépatique. Les troubles graves de l'absorption intestinale et les amputations digestives participent du syndrome de malabsorption globale.
- Dans le syndrome de la mort subite du nourrisson, il a été décrit des taux hépatiques de biotine significativement abaissés par rapport à la normale (Johnson et Hood, 1980).

TRAITEMENTS

Les anomalies métaboliques congénitales biotine-dépendantes sont traitées par de fortes doses de biotine : dans les déficits en biotinidase (100 à 500 µg/jour) et 10 à 100 fois plus dans les déficits en holoenzyme synthétase. Au cours des troubles des phanères, les doses préconisées sont de 5 à 10 mg/jour par voie parentérale pendant 4 à 6 semaines. Un relais oral est ensuite proposé (Lemoine *et al.*, 1995a, 1995b).

La biotine est parfaitement tolérée même à hautes doses et il n'existe pas de toxicité ni d'effet secondaire ; il n'existe donc pas de contre-indications à son utilisation.

Références bibliographiques

Bitsch R, Salz I, Hotzel D (1989). Studies on bioavailability of oral biotin doses for humans. *Int J Vit Nutr Res*, **59** : 65-71.

Fayol V. Biotine. In : Le Moël G, Saverot-Dauvergne A, Gousson T, Guéant JL (1998). *Le statut vitaminique*. Editions Médicales Internationales, Paris, 275-285.

Gaudry M, Ploux O. Biotin. In : De Leenheer AP, Lambert WE, Nelis HJ (1992). *Modern chromatographic analysis of vitamins*. Marcel Decker, New York, 440-467.

Harthé C, Claustrat B (2003). A sensitive and practical competitive radioassay for plasma biotin. *Ann Clin Biochem*, **40** : 259-263.

Jonhson AR, Hood RI (1980). Biotine and the sudden infant death syndrome. *Nature*, **285** : 159-160.

Kendall G, Ionescu-Matiu I, Dreesman R (1983). Utilization of the biotin/avidin system to amplify the sensitivity of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Immunol Methods*, **56** : 329-339.

Le Grusse J, Watier B (1993). *Les vitamines, données biochimiques, nutritionnelles et cliniques*. Centre d'études et d'information sur les vitamines, Neuilly sur Seine.

Lemoine A, Chanay H, Bouillot P, Cirette B (1995a). Biotine. In : *Encycl Med Chir - Thérapeutique*. Elsevier, Paris, 25-202-E-20.

Lemoine A, Chanay H, Bouillot P, Cirette B (1995b). Biotine. In : *Encycl Med Chir – Endocrinologie nutrition*. Elsevier, Paris, 10-545-C-10.

Munich A, Saudubray JM, Cotisson A et al. (1981). Biotin dependent multiple carboxylase deficiency presenting as a congenital lactic acidosis. *Eur J Pediatr*, **137** : 203-206.

Przyjazny A, Hentz NG, Bachas LG (1993). Sensitive and selective liquid chromatographic postcolumn reaction detection system for biotin and biocytin using a homogeneous fluorophore-linked assay. *J Chromatogr*, **654** : 79-86.

Sanghvi RS, Lemons RM, Baker H, Thoene JG (1982). A simple method for determination of plasma and urinary biotin. *Clinica Chimica Acta*, **124** : 85-90.

Stein J, Hahn A, Lembcke B, Rehner G (1992). High performance liquid chromatographic determination of biotin in biological materials after crown ether catalyzed fluorescence derivatization with panacyl bromide. *Anal Biochem*, **200** : 89-94.

Folates

Vitamine B₉

Jean-Louis Guéant, Christian Villaume, Georges Covi

Entre 1935 et 1939, divers auteurs mettent en évidence dans le foie et les levures, des substances qu'ils désignent sous des appellations différentes : vitamine M, facteur éluat et vitamine Bc. Ils constatent que leur absence provoque une anémie chez le singe rhésus, une anémie macrocytaire chez le rat et un arrêt de la croissance de *Lactobacillus casei* et de *Streptococcus lactis*. Il s'agit en fait de composés chimiquement et biologiquement très voisins qui dérivent de l'acide folique, dénommé ainsi parce qu'il abonde dans les feuilles de certains végétaux. Tous ces composés sont regroupés sous le terme de folates ou vitamine B₉. En 1945, la détermination de la structure de l'acide folique et sa synthèse sont réalisées. La même année, T. Spies démontre que l'acide folique est capable de guérir l'anémie mégalo-blastique chez la femme enceinte.

DÉFINITION

La vitamine B₉ est représentée par le groupe des folates (du mot latin "folium", "feuille" à cause de l'abondance de la vitamine B₉ dans les végétaux foliacés). Les différentes formes de vitamine B₉ dérivent de l'acide folique (acide ptéroyl-monoglutamique). L'acide ptéroyl-monoglutamique est formé par l'association d'une ptéridine, d'un acide para-amino-benzoïque et d'un acide glutamique. Les formes réduites, dihydrofolate (DHF) et tétrahydrofolate (THF), sont les seules actives.

STRUCTURE ET PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

L'acide folique consiste en une partie 2-amino-4-hydroxy-ptéridine (ptéridine) liée par un groupement méthylène en position C-6 à une partie para-aminobenzoyl glutamique (figure 1). L'acide folique est le premier dérivé à avoir été synthétisé chimiquement. La synthèse des coenzymes B₉ à partir de l'acide folique nécessite plusieurs étapes :

- La réduction de l'acide folique en dihydro- et tétrahydrofolate, respectivement sur les positions 7,8 et 5,6.
- l'élongation de la chaîne glutamate par addition de résidus glutamiques en position gamma.
- la substitution de groupements monocarbonés en position N5 et/ou N10.

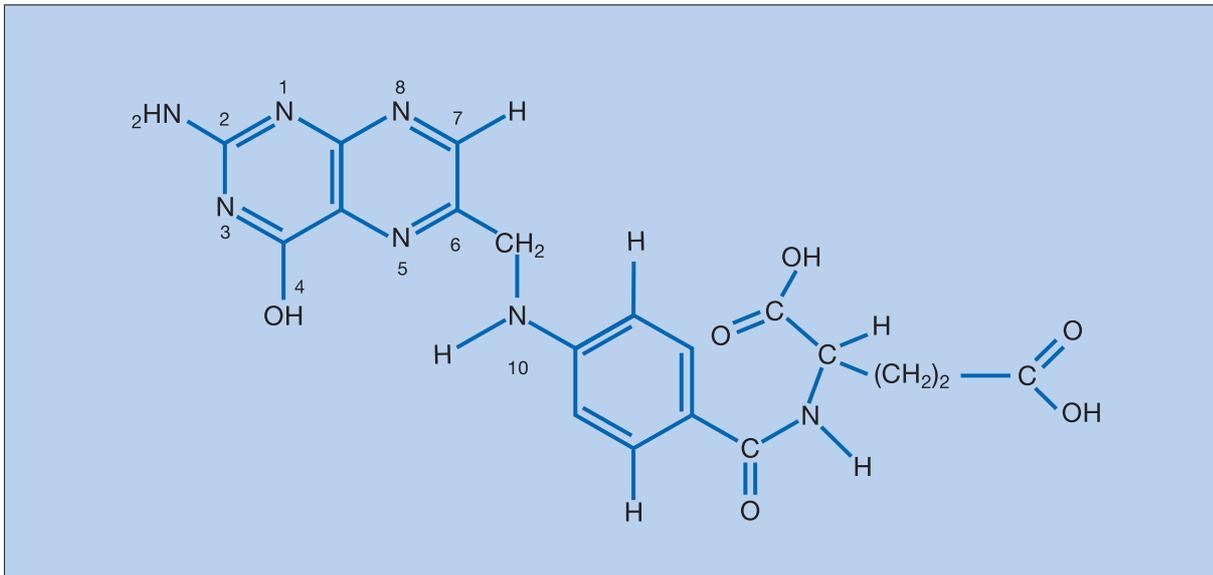


Figure 1 : Acide Folique.

L'acide folique est de couleur jaune, peu soluble dans l'eau et les solvants organiques, mais soluble en milieu alcalin. Il est instable lorsqu'il est exposé à la lumière et à l'air. L'exposition aux UV induit un clivage rapide de la molécule en position 9,10 pour donner une partie ptéridine et une amine aromatique libre. La lumière provoque une oxydation très rapide des folates réduits d'où la nécessité d'utiliser des agents réducteurs tels que l'acide ascorbique ou le mercaptoéthanol pour leur dosage.

MÉTABOLISME

Absorption et transport

Étapes intraluminale et entérocytaire

Dans l'alimentation, la majorité des folates sont sous forme méthyl- ou formyl-polyglutamates réduits. Ils sont liés aux protéines alimentaires dont ils sont libérés grâce aux protéases digestives. Ces polyglutamates sont ensuite transformés en monoglutamates activement absorbés par les entérocytes au niveau du jéjunum. Dans l'entérocyte, les polyglutamates sont scindés en monoglutamates sous l'effet de la conjugase intestinale qui est une γ -glutamylhydrolase présente dans la lumière et sur la bordure en brosse. Les monoglutamates sont ensuite transformés en N5-méthyltétrahydrofolates qui traversent la barrière intestinale et passent dans le sang portal. Un récepteur spécifique des folates a été identifié sur la bordure en brosse (de Nonancourt-Didion *et al.*, 2001). Le système de transport à travers l'entérocyte est saturable et optimal à un pH compris entre 5,5 et 6. Quand des doses pharmacologiques d'acide folique ou d'autres folates sont administrées, la majeure partie de la vitamine transportée apparaît sous forme non modifiée dans la circulation portale.

Dans le sang

Dans le sang, une partie importante des folates circulants est liée à des protéines de faible affinité. Quarante pour cent sont retrouvés associés à l' α_2 -macroglobuline, 33 % à l'albumine et 23 % à la transferrine. Les concentrations en vitamine B₉ varient de 5 à 15 $\mu\text{g/l}$ dans le plasma et sont 20 fois plus élevées dans les globules rouges. La captation cellulaire met en jeu deux transporteurs, la *folate binding protein* (FBP) et le transporteur des folates réduit (RFC) (Antony, 1992). La FBP transporte préférentiellement les folates oxydés. Le RFC est la protéine privilégiée du transport des folates réduits. Le processus d'internalisation des folates par la FBP met en jeu la potocytose, processus d'endocytose spécifique des protéines à ancre GPI (Anderson, 1998). Les structures impliquées sont les cavéoles, qui se présentent sous forme de vésicules de 50 nm de diamètre et dont la surface est tapissée d'un manteau strié. Ces vésicules peuvent être ouvertes ou closes, avec une implication probable du manteau strié dans l'alternance de ces états. Le cholestérol est indispensable au maintien des structures en radeau. Le processus d'internalisation dure 1 heure. Les cavéoles sont retrouvées à la surface des cellules endothéliales et des fibroblastes. La cavéoline, un des composés du manteau strié, est identifiée dans les fibroblastes. Le retrait du cholestérol entraîne la dépolymérisation du manteau.

Dans la cellule

L'acide folique nouvellement internalisé doit nécessairement être réduit pour être fonctionnel (Wagner, 1996). Il subit aussi une polyglutamation afin d'être retenu au sein de la cellule, majoritairement sous forme de pentaglutamate. L'enzyme responsable de la polyglutamation est la folylpolyglutamate synthétase. La polyglutamation semble aussi nécessaire à une bonne interaction entre les folates et les enzymes du cycle des folates. Il existe une enzyme lysosomiale «antagoniste» de la synthétase, la folylpolyglutamate hydrolase. Les formes monoglutamiques peuvent se fixer aux enzymes du cycle des folates. La forme active des folates est l'acide tétrahydrofolique obtenu par deux réductions successives de l'acide folique par la dihydrofolate réductase (DHFR, EC 1.5.1.3) ou une réduction si le substrat est l'acide dihydrofolique. La première réduction se fait en positions 7 et 8, la seconde en positions 5 et 6 (figure 1). Pivot d'un cycle complexe, le tétrahydrofolate se comporte comme un transporteur d'unités monocarbonées par substitution des azotes N₅ et N₁₀ (figure 1). Les réactions d'interconversion sont compartimentées ; elles peuvent prendre place dans le cytoplasme ou dans la mitochondrie. Il y a sans doute une canalisation des différentes formes de folates dans le cytoplasme. Les enzymes sont probablement organisées en groupes, agissant successivement sans laisser diffuser dans le cytoplasme les unités monocarbonées. Seules les formes polyglutamates seraient canalisées. La méthylène-tétrahydrofolate deshydrogénase et la méthylène-tétrahydrofolate cyclohydrolase ont des activités liées. C'est aussi le cas entre la sérine hydroxy-méthyl transférase, la 10-formyl synthétase et la 10-formyl deshydrogénase qui réduit le 10-formyl THF en THF avec production de CO₂, la méthylène-tétrahydrofolate cyclohydrolase et la 10-formyl synthétase. Si les folates ou la vitamine B₁₂ viennent à manquer, la production de méthionine cesse pour favoriser la production de bases puriques. Pour répondre à un déficit en méthionine, le cycle s'oriente plutôt en faveur du 5-CH₃-THF et de la méthionine synthase, privilégiant les réactions de reméthylation (figure 2). Une proportion importante des folates cellulaires - jusqu'à 50 % en fonction du tissu et du type cellulaire - est associée à la mitochondrie.

Le pool de folates mitochondrial est distinct du pool des folates cytosoliques et a des fonctions différentes dans le transfert de radicaux monocarbonés. Seules les formes monoglutamiques du 5-formyl-THF et du 5-CH₃-THF sont transportées spécifiquement à l'intérieur de la mitochondrie. Les cellules de mammifères ont une folylpolyglutamate synthétase mitochondriale. Les formes polyglutamates peuvent être exportées vers le cytoplasme.

Distribution, stockage et élimination

Le foie capte rapidement 10 à 20 % des folates alimentaires, avec une préférence pour les dérivés non méthylés et non réduits. Les tissus périphériques s'enrichissent en dérivés fonctionnels, réduits et méthylés. Dans les tissus, les folates endogènes sont presque exclusivement des folylpolyglutamates tandis que les ptéroylmonoglutamates prédominent dans le plasma et les urines. La transformation des folates en polyglutamates est nécessaire pour la rétention tissulaire et la concentration des folates transportés ; bien que le métabolisme en dérivés polyglutamates soit considéré comme un mécanisme de stockage, les folylpolyglutamates sont aussi des coenzymes actifs.

Le foie est l'organe de stockage essentiel. Les réserves en folates chez l'homme sont relativement faibles (estimées entre 5 et 15 mg), compte tenu des besoins quotidiens (300 µg/jour). Les folates hépatiques sont pour partie excrétés dans la bile et réabsorbés. Cette circulation entérohépatique serait un des mécanismes impliqués dans la recirculation des folates. Les autres compartiments des folates sont les tissus à renouvellement rapide, essentiellement la moelle osseuse et les épithéliums buccal, digestif, vaginal, etc.

Les folates sont filtrés par le glomérule et réabsorbés au niveau du tubule proximal. En cas de concentration importante des folates plasmatiques, les capacités de réabsorption sont dépassées et les dérivés de l'acide folique sont éliminés dans les urines.

Rôles biochimiques

De par leur structure chimique, les folates jouent un rôle majeur dans les échanges de groupements mono-carbonés. Ils ont donc une fonction essentielle dans le métabolisme de l'histidine, de la glycine, dans la synthèse de la méthionine par reméthylation de l'homocystéine et dans la synthèse des purines et des pyrimidines. Le cycle des folates et son rôle dans le métabolisme des monocarbonés est résumé sur la [figure 2](#). Il dépend de deux autres vitamines du groupe B, les vitamines B₁₂ et B₂ (Guéant, 2002 ; Ogier, 1987).

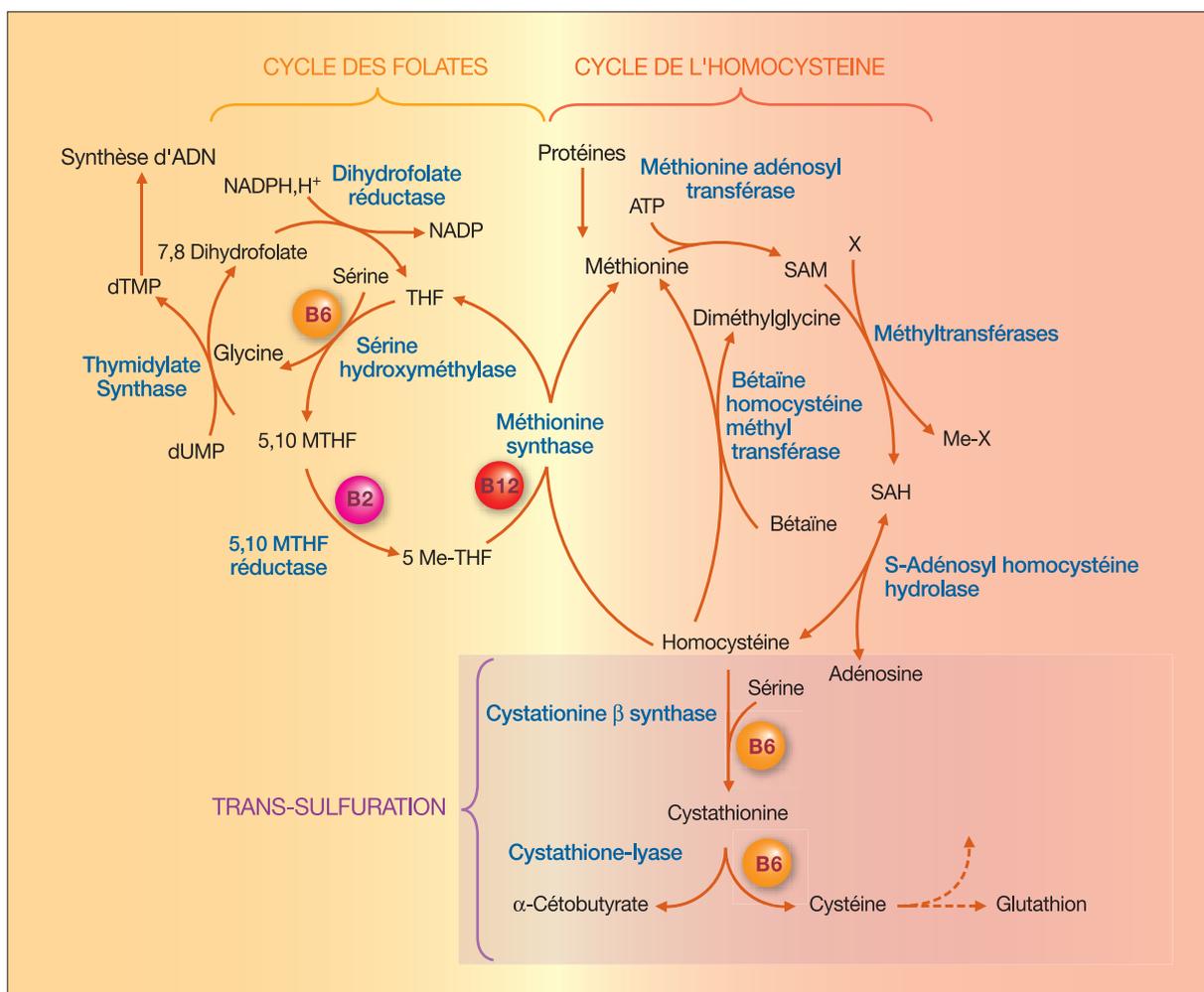


Figure 2 : Cycle des folates et métabolisme des monocarbone.

dUMP : désoxyuracilemonophosphate ; dTMP : désoxythymidinemonophosphate ; SAH : S-adenosylhomocystéine ; FAD : Flavine-adenosine dinucléotide ; NADP : Nicotinamide-adenine-dinucléotide phosphate ; THF : Tétrahydrofolate ; DHF : Dihydrofolate ; MTHF : Méthylène-THF ; Me-THF : Méthyl-THF ; SAM : S-adenosylméthionine

PHYSIOPATHOLOGIE

Manifestations de la carence

La carence profonde donne lieu à des signes généraux, hématologiques et neuropsychiatriques. Lentement, une asthénie et une anorexie apparaissent. L'anémie peut être précédée par une macrocytose isolée. Elle est de type mégalo-blastique, arégénérative. Il existe souvent une carence combinée en folates et en fer qui se traduit, au lieu de la classique anémie macrocytaire, par une anémie normocytaire avec présence de corps de Jolly sur le frottis. Le tableau clinique inaugural peut, indépendamment ou à côté des signes cliniques de l'anémie, comporter des troubles du sommeil, de la mémoire et une irritabilité. Parfois, il peut se manifester de manière aiguë par des nausées, des vomissements et des diarrhées. S'y associent des lésions des muqueuses bucco-pharyngées et

éventuellement des dermites et/ou un purpura. La carence en folates est associée à un risque augmenté de maladie cardiovasculaire et de déficit cognitif du sujet âgé, notamment du fait de l'augmentation des taux plasmatique et cellulaire de l'homocystéine. Son association avec le risque de cancer du colon est également suggérée par certaines études (Peyrin-Biroulet *et al.*, 2004).

Hématopoïèse

Les cellules souches sanguines se divisent activement en permanence. Si les purines et pyrimidines constitutives des acides nucléiques sont en quantité insuffisante, ces cellules ne peuvent plus se diviser, mais continuent à grandir ; ceci explique en partie le développement de l'anémie mégaloblastique observé dans les carences en vitamine B₉.

Système nerveux central

La carence en vitamine B₉ induit des troubles neuropsychiatriques dont la pathogénie n'est pas très claire. Il pourrait s'agir d'anomalies de la synthèse de certaines amines, et de la glycine, elle même neurotransmetteur. Contrairement à la carence en vitamine B₁₂, elle n'induit pas de troubles de la myélinisation. Cette différence n'est pas expliquée.

Malformations

Il existe un faisceau d'arguments pour penser que la supplémentation en folates réduit l'incidence des malformations du tube neural et des trisomies dans certaines populations à risque (Guéant *et al.*, 2003 ; Mills *et al.*, 1995). Le lien métabolique entre les folates, le métabolisme des unités monocarbonées et le développement du tube neural n'est pas connu.

POPULATIONS À RISQUES DE CARENCE

Carences d'apport

Les carences d'apport sont relativement fréquentes dans les pays occidentaux. Elles correspondent à une consommation insuffisante d'aliments riches en folates (légumes verts, fruits et abats) ou d'une cuisson prolongée et systématique des aliments. En Europe, il existe un gradient croissant nord sud des apports en folates qui pourrait expliquer en partie les différences d'association du polymorphisme C677T du gène MTHFR avec le risque d'anomalie de fermeture du tube neural et de trisomie ainsi que les différences de fréquences alléliques de ce polymorphisme. En Afrique, la prévalence de la carence en folates est très élevée et se traduit par une élévation très importante de la concentration en homocystéine plasmatique chez les rares porteurs du génotype MTHFR 677TT (Amouzou *et al.*, 2004).

Malabsorption

Les principales étiologies des carences en folates sont : les malabsorptions, secondaires aux effets digestifs et hépatiques de l'alcool ou secondaires à une atteinte pariétale telle qu'une atrophie villositaire de la maladie coéliqua ou de la sprue tropicale, une iléocolite étendue, une sclérodermie, un lymphome, une résection du grêle. Il existe également une malabsorption congénitale des folates, qui est très rare.

EXPLORATION BIOLOGIQUE

Paramètres accessibles à l'analyse

La diminution de la concentration sérique et/ou de la concentration érythrocytaire en folates doit faire évoquer une carence. Celle-ci peut être confirmée, en dosant l'homocystéine plasmatique totale, classiquement augmentée dans ce contexte, même en l'absence d'anomalies hématologiques (Fayol, 1996 ; Guéant, 2002). La mesure des concentrations sériques et/ou érythrocytaires est recommandée en présence de signes cliniques évocateurs d'une carence, en cas de macrocytose isolée ou d'une hyperhomocystéinémie modérée, dans un contexte de thrombophilie. Une diminution concomitante des folates sériques et érythrocytaires est très évocatrice d'une carence. Le taux des folates dans le sérum est soumis à des fluctuations en fonction du régime alimentaire récent ou de la prise de certains médicaments. Le taux des folates érythrocytaires permet une estimation des réserves en folates de l'organisme et est corrélée avec le taux de folates hépatiques. Parfois, une diminution des folates érythrocytaires avec folates sériques normaux ou élevés est observée dans les carences en vitamine B₁₂ ou au début d'un traitement par acide folique (Zittoun, 1998).

Dosages des folates

Techniques par compétition

Les techniques par compétition sont basées sur le principe de la compétition de la vitamine à doser avec une vitamine marquée vis-à-vis de sites de liaison d'un accepteur ayant une haute affinité pour la vitamine. Elles utilisent la β -lactoglobuline ou la FBP comme ligand. L'extraction se fait par dénaturation des protéines à 100 °C ou à pH 12 en présence de dithiothreitol qui permet de conserver les folates sous forme réduite. Les protéines de liaison sont soit en solution, soit immobilisées de façon covalente sur des particules : billes de verre ou particules de cellulose. Le marquage de la vitamine est :

- soit radioactif (technique par radiodilution isotopique)
- soit par un composé chimique luminescent, en général un ester d'acridinium qui émet une lumière induite par une réaction chimique d'oxydation de ce produit

- soit par une enzyme, en général la phosphatase alcaline dont l'activité est révélée par combinaison à un substrat, le phosphate de méthyl 4-ombelliférone

Au total, la quantité de radioactivité ou de lumière émise est inversement proportionnelle à la quantité de folates présente dans l'échantillon.

Techniques microbiologiques

Les techniques microbiologiques utilisent un germe "folates-dépendant", dont la croissance est proportionnelle au taux de vitamine présent dans l'échantillon à doser. Ces méthodes restent des techniques de référence.

Les échantillons sont déprotéinisés à 100 °C en présence de vitamine C, qui joue le rôle d'anti-oxydant. La mise en contact avec la souche bactérienne est réalisée pendant 20 heures à 37 °C. Le germe le plus fréquemment utilisé, *Lactobacillus casei* est sensible à toutes les formes oxydées et réduites de folates ; d'autres germes sont sensibles à des formes plus spécifiques. Par exemple, *Streptococcus faecalis* permet de doser toutes les formes de folates à l'exception du N5 méthyl-THF. La concentration en N5 méthyl-THF, forme prépondérante dans le sérum et les érythrocytes, est obtenue par différence entre les valeurs de *L. casei* et de *S. faecalis*. Un troisième germe, *Pediococcus cerevisiae* est sensible exclusivement au N5- formyl- THF (acide folinique).

Avantages et inconvénients des différentes techniques

Les techniques par compétition sont rapides, fiables dans près de 95 % des cas pour le dosage des folates sériques. Il faut signaler cependant de rares cas où des taux artificiellement abaissés de folates dans le sérum ne correspondent pas, en fait, ni au tableau clinique, ni aux taux trouvés à l'aide de la technique microbiologique, ni à celui du dosage des indicateurs métaboliques, notamment l'homocystéine sérique, qui reste dans les limites de référence. À l'inverse, des concentrations normales sont parfois trouvées dans les érythrocytes chez des malades présentant une carence typique. Ces techniques par compétition dosent tous les dérivés actifs ou inactifs. Elles présentent des interférences avec les antimétabolites analogues structuraux des folates tel que le méthotrexate. Les méthodes de radiodilution isotopique peuvent être couplées au dosage de la vitamine B₁₂ en utilisant conjointement 2 isotopes, la vitamine B₁₂-Cbl et l'acide folique-iode 125. La nouvelle génération de dosage fait appel à des traceurs non marqués par chemiluminescence (ester d'acridinium) ou enzymofluorimétrie (enzyme : phosphatase alcaline, substrat : méthyl-umbelliferyl-phosphate). Ces techniques sont moins sensibles que les méthodes microbiologiques, notamment pour le dosage des folates érythrocytaires. Une concentration en folates normale dans les érythrocytes ne peut exclure une carence vraie dans un contexte clinique évocateur et doit être contrôlée par une technique microbiologique.

Les techniques microbiologiques sont très sensibles et reproductibles ; elles présentent l'avantage de ne doser que les formes actives de folates mais elles sont fastidieuses. De plus, elles sont soumises à des interférences avec les antibiotiques et les antimétabolites, tels le méthotrexate, la triméthoprime, la pyriméthamine.

Facteurs de variation pré-analytiques et analytiques

Les folates sont habituellement dosés dans le sérum et dans les érythrocytes. Le dosage dans les érythrocytes ne peut être pratiqué directement car il est nécessaire de déconjuguer les polyglutamates en monoglutamates. Ces dosages impliquent un prélèvement sur tube sec (folates sériques) et sur EDTA (folates érythrocytaires).

Les prélèvements doivent être traités le plus rapidement possible en raison de la labilité des folates réduits. Le sérum doit être recueilli après centrifugation et congelé à -20 °C. Si l'échantillon doit séjourner à la température ordinaire, il convient d'ajouter de l'acide ascorbique à raison de 5 mg/ml de sang pour stabiliser les folates réduits. Le sang total est hémolysé en présence d'eau distillée enrichie en acide ascorbique à raison de 10 g/l en pratiquant une dilution au 1/10 ou au 1/20 selon les protocoles utilisés. Cet hémolysat doit séjourner au moins 1 heure à température du laboratoire pour permettre à la conjugase sérique de scinder les polyglutamates majoritairement présents dans les globules rouges.

Variations physiologiques et interprétation des résultats

Les valeurs usuelles dépendent des laboratoires. Elles sont comprises entre 5 et 20 µg/l pour les folates sériques et entre 120 et 500 µg/l pour les folates érythrocytaires et varient avec l'âge (Potier de Courcy et Zittoun, 1990). L'établissement de valeurs de référence dépend non seulement de l'environnement nutritionnel mais également de polymorphismes des enzymes cibles du métabolisme des folates tels que la méthylène-tétrahydrofolate-réductase (MTHFR) et la méthionine synthase, qui jouent un rôle notamment comme déterminants génétiques de la transméthylation de l'homocystéine en méthionine par le méthyl-tétrahydrofolate. La concentration sérique des folates est plus élevée chez les nouveau-nés et les enfants. Les folates baissent relativement chez les sujets âgés. Il existe également une baisse des folates entre le 1^{er} trimestre et le terme de la grossesse.

Les principaux facteurs de variations analytiques et biologiques des folates figurent dans le [tableau 1](#).

STRATÉGIE DIAGNOSTIQUE

Plusieurs examens biologiques ont un intérêt complémentaire pour établir le diagnostic d'une carence en folates. Il s'agit, en plus des dosages sériques et érythrocytaires des folates, des tests hématologiques et du dosage de l'homocystéine. Il faut également veiller à écarter l'existence d'une carence en vitamine B₁₂ qui peut être masquée par la carence et/ou la "supplémentation" en folates.

Frottis sanguin et myélogramme

Dans un contexte d'anémie macrocytaire et mégalo-blastique, le frottis confirme la présence de macrocytes et d'une polychromasie, les polynucléaires sont segmentés et de grandes tailles, le myélogramme montre une moelle riche en érythroblastes de grande taille d'où le terme de mégalo-blastique. Les examens hématologiques ne permettent pas de différencier une carence en folates d'une carence en vitamine B₁₂.

Tableau 1 : Facteurs de variations pré-analytiques et analytiques du dosage des folates.

Facteurs de variation	Recommandations	Variations observées
Facteurs de variation liés à l'échantillon		
Nature de l'échantillon	Sérum : prélèvement centrifugé dans les 3 heures	Risque d'augmentation de la concentration sérique par enrichissement provenant des folates érythrocytaires
Agents physiques : UV	Proscrire l'exposition directe à la lumière	Photolyse des folates
Conservation	À + 4 °C au maximum : 24 h À - 20 °C : 4 à 6 semaines Ajout de vitamine C dans le culot érythrocytaire afin de conserver les folates sous forme réduite	Dégradation au cours du temps des folates sans addition d'acide ascorbique
Facteurs de variation liés au spécimen		
Hémolyse	À proscrire	
Radioisotopes et xénobiotiques	À proscrire : Technetium 99 et Gallium 67 Antibiotiques Méthotrexate	Interférences respectives sur : Dosages radioisotopiques Dosages microbiologiques Tous les dosages

Le dosage vitaminique

Dans le contexte d'une macrocytoses et/ou d'une anémie mégalo-blastique, il faut associer les dosages des folates sériques ou érythrocytaires au dosage de la vitamine B₁₂. Les méthodes par compétition non isotopiques sont les plus fréquemment utilisées. Les laboratoires très spécialisés utilisent plutôt les méthodes radioisotopiques et les méthodes microbiologiques.

Dosages des métabolites

Il existe une hyperhomocystéinémie modérée souvent comprise entre 15 et 30 µmol/l dans un contexte de carence en folates. Cette augmentation est inconstante et elle est classiquement moins importante que celle observée dans les carences en vitamine B₁₂. Le diagnostic différentiel impose de doser, en outre, les 2 vitamines. Le dosage de l'acide méthylmalonique est utile lorsque qu'une suspicion de carence en vitamine B₁₂ existe.

Test de charge en folates

Ce test de charge est réservé à des laboratoires spécialisés. Il est utilisé lorsque le diagnostic de malabsorption congénitale est évoqué.

SOURCES ET BESOINS

Les aliments les plus riches en acide folique sont : la levure sèche, le foie, les épinards frais en salades, les petits pois, les haricots, les avocats, les tomates surtout sous forme de jus et certains fruits, les oranges surtout sous forme de jus, les pamplemousses et les melons. Les céréales de tout type sont des aliments à très forte teneur en folates ainsi que tous les fruits secs. Enfin, parmi les aliments d'origine animale, ce sont les abats et notamment le foie de bœuf qui ont la plus grande teneur en folates. Il existe depuis 1998 un enrichissement des céréales en folates aux Etats Unis, ce qui s'est traduit par une augmentation sensible de la concentration plasmatique dans les études épidémiologiques récentes (Potier de Courcy *et al.*, 2001).

Une partie importante (jusqu'à 50 %) des folates est perdue dans l'eau de cuisson des légumes. Les folates présents dans les aliments sont des ptéroyl-polyglutamates réduits et très sensibles à l'oxydation. Des pertes importantes de folates alimentaires surviennent lors de la préparation des repas, notamment par cuisson prolongée des aliments dans l'eau en ébullition, ce qui entraîne une libération des folates dans l'eau. Les dérivés polyglutamates peuvent être hydrolysés en monoglutamates durant la conservation ou la préparation des repas.

CONCLUSION

Les carences en folates sont fréquentes dans certaines populations à risque telle que la femme en âge de procréer, la femme enceinte et le sujet âgé. Elle est associée à un risque augmenté de malformations de type spina bifida. Il existe également une association avec les maladies neurodégénératives et les maladies cardiovasculaires qui pourrait être en partie indépendante de l'hyperhomocystéinémie produite par la carence. Le diagnostic positif de la carence impose d'écarter une carence en vitamine B₁₂ associée.

Références bibliographiques

- Amouzou EK, Chabi NW, Adjalla CE et al.** (2004). High prevalence of hyperhomocysteinemia related to folate deficiency and mutated the 677 C → T mutation of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase in coastal West Africa. *Am J Clin Nutr*, **79** : 619-624.
- Anderson RGW** (1998). The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem*, **67** : 199-225.
- Antony AC** (1992). The biological chemistry of folate receptors. *Blood*, **79** : 2807-2820.
- De Nonancourt-Didion M, Guéant JL, Adjalla C et al.** (2001). Overexpression of folate binding protein α is one of the mechanism explaining the adaptation of HT29 cells to high concentration of methotrexate. *Cancer Lett*, **171** : 139-145.
- Fayol V** (1996). Actualités sur la vitamine B₁₂ et les folates : dosage et interprétation. *Spectra Biologie*, **15** : 25-30.
- Green R.** Metabolite assays in cobalamin and folate deficiency. *In* : Wickramasinghe S (1995). *Baillières Clinical Haematology*, London, 533-566.
- Guéant JL.** Folates. *In* : EMC (2002). Elsevier, Paris.
- Guéant JL, Rodriguez-Guéant RM, Anello G et al.** (2003). Genetic determinants of folates and vitamin B₁₂ metabolisms: a common pathway in neural tube defect and Down syndrome. *Clin Chem Lab Med*, **41** : 1473-1477.
- Mills IL, McPartlin IM, Kirke PN et al.** (1995). Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet*, **345** : 149-151.
- Ogier H.** Acide folique (folacine). *In* : Saudubray JM, Ogier H, Munnich A (1987). *Les Vitamines, Aspects métaboliques, génétiques, nutritionnels et thérapeutiques*. Masson, Paris, 282-310.
- Peyrin-Biroulet L, Barraud H, Ancel D et al.** (2004). Folate metabolism and colorectal carcinogenesis. *Gastroenterol Clin Biol*, **28** : 582-592.
- Potier de Courcy G, Christidès JP, Hercberg S.** Vitamine B₉ (acide folique). *In* : Martin A (2001). *Apports nutritionnels conseillés pour la population française*. CNERNA-CNRS, Edition Tec & Doc, 3ème édition, 205-211.
- Potier de Courcy G, Zittoun J.** Acide folique. *In* : Siest G, Henny J, Schiele F (1990). *Référence en biologie clinique*. Elsevier, 57-68.
- Wagner C** (1996). Symposium on the subcellular compartmentation of folate metabolism. *J Nutr*, **126** : 1228S-1234S.
- Zittoun J.** Acide folique. *In* : Le Moël G, Saverot-Dauvergne A, Gousson T, Guéant JL (1998). *Le statut vitaminique. Physiopathologie, exploration biologique et intérêt clinique*. Editions Médicales Internationales, Tec & Doc, 287-302.



Vitamine B₁₂

Jean-Louis Guéant - Georges Covi

Le syndrome de carence de la vitamine B₁₂ a été successivement décrit par Jean-Baptiste Combe, Thomas Addison, puis par Biermer au cours du XIX^e siècle. La manifestation principale est une anémie mégaloblastique, à laquelle s'associent des troubles neurologiques et des troubles digestifs, l'ensemble constituant l'anémie pernicieuse. En 1925, Whipple met en évidence expérimentalement l'action antianémique du foie de veau. Un an plus tard, Minot et Murphy établissent que cette thérapeutique est capable d'interrompre l'évolution de l'anémie pernicieuse de Biermer. En 1928, Castle postule que la substance antipernicieuse est composée, d'une part, d'un facteur extrinsèque apporté par l'alimentation, en particulier par la consommation de foie, et d'autre part, d'un facteur intrinsèque présent dans la muqueuse gastrique. Une série de travaux conduit en 1948 à l'isolement à partir du foie de la vitamine B₁₂, à l'état de cyanocobalamine sous forme de cristaux rouges. À partir de 1955, les recherches s'orientent vers la détermination de la structure chimique de la cyanocobalamine isolée du foie ainsi que de plusieurs facteurs, ayant une activité vitaminique B₁₂ et un noyau cobalamine. Dorothee Crowfoot Hodgkin, Prix Nobel de Médecine, établit la structure des cobalamines par cristallographie aux rayons X. Le facteur intrinsèque, décrit par Castle, est purifié en 1965 par Ralph Gräsbeck. En 1973, la synthèse chimique de la cyanocobalamine est réalisée par Woodward *et al.* Les deux dernières décennies ont permis d'augmenter considérablement nos connaissances concernant les mécanismes d'assimilation, le transport de cette vitamine, mais aussi les différentes étapes de sa biosynthèse par des micro-organismes (Aimone-Gastin *et al.*, 1998 ; Alpers, 1999 ; Guéant et Namour, 2003 ; Stabler, 1999).

DÉFINITION

La vitamine B₁₂ est représentée par un ensemble de composés appartenant à la famille des cobalamines : cyanocobalamine, hydroxocobalamine, méthylcobalamine et adénosylcobalamine. Les cobalamines ont une structure chimique proche de l'hème, mais l'atome central de fer y est remplacé par un atome de cobalt, d'où le nom de cobalamines (Stabler, 1999).

La cyanocobalamine est une poudre rouge violacé, soluble dans l'eau. Elle est stable à la chaleur, mais sensible à la lumière. Il existe notamment une photoconversion de l'hydroxocobalamine en aquocobalamine, ou encore une conversion des coenzymes B₁₂ en cyanocobalamine en présence de cyanure de potassium. C'est pour cette dernière raison que la forme moléculaire standard utilisée en chimie clinique est la cyanocobalamine. Elle présente un spectre UV caractéristique avec deux bandes d'absorption principales respectivement situées entre 315 et 358 nm et 518 et 550 nm selon les vitamères. La vitamine B₁₂ est soluble dans l'eau mais également soluble dans certains solvants, tels que l'acétone. C'est cette propriété qui a été utilisée pour sa purification.

STRUCTURE

La vitamine B₁₂ représente un groupe de molécules, les cobalamines, qui sont des cobamides. Les cobamides sont constituées par l'addition, en dessous de la structure tétrapyrrolique presque plane (position α) d'un ribonucléotide, uni par coordinence au cobalt et par liaison ester à l'aminopropanol du pyrrole D, ainsi que par l'addition au-dessus du plan (position β) d'un deuxième ligand anionique, uni par coordinence au cobalt. Les cobalamines sont des cobamides dont le ribonucléotide est un 5,6-diméthylbenzimidazole (Figure 1). Le ligand 5,6-diméthylbenzimidazole symétrique par rapport au plan est variable et labile. Ce peut être un groupement hydroxyle (hydroxocobalamine), méthyle (méthylcobalamine, qui est un coenzyme), 5'-désoxyadénosine (5'-désoxyadénosylcobalamine, qui est la deuxième forme coenzymatique connue). On retrouve également dans le sang circulant des traces d'aquocobalamine et de cyanocobalamine (Stabler, 1999).

MÉTABOLISME

Absorption

La vitamine B₁₂ d'origine alimentaire est essentiellement apportée par les protéines d'origine animale (foie, œuf, viande, lait, poissons, crustacés). Les cobalamines sont d'abord libérées des protéines par l'acidité et la pepsine gastriques. Elles se lient à l'haptocorrine dans l'estomac, car l'affinité de la vitamine B₁₂ pour cette protéine d'origine salivaire est supérieure à celle pour le facteur intrinsèque

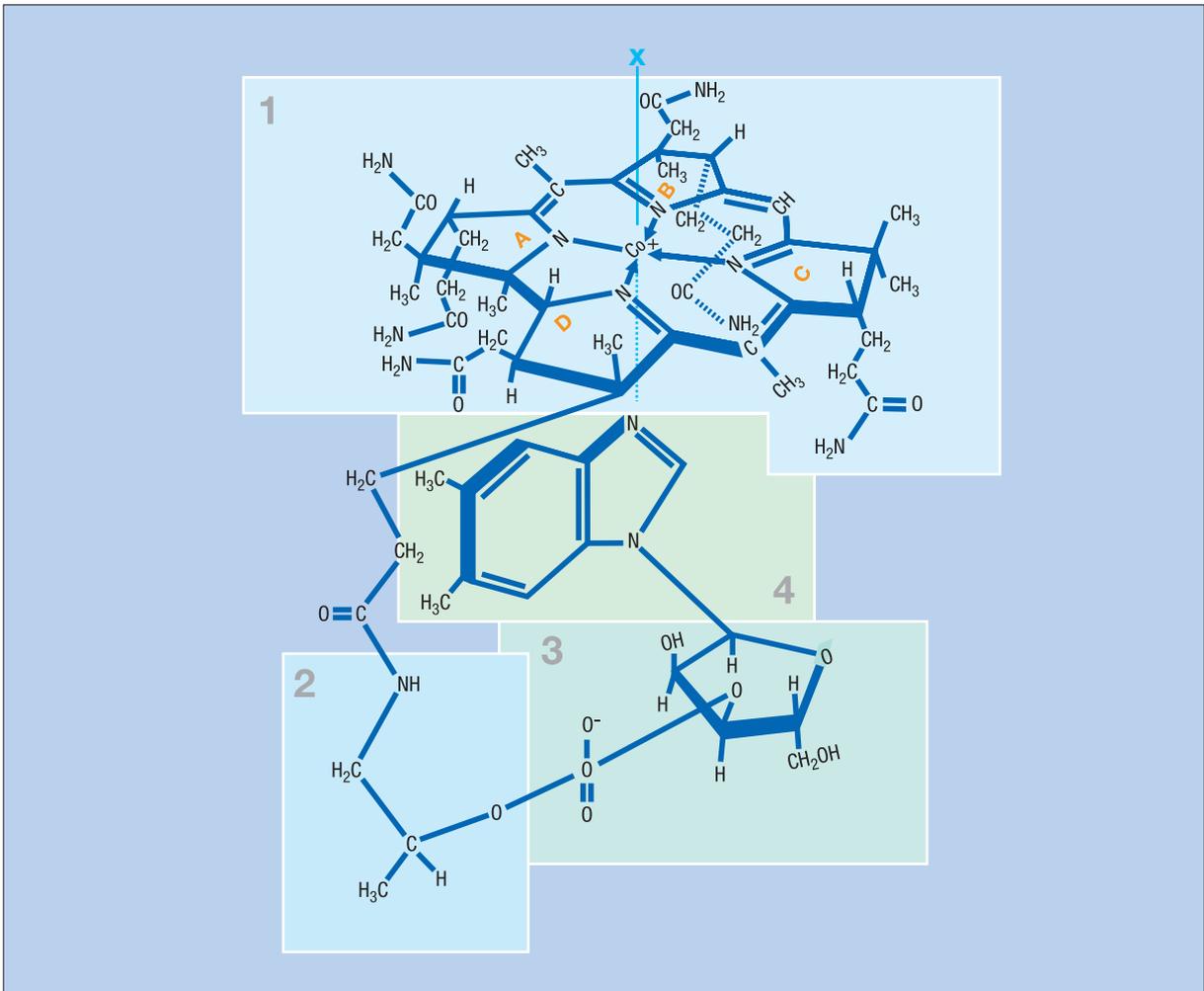


Figure 1 : Structure des cobalamines.

synthétisé par les cellules pariétales de l'estomac. L'haptocorrine est dégradée par les enzymes protéolytiques pancréatiques, ce qui permet aux cobalamines de se lier au facteur intrinsèque. Le complexe cobalamine-facteur intrinsèque est ensuite absorbé par endocytose au niveau de l'iléon distal, après fixation sur un récepteur multiligand formé de cubiline associée à la protéine amnionless. Le facteur intrinsèque est alors dégradé dans le compartiment lysosomal et les cobalamines sont transférées sur la transcobalamine synthétisée par les entérocytes et le complexe passe ensuite dans la circulation sanguine (Aimone-Gastin *et al.*, 1998 ; Alpers, 1999 ; Nicolas et Guéant, 1995). La transcobalamine est une protéine synthétisée par un gène de ménage qui permet au complexe d'être internalisé par endocytose dans toutes les populations cellulaires après fixation sur un récepteur dont le gène reste encore non identifié. L'haptocorrine est également retrouvée dans le sang et dans la plupart des cellules. Son rôle est mal connu. Elle pourrait participer au stockage sanguin et cellulaire et surtout à l'élimination dans la bile des cobalamines et d'analogues structuraux qui constituent potentiellement des facteurs anti-vitaminiques. Il existe un cycle entéro-hépatique et un stockage hépatique qui permettent à l'organisme de constituer des réserves pour 3 ans. En effet, le foie est l'organe le plus riche en vitamine B₁₂. Il contient plus de 60 % de la totalité de la vitamine B₁₂ présente dans l'organisme.

Utilisation

La cyanocobalamine et l'hydroxocobalamine utilisées en thérapeutique sont des dérivés oxydés stables (Co^{3+}). La méthylcobalamine et l'adénosylcobalamine sont deux coenzymes de formes réduites instables (Co^{1+}).

Rôles métaboliques

L'activité vitaminique correspond à deux coenzymes, la 5' désoxyadénosylcobalamine (AdoCbl) et la méthylcobalamine (MeCbl) (P01-II-97-01). La 5' désoxyadénosylcobalamine est le coenzyme de la méthylcoenzyme A mutase (EC 5.4.99.2) qui catalyse la conversion de l'acide méthylmalonyle en succinyl coenzyme A par transfert intrachaîne d'un atome d'hydrogène (Guéant *et al.*, 1990 ; Rosenblatt et Fenton, 1999 ; Vidailhet et Touati, 1998). Cette réaction est mitochondriale et permet l'oxydation ultérieure du succinyl-coenzyme A dans le cycle de Krebs. La méthylcobalamine est le coenzyme de la méthionine synthase (EC 2.1.1.13), qui permet la synthèse de méthionine par transméthylation de l'homocystéine. Le groupement méthyle transféré est apporté par le méthyltétrahydrofolate, ce qui permet la régénération du tétrahydrofolate. En cas de carence en méthylcobalamine, il y a donc une trappe métabolique probable du méthyltétrahydrofolate avec défaut de régénération (Guéant *et al.*, 1990 ; Rosenblatt et Fenton, 1999 ; Vidailhet et Touati, 1998). La cobalamine est un intermédiaire du transfert dont le cobalt se comporte comme une base catalytique qui suit un cycle réductionnel, lui-même catalysé par une méthionine synthase réductase (Rosenblatt et Fenton, 1999). Cette réaction cytoplasmique est particulièrement importante. En effet, l'homocystéine est un acide aminé pro-oxydant, non incorporé dans les protéines, dont le taux cellulaire est régulé par cette réaction. L'homocystéine est un facteur de risque de thrombophilie, de maladies cardiovasculaires et neurodégénératives. En outre, la méthionine, acide aminé indispensable, est le précurseur de la S-adénosyl méthionine qui est le substrat des réactions de méthylation de l'ADN, des lipides, des protéines et de certains biofacteurs essentiels au métabolisme cellulaire (Stabler, 1999). Enfin, la trappe métabolique du méthyltétrahydrofolate pourrait diminuer la synthèse du thymidylate par défaut de régénération du tétrahydrofolate (Zittoun et Cooper, 1987). Au total, la carence cellulaire et tissulaire est responsable d'une accumulation de chromatine avec blocage de la mitose qui affecte en tout premier lieu les cellules à renouvellement rapide, ce qui se traduit par une anémie macrocytaire et/ou mégaloblastique avec pancytopénie et par une atrophie des muqueuses, notamment digestives. Les manifestations neurologiques centrales et périphériques sont moins bien expliquées. Il existe une neuropathie périphérique avec sclérose combinée de la moelle, une dégénérescence de la gaine de myéline, ainsi qu'une atteinte mal systématisée du système nerveux central qui s'accompagne de troubles des fonctions supérieures pouvant évoluer vers une démence.

Elimination

La vitamine B₁₂ est éliminée par la bile, les urines et les fèces. La demi-vie de la vitamine B₁₂ dans l'organisme est d'environ un an.

Effecteurs métaboliques de la carence en vitamine B₁₂

L'augmentation de l'homocystéine circulante peut correspondre soit à une carence en vitamine B₁₂, soit à une carence en folates ou en vitamine B₆ - une augmentation conjointe de la cystathionine, produit du catabolisme de l'homocystéine, étant un argument en faveur d'une carence en vitamine B₆. L'augmentation de l'acide méthylmalonique plasmatique ou sérique est spécifique d'une carence en vitamine B₁₂ et plus particulièrement d'une carence en adocobalamine, puisqu'elle résulte d'un défaut de conversion du méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA. Dans certains cas de carence en vitamine B₁₂, l'acide méthylmalonique peut être élevé alors même que le taux de l'homocystéine reste normal ; c'est notamment le cas des affections génétiques qui se traduisent par une absence de méthylcobalamine. En cas de carence en méthylcobalamine, il peut exister une élévation du 5-méthyltétrahydrofolate circulant. Pour expliquer ce fait, certains auteurs évoquent l'existence d'une trappe métabolique, correspondant à un défaut de régénération du tétrahydrofolate à partir du 5-méthyltétrahydrofolate. Cette hypothèse reste néanmoins controversée

RÔLE PHYSIOLOGIQUE ET MANIFESTATIONS DE LA CARENCE

Etant donné que les réserves en vitamines B₁₂ sont importantes, la carence s'installe très lentement. Contrairement à la carence en vitamine B₉, il faut plusieurs mois pour voir apparaître les premiers signes de déficit en cobalamines. On observe alors une asthénie et une anorexie.

Hématopoïèse

La carence en vitamine B₁₂ induit une diminution globale de l'hématopoïèse et une anémie mégaloblastique similaire à l'anémie par carence en vitamine B₉. Cet effet est expliqué biochimiquement par les interrelations existant entre le métabolisme des vitamines B₉ et B₁₂, et notamment par un blocage de la reméthylation des folates en cas de carence cellulaire en méthylcobalamine. L'anémie est macrocytaire et arégénérative ; si elle est profonde, les signes généraux des anémies s'associent à ceux de la carence en vitamine B₁₂. La macrocytose est le premier signe de carence en vitamine B₁₂, elle apparaît avant l'anémie (Zittoun et Cooper, 1987).

Système nerveux

Les cobalamines jouent aussi un rôle dans l'intégrité du système nerveux. La carence en vitamine B₁₂ induit une neuropathie par dégénérescence des nerfs périphériques et des cordons latéraux et postérieurs de la moelle. Le principal trouble neurologique est une neuropathie sensitive bilatérale et symétrique avec paresthésies débutant le plus souvent au niveau des membres inférieurs. Il existe des altérations des axones avec dégénérescence de la gaine de myéline dont les mécanismes moléculaires sont mal expliqués, et qui ne sont pas observés dans la carence en folates (Stabler, 1999). Les répercussions cliniques de la sclérose combinée de la moelle

comportent des paresthésies, des douleurs, une diminution de la sensibilité superficielle et profonde pouvant altérer la marche. Le cervelet peut être atteint avec comme conséquence une démarche ébrieuse. Des signes psychiatriques sont fréquents sous forme d'instabilité affective, de trouble de la mémoire, ou de dépression.

Systeme cutanéomuqueux

La vitamine B₁₂ intervient également dans l'intégrité du système cutanéomuqueux. Lors d'un état de carence, son altération est caractérisée essentiellement par la glossite de Hunter : la langue apparaît lisse, décapillée. Enfin, une carence profonde s'accompagne d'une atrophie villositaire qui majore la malabsorption (Aimone-Gastin *et al.*, 1998).

POPULATIONS À RISQUE DE CARENCE

Régime végétarien strict

La vitamine B₁₂ est apportée exclusivement par les aliments d'origine animale. Il est donc logique que les végétaliens soient exposés à la carence.

Malabsorptions

Les carences sont fréquentes chez le sujet âgé (Joosten *et al.*, 1993) et doivent être systématiquement recherchées dans un contexte de manifestation neurologique et/ou de macrocytose érythrocytaire. Chez l'enfant et l'adulte jeune, il faut rechercher les causes génétiques qui affectent l'absorption, l'anémie de Biermer familiale, le déficit héréditaire en facteur intrinsèque, la maladie d'Imlerslund-Gräsbeck et le déficit héréditaire en transcobalamine. Les principales étiologies des carences en vitamine B₁₂ sont les gastrites chroniques antro-fundiques, la gastrite auto-immune de Biermer (avec atrophie fundique et la présence fréquente d'anticorps anti-facteur intrinsèque), les atrophies villositaires étendues à l'iléon, la cholestase, les iléites inflammatoires, le syndrome de l'anse borgne, la résection étendue de l'intestin grêle (Aimone-Gastin *et al.*, 1998 ; Stabler, 1999). L'augmentation de la concentration en vitamine B₁₂ peut être observée dans certaines affections, notamment lorsqu'il existe une cytolysé hépatique. La carence en vitamine B₁₂ peut être masquée chez les sujets supplémentés en folates. Il existe des carences cellulaires en vitamine B₁₂ par anomalie héréditaire du métabolisme des coenzymes AdoCbl et MeCbl (Rosenblatt et Fenton, 1999 ; Vidailhet et Touati, 1998). Dans ce cas, il n'y a pas de diminution de la concentration sérique en vitamine B₁₂. La concentration de l'un des coenzymes peut être anormale et surtout il existe, conjointement aux signes cliniques, une augmentation isolée ou combinée de l'acide méthylmalonique et de l'homocystéine.

Paramètres accessibles à l'analyse

Le diagnostic d'une carence en vitamine B₁₂ requiert la pratique d'un certain nombre de tests, variables selon les équipes et les plateaux techniques disponibles. Les tests les plus couramment utilisés sont le dosage de la vitamine B₁₂, le dosage des effecteurs métaboliques et, en tout premier lieu, celui de l'acide méthylmalonique et de l'homocystéine. L'intérêt du dosage de la vitamine B₁₂ concerne principalement le dépistage de la carence vitaminique. La limite de ce dosage, comme pour d'autres vitamines, réside dans le fait que le taux circulant n'est qu'un reflet indirect du stock tissulaire. C'est pourquoi les effecteurs métaboliques, tels que l'acide méthylmalonique ou l'homocystéine sériques sont de meilleurs marqueurs de la carence tissulaire. Le dosage des transcobalamines est utile pour le diagnostic des déficits héréditaires en transcobalamines et de l'hypervitaminose observée dans certains syndromes myéloprolifératifs. En pratique courante, les laboratoires de routine se cantonnent au seul dosage de la vitamine B₁₂, sérique ou plasmatique.

Dosage de la vitamine B₁₂

Il existe trois types de dosages de la vitamine B₁₂, les méthodes microbiologiques, les dosages par compétition avec un ligand marqué, les dosages spécifiques des vitamères avec séparation chromatographique (Fayol, 1996 ; Guéant *et al.*, 1990). Les premières méthodes utilisées furent les méthodes microbiologiques. La commodité du dosage radio-isotopique par compétition en a fait pendant longtemps la méthode la plus usitée, malgré ses contraintes réglementaires. Actuellement, les méthodes non isotopiques, qui font appel au même principe de dosage par compétition, permettent de rendre ce dosage accessible à l'ensemble des laboratoires.

Méthodes microbiologiques

Quatre micro-organismes sont utilisés pour le dosage microbiologique : *Lactobacillus leishmanii*, *Ochromonas malhamensis*, *Euglena gracilis* et *Escherichia coli*. La première étape est la défécation du sérum qui se fait à ébullition en milieu acide, en présence ou non de cyanure. La croissance des micro-organismes en présence de l'échantillon à doser est comparée à celle d'échantillons standards. Elle est mesurée par turbidimétrie ou par titrimétrie. Cette croissance peut être influencée par certains facteurs pouvant interférer avec le dosage. Les performances des dosages microbiologiques sont voisines de celles des méthodes radio-isotopiques. La limite de détection est de l'ordre de 30 pmol/l. Ces méthodes sont cependant fastidieuses, ce qui en limite grandement l'usage dans les laboratoires d'analyses de routine (Guéant *et al.*, 1990).

Méthodes isotopiques

Le dosage radio-isotopique repose sur la compétition entre les corrinoides à doser et un traceur isotopique, vis-à-vis d'une protéine acceptrice. La première étape du dosage consiste à libérer les cobalamines de leurs accepteurs protéiques. Cette libération est obtenue soit par traitement à

chaud en milieu acide, soit par extraction à froid en milieu fortement alcalin et en présence d'ions cyanures et de 1-4 dithiothreitol. Le traceur le plus usité est la cobalamine marquée au cobalt 57. Un dérivé histamide de la carboxycobalamine marqué à l'iode 125 a également été décrit. L'accepteur utilisé dans le dosage est le facteur intrinsèque purifié, qui est très spécifique des cobalamines. L'association haptocorrine et facteur intrinsèque n'est pas recommandable car elle dose à la fois les cobalamines et leurs analogues. Le complexe facteur intrinsèque-cobalamine (traceur ou molécule à doser) est séparé des cobalamines libres par fixation covalente du facteur intrinsèque sur un support solide, ou par liaison à un anticorps couplé à une phase solide ou encore en éliminant les cobalamines libres par adsorption sur une suspension de charbon actif recouvert de protéines (hémoglobine ou albumine). Cette méthode peut être couplée au dosage simultané des folates en utilisant conjointement deux protéines de liaison spécifique et deux molécules marquées, vitamine B₁₂-cobalt 57 et acide folique-iode 125.

Méthodes non-isotopiques

Actuellement, les méthodes automatisées utilisant des marqueurs non isotopiques sont les plus répandues en routine. Elles reposent sur le même principe que le dosage radio-isotopique par compétition, mais utilisent un traceur non radioactif (Duché, 2001 ; Fayol, 1996 ; Guéant *et al.*, 1990).

Une première catégorie de tests fait appel à une technologie utilisant une protéine recombinante. L'enzyme P-galactosidase recombinante peut être clivée en deux fragments inactifs qui se réassocient spontanément avec régénération du site actif lors de la réaction de liaison vitamine B₁₂-protéine liante (facteur intrinsèque). L'activité enzymatique est ainsi directement proportionnelle à la quantité de vitamine présente dans l'échantillon.

Une deuxième catégorie de tests est fondée sur une technique immuno-enzymologique microparticulaire. Après extraction, la vitamine B₁₂ est mise en présence des microparticules recouvertes de facteur intrinsèque. Dans un deuxième temps, un conjugué vitamine B₁₂-phosphatase alcaline est ajouté, après fixation des microparticules sur une matrice en fibre de verre. L'activité enzymatique est alors inversement proportionnelle à la concentration de l'échantillon en vitamine B₁₂.

Une troisième catégorie de tests consiste en un dosage par compétition entre la vitamine B₁₂ à doser dans l'échantillon et la vitamine B₁₂ couplée à un ester d'acridinium. Le facteur intrinsèque est lié de façon covalente à des particules magnétiques.

Toutes les techniques par immuno-compétition, isotopiques ou non, donnent des résultats satisfaisants au niveau des contrôles de qualité interlaboratoires auxquels elles sont soumises. En raison de leur facilité d'utilisation, les méthodes par immuno-compétition non-isotopiques sont actuellement les plus utilisées dans les laboratoires de routine.

Techniques chromatographiques

Les dosages des différents vitamères sont des méthodes limitées aux laboratoires de recherche très spécialisés. Les vitamères sont séparés soit par chromatographie sur couche mince soit par CLHP (chromatographie liquide à haute performance). Dans le premier cas, la quantification se fait par microbiologie/colorimétrie ; dans le deuxième cas, elle se fait par dosage radio-isotopique des fractions collectées.

Techniques recommandées et valeurs usuelles

Les dosages microbiologiques sont réservés aux laboratoires de recherche et présentent un intérêt notamment pour l'analyse alimentaire. Les dosages par compétition sont ceux utilisés couramment en biologie clinique. La reproductibilité intra- et inter-série est inférieure à 10 % (coefficient de variation). La limite de détection est de 30 pmol/l. Le domaine de mesure est compris entre 50 et 900 pmol/l (Guéant *et al.*, 1990). Le dosage des vitamines est indiqué dans le diagnostic des maladies congénitales du métabolisme des coenzymes B₁₂, la 5' désoxyadénosylcobalamine et la méthylcobalamine. Les valeurs usuelles considérées comme normales, quelle que soit la technique, chez un sujet sain, varient de 150 à 600 pmol/l. Le suivi biologique d'un même patient, devrait, pour avoir du sens, être effectué dans le même laboratoire, par la même technique, dans les mêmes conditions pré-analytiques et analytiques.

Facteurs de variation pré-analytiques et analytiques (Aimone-Gastin *et al.*, 1998 ; Guéant *et al.*, 2001)

La vitamine B₁₂ est dosée préférentiellement dans le sérum. Elle peut également être dosée dans un tube contenant de l'EDTA. Les héparinates sont à proscrire. La stabilité des prélèvements à - 20 °C est importante, à condition d'éviter l'exposition à la lumière et la présence de certains agents prooxydants (fer, acide ascorbique). Les facteurs de variation analytiques et pré-analytiques sont résumés dans le [tableau 1](#).

Tableau 1 : Vitamine B₁₂ : facteurs de variation pré-analytiques et analytiques

Facteurs de variation	Recommandations	Variations observées
Facteurs de variation liés à l'échantillon		
Nature de l'échantillon	Sérum ou plasma	La concentration plasmatique est un peu plus basse que la concentration sérique (différence estimée à 4 %)
Anticoagulant	Sans anti-coagulant ou avec EDTA	A éviter : héparinate pour les dosages radio-isotopiques
Agents physiques : UV	Proscrire l'exposition directe à la lumière	Photolyse des cobalamines
Conservation	À + 4 °C : au maximum 24 h À - 20 °C : 4 à 6 semaines	Pourcentage de dégradation au cours du temps non connu
Facteurs de variation liés au spécimen		
Hémolyse	À proscrire	
Médicaments et xénobiotiques	Technetium 99 et Gallium 67 Acide ascorbique Hydrate de chloral Antibiotiques Méthionine	

Interprétation des résultats

Les valeurs de référence doivent être déterminées par chaque laboratoire. Elles dépendent en effet de l'environnement nutritionnel et de facteurs génétiques tels que les polymorphismes et les enzymes cibles qui diffèrent en fonction des pays et régions géographiques (Guéant *et al.*, 1990). On considère en général qu'une concentration sérique en vitamine B₁₂ inférieure à 150 pmol/l doit faire rechercher une carence. Il existe cependant des carences avérées sans diminution de la concentration sérique, ce qui illustre l'importance de dosages conjoints des effecteurs métaboliques tels que l'homocystéine et l'acide méthylmalonique. La vitamine B₁₂ sérique est abaissée au cours des deux derniers trimestres de la grossesse, en l'absence de signes de carence. Les principaux facteurs de variation physiologique sont résumés dans le [tableau 2](#).

Tableau 2 : Vitamine B₁₂ : facteurs de variation physiologique

Facteurs de variation	Variations et commentaires
Age	Résultats contradictoires : pas de variation ou diminution de 6,2 % par décade
Sexe	Résultats contradictoires : pas de différence ou valeurs plus élevées chez les femmes par rapport aux hommes (+ 27 %)
Grossesse	Diminution progressive pendant toute la grossesse jusqu'à 40 % de la valeur initiale. Rétablissement de la concentration initiale 3 à 5 semaines après l'accouchement
Origine ethnique	La différence observée peut correspondre à une cause nutritionnelle ou environnementale
Régime végétalien	Diminution de la vitaminémie par carence d'apport
Malnutrition protéino-énergétique	Élévation en rapport avec l'état inflammatoire et la carence Élévation des analogues en rapport avec un déséquilibre de la flore intestinale
Xénobiotiques	Perturbation du transport humoral : alcool en rapport avec l'hépatopathie, biguanides, néomycine Inhibition de l'absorption : P.A.S., cholestyramine, colchicine Inactivation des cobalamines : protoxyde d'azote

Variations pathologiques

Une diminution de la concentration sérique de la vitamine B₁₂ est observée lors des carences d'apport, des carences par malabsorption spécifique (Biermer) ou non spécifique, par déficit congénital en facteur intrinsèque ou en transcobalamine, par maladie d'Imlerslund-Gräsbeck. La prise de certains médicaments (biguanides, colchicine, cholestyramine) peut diminuer l'absorption de la vitamine B₁₂.

Une augmentation de la concentration plasmatique de vitamine B₁₂ est observée dans la leucémie myéloïde chronique et les syndromes myéloprolifératifs, au cours de la cirrhose et du cancer du foie, lors de traitements par la cyanocobalamine.

STRATÉGIE DIAGNOSTIQUE

L'exploration analytique des cobalamines n'a d'intérêt que dans le cadre du diagnostic biologique des carences en vitamine B₁₂. Plusieurs examens biologiques permettent d'établir le diagnostic positif et étiologique de carence en cobalamine : les tests hématologiques, le dosage sérique de la cobalamine et des effecteurs métaboliques et les tests d'absorption.

Examen du frottis sanguin et myélogramme

L'examen microscopique du frottis sanguin montre la présence de macrocytes, de macro-ovalocytes, d'une polychromasie et de corps de Jolly. Les polynucléaires neutrophiles sont de grande taille et présentent des noyaux hypersegmentés à plus de cinq lobes. Les plaquettes sont souvent géantes.

La moelle est riche et très bleue, du fait de la basophilie du cytoplasme des érythroblastes qui peuvent représenter jusqu'à 70-80 % des éléments médullaires. Ces érythroblastes sont de grande taille, d'où le terme "mégalo-blastique" pour caractériser les anémies par carence en cobalamines (ou en folates) (Vidailhet et Touati, 1998 ; Zittoun et Cooper, 1987).

Dosages vitaminiques

En cas de macrocytose d'étiologie indéterminée ou en cas d'anémie mégalo-blastique, les concentrations de la vitamine B₁₂ sérique et des folates sériques et érythrocytaires doivent être déterminées, pour les puristes, par méthode radio-isotopique ou par dosage microbiologique. Un taux inférieur à 100 pmol/l de vitamine B₁₂ est considéré comme anormal, et il existe un intervalle intermédiaire, compris entre 100 et 150 pmol/l, où se superposent les populations de patients carencés et de sujets sains.

Dosages des métabolites

Les taux normaux d'homocystéine dans le sérum sont inférieurs à 20 micromol/l. Une élévation de l'homocystéine et de la cystathionine dans le sérum est observée dans les carences en vitamine B₁₂. L'élévation de l'homocystéine est également observée dans les carences en folates. La cystathionine est élevée dans les carences en folates et en vitamine B₁₂.

L'augmentation des taux d'acide méthylmalonique et d'acide 2-méthylcitrique dans le sang est un signe précoce de la carence en adocobalamine, mais est aussi constatée dans les exceptionnelles méthylmalonylaciduries congénitales par déficit en méthylmalonyl-CoA mutase ou par défaut de synthèse de l'adénosylcobalamine (Rosenblatt et Fenton, 1999 ; Vidailhet et Touati, 1998).

Dosages des protéines de transport

Le dosage des transcobalamines sériques est d'un intérêt limité pour le diagnostic des principales étiologies des carences par malabsorption. La transcobalamine II insaturée est augmentée en cas de carence, mais aussi en cas de syndrome inflammatoire, de cytolyse, et en cas d'hépatome. Le dosage de l'holotranscobalamine (transcobalamine saturée) est utile en cas de suspicion d'une carence et absence d'une hypovitaminémie. C'est en pratique un paramètre très onéreux dont l'évaluation doit être complétée. L'haptocorrine (transcobalamine I et III ou protéine R) est augmentée en cas de syndrome myéloprolifératif.

Test de dU-suppression

Ce test évalue la biosynthèse du thymidylate, étape indispensable à la biosynthèse de l'ADN. Il est fondé sur la détermination de la suppression de l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN après addition de déoxyuridine froide dans une suspension de cellules médullaires. C'est un test qui n'est pratiqué que dans quelques laboratoires très spécialisés (Zittoun et Cooper, 1987).

Le dosage du récepteur soluble du facteur intrinsèque dans les urines

Le dosage du récepteur soluble du facteur intrinsèque dans les urines est utile pour le diagnostic de la maladie d'Imerslund-Gräsbeck (Aimone-Gastin *et al.*, 1998).

SOURCES ET BESOINS

La vitamine B₁₂ est exclusivement synthétisée par les micro-organismes. Ce nutriment est présent à l'état de traces dans les aliments dont les plus riches en vitamine B₁₂ sont par ordre décroissant : le foie, les rognons, le poisson, les viandes. Les apports sont environ 2 à 5 fois plus abondants dans les pays industrialisés que dans les pays en voie de développement. Les besoins sont variables selon les périodes de la vie. Ils sont considérés comme particulièrement importants chez les enfants et chez les femmes en période gestationnelle ou d'allaitement. Les apports nutritionnels conseillés sont estimés à 2,4 µg/j chez l'adulte (Guéant *et al.*, 2001).

CONCLUSION

Les carences en vitamine B₁₂ sont relativement fréquentes, notamment chez le sujet âgé, et correspondent essentiellement à une malabsorption. Ceci s'explique par la très faible teneur des aliments en vitamine B₁₂, mais aussi par la complexité des mécanismes de transport. Le diagnostic positif de la carence n'est pas toujours aisé. En particulier, elle ne s'accompagne pas toujours de signes hématologiques. Dans ce contexte, le dosage des effecteurs métaboliques dans le sérum (homocystéine et acide méthylmalonique) vient utilement compléter le dosage de la vitamine elle-même pour établir le diagnostic.

Références bibliographiques

- Aimone-Gastin I, Guéant JL, Ilardo C, Nicolas JP.** Vitamine B₁₂. *In* : Le Moël G, Saverot-Dauvergne A, Gousson T, Guéant JL (1998). *Le statut vitaminique*. Editions Médicales Internationales, Paris, 303-316.
- Alpers DH.** Intrinsic factor, haptocorrin, and their receptors. *In* : Banerjee R (1999). *Chemistry and Biochemistry of B₁₂*. John Wiley & Sons, New York, 411-440.
- Duché JC** (2001). Dosage plasmatique de la vitamine B₁₂ sur l'ACS180, Bayer diagnostics. Comparaison avec un dosage radio-isotopique. *Ann Biol Clin*, **59** : 617-621.
- Fayol V** (1996). Actualités sur la vitamine B₁₂ et les folates : dosage et interprétation. *Spectra Biologie*, **15** : 25-30.
- Guéant JL, Djalali M, Nicolas JP.** Cobalamine (vitamine B₁₂). *In* : Siest G, Henny J, Schiele F (1990). *Références en Biologie Clinique*. Elsevier, Paris, 225-231.
- Guéant JL, Namour F, Aimone-Gastin I, Nicolas JP.** Vitamine B₁₂ (cobalamines). *In* : Martin A (2001). *Apports nutritionnels conseillés pour la population française*. Editions Tec & Doc, Paris, 211-214.
- Guéant JL, Namour F.** Vitamin B₁₂: absorption, metabolism and deficiency. *In* : Alpers D (2003). *Encyclopedia of Gastroenterology*. Elsevier, New York, 619-624.
- Joosten E, Van den Berg A, Riezler R et al.** (1993). Metabolic evidence that deficiencies of vitamin B₁₂ (cobalamin), folate and vitamin B₆ occur commonly in elderly people. *Am J Clin Nutr*, **58** : 468-476.
- Nicolas JP, Guéant JL.** Gastric intrinsic factor and its receptor. *In* : Wickramasinghe SN (1995). *Baillière's Clinical Hematology. Megaloblastic anaemia, vol. 8*. Baillière Tindall, London, 515-531.
- Rosenblatt DS, Fenton WA.** Inborn errors of cobalamin metabolism. *In* : Banerjee R (1999). *Chemistry and Biochemistry of B₁₂*. John Wiley & Sons, New York, 367-384.
- Stabler SP.** B₁₂ and Nutrition. *In* : Banerjee R (1999). *Chemistry and Biochemistry of B₁₂*. John Wiley & Sons, New York, 343-365.
- Vidailhet M, Touati G.** Vitamines et erreurs innées du métabolisme. *In* : Le Moël G, Saverot-Dauvergne A, Gousson T, Guéant JL (1998). *Le statut vitaminique*. Editions Médicales Internationales, Paris, 391-409.
- Zittoun J, Cooper BA** (1987). *Folates et cobalamines*. Doin, Paris.

Vitamine C

Jean-Claude Guillard - Gisèle Le Moel

STRUCTURE CHIMIQUE - NOMENCLATURE ACTUALISÉE

Le terme "vitamine C" est utilisé comme terme générique pour tous les composés possédant l'activité biologique de l'acide L-ascorbique, dont la structure est apparentée à celle des sucres à six atomes de carbone ([figure 1](#)). De formule $C_6H_8O_6$, l'acide L-ascorbique (ou 2-oxo-L-thréo-hexono-4-lactone-2,3-enediol) comporte une fonction lactone, deux carbones asymétriques, les carbones 4 et 5, deux fonctions alcool et une fonction ène-diol ($HO-C=C-OH$) sur les carbones 2 et 3. C'est ce groupement qui est responsable du caractère acide de l'acide ascorbique ($pK_a = 4,17$), ainsi que de ses propriétés réductrices à la base de son activité biologique. L'ionisation de l'acide ascorbique donne un énolate conjugué avec le $C=O$ lactonique, siège d'une forte mésomérie ([figure 2](#)) et au pH physiologique l'anion ascorbate est la forme qui prédomine.

PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

L'acide ascorbique se présente sous la forme d'une poudre blanche cristalline. Il est facilement soluble dans l'eau (300 g/l), peu soluble dans l'alcool et insoluble dans l'éther ou le chloroforme. Stable à l'état solide, l'acide ascorbique est rapidement oxydé au contact de l'oxygène lorsqu'il est en solution aqueuse ([tableau 1](#)).

L'ascorbate est un réducteur. Il peut céder un ou deux électrons à un oxydant ; par perte d'un électron et d'un proton, l'ascorbate s'oxyde en radical anion mono-déhydroascorbate (ascorbate $^{\bullet-}$ ou radical ascorbyle), lequel à son tour peut perdre un deuxième électron en s'oxydant en acide L-déhydroascorbique ([figure 3](#)). L'oxydation mono-électronique de l'ascorbate permet de réduire Fe^{3+} en Fe^{2+} et Cu^{2+} en Cu^+ ([figure 4](#)).

L'acide ascorbique est stable en solution acide. L'acide métaphosphorique contenant de l'EDTA (0,5-2 %), l'acide oxalique, l'acide trichloroacétique et l'acide perchlorique contenant un agent réducteur tel que le 2,3-dimercaptopropanol sont utilisés comme milieu d'extraction. L'extraction de l'acide ascorbique doit être conduite en lumière réduite et si possible en atmosphère inerte.

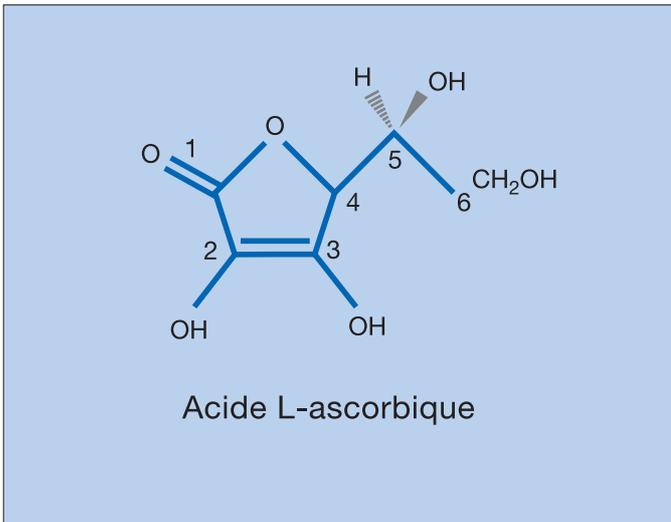


Figure 1 : Structure de l'acide ascorbique.

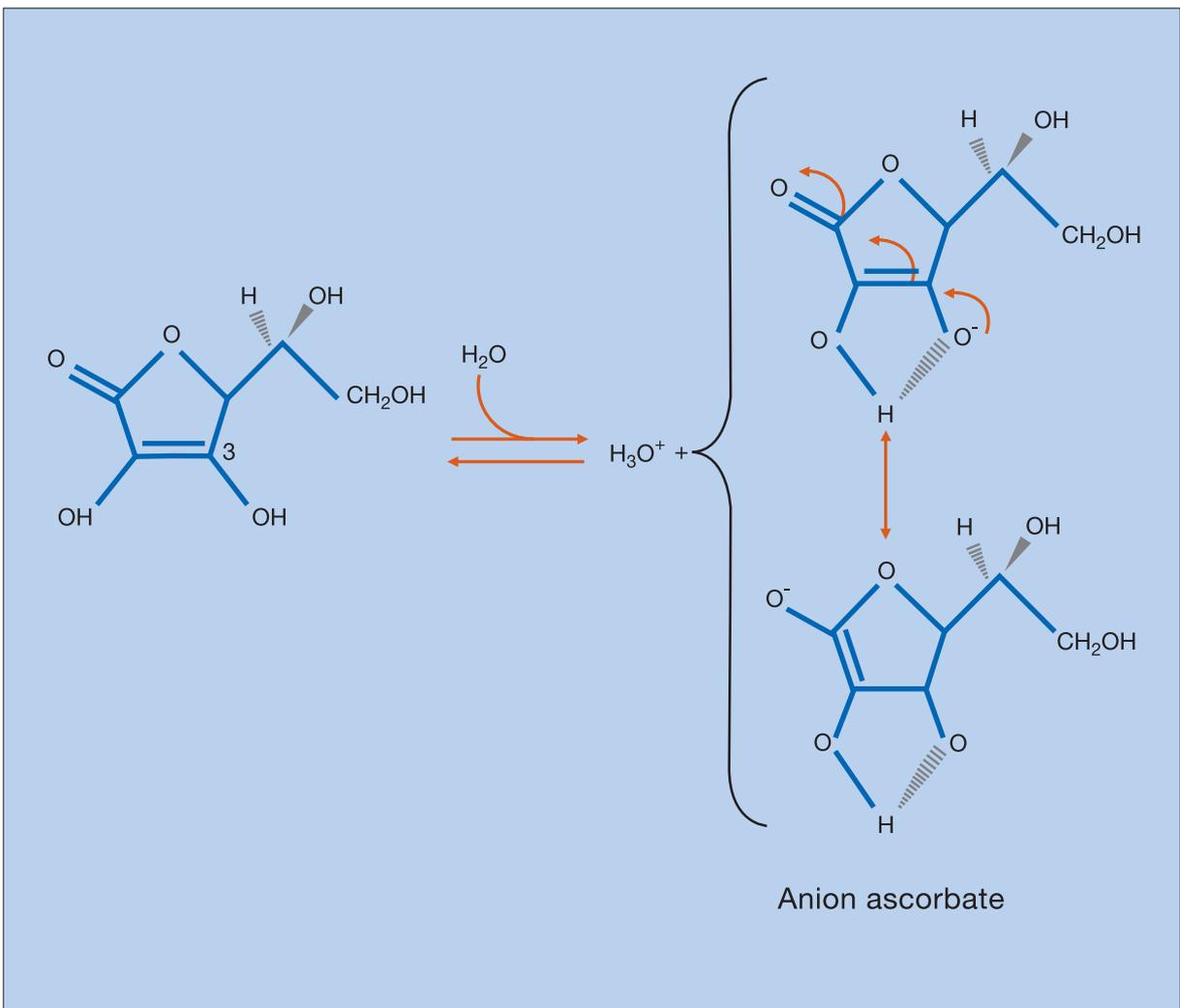


Figure 2 : Ionisation de l'acide L-ascorbique en anion ascorbate.

Tableau 1 : Propriétés physiques de l'acide ascorbique.

Formule brute	C ₆ H ₈ O ₆
Masse molaire	176,13
Forme cristalline	Mélange d'aiguilles et de plaquettes
Point de fusion	190-192 °C
Pouvoir rotatoire	[α] _{25/D} +20,5 °C à 21,51 °C
pH à 5 g/l	≈ 3
pH à 50 g/l	≈ 2
pK ₁	4,17
pK ₂	11,57
Potentiel redox	
déhydroascorbate/ascorbate	- 174 mV
ascorbate ^{•-} , H ⁺ /ascorbate ⁻	+ 282 mV
Solubilité, g/ml	
dans l'eau	0,3
dans l'éthanol absolu	0,02
dans l'éther, le chloroforme, le benzène	Insoluble
Spectre d'absorption	
à pH 2,0	E _{max} (1 %, 10 mm) = 695 à 245 nm
à pH 6,4	E _{max} (1 %, 10 mm) = 940 à 265 nm

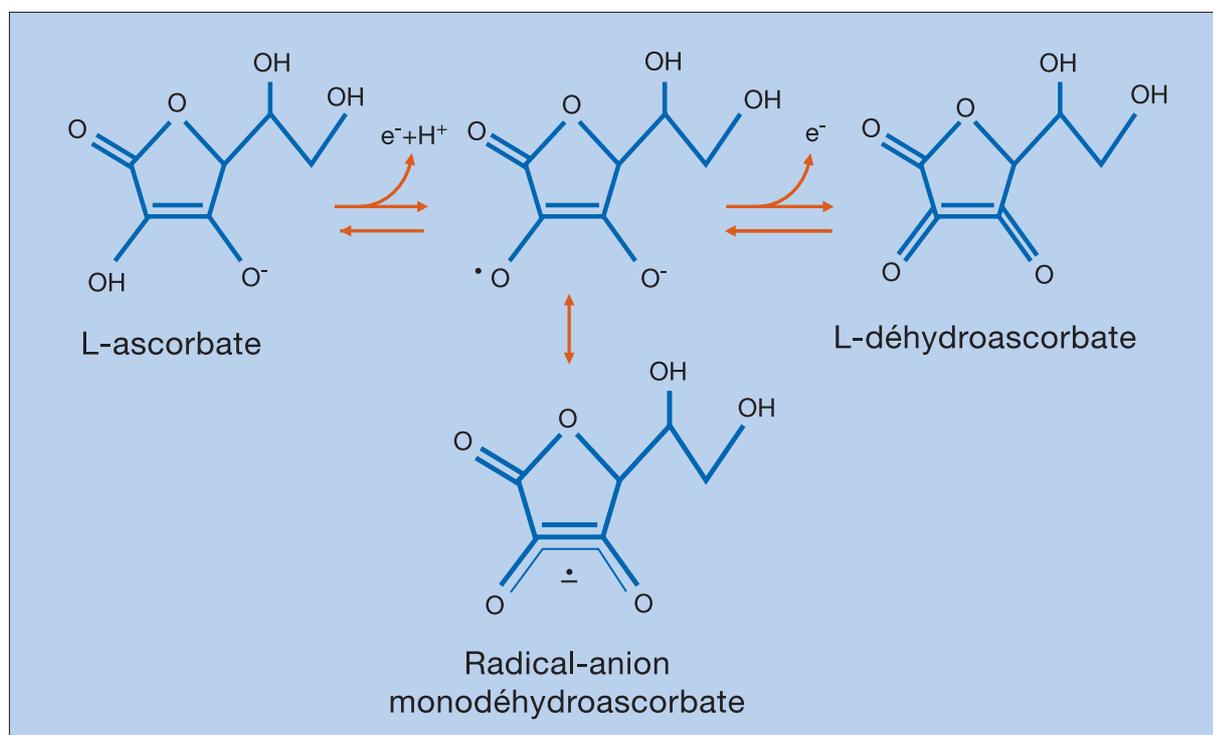


Figure 3 : Oxydation de l'acide ascorbique en radical anion monodéhydroascorbate.

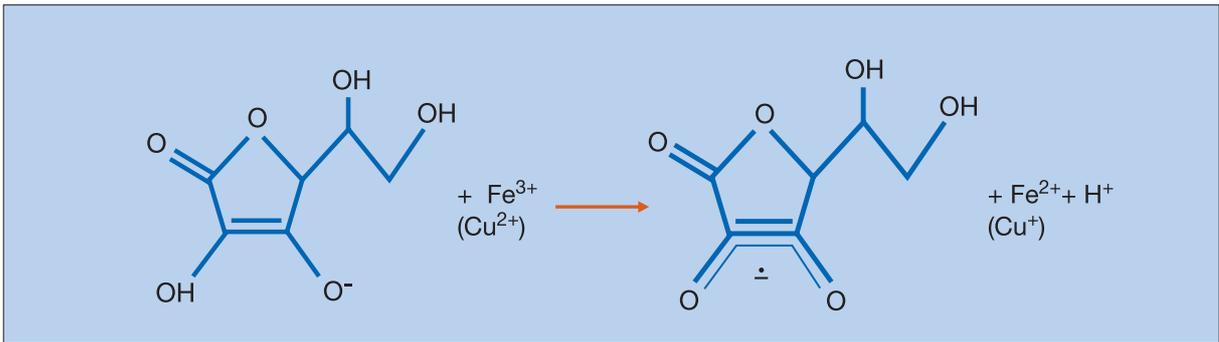


Figure 4 : La formation d'un radical anion monodéhydroascorbate s'accompagne de la réduction des ions Fe^{3+} et Cu^{2+} en Fe^{2+} et Cu^{+} .

MÉTABOLISME

Absorption intestinale

L'absorption intestinale de la vitamine C dépend de deux mécanismes : en présence de doses physiologiques, la vitamine est absorbée par un mécanisme de transport actif tandis qu'aux fortes doses, il existe une diffusion passive, peu efficace. Lorsque les apports de vitamine C sont bas (< 30 mg/j), la presque totalité de la dose ingérée est absorbée ; lorsque les apports varient de 30 à 180 mg/j, 70 à 90 % de la quantité ingérée sont absorbés. Le coefficient d'absorption intestinale est égal à 50 % pour une dose de 1,5 g et à 16 % dans le cas d'une dose de 12 g. La présence de grandes quantités de vitamine C non absorbée dans la lumière intestinale est à l'origine de la diarrhée osmotique et des troubles digestifs observés chez les individus ayant ingéré des doses importantes de vitamine C (> 2 g). Sur le plan pratique, il sera donc préférable d'ingérer plusieurs petites doses de vitamine C qu'une dose importante, qui sera mal absorbée et pourra être à l'origine de troubles digestifs.

L'absorption intestinale et l'entrée dans les cellules de l'acide ascorbique dépendent de transporteurs spécifiques "*Sodium Vitamin C Transporter*" (SVCT1 et SVCT2) appartenant à la famille des transporteurs "*Soluble Carriers*" ou SLC (Tsukaguchi *et al.*, 1999). La forme oxydée de l'acide ascorbique, le déhydroascorbate, franchit rapidement la membrane plasmique ; le transfert transmembranaire du déhydroascorbate dépend des transporteurs GLUT dans de nombreuses cellules, dont les entérocytes, les neurones et les astrocytes (figure 5).

Dans le rein, la vitamine C filtrée est réabsorbée jusqu'à un seuil correspondant à 14 mg de vitamine C/l de plasma. De ce fait, une quantité faible de vitamine C est excrétée par voie rénale lorsque les apports sont inférieurs ou égaux à 80 mg/j et l'excrétion rénale augmente proportionnellement lorsque la dose ingérée est supérieure à cette valeur. L'absorption intestinale dose-dépendante et la régulation de l'excrétion rénale permettent de maintenir les stocks corporels de vitamine C en cas d'apports faibles et de limiter l'augmentation de l'ascorbémie en cas d'apports élevés.

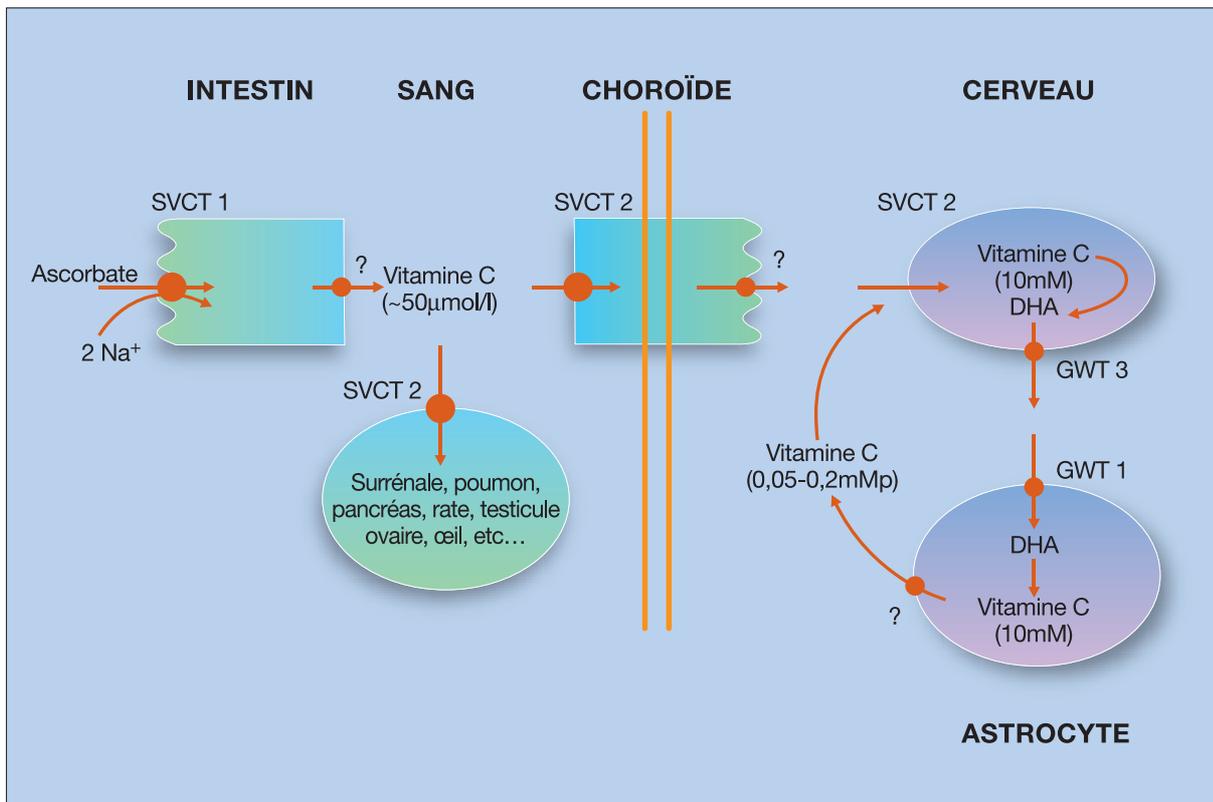


Figure 5 : Mécanismes impliqués dans le transport de la vitamine C.

Après absorption, la vitamine C passe dans le sang et est transportée aux différents tissus. Dans le plasma, la vitamine C est principalement sous forme d'ascorbate, l'acide déhydroascorbique ne représentant que 5 à 10 % de la vitamine C totale.

Métabolisme

Un grand nombre de cellules accumulent l'ascorbate contre un gradient de concentration. C'est ainsi que chez l'homme, les concentrations de l'ascorbate dans les glandes surrénales, l'hypophyse, le foie, les reins, les muscles et la rate sont très supérieures à celle mesurée dans le plasma : respectivement, 30-40, 40-50, 10-16, 5-15, 3-4 et 10-15 mg/100g versus 0,4-1,0 mg/100ml (Johnston *et al.*, 2001). Une part de l'ascorbate intracellulaire dérive du déhydroascorbate (DHA). Le DHA pénètre dans les cellules par les transporteurs GLUT 1, 2 et 4 et ce transport est inhibé *in vivo* par le glucose. Il a été de ce fait suggéré que les diabétiques ont un statut altéré en vitamine C du fait de l'effet inhibiteur qu'exerce le glucose sur le captage cellulaire du DHA.

L'ascorbate participe à de nombreuses réactions cellulaires entraînant son oxydation.

Élimination

La vitamine C est éliminée dans les urines sous forme inchangée et de métabolites. Aux doses physiologiques, le principal métabolite urinaire est l'acide oxalique. Le turn over de l'acide ascorbique est de 45 à 60 mg par jour (soit environ 3 % du pool total) et sa demi-vie est d'environ dix à vingt jours.

PHYSIOLOGIE

Les fonctions biologiques de la vitamine C mettent en jeu l'équilibre ascorbate/radical-anion monodéhydroascorbate. L'ascorbate est impliqué dans des réactions avec des oxydants mono-électroniques, principalement les cations ferrique et cuivrique, qu'il réduit respectivement en ions ferreux et cuivreux (figure 4). Ces métaux font partie d'un grand nombre d'oxygénases. Dans ces métallo-enzymes, l'ion métallique doit se trouver à l'état réduit pour être actif. La fonction de l'ascorbate est de maintenir dans cet état les ions ferrique ou cuivrique qui ont tendance à se former au contact de l'oxygène.

L'ascorbate est facilement oxydé en produisant un radical intermédiaire ayant une faible réactivité, le radical-anion monodéhydroascorbate. La faible réactivité de ce radical est à l'origine des effets antioxydants de l'ascorbate : un radical libre plus réactif se combine avec l'ascorbate et un radical moins réactif (le radical-anion monodéhydroascorbate) se forme.

La vitamine C a deux fonctions principales : celle de cofacteur dans les réactions d'hydroxylation catalysées par des oxygénases et celle d'antioxydant en phase aqueuse.

Réactions d'hydroxylation

Synthèse du collagène

L'une des fonctions biochimiques les plus importantes de la vitamine C est son rôle dans la biosynthèse du collagène, ainsi que l'atteste le fait que le scorbut soit caractérisé par des anomalies du tissu conjonctif et des troubles de la cicatrisation. L'ascorbate est en effet essentiel à l'hydroxylation post-translationnelle de la proline et de la lysine du procollagène afin de former l'hydroxyproline et l'hydroxylysine, deux acides aminés indispensables à la stabilisation de la triple hélice du collagène. De plus, une action directe de l'ascorbate sur l'expression des gènes de synthèse du collagène dans les fibroblastes en culture, indépendamment de son rôle dans le processus d'hydroxylation, est notée (Geesin et Berg, 2001).

Synthèse des catécholamines

L'enzyme dopamine- β -hydroxylase (D β H), une enzyme tétramérique, ayant pour cofacteurs le cuivre et la vitamine C, catalyse la synthèse de la noradrénaline à partir de la dopamine. La D β H est présente dans les granules chromaffines de la médullosurrénale et les vésicules synaptiques des terminaisons nerveuses sympathiques. L'activité de l'enzyme est optimale lorsque les ions cuivre qu'elle recèle (deux ions par monomère) sont à l'état réduit (Cu⁺). La fonction de l'ascorbate est de maintenir à l'état réduit cette enzyme. Le rôle de cofacteur indispensable de la vitamine C dans la synthèse des catécholamines a été récemment confirmé (Bornstein *et al.*, 2003) : chez les souris dont le gène codant pour SVCT2 a été invalidé, les teneurs tissulaires de vitamine C sont abaissées et les teneurs des médullosurrénales en noradrénaline et adrénaline sont respectivement diminuées de 50 et 81 %.

Synthèse de la carnitine

La synthèse de la carnitine s'effectue dans le foie à partir d'un acide aminé, la lysine. Cette synthèse nécessite deux hydroxylations. La première hydroxylation est catalysée par une enzyme mitochondriale, l' ϵ -N-triméthyllysine hydroxylase, et la seconde, par une enzyme cytoplasmique, la γ -butyrobétaine hydroxylase.

La carnitine synthétisée dans l'hépatocyte est libérée dans la circulation et captée par les tissus périphériques, en particulier les muscles squelettiques et le cœur. Elle sert de transporteur aux acyl-CoA qui ne peuvent franchir la membrane mitochondriale.

Catabolisme de la phénylalanine et de la tyrosine

Une preuve de l'implication de la vitamine C dans les réactions catalysées par les oxygénases est donnée par le comportement des cobayes carencés en vitamine C. Ces animaux excrètent dans les urines des quantités importantes d'acide phénylpyruvique et d'homogentisate, des catabolites de la tyrosine et de la phénylalanine. La première réaction de dégradation de la phénylalanine étant son hydroxylation en tyrosine, une même voie assure la dégradation de ces deux acides aminés. La phénylalanine est hydroxylée dans un premier temps en tyrosine sous l'action de la phénylalanine hydroxylase. Puis, la tyrosine subit une transamination en p-hydroxyphénylpyruvate, lequel est oxydé en homogentisate par la p-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase. L'homogentisate est à son tour oxydé par une autre dioxygénase en 4-maléylacétoacétate. Ces deux enzymes ayant pour cofacteurs le cuivre et la vitamine C, leur activité diminue en cas de manque de vitamine C ; l'homogentisate s'accumule, car la deuxième hydroxylation se déroule à une vitesse plus lente, et est éliminé dans les urines. L'homogentisate urinaire est ensuite oxydé en un pigment brun noirâtre. Cette élimination prend des proportions plus importantes en cas de déficit complet de l'homogentisate dioxygénase observé lors de l'alcaptonurie.

Activation des hormones peptidiques

De nombreuses hormones et *hormone-releasing factors* sont activés par des mécanismes post-translacionnels dont l' α -amidation. C'est le cas de nombreux peptides à fonction hormonale. Le précurseur α -amidé contient toujours un résidu glycine du côté de l'extrémité carboxy et l' α -amidation se fait en deux étapes. Dans une première étape, le peptidylglycine est hydroxylé en peptidyl- α -hydroxyglycine sous l'action de la "*peptidyl α -amidating mono-oxygenase*" (PAM) en présence d'oxygène, de cuivre et d'ascorbate (Eipper et Mains, 1991).

Hydroxylases dépendantes du cytochrome P450

Les hydroxylases microsomales dépendantes du cytochrome P450 catalysent, en présence de l'acide ascorbique, la transformation du cholestérol en acides biliaires et la dégradation de nombreux xénobiotiques (carcinogènes, polluants, pesticides). Il en est de même pour les hydroxylases microsomales et mitochondriales de la glande surrénale responsables de la synthèse du cortisol.

Métabolisme du fer

Le fer alimentaire se présente sous forme héminique, facilement absorbable, et sous forme non héminique, dont l'absorption est grandement dépendante de la composition du bol alimentaire. La vitamine C favorise l'absorption intestinale du fer non héminique et une relation dose-effet existe entre la quantité de vitamine C ingérée et le coefficient d'absorption intestinale du fer pour des doses de vitamine C comprises entre 10 et 100 mg (Bendich et Cohen, 1990). L'amplitude de l'effet de la vitamine C sur l'absorption du fer non héminique dépend de nombreux facteurs outre la dose de vitamine C : le type de repas, la composition du bol alimentaire, la présence de phytates, les modalités d'administration de la vitamine C, le statut en fer du sujet. Le rôle bénéfique de la vitamine C semble lié à sa capacité à réduire le fer ferrique en fer ferreux. Le fer ferrique (Fe^{3+}) est en effet soluble à pH acide et insoluble à pH alcalin, le pH qui règne dans le duodénum. En solution aqueuse, les ions métalliques sont liés par des ponts aux molécules d'eau. Si le pH augmente, des ions hydroxydes apparaissent et des polymères métalliques ou des hydroxydes métalliques insolubles se forment. A pH > 4, presque tout le fer ferrique précipite sous la forme de chlorure ferrique. Si l'ascorbate est ajouté au chlorure ferrique en solution acide, Fe^{3+} est réduit en Fe^{2+} , qui forme un complexe soluble à pH élevé.

L'acide ascorbique influence la répartition du fer dans l'organisme. Il favorise l'incorporation du fer dans la ferritine ainsi que sa mobilisation à partir de cette forme de réserve.

Métabolisme de l'histamine

L'acide ascorbique joue un rôle important dans le métabolisme de l'histamine. En effet, chez l'animal, la carence en vitamine C résulte en une accumulation d'histamine (Dawson et West, 1965). La carence en vitamine C n'ayant aucun effet sur l'activité de l'histaminase, les auteurs attribuent cet effet à une modification de la synthèse de l'histamine. Une étude ultérieure (Clemetson, 1980) montre que l'acide ascorbique prévient l'accumulation d'histamine et contribue à sa dégradation et à son élimination. L'acide ascorbique pourrait également agir en modulant la synthèse des prostaglandines et le métabolisme des nucléotides cycliques.

Métabolisme des nitrosamines

Au pH stomacal, les nitrites peuvent réagir avec différentes amines secondaires ou tertiaires en formant des nitrosamines hautement toxiques et carcinogènes. Ces dérivés N-nitroso aminés sont responsables de transformations cellulaires malignes. La vitamine C inhibe la formation des nitrosamines mais n'a aucun effet sur les nitrosamines déjà formées.

Réponse immunitaire

L'acide ascorbique est mis en jeu dans les fonctions immunologique et bactéricide des leucocytes en augmentant leur mobilité et en protégeant leur membrane des attaques oxydatives. L'acide ascorbique stimule aussi la formation de l'interféron (Gershoff, 1993).

Action antioxydante

Du fait de sa capacité à donner des électrons, l'ascorbate est un antioxydant puissant. Il piège les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO), tels le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$), l'anion superoxyde ($\text{O}_2\bullet^-$) et les espèces réactives dérivées de l'azote (ERN), tel que le peroxy-nitrite. Sa concentration tissulaire élevée lui permet d'exercer une protection antioxydante efficace : dans l'œil, vis-à-vis de l'attaque radicalaire générée par les photons ; dans les neutrophiles, vis-à-vis des ERO produites lors de la flambée oxydative de la phagocytose ; dans le sperme, vis-à-vis de l'attaque oxydative de l'ADN (Delamere, 1996 ; Fraga *et al.*, 1991 ; Levine *et al.*, 1994). L'ascorbate protège le plasma et les lipoprotéines de faible densité (LDL) en piégeant les ERO présentes dans la phase aqueuse avant qu'elles initialisent la peroxydation lipidique (Frei *et al.*, 1988). L'ascorbate joue aussi ce rôle antioxydant indirectement en régénérant d'autres antioxydants tels que le glutathion et la vitamine E.

EXPLORATION DU STATUT

Paramètres accessibles à l'analyse

Peu de paramètres sensibles et spécifiques permettant d'évaluer le statut vitaminique C sont actuellement disponibles. Trois sortes de tests sont accessibles et complémentaires :

- Evaluation des apports alimentaires de vitamine C à l'aide d'une enquête alimentaire ; quelle que soit la méthode d'enquête utilisée l'évaluation de l'apport alimentaire de vitamine C est difficile du fait de l'incertitude relative à la précision et à l'exactitude des données disponibles dans les tables alimentaires et de la forte variation de la teneur en vitamine C des différents aliments.
- Dosage de la vitamine C (acide ascorbique seul ou acide ascorbique + acide déhydroascorbique) dans le sang (éléments figurés, plasma, sérum) et dans l'urine. Plus récemment, le radical ascorbyle a été proposé comme un indice du stress oxydatif ; son dosage ne sera pas envisagé ici car faisant appel à des méthodes lourdes telle que la résonance paramagnétique électronique.
- Tests fonctionnels. Trois tests fonctionnels, le test au 2,6-dichloroindophénol, le test salivaire et le test lingual ont été développés ; malheureusement, ces tests bien que simples, non invasifs et faciles à mettre en œuvre sont peu spécifiques et peu sensibles.

Au total, le dosage de la vitamine C dans le plasma reste le test biologique le plus couramment utilisé. Cependant, du fait de l'absence de stockage, l'ascorbémie est essentiellement le reflet des apports récents en vitamine C. Après absorption intestinale, la vitamine C se répartit rapidement dans les tissus périphériques. Dans les leucocytes, la concentration est 80 fois supérieure à la concentration plasmatique. La concentration leucocytaire en acide ascorbique est considérée comme le meilleur reflet des réserves tissulaires en acide ascorbique.

Méthode de dosage

Cas du plasma

De très nombreuses méthodes de dosage de la vitamine C dans le plasma ont été publiées. La méthode recommandée (Guilland *et al.*, 1998) utilise la chromatographie liquide haute performance couplée à la détection fluorimétrique de la quinoxaline formée par réaction de l'acide déhydroascorbique avec l'orthophénylènediamine. L'acide ascorbique doit être oxydé au préalable en acide déhydroascorbique par l'iode (Tessier *et al.*, 1996), le brome ou le ferricyanure de potassium. Cette méthode présente l'avantage de doser la vitamine C totale (DHA + ascorbate) et, si besoin, de différencier la forme oxydée de la forme réduite.

Cas des leucocytes

Dans un premier temps, il est nécessaire d'isoler les cellules mononuclées (monocytes et lymphocytes) dans un certain volume de sang total, de les compter, de les lyser et de doser la vitamine C dans le lysat avec la même technique que celle utilisée pour le plasma. Le dosage leucocytaire est effectué par des laboratoires spécialisés dans des contextes particuliers de carence inexplicquée

Préparation de l'échantillon plasmatique

La préparation de l'échantillon est une étape essentielle du dosage du fait de la grande oxydabilité de l'acide ascorbique et du caractère instable du DHA. Le temps écoulé entre le prélèvement et le traitement au laboratoire doit être le plus court possible, même si le stockage du sang à + 4 °C à l'obscurité n'entraîne pas de perte de vitamine C pendant 24 heures (Dhariwal *et al.*, 1991). L'acide ascorbique étant rapidement oxydé à pH neutre ou alcalin, l'acidification du plasma doit être immédiate après centrifugation, suivie d'une congélation toute aussi rapide si le dosage est différé. Dhariwal *et al.* (1991) ne notent aucune perte de vitamine C au bout d'un mois de stockage au congélateur après déprotéinisation du plasma. Sur le plan pratique, un des protocoles utilisés consiste à déprotéiniser le plasma, obtenu par centrifugation du sang, par l'acide métaphosphorique à 5 % préparé extemporanément (un volume de plasma et deux volumes d'acide métaphosphorique). Après avoir agité le tube sur un vortex pendant 30 secondes, le défécant est centrifugé et le surnageant stocké à - 80 °C si besoin.

Préparation de l'échantillon leucocytaire.

Les manipulations sont effectuées à froid :

- Isolement des cellules mononuclées et comptage :
 - Recueil du sang sur EDTA, isolement selon la technique de Ficoll et centrifugation à froid à + 5 °C. Les cellules mononuclées sont sur le filtre à l'interface culot globulaire, granulocytes et plasma
 - Lavage des globules blancs et centrifugation, reprise du culot de centrifugation dans le réactif DPBS IX et dans une solution de bleu Trypan pour visualiser les cellules vivantes et les compter à l'aide d'une cellule de Malassez ou d'un compteur de cellules.
- Déprotéinisation en reprenant le culot de centrifugation par une solution d'acide métaphosphorique à 5 %.
- Lyse par congélation à - 80 °C ou à - 20 °C.
- Dosage de la vitamine C dans le lysat par la même technique que le dosage plasmatique.

Valeurs fréquentes et variations physiologiques

- Vitamine C plasmatique : 5 à 15 mg/l
- Vitamine C leucocytaire : moyenne = 360 $\mu\text{g} / 10^8$ cellules (valeurs extrêmes : 225 à 450 $\mu\text{g} / 10^8$ cellules) (Djedour *et al.*, 2005).
- Une ascorbémie < 2 mg/l (< 11 $\mu\text{mol/l}$) est considérée comme indiquant un risque élevé de carence en vitamine C ; les teneurs plasmatiques correspondant à un statut marginal sont moins bien définies. Pour Sauberlich *et al.* (1974), une ascorbémie < 2 mg/l et une ascorbémie comprise entre 2,0-2,9 mg/l correspondent respectivement à des risques de carence élevé et modéré.

VARIATIONS PATHOLOGIQUES

Etats de carence

La carence en vitamine C est responsable du scorbut chez l'adulte et de la maladie de Barlow chez l'enfant. Ces carences sont en recrudescence, dans nos pays développés, du fait de l'augmentation de la précarité.

Scorbut chez l'adulte

Dans sa forme ultime, le scorbut est caractérisé par des hémorragies sous cutanées et intramusculaires, des œdèmes des membres inférieurs, une neuropathie et une hémorragie cérébrale et, s'il n'est pas traité, le pronostic vital est mis en jeu. Actuellement, même dans les pays industrialisés, un état scorbutique doit être soupçonné en présence de lésions cutanées (papules hyperkératosiques sur les membres inférieurs, les fesses puis les bras et le dos, érythème, purpura, hémorragies périfolliculaires), de saignements gingivaux particulièrement chez les éthyliques chroniques, les personnes âgées vivant en institution, ou les personnes vivant seules.

Scorbut infantile (maladie de Barlow)

Le scorbut infantile, très rare, peut survenir chez des nourrissons ne recevant qu'une alimentation artificielle sans aucun complément de jus de fruit frais. Sur le plan clinique, il diffère du scorbut de l'adulte par une atteinte marquée sur la croissance osseuse. L'enfant prés scorbutique devient anorexique et apathique.

Les études de déplétion en vitamine C montrent que les premiers signes cliniques du scorbut apparaissent plusieurs semaines après l'observation d'une ascorbémie nulle et un mois environ après la disparition de l'acide ascorbique des leucocytes. Les premiers signes cliniques observés lors d'un scorbut expérimental se produisent lorsque les concentrations plasmatiques sont comprises entre 1,3 et 2,4 mg/l (Hodges *et al.*, 1971).

De ce fait, le dosage de l'ascorbémie présente l'intérêt de pouvoir prévenir l'apparition des premières manifestations cliniques du scorbut. Les taux plasmatiques sont soumis aux variations liées aux apports alimentaires récents. De petites doses de vitamine C permettent d'obtenir rapidement le taux

de saturation plasmatique, alors qu'il faut des doses plus importantes pour corriger une déplétion cellulaire. Le dosage de la vitamine C leucocytaire est actuellement la meilleure méthode d'évaluation du statut vitaminique C et représente un bon reflet des réserves tissulaires (Burch, 1961).

Etats marginaux de carence

Les états marginaux de carence sont caractérisés par asthénie, anorexie et faiblesse musculaire. La carence s'installe rapidement. Les expériences de carence expérimentale en vitamine C (Breskin *et al.*, 1985) montrent à J₄₁, une ascorbémie nulle ; à J₁₂₁, une diminution des taux cellulaires d'ascorbate ; à J₁₃₂, une folliculite hyperkératosique ; à J₁₆₁, des pétéchies ; à J₁₈₀, des anomalies dentaires ; à J₁₈₂, un retard de cicatrisation. En cas de supplémentation, ces signes disparaissent en une semaine environ.

Les états marginaux peuvent avoir des conséquences multiples du fait des nombreux rôles joués par la vitamine C tant sur le système immunitaire que dans la survenue des pathologies dégénératives dans lesquelles le stress oxydant est impliqué.

Références bibliographiques

- Bendich A, Cohen M** (1990). Ascorbic acid safety: analysis of factors affecting iron absorption. *Toxicol Lett*, **51** : 189-201.
- Bornstein SR, Yoshida-Hiroi M, Sotiriou S et al.** (2003). Impaired adrenal catecholamine system function in mice with deficiency of the ascorbic acid transporter (SVCT2). *FASEB J*, **17** : 1928-1930.
- Breskin MW, Trahms CM, Worthington-Roberts B et al.** (1985). Supplement use: vitamin intakes and biochemical indexes in 40 to 108 month-old children. *J Am Diet Assoc*, **85** : 49-56.
- Burch HB** (1961). Methods for detecting and evaluating ascorbic acid deficiency in man and animals. *Ann NY Acad Sci*, **92** : 268-276.
- Clemetson CAB** (1980). Histamine and ascorbic acid in human blood. *J Nutr*, **110** : 662-668.
- Dawson W, West GB** (1965). The influence of ascorbic acid on histamine metabolism in guinea-pigs. *Br J Pharmacol*, **24** : 725-734.
- Delamere NA** (1996). Ascorbic acid and the eye. *Subcell Biochem*, **25** : 313-329.
- Dhariwal KR, Hartzell WO, Levine M** (1991). Ascorbic acid and dehydroascorbic acid measurements in human plasma and serum. *Am J Clin Nutr*, **54** : 712-716.
- Djedour A, Merah K, Dupré T et al.** (2005). Détermination de la stabilité de la vitamine C leucocytaire in vitro. *Act Pharma Biol Clin, 13ème série Ed Elsevier (sous presse)*.
- Eipper BA, Mains RE** (1991). The role of ascorbate in the biosynthesis of neuroendocrine peptides. *Am J Clin Nutr*, **54** : 1153S-1156S.
- Gershoff SN** (1993). Vitamin C (Ascorbic acid): new roles, new requirements? *Nutr Rev*, **51** : 313-326.
- Fraga CG, Motchnick PA, Shigenaga MK et al.** (1991). Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88** : 11003-11006.
- Frei B, Stocker R, Ames BN** (1998). Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85** : 8748-8752.
- Geesin JC, Berg RA.** Ascorbic acid regulation of extracellular matrix expression. In : Rucker RB, Suttie JW, McCormick DB, Machlin LJ (2001). *Handbook of vitamins*, 3rd edition, Marcel Dekker, New York, 555-568.
- Guilland JC, Lequeu B, Birlouez-Aragon I, Bourgeois C.** Vitamine C. In : Le Moël G, Saverot-Dauvergne A, Gousson T, Guéant JL (1998). *Le statut vitaminique. Physiopathologie, exploration biologique et intérêt clinique*. EMI, Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 317-340.
- Hodges RE, Hood J, Canham JE et al.** (1971). Clinical manifestations of ascorbic acid deficiency in man. *Am J Clin Nutr*, **24** : 432-443.
- Johnston CS, Steinberg FM, Rucker RB.** Ascorbic acid. In : Rucker RB, Suttie JW, McCormick DB, Machlin LJ (2001). *Handbook of Vitamins*, 3rd Edition, Marcel Dekker, New York, 529-554.
- Levine M, Dhariwal KR, Wang Y et al.** Ascorbic acid in neutrophils. In : Frei B (1994). *Natural Oxidants in Health and Disease*. Academic Press, San Diego, 469-488.
- Sauberlich HE, Skala JH, Dowdy RP** (1974). *Laboratory tests for the assessment of nutritional status*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Tessier F, Birlouez-Aragon I, Tjani C, Guilland JC** (1996). Validation of a micromethod for determining oxidized and reduced vitamin C in plasma by HPLC-fluorescence. *Int J Vitam Nutr Res*, **66** : 166-170.
- Tsakaguchi H, Tokui T, MacKenzie B et al.** (1999). A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature*, **399** : 70-75.

Dossier clinique

Hématomes sous duraux spontanés du nourrisson et hypovitaminose C

Trois nourrissons - deux frères, Jonathan et Nicolas et un enfant unique Tristan - ont été admis en urgence en réanimation pédiatrique et neurologique pour accident hémorragique majeur avec hématome sous dural d'apparition précoce à l'âge d'un mois pour Jonathan et Nicolas et de 5 mois pour Tristan avec macrocranie et fontanelle tendue. Aucun signe de maltraitance n'a été constaté.

L'échographie transfontanelle a mis en évidence un épanchement sanguin intracrânien et le scanner une importante collection sanguine sous durale avec hématome contenant du sang frais et du sang ancien. Les examens biologiques ont précisé l'existence d'une anémie hyposidérémique chronique, avec hypochromie, microcytose, une hypoferritinémie, une augmentation de la transferrine, une érythropoïèse sidéroprive et une hypovitaminose C (ascorbate < 5mg/l). Une supplémentation *per os* de vitamine C a été prescrite chez chacun de ces enfants à partir de 6 mois : 1g puis 2g puis 3 g/j après 5 ans. Malgré cette supplémentation, la vitamine C plasmatique est restée effondrée chez Jonathan et Nicolas et a diminué chez Tristan au cours de sa croissance.

Une exploration de cette hypovitaminose de cause inconnue a été effectuée chez la mère et la grand-mère de Tristan qui présentaient une tendance hémorragique avec gingivorragie, ecchymoses précoces malgré une alimentation riche en fruits et légumes frais, anémie ferriprive réfractaire au traitement martial. Deux types de tests ont été effectués : des dosages de l'acide ascorbique et déhydroascorbique dans le plasma, les leucocytes, l'urine, les selles et des épreuves dynamiques de charge orale et intraveineuse en vitamine C pour éliminer une malabsorption.

Afin de tester l'hypothèse d'un trouble électif d'absorption de la vitamine C, une épreuve de charge de 3 g d'acide ascorbique *per os* a été pratiquée chez la mère et a mis en évidence un pic d'absorption à 1h dans le plasma et à 2 h dans les leucocytes avec des valeurs leucocytaires très élevées : 600 μg vs 260 μg $\times 10^8$ cellules chez le témoin, évoquant des anomalies de transport cellulaires de la vitamine C.

Les tendances hémorragiques dans les 3 générations, sans malabsorption, suggèrent une carence héréditaire transmise sur le mode autosomique dominant.

La vitamine C pénètre dans la cellule par les transporteurs glucose dépendants GLUT 1,3 et 4 et par des transporteurs spécifiques SVCT1 et SVCT2 récemment clonés. Le ou les transporteurs de sortie sont inconnus L'étude de GLUT 1, 2 et 4 n'a pas mis en évidence d'anomalies des transporteurs glucose dépendants. L'étude des gènes codant pour les transporteurs intracellulaires SVCT1 et SVCT2 n'a pas permis à ce jour d'exclure ces deux transporteurs.

La mise en évidence d'une hypovitaminose C dans des observations d'hématomes sous duraux spontanés du nourrisson est un élément nouveau à prendre en compte dans la stratégie diagnostique, compte tenu des implications médico-légales qui peuvent en découler. Plusieurs cas d'hypovitaminose C inexplicée ont été rapportés mais le mécanisme génétique et héréditaire reste encore inconnu.

Assurance qualité des dosages de vitamines

Henri Faure

L'assurance qualité est un élément fondamental dans chacune des étapes conduisant au rendu d'un résultat biologique, qu'il soit quantitatif ou qualitatif. Progressivement, la qualité entre dans un cadre législatif de plus en plus précis qui inclut la formation des personnels, la structure et les contraintes des locaux, la traçabilité, le suivi et la correction des anomalies, la réactovigilance, l'accréditation, l'innocuité. Dans sa globalité, l'assurance qualité recouvre un large domaine dont il serait difficile de décrire tous les aspects en quelques pages, nous n'envisagerons donc ici que l'assurance qualité analytique.

Pour beaucoup de paramètres de biologie courante, il existe un contrôle de qualité national et le Guide de Bonne Exécution des Analyses (GBEA, Journal Officiel 1999) contraint d'y participer. En ce qui concerne les analyses plus spécialisées, il n'existe pas encore de contrôle national, mais l'adhésion à des programmes d'assurance qualité est recommandée pour s'assurer de la validité des résultats rendus au patient et à son médecin traitant. Les dosages de vitamines rentrent dans ce dernier cadre. Le biologiste devra donc garantir les qualités analytiques de ses techniques en utilisant d'une part des procédures opératoires validées (Vassault *et al.*, 1986) et d'autre part des contrôles de qualité internes, associés à un programme d'assurance qualité externe.

Contrairement aux analyses réalisées sur des automates à cadence élevée, les dosages de vitamines sont souvent mis au point et adaptés dans le laboratoire à partir de publications scientifiques. Le biologiste, après avoir évalué les performances analytiques de sa méthode et rédigé les procédures et modes opérationnels, devra en établir les critères de validation technique, en particulier au travers des sérums de contrôles internes et externes. D'autre part, même lors de dosages sur automate ou au moyen de trousse commerciales, il peut être utile de rechercher la cause de résultats non satisfaisants obtenus, par exemple, lors d'un contrôle de qualité. Dans cette hypothèse, le biologiste peut se retrouver en situation de mise au point. Par ces tests, il pourra éventuellement corriger la cause de l'erreur constatée ou au moins fournir des éléments d'information importants à la firme qui commercialise la méthode pour qu'elle apporte elle-même les correctifs nécessaires.

CRITÈRES DE QUALITÉ D'UNE ANALYSE

Ils sont définis par trois propriétés fondamentales liées à la méthode de dosage : la précision, l'exactitude ou justesse et la spécificité, dans le domaine des concentrations usuellement rencontrées dans les liquides biologiques explorés. L'estimation de ces critères a été décrite extensivement dans une série d'articles spécialisés ; il faut cependant préciser que ces techniques d'évaluation concernent surtout les paramètres mesurés sur des automates de biochimie clinique. Les dosages de vitamines faisant appel à des méthodes spécialisées - souvent la chromatographie liquide à hautes performances - les validations de techniques pourront être faites avec des séries de mesures moins importantes.

Précision

La précision est une qualité fondamentale de toute mesure. Sans une précision minimale, il ne peut pas y avoir de quantification et les résultats ainsi produits seraient faux. La précision se mesure par la répétabilité (*within-run precision*) et par la reproductibilité (*between-run precision*) d'une analyse ; mais, alors qu'on évalue la répétabilité en réalisant des dosages sur le même matériel (sérum, liquide de ponction, etc.) dans une même journée et donc avec les mêmes réactifs, la reproductibilité se mesure - toujours sur le même matériau - lors de séances de dosages différentes et avec des réactifs neufs à chaque série d'analyses. En pratique, on mesure la répétabilité en faisant 20 fois le même dosage sur le même sérum dont la concentration vitaminique se trouve dans la moyenne des concentrations fréquemment observées chez des personnes bien-portantes. On calcule ensuite la moyenne et l'écart-type de ces 20 résultats et la répétabilité est évaluée à l'aide du coefficient de variation obtenu en divisant l'écart-type par la moyenne. La reproductibilité se mesure de façon similaire mais en répétant 3 fois, sur 3 séances de dosages différentes, la série de 20 dosages sur le même sérum. Il est souhaitable d'avoir une répétabilité inférieure à 5 % et une reproductibilité inférieure à 10 %.

Une mauvaise précision vient souvent d'appareils de mesure défectueux (pipettes, injecteurs), de pompes HPLC dont le débit est irrégulier ; elle peut aussi venir d'une trop grande instabilité du composé mesuré ou de son dérivé. Dans ce dernier cas, un injecteur automatique à plateau réfrigéré et des flacons d'injection en verre ambré et sertis à la pince - éventuellement sous gaz inerte - pour la disposition des échantillons en attente de dosage peuvent être nécessaires.

Exactitude

L'exactitude est l'aptitude à trouver un résultat aussi proche que possible de la concentration vraie. L'erreur systématique mesurée sur un échantillon de contrôle de qualité certifié permet d'en évaluer l'importance. En pratique, il suffit de mesurer 10 fois la concentration du matériel de contrôle certifié et de faire la moyenne des valeurs trouvées. L'inexactitude est la différence entre cette moyenne et la valeur cible indiquée pour le matériel de contrôle. L'inexactitude ne devrait pas dépasser 10 % de la concentration mesurée. Pour être complet, cette estimation doit être faite si possible à deux niveaux de concentration : un niveau correspondant au seuil des valeurs hautes et un niveau correspondant au seuil des valeurs basses. L'exactitude étant fortement liée à l'étalonnage, l'inexactitude peut en effet varier en fonction du niveau de concentration.

Pour les vitamines, seul le *National Institute of Standards and Technology** (NIST) commercialise des sérums certifiés en vitamines liposolubles et en vitamine C. En l'absence de matériaux de contrôle certifiés, l'exactitude pourra être estimée par la méthode des ajouts. Pour cela on utilise un sérum si possible déplété en vitamines par vieillissement à température ambiante et à la lumière, auquel on ajoute des concentrations correspondant à environ 1/4 de la différence entre la limite inférieure et la limite supérieure des concentrations usuellement rencontrées. Ces ajouts devront être faits en utilisant des rapports de volume entre le sérum et la solution d'ajout aussi grands que possible et voisins de 100:1, soit par exemple 5 ml de sérum pour un ajout de 50 µl de la solution 100 fois plus concentrée que l'écart souhaité (1/4 de l'intervalle des valeurs normales). On mesure ensuite la concentration du sérum déplété, puis celle du sérum avec ses 3 ajouts en faisant un minimum de 5 mesures par niveau de concentration. L'inexactitude pourra être calculée en faisant la différence ou le rapport entre la valeur moyenne trouvée et la valeur attendue. Cette méthode n'est cependant pas utilisable avec des vitamines trop instables ou avec les vitamines liposolubles. La dégradation ou la mauvaise incorporation des produits ajoutés aux lipides conduirait dans ce cas à une mauvaise estimation de l'exactitude.

En tout état de cause, une inexactitude trop importante doit faire vérifier les étalons (internes et externes) et l'étalonnage en premier lieu, mais elle peut également venir d'une mauvaise spécificité.

L'exactitude est la seule garantie que des dosages faits pour le même patient dans des laboratoires différents donneront des résultats comparables. D'autre part, le résultat exact d'un dosage est logiquement le seul utilisable lorsque l'on veut aligner des laboratoires fournissant des résultats différents lors d'un contrôle de qualité externe, sur une même concentration.

Spécificité

C'est l'aptitude à ne mesurer que le produit dosé, que celui-ci se trouve ou non en présence de substances ayant des propriétés physico-chimiques ou une structure moléculaire voisines. Classiquement, une spécificité médiocre sera à l'origine d'interférences et pourra conduire à des résultats parfois fortement erronés.

La spécificité, malgré son importance, est souvent difficile à évaluer dans les liquides biologiques à cause du grand nombre de molécules qui interfèrent potentiellement sur le dosage. Ces molécules peuvent être physiologiques ou provenir de médicaments ou de leur métabolisme. En pratique, ces molécules sont rarement toutes connues et certaines n'apparaissent que dans des conditions physiopathologiques très particulières. Lors de la mise au point de la méthode, la spécificité du dosage vis-à-vis des substances couramment rencontrées dans le sang devra être contrôlée. En cas de doute, il est utile d'ajouter la molécule suspectée d'interférence à un sérum puis de doser le sérum intact et le sérum surchargé. Lors de 5 dosages de chacun des deux sérums, on doit trouver la même concentration moyenne dans les deux séries de dosages. Un test de Student servira éventuellement à confirmer l'absence d'interférence.

Les étalons internes, obligatoires lorsqu'on fait une extraction, doivent avoir des propriétés physico-chimiques aussi proches que possible des vitamines dosées. Si les différences sont trop marquées, on observera des erreurs comparables à un manque de spécificité. Ceci est particulièrement vrai pour les vitamines liposolubles dont les coefficients d'extraction varient en fonction de la proportion de lipides ; des étalons internes insuffisamment apolaires donneront des résultats erronés car ils seront extraits plus complètement que les vitamines elles-mêmes.

Dans l'hypothèse d'interférences majeures pouvant fausser un résultat dans des proportions supérieures à 10 %, la méthode ne pourra pas être utilisée lorsque la molécule interférente est présente dans le milieu à analyser. Si l'interférence maximale est inférieure à 10 % et si elle ne peut pas être éliminée par une adaptation analytique, on pourra quantifier l'erreur ainsi générée. Pour cela, il faudra analyser 10 fois un sérum de concentration moyenne et 10 fois ce même sérum auquel on aura ajouté la substance interférente à sa concentration maximale. On calcule ensuite la moyenne M1 obtenue en analysant le sérum seul puis celle obtenue avec le sérum contenant la substance interférente M2 ; le rapport $(M2-M1)/M1$ mesure le pourcentage maximal de l'erreur due à l'interférence du produit testé.

Limites de détection et de mesure

La méthode analytique doit permettre des dosages non seulement dans l'intervalle des concentrations fréquemment rencontrées mais aussi dans les zones pathologiques élevées et basses. Les concentrations élevées posent rarement des problèmes, car il suffit de diluer l'échantillon si sa concentration sort du domaine de mesure et il faudra cependant s'assurer que la dilution ne modifie pas les critères de qualité. Pour cela, on peut utiliser 5 sérums dont la concentration se situe au niveau du point de gamme le plus haut, puis diluer ces sérums et les doser chacun en duplicate. En appliquant le coefficient de dilution, on doit trouver des concentrations équivalentes, et en tous cas dont les différences en pourcentage sont inférieures à deux fois la répétabilité (CV %). Dans tous les cas, il n'est pas conseillé de faire des dosages au-delà de concentrations 1,5 fois supérieures à celles du point de gamme le plus haut. En effet, une petite erreur de mesure sur les points de gamme induit une imprécision dans l'équation de la droite d'étalonnage. Cette imprécision est acceptable dans le domaine couvert par les points de gamme, mais elle se transforme rapidement en une erreur importante lorsque l'on extrapole à des concentrations trop élevées.

La limite de détection est la plus petite concentration qui donne un signal détectable. En pratique, pour l'évaluer on analysera 10 échantillons qui ne contiennent pas la vitamine dosée. On mesure alors la concentration trouvée ; en HPLC, si on ne voit pas de pic, il faudra zoomer sur le bruit de fond de la ligne de base et faire un calcul de concentration sur le plus grand pic de bruit de fond se trouvant dans le temps de rétention attendu du pic. La limite de détection correspond à la concentration égale à 3 fois l'écart-type calculé sur les 10 résultats trouvés. En réalité, c'est la limite de quantification qui sera utilisée pour définir la limite basse du domaine de mesure. On obtient cette limite en multipliant l'écart type obtenu ci-dessus, non pas par 3 mais par un facteur 5. Mathématiquement, on démontre que la répétabilité est de 20 % (1/5) dans les concentrations voisines de la limite de quantification, et de 33 % (1/3) près de la limite de détection. Ces chiffres sont compatibles avec les dosages de vitamines dont les concentrations physiologiques sont souvent faibles.

La linéarité doit être vérifiée en analysant au moins 30 solutions de calibration de concentrations si possible toutes différentes et réparties sur l'intervalle de mesure des concentrations physiologiques. On calcule ensuite une régression polynomiale en x^3 (courbe de tendance d'ordre 3 disponible sur tous tableurs pour micro-ordinateur). Les coefficients des variables x^2 et x^3 ne doivent pas être supérieurs respectivement à 0,005 et 0,0005.

Erreur ou incertitude globale

Elle est représentée par la somme des erreurs due à l'imprécision, à l'inexactitude et au manque de sélectivité. C'est l'erreur maximale réelle qui se produira sur le résultat final de l'analyse, et c'est donc en pratique l'erreur qui mesure le mieux la fiabilité du résultat final.

Si une méthode produit des résultats avec une précision de 8,5 %, et avec une inexactitude de 5,1 %, et si les interférences tolérées produisent des variations de 3,2 %, l'erreur globale sera de 16,8 %.

On estime que cette erreur ne doit pas dépasser (Vassault *et al.*, 1999):

$$\frac{(S_b - S_h)}{4} \times \frac{1}{M}$$

S_b et S_h : seuils, respectivement bas et haut, des valeurs normales

M : moyenne des valeurs normales

ÉTALONNAGE

L'étalonnage - ou calibration - consiste à établir la relation existant dans des conditions opératoires déterminées entre la grandeur du signal - densité optique, unités de fluorescence, surface de pic - et la concentration mesurée. Cette relation peut être linéaire (préférable car définie précisément par un petit nombre de points d'étalonnage) ou non linéaire (on utilisera alors des courbes d'étalonnage logarithmiques, polynomiales ou même des équations encore plus complexes exigeant un plus grand nombre de points d'étalonnage). Dans le cas d'une relation linéaire, il faudra déterminer la zone de linéarité des mesures, la linéarité n'étant jamais infinie. La relation signal-concentrations servira ensuite à calculer les concentrations des solutions inconnues.

Les solutions utilisées pour étalonner l'appareil de mesure ont une influence directe sur l'exactitude des résultats produits. Ces solutions doivent donc répondre autant que possible à des critères de pureté maximale et les concentrations de ces solutions devront être impérativement connues avec la plus grande précision. Comme il n'existe pas encore de trousse commerciale de dosage pour toutes les vitamines, le biologiste devra s'assurer lui-même de la pureté des analytes servant à la fabrication de solutions d'étalonnage ; il devra aussi fixer avec une précision maximale la concentration de sa solution étalon primaire. Cette solution servira à fabriquer les solutions étalons de travail par dilutions croissantes. Pour les vitamines, la définition de la concentration de la solution étalon pourra rarement être faite par pesée, d'une part à cause des faibles concentrations rencontrées dans les liquides biologiques qui demandent donc des précisions de pesée difficiles à atteindre, d'autre part et, surtout, parce que les vitamines commercialisées par les distributeurs de chimie fine sont rarement d'une pureté suffisante. Pour ces raisons, la pesée n'est pas une bonne méthode pour calibrer les solutions étalons. Leurs concentrations seront contrôlées de préférence par spectrophotométrie en utilisant les coefficients d'absorption moléculaire et la loi de Beer-Lambert. Cette technique n'étant cependant pas totalement spécifique, il faudra veiller à n'utiliser que des produits de pureté maximale, pureté qui pourra être évaluée sur un tracé chromatographique de la solution étalon concentrée.

Calcul de la concentration à partir de la densité optique mesurée (DO) dans une cuve en quartz de 1 cm de trajet optique :

$$C (\mu\text{M}) = \frac{\text{DO}}{\epsilon} \times 1.000.000$$

ϵ étant le coefficient d'absorption moléculaire exprimé en Abs.cm⁻¹.Moles⁻¹

Si le coefficient est exprimé sous forme de E^{1%} cm on peut calculer ϵ ainsi :

$$\epsilon = \frac{E^{1\% \text{ cm}}}{10} \times M \qquad M = \text{masse molaire}$$

Les vitamines étant souvent instables, il faut définir les conditions de conservation et de stockage de ces solutions étalons, et en particulier la température, les additifs éventuels (BHT, glutathion, acide métaphosphorique) et la durée de stockage maximum aussi bien au congélateur qu'à température ambiante. Ces éléments sont aussi fondamentaux dans l'étape préanalytique du dosage des échantillons biologiques.

Enfin, les concentrations des solutions à partir desquelles seront tracées les droites d'étalonnage devront encadrer les valeurs physiologiques. Il est déconseillé de faire des dosages lorsque les concentrations inconnues sortent de l'intervalle de concentration des solutions d'étalonnage. Une droite d'étalonnage pourra être définie en utilisant un minimum de 3 solutions d'étalonnage - ou 4 si la droite ne passe pas par le "0" - dont le premier niveau de concentration se trouvera à la limite de quantification et le dernier à environ 1,5 fois la limite supérieure des concentrations couramment rencontrées. Dans le cas d'une droite d'étalonnage, il faudra vérifier la linéarité de la gamme dans le domaine des valeurs physiologiques.

CONTRÔLE INTERNE DE QUALITÉ DES DOSAGES DE VITAMINES

Il consiste à doser plusieurs fois des sérums de contrôle dont les concentrations sont connues préalablement à l'analyse. Les fabricants de ces matériaux de contrôle indiquent les concentrations cibles et les limites hautes et basses à ne pas dépasser pour que les résultats de la série soient considérés comme justes. Lorsque les concentrations des contrôles internes se trouvent dans l'intervalle fixé par le fabricant et à condition que les résultats des étalons répondent également à leurs propres critères, la série d'analyse peut être validée par le technicien. Les contrôles internes et surtout les contrôles externes permettent d'évaluer l'erreur analytique globale.

Étalons et contrôles internes sont totalement indépendants et ne peuvent pas être permutés. En effet, les critères de précision et d'exactitude exigés pour les contrôles internes sont généralement bien moins contraignants. Les contrôles de qualité internes doivent être analysés avec les sérums inconnus à raison d'un contrôle haut et un contrôle bas toutes les 10 analyses. Les contrôles internes de qualité sont livrés avec des valeurs seuil d'acceptabilité ; si un résultat de contrôle interne sort de la fourchette d'acceptabilité, la raison doit en être recherchée et toute la série de dosage qui a été analysée avant doit être analysée de nouveau. Lorsque l'analyse de tous les

contrôles internes donne des résultats inclus dans les intervalles d'acceptabilité, les séries d'analyses de sérums inconnus peuvent être validées par le technicien. Tous les résultats des contrôles de qualité interne doivent être conservés au moins 5 ans.

En l'absence de sérum de contrôle de qualité interne fourni par un fabricant, il est possible d'utiliser un pool de sérums qui seront aliquotés et congelés puis analysés comme des sérums de contrôle de qualité interne. Cette méthode a cependant l'inconvénient de ne connaître ni la concentration cible, ni les limites d'acceptabilité. Le biologiste devra donc lui-même déterminer ces critères en analysant ces sérums aliquotés au moins 3 fois dans 10 séries de dosages différentes. On calculera la médiane et l'écart-type de toutes les concentrations, le seuil haut sera égal à médiane + (1,96 x écart type) et le seuil bas à médiane - (1,96 x écart type). En utilisant ce schéma, la participation à un programme d'assurance qualité externe est cependant indispensable pour s'assurer de la validité des valeurs seuil établies par le laboratoire. D'autre part, il faudra s'assurer de la bonne conservation des sérums aliquotés et fixer des dates limites de conservation dans les conditions de température déterminées. Cette technique peut acquérir une bonne robustesse, surtout si elle est appliquée par plusieurs laboratoires différents utilisant les mêmes sérums.

CONTRÔLE DE QUALITÉ EXTERNE DES VITAMINES

Contrairement aux concentrations des sérums de contrôle interne, celles des sérums des programmes externes de qualité sont inconnues lors de l'analyse. Ces sérums sont analysés simultanément par plusieurs laboratoires différents. D'autre part, les valeurs seuil calculées lors des sessions de contrôle de qualité externe délimitent des intervalles plus petits et exigent donc une erreur globale moins importante que celle tolérée par les contrôles internes.

Les sérums de contrôle de qualité peuvent être dosés par un laboratoire de référence. Dans ce cas, les comptes-rendus comprendront des valeurs assignées dont la valeur est proche de celle d'un sérum de référence. Actuellement, seul le *National Institute of Standards and Technology* (NIST)* organise un tel programme pour les vitamines liposolubles et de nombreux autres composés dosés en biochimie de routine ou en biochimie spécialisée. Ces programmes sont coûteux car ils demandent de développer plusieurs méthodes de référence différentes. Plus généralement, les concentrations ne sont pas mesurées par l'organisateur et les valeurs cibles sont calculées à partir des médianes ou des moyennes des résultats de tous les participants. Leur exactitude est basée sur le fait que la valeur pivot d'un grand nombre de résultats provenant de laboratoires différents est très proche de la valeur exacte. Le programme annuel d'assurance qualité de la Société Francophone Vitamines et Biofacteurs** fonctionne sur ce principe. De plus, plusieurs laboratoires inscrits participent également aux programmes du NIST. Les résultats obtenus par ces laboratoires aux deux programmes sont très proches ce qui assure une bonne exactitude au programme SFVB.

À la condition que les coefficients de corrélation soient suffisamment élevés et supérieurs à 0,90, il est possible d'établir des droites de régression entre les valeurs obtenues par le laboratoire et les valeurs cibles (figures 1, 2 et 3). De telles droites fournissent de précieux renseignements sur l'étalonnage, la

* NIST - Jeanice Brown Thomas - Micronutrient Measurement Quality Assurance Program - NIST - 100 Bureau Drive Stop 8390 Gaithersburg, MD USA

** Programme Annuel d'Assurance Qualité SFVB - Att. Henri Faure - DBI Bâtiment B - CHU La Tronche - F38043 Grenoble Cedex 9

Figure 1 :
erreur d'exactitude
due à un défaut
d'étalonnage

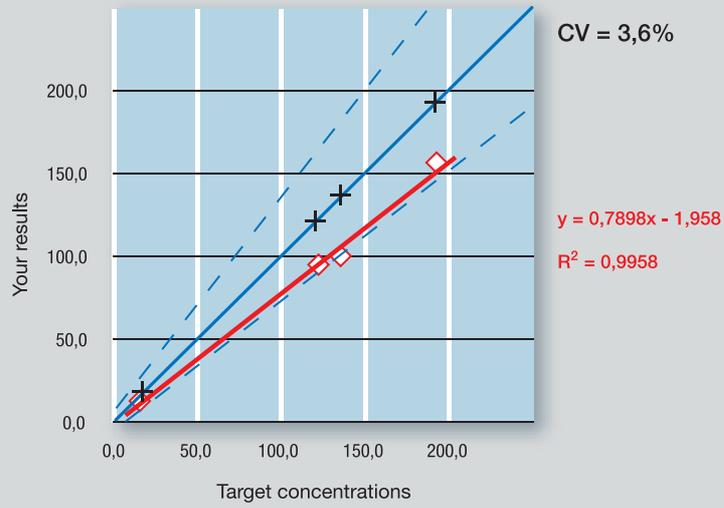


Figure 2 :
anomalie de précision
ou de spécificité

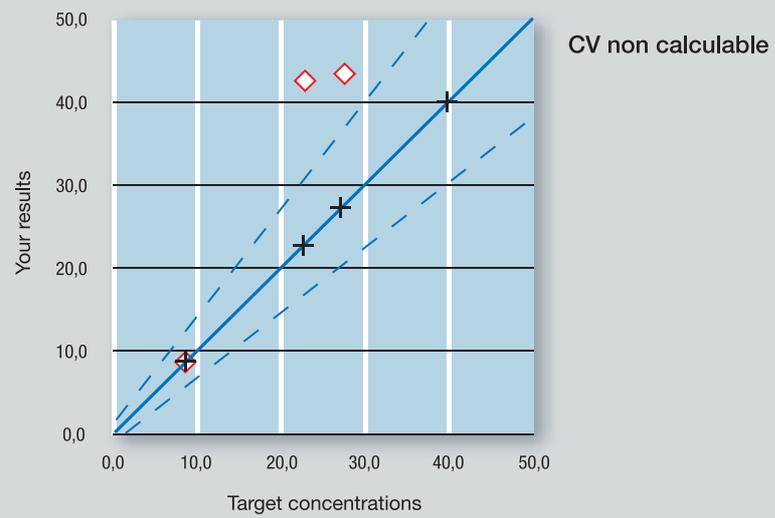
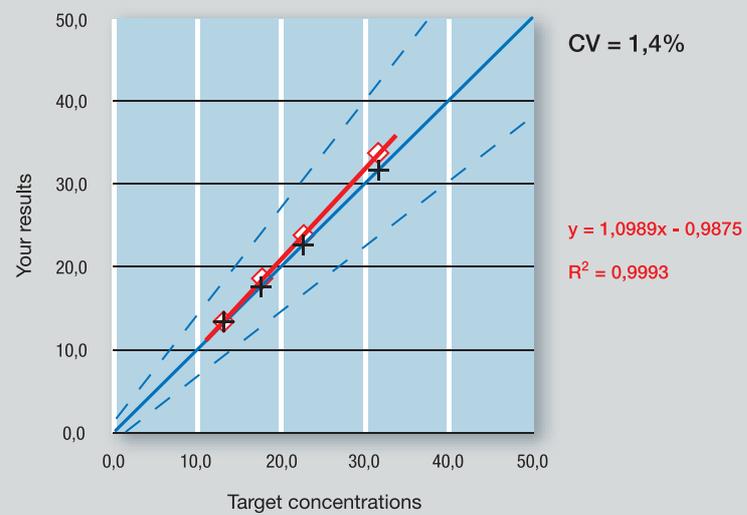


Figure 3 :
bons résultats



répétabilité et la spécificité de la méthode analytique utilisée. Les diagrammes de Youden ont le même but, mais ils fournissent des résultats moins fiables car ils sont établis sur seulement deux sérums.

Contrairement aux contrôles internes dont les valeurs cibles sont mesurées parfois depuis longtemps, les contrôles de qualité externes évaluent la performance analytique globale du laboratoire à un moment donné. Les fourchettes de tolérance sont donc plus étroites et les valeurs cibles plus précises. Pour assurer une conservation rigoureuse des sérums de contrôle, la forme lyophilisée ou la congélation s'imposent pour l'expédition des sérums destinés aux contrôles des vitamines. De plus, il faut un minimum de 12 résultats par sérum pour pouvoir établir des valeurs cibles et des valeurs seuil suffisamment précises. Si ces paramètres sont établis avec moins de 10 participants, par exemple lors de calculs de moyennes par méthode ou par appareil différent, ils n'ont aucune robustesse et sont fréquemment entachés d'erreurs d'exactitude importantes, surtout en cas de dispersion des résultats.

Le GBEA impose des mesures correctives lorsqu'un laboratoire obtient de mauvais résultats sur l'ensemble des sérums d'un programme d'assurance qualité. En cas de nécessité, ces organismes d'assurance qualité doivent, dans la mesure du possible, aider les biologistes à analyser les causes d'erreurs. Dans un premier temps, les mesures correctives devraient faire vérifier les critères de qualité décrits plus haut, ce qui amène souvent à changer ses étalons (fournisseur, établissement des concentrations) ; parfois, il peut être nécessaire de modifier certaines conditions analytiques ou même de changer complètement de méthode de séparation et de dosage. Les organismes de contrôle de qualité aident les biologistes dans cette démarche, et proposent des méthodes fiables et éprouvées aux personnes qui en font la demande.

Références bibliographiques

Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale. *Journal Officiel de la République Française*, Numéro 287 du 11 Décembre 1999, page 18441.

Vassault A, Azzedine MC, Bailly G et al. (1986). Protocole de validation de techniques (document B, stade 3). *Ann Biol Clin*, **44** : 746-755.

Vassault A, Grafmeyer D, de Graeve J et al. (1999). Critères et standards de qualité pour la validation des méthodes de biochimie clinique. *Ann Biol Clin*, **57** : 685-695. *Erratum in : Ann Biol Clin* (2000) ; **58** : 110.

ASPECTS PHYSIOPATHOLOGIQUES

PARTIE II

Le stress oxydant

Patrice Thérond, Dominique Bonnefont-Rousselot

LA NOTION DE STRESS OXYDANT

ET D'ESPÈCES RÉACTIVES DE L'OXYGÈNE (ERO)

À l'état physiologique, tout organisme vivant en aérobiose produit des espèces réactives de l'oxygène (ERO), parmi lesquelles des radicaux libres, qui sont utiles en particulier pour la modulation de certaines activités cellulaires (prolifération, survie, apoptose...), à tel point que ces ERO sont à présent considérées comme de véritables messagers intracellulaires. Ces espèces incluent non seulement des radicaux libres dérivés de l'oxygène (anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, radical hydroxyle $\bullet OH$, radical hydroperoxyde HO_2^{\bullet} , radical peroxyde RO_2^{\bullet} , radical alcoxyde RO^{\bullet}), mais aussi d'autres espèces non radicalaires (peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , acide hypochloreux $HOCl$, ozone O_3 , oxygène singulet $^1\Delta gO_2$, peroxyde d'azote $ONOO^-$).

Une vision simple de la formation des principales espèces activées de l'oxygène peut être apportée par la "chaîne de réduction monovalente" de l'oxygène. Elle consiste en l'addition successive sur la molécule d'oxygène, un par un, de quatre électrons conduisant à la formation de la molécule d'eau, selon le schéma suivant (figure 1) :

Les organismes vivant en aérobiose se sont adaptés à la vie en présence d'oxygène en développant des systèmes de défense antioxydants, à la fois enzymatiques et non enzymatiques. Le stress oxydant est une situation dans laquelle la balance entre pro-oxydants (ERO) et

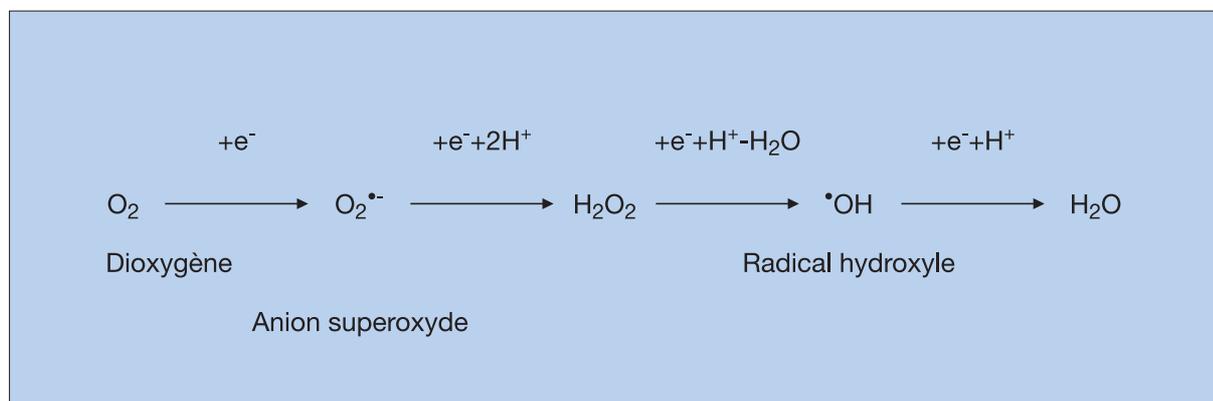


Figure 1 : Réduction monovalente de l'oxygène

antioxydants est déséquilibrée, soit en raison d'une production excessive de ces ERO (par exemple dans les processus d'ischémie-reperfusion, les intoxications par des xénobiotiques, les pathologies chroniques telles que le diabète ou l'athérosclérose...), soit en raison d'un déficit en substances antioxydantes, comportant des vitamines antioxydantes d'origine endogène ou nutritionnelle et des micronutriments nécessaires à l'activité de certaines enzymes antioxydantes (Halliwell et Gutteridge, 1999). Ce stress oxydant est à l'origine de nombreux effets tant au niveau moléculaire que cellulaire. Par exemple, il provoque des dommages vis-à-vis des principales cibles moléculaires biologiques (lipides, protéines, acides nucléiques). Le vieillissement et de nombreuses pathologies (athérosclérose, diabète sucré, maladies inflammatoires, maladie d'Alzheimer ...) s'accompagnent d'un stress oxydant (Delattre *et al.*, 2003).

LES SYSTÈMES DE DÉFENSE ANTIOXYDANTS

Outre les protéines (transferrine, haptoglobine, métallothionéine) qui diminuent la disponibilité des pro-oxydants tels que les ions Fe^{2+}/Fe^{3+} , Cu^{2+}/Cu^{+} , et les protéines comme les protéines de choc thermique, qui protègent les biomolécules contre les agressions oxydatives, les systèmes de défense anti-oxydants comportent, :

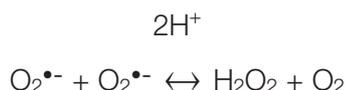
- des enzymes, telles que superoxyde dismutase, catalase, peroxydase, capables d'éliminer les ERO de façon catalytique ;
- des composés de basse masse moléculaire, tels que glutathion, vitamine E (dont le constituant major est l' α -tocophérol), vitamine C (acide ascorbique), bilirubine, acide urique, capables de piéger les ERO.

Il faut par ailleurs noter l'importance des éléments traces (zinc, cuivre, manganèse, sélénium) dans la défense anti-radicalaire, avec notamment leur participation au fonctionnement d'enzymes anti-oxydantes.

Systemes enzymatiques

Les superoxyde dismutases (SOD)

Les SOD catalysent la dismutation mono-électronique de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène :



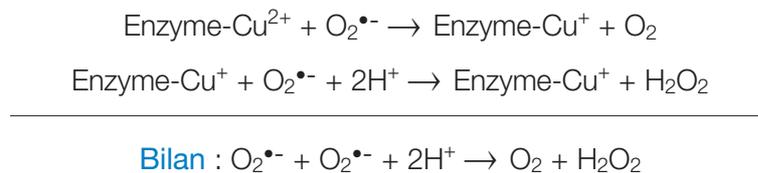
Chez l'homme, il existe plusieurs types de SOD, qui diffèrent par leur structure et leur localisation cellulaire : la SOD à cuivre et à zinc (Cu,Zn-SOD) essentiellement présente dans le cytoplasme des cellules et la SOD à manganèse (Mn-SOD) dans les mitochondries des eucaryotes. Une Cu,Zn-SOD extra-cellulaire (EC-SOD), immunologiquement distincte de la Cu,Zn-SOD cytosolique, a été décrite.

- La Cu,Zn-SOD

La Cu,Zn-SOD est présente dans le cytosol de pratiquement toutes les cellules eucaryotes. La Cu,Zn-SOD isolée de ces cellules présente une masse moléculaire d'environ 32 000 Da et est constituée de deux sous-unités protéiques, chacune comportant un atome de cuivre et un atome de zinc. Il existe par ailleurs une Cu,Zn-SOD extra-cellulaire qui en est totalement différente, puisqu'il s'agit d'une glycoprotéine tétramérique de masse moléculaire voisine de 135 000 Da, chaque sous-unité comportant un atome de cuivre et un atome de zinc.

La dismutation spontanée de $O_2^{\bullet-}$ dépend fortement du pH de la solution. À pH 7, la constante de vitesse de la réaction est de $6 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{s}^{-1}$. En revanche, la dismutation catalysée par la SOD se produit avec une constante de vitesse quasi-indépendante du pH entre pH 5,3 et pH 9,5, et dont la valeur est voisine de $1,6 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{s}^{-1}$.

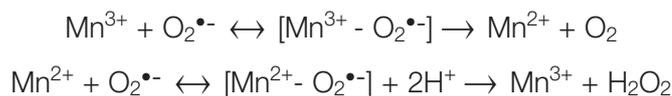
Les ions Cu^{2+} sont nécessaires à l'activité SOD, tandis que les ions Zn^{2+} (qui n'ont qu'un seul état de valence possible) ne participent pas au cycle catalytique, mais stabilisent la structure de l'enzyme :



- La Mn-SOD

Sa masse moléculaire est voisine de 40 000 Da.

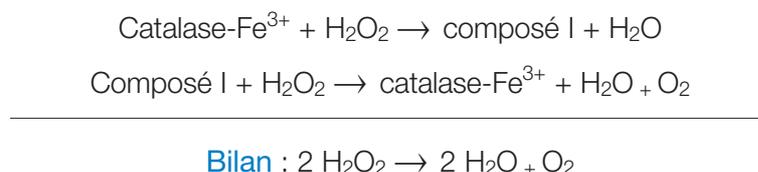
Elle contient du manganèse au niveau de son site actif et catalyse la même réaction que la Cu,Zn-SOD, avec, à pH 7, les mêmes vitesses de dismutation de $O_2^{\bullet-}$ que pour la Cu,Zn-SOD :



Chez les organismes supérieurs, les Mn-SOD renferment généralement 4 sous-unités protéiques, avec 0,5 à 1 ion manganèse par sous-unité. L'élimination du Mn du site actif entraîne une perte de l'activité Mn-SOD.

La catalase

La catalase est une enzyme hémique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire. Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les hématies. La localisation de la catalase dans les peroxysomes, organites cellulaires qui sont également le lieu de production de H_2O_2 , substrat de l'enzyme, fait que la détoxification du peroxyde d'hydrogène est assurée *in situ*. La réaction catalysée par cette enzyme consiste en une dismutation de H_2O_2 :



L'enzyme comporte 4 sous-unités protéiques, chacune contenant un groupement hémique avec Fe^{3+} lié au site actif. Chaque molécule a habituellement une molécule de NADPH, H^+ qui lui est liée, la protégeant ainsi d'une éventuelle inactivation par le peroxyde d'hydrogène. La dissociation des sous-unités résulte en une perte de l'activité catalase.

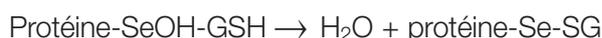
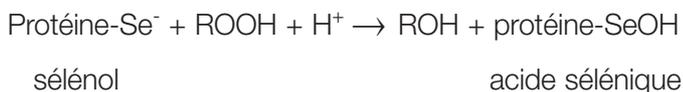
Les peroxydases (glutathion peroxydase et autres peroxydases)

Les peroxydases sont des enzymes capables de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes (en particulier d'origine lipidique) en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur. La dénomination des peroxydases dépend de la nature de ce substrat réducteur, dont chaque enzyme est spécifique. Ainsi, il est possible de distinguer des glutathion peroxydases, des cytochrome c peroxydases, des NADH peroxydases. Nous nous limiterons ici aux caractéristiques de la glutathion peroxydase (GSH-Px). La GSH-Px catalyse la réduction des hydroperoxydes (ROOH) en alcools, moins réactifs, tandis que le glutathion réduit (GSH) est transformé en glutathion oxydé (GSSG) :

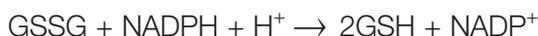


Dans cette réaction, ROOH peut être un hydroperoxyde d'acide gras, de cholestérol (estérifié ou non) ou un hydroperoxyde synthétique. Le glutathion (glutamyl-cystéinyl-glycine) est le thiol majoritaire au niveau cellulaire, où il est présent essentiellement sous forme réduite.

La GSH-Px est constituée de 4 sous-unités protéiques, chaque sous-unité comportant un atome de sélénium, intégré dans le site actif sous forme de séléno-cystéine (l'atome de soufre de la cystéine est remplacé par un atome de sélénium). Le mécanisme catalytique comporte une oxydation par ROOH suivie de la liaison successive des 2 molécules de glutathion :



On voit donc toute l'importance du sélénium pour le bon fonctionnement de cette enzyme. Un déficit en sélénium conduit d'ailleurs à une baisse de l'activité GSH-Px, donc à une moindre épuration des hydroperoxydes. Par ailleurs, afin de maintenir constant le rapport GSH/GSSG dans la cellule, la glutathion réductase régénère le glutathion, par oxydation concomitante du NADPH, H^+ :



Parmi les GSH-Px, il est en fait possible de distinguer :

- la GSH-Px "classique", présente pour 90 % dans le cytosol et pour 10 % dans les mitochondries ;
- la GSH-Px plasmatique, glycoprotéine tétramérique, dont l'activité est faible en raison de la faible concentration de glutathion réduit dans le plasma ($\approx 1-3 \mu\text{mol/l}$, alors que le K_m de l'enzyme pour GSH est de l'ordre de la mmol/l) ;

- la “*phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase*”, qui est monomérique (masse moléculaire ≈ 19000) et qui est capable de réduire spécifiquement les hydroperoxydes de phospholipides membranaires ;
- enfin, la GSH-Px intestinale, qui métabolise les hydroperoxydes des lipides alimentaires et ceux produits au cours de la peroxydation lipidique intestinale.

Coopération entre enzymes antioxydantes

Une coopération étroite doit exister entre les enzymes antioxydantes ; ainsi, l'activité SOD conduit, simultanément à la détoxification de $O_2^{\bullet-}$, à la production de peroxyde d'hydrogène, lui-même composé à pouvoir oxydant. H_2O_2 doit alors être pris en charge par le système catalase et/ou peroxydases.

Systemes non enzymatiques

Ces systèmes antioxydants comportent des composés synthétisés *in vivo*, tels que la bilirubine, les hormones sexuelles (œstrogènes), la mélatonine, l'acide lipoiique, le coenzyme Q, l'acide urique, les mélanines...et des composés apportés par l'alimentation, comme l'acide ascorbique (vitamine C), la vitamine E, les caroténoïdes ou les polyphénols (figure 2).

Il est également possible de classer ces systèmes antioxydants selon qu'ils sont hydrosolubles, assurant une protection des milieux intra- et extracellulaires, ou liposolubles, agissant alors au niveau des membranes et des lipoprotéines circulantes.

Antioxydants hydrosolubles

L'acide ascorbique est un composé réducteur, qui agit en synergie avec l' α -tocophérol en permettant sa régénération, lui-même étant ensuite régénéré par une NADH-réductase. Toutefois, ses propriétés réductrices ne sont pas toujours bénéfiques puisque, en présence de métaux de transition, l'acide ascorbique est susceptible de se comporter en pro-oxydant.

Le glutathion réduit joue un rôle majeur dans la détoxification des hydroperoxydes par les glutathion peroxydases. En outre, les glutathion transférases constituent une famille d'enzymes catalysant la conjugaison du glutathion à de nombreux substrats.

L'acide urique présente également, aux concentrations physiologiques, une activité antioxydante puisqu'il piège les radicaux $\bullet OH$.

Enfin, les polyphénols, parmi lesquels les flavonoïdes, sont des piègeurs de radicaux libres et des chélateurs d'ions métalliques, ce qui leur confère des propriétés antioxydantes, plus ou moins importantes selon leur structure. Ils fonctionnent notamment en cédant un atome d'hydrogène à des radicaux formés lors de la peroxydation lipidique tels que les radicaux peroxyde RO_2^{\bullet} ou alcoxyde RO^{\bullet} . Ces polyphénols, présents en particulier dans le thé et le vin, auraient un effet bénéfique contre les maladies cardio-vasculaires.



Vitamines E



Acide lipoïque

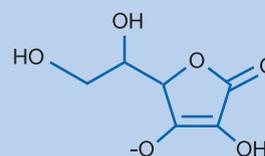
α -tocophérol = R₁, R₂, R₃ : CH₃
 β -tocophérol = R₁, R₃ : CH₃ ; R₂ : H
 γ -tocophérol = R₁, R₂ : CH₃ ; R₃ : H
 δ -tocophérol = R₁ : CH₃ ; R₂, R₃ : H



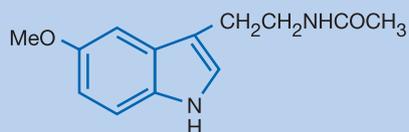
β -carotène



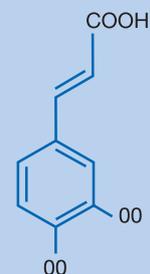
Ubiquinol (coenzyme Q)



Ascorbate



Mélatonine



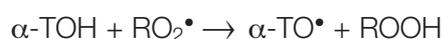
Acide caféique (exemple de polyphénol)

Figure 2 : Structures de quelques antioxydants non enzymatiques

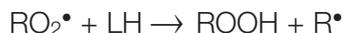
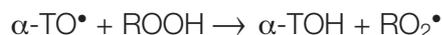
Antioxydants liposolubles

Vitamine E, β -carotène, ubiquinol-10 et lycopène sont des antioxydants liposolubles transportés par les lipoprotéines, en particulier les lipoprotéines de basse densité (LDL) qu'ils protègent contre les phénomènes de peroxydation lipidique touchant les acides gras poly-insaturés. Les antioxydants liposolubles agissent aussi au niveau membranaire.

Le composant majeur de la vitamine E est l' α -tocophérol. Son action antioxydante consiste en un piégeage des radicaux peroxyde RO_2^\bullet issus de la peroxydation lipidique et capables d'auto-entretenir cette peroxydation par une réaction en chaîne. L' α -tocophérol agit donc par rupture de cette chaîne de peroxydation, grâce à la fonction hydroxyle du noyau chromanol. Les radicaux peroxydes sont alors réduits en hydroperoxydes, tandis que l' α -tocophérol (α -TOH) conduit à un radical α -tocophéroxyde (α -TO $^\bullet$) :



Nous avons vu que ce radical peut être recyclé en α -tocophérol grâce à l'intervention de l'acide ascorbique. Les LDL renferment 6 à 8 molécule d' α -tocophérol par particule. Lors d'une oxydation, l' α -tocophérol constitue une des premières lignes de défense. Toutefois, à côté de ce rôle protecteur, la vitamine E peut, dans certaines conditions et en particulier à de fortes concentrations et en l'absence d'autres antioxydants (conditions obtenues essentiellement *in vitro*), avoir un effet pro-oxydant vis-à-vis des acides gras poly-insaturés :



Les caroténoïdes, dont font partie le β -carotène et le lycopène, piègent l'oxygène singulet, grâce à leur structure très riche en doubles liaisons. Le β -carotène est aussi capable de piéger des radicaux peroxydes et protège ainsi les LDL, dans lesquelles il est transporté à raison d'environ 0,3 molécule par particule LDL.

Enfin, l'ubiquinol-10, présent à raison d'environ 0,3 molécule par particule LDL, constitue la toute première ligne de défense des LDL lors d'une oxydation ; il pourrait représenter un élément protecteur contre le processus d'athérogenèse.

Références bibliographiques

Delattre J, Durand G, Jardillier JC. Biochimie Pathologique, Aspects moléculaires et cellulaires. Flammarion, Paris, 2003.

Delattre J, Beaudoux J-L, Bonnefont-Rousselot D. Radicaux libres et stress oxydant : Aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier, Paris, 2005.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd Edition, Oxford University press, 1999.

Vitamine D & PTH

Françoise Paillard

L'équilibre phosphocalcique est sous le contrôle de deux hormones : l'hormone parathyroïdienne et le calcitriol, ou vitamine D active, qui agissent en synergie pour maintenir au plus proche de la normale la fraction ionisée, biologiquement active, du calcium plasmatique.

RAPPEL PHYSIOLOGIQUE

L'hormone parathyroïdienne (PTH), polypeptide de 84 acides aminés secrété par les glandes parathyroïdes, est impliquée dans un nombre important de pathologies dont le caractère biologique essentiel est une valeur de calcémie anormale, si bien que sa détermination est aujourd'hui incontournable. Sa sécrétion est essentiellement modulée par les variations de la calcémie ionisée détectées par un récepteur spécifique très sensible, situé sur la membrane des cellules parathyroïdiennes, le *Ca-sensing receptor* ou CaSR. Celui-ci peut subir des mutations inactivatrices ou activatrices responsables d'hypercalcémie ou d'hypocalcémie.

D'autres facteurs interviennent : l'hypomagnésémie et le métabolite actif de la vitamine D (le calcitriol) freinent sa sécrétion, l'hyperphosphorémie la stimule.

La vitamine D est pour l'essentiel formée au niveau de la peau à partir du 7-déhydrocholestérol, qui sous l'action des UV est transformé en prévitamine D au prorata de l'exposition solaire, une fraction plus modeste étant apportée par l'alimentation. Elle est transportée dans le sérum par une protéine spécifique et est transformée dans le foie en 25-OH vitamine D. Une faible quantité de 25-OH-D est convertie dans le rein en 1-25(OH)₂ D active, le calcitriol. Cette étape faisant l'objet d'une régulation très précise, la 1-25(OH)₂ D peut être considérée comme une hormone, qui joue un rôle majeur dans l'absorption digestive du calcium et dans le renouvellement osseux. Il existe des récepteurs spécifiques cytoplasmiques du calcitriol dans le tissu osseux et dans l'épithélium intestinal et rénal.

L'action de la PTH s'exerce directement, après liaison à des récepteurs de surface, communs à la PTH et au peptide tumoral hypercalcémiant, le PTHrp, sur ses cellules cibles dans le rein et dans l'os, et indirectement sur l'intestin. Le récepteur de la PTH appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G, comme le CaSR. La liaison hormone - récepteur au niveau des cellules rénales active à la fois l'adénylate-cyclase, en produisant de l'AMP cyclique qui apparaît dans les urines et dont la synthèse est proportionnelle à la concentration hormonale, et la phospholipase C. La PTH augmente la réabsorption tubulaire distale du calcium ; elle diminue la réabsorption proximale des phosphates et stimule l'activité de la 1-alpha hydroxylase qui transforme le métabolite inactif de la vitamine D, le 25 OH-D, en son métabolite actif le calcitriol, 1,25(OH)₂-D, responsable

de l'absorption digestive du calcium et du phosphore. Dans l'os, la PTH se fixe sur ses récepteurs ostéoblastiques qu'elle active, ce qui, par l'intermédiaire de facteurs locaux, entraîne une activation des ostéoclastes responsables de la résorption osseuse : elle provoque une mobilisation rapide du calcium de surface, contribuant au maintien de la calcémie, et active ainsi le remodelage osseux en synergie avec le calcitriol. Par ailleurs, elle semblerait augmenter la formation de l'os trabéculaire.

Au total, la PTH est une hormone hypercalcémisante, dont tous les effets tendent à élever le calcium extra-cellulaire, et hypophosphatémisante par perte urinaire de phosphates.

DOSAGES

Commentaires à propos du dosage de la PTH

Les dosages radio-immunologiques de l'hormone parathyroïdienne datent des années 80 ; les premiers utilisaient des anticorps dirigés soit contre l'extrémité carboxy-terminale, inactive biologiquement, de la PTH, soit contre des fragments de la molécule (*mid-region*), inactifs également, produits dans la circulation par le catabolisme rénal et hépatique, ce qui induisait de très importantes erreurs d'interprétation. En effet, la PTH sécrétée a une demi-vie courte, de quelques minutes, et est active par son extrémité N-terminale. Les différents fragments inactifs résultant de sa destruction ont des durées de vie variables plus longues et sont susceptibles de s'accumuler, dans l'insuffisance rénale (IRC) en particulier.

Le premier dosage de PTH "INTACT" est apparu en 1987 ; il prend en sandwich les deux extrémités de la molécule ce qui le rend théoriquement insensible aux différents fragments circulants surtout en cas d'insuffisance rénale. C'est un dosage fidèle qui est disponible pour la RIA et sur automate d'immunoanalyse. La valeur normale est de 8-55 pg/ml en RIA.

Cependant, il a été démontré en 1998 que ce dosage ne rendait pas bien compte des troubles osseux dans l'hyperparathyroïdisme secondaire (HPT2) de l'IRC car il reconnaissait également un fragment 7-84 de la PTH, qui existerait en faible quantité chez le sujet normo-parathyroïdien, en plus grande quantité dans l'HPT primaire (HPT1), mais surtout en quantités variables et très importantes dans l'IRC. Or, ce fragment est inactif, ne stimulant pas l'adénylate cyclase, et aurait un rôle inhibiteur sur la sécrétion de PTH. Le dosage de PTH "Intact" surestimerait le taux de PTH active circulante en dosant en même temps le fragment inactif de PTH 7-84, surtout chez l'insuffisant rénal, et conditionnerait un traitement supprimeur de la PTH inadéquat.

En 2002, un dosage spécifique : la PTH "Bio-intact 1-84" a été mis sur le marché, sans aucune réaction croisée avec le fragment 7-84 ; il s'agit d'un dosage immunométrique, utilisant deux anticorps spécifiques des deux extrémités de la molécule, utilisé sur un automate spécialisé en chimiluminescence. L'intérêt du dosage couplé des deux types de dosages est à l'étude : le rapport PTH "Bio-intact" / PTH "intact" indiquant théoriquement la fraction de fragment 7-84 présent.

La valeur normale de PTH Bio donnée par le fabricant est de 6-40 pg/mL.

Le dosage de 25-OH-D₃

Il s'agit soit d'un dosage radio-immunologique, dosage un peu lourd en routine parce que précédé d'une phase d'extraction sur colonne avant le RIA, soit d'un dosage non isotopique utilisable sur automate d'immunoanalyse.

La valeur trouvée représente le stock en vitamine D inactive mais disponible pour l'hydroxylation ; elle seule dépend des apports alimentaires et de l'ensoleillement. La valeur normale se situe entre 12-50 ng/mL.

Le dosage de 1,25-(OH)₂-D₃

Il s'agit habituellement d'un dosage RIA, comprenant extraction et délipidation ; la valeur trouvée représente la fraction normalement hydroxylée dans le rein sous l'influence de la PTH, mais pathologiquement dans d'autres sites d'hydroxylation (granulomes).

La valeur normale se situe entre 14 et 60 pg/mL.

CONTEXTE PATHOLOGIQUE DE PRESCRIPTION DU DOSAGE DE LA PTH ET DE LA VITAMINE D

Les dosages de la PTH et de la vitamine D s'imposent principalement dans:

- Les hypercalcémies liées à une valeur de Ca⁺⁺ élevée ; elles sont pour plus de 90 % dues à une hyperparathyroïdie primitive (HPT1) ou à un cancer, respectivement 45 % et 55 % des cas. Bien que souvent évoqué sur le contexte clinique (l'hypercalcémie des hyperparathyroïdies, étant généralement bien tolérée et depuis longtemps, l'hypercalcémie des cancers survenant plus souvent dans un tableau aigu et grave), le diagnostic ne peut être confirmé que par le dosage de PTH, inadaptée et élevée seulement dans l'hypercalcémie parathyroïdienne. La crise parathyroïdienne aiguë ne peut donc, quant à elle, être diagnostiquée que grâce au laboratoire. Dans tous les autres cas la PTH est basse, normalement adaptée à l'hypercalcémie et les autres dosages, vitamine D et éventuellement PTHrp, prennent alors toute leur importance.
- Les hypocalcémies liées à un Ca⁺⁺ bas ont des causes variées dont les plus communes sont les hypoparathyroïdies quelles qu'en soient les causes, chirurgicales, immunes, congénitales... où les valeurs de PTH sont basses et toujours inadaptées à la calcémie basse également, et les anomalies du métabolisme de la vitamine D, soit par carence d'apport (25(OH)-D effondrée), soit par insuffisance d'hydroxylation comme dans l'insuffisance rénale chronique (1,25(OH)₂-D₃ basse), soit par défaut d'utilisation comme dans certains rachitismes... où les valeurs de PTH, élevées, sont adaptées à l'hypocalcémie signant l'hyperparathyroïdie secondaire. Les pseudo-hypoparathyroïdies, quant à elles sont dues à un défaut dans la synthèse des récepteurs ou des messagers intracellulaires, la PTH est alors élevée, adaptée, dans un tableau clinique d'hypo-parathyroïdie.

Il est bien évident que les dosages de PTH et de vitamine D, du 25-(OH)-D₃ représentant le stock en vitamine et du 1,25-(OH)₂-D₃, le calcitriol, représentant le métabolite actif de la vitamine D, sont indispensables à la confirmation des hypothèses diagnostiques pour lesquelles il pourra être utile par ailleurs de s'aider du dosage de l'AMPc néphrogénique.

- Les hypercalciuries, responsables de lithiases rénales à répétitions bénéficieront d'un bilan phosphocalcique comportant PTH et vitamine D qui permettront de détecter une fuite urinaire ou une hyper-absorption digestive, de calcium et/ou de phosphore et de mettre en route un traitement diététique et/ou médicamenteux destiné à éviter les récives.

INTERPRÉTATION ET DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL

L'interprétation des résultats ne peut se faire qu'en comparant les valeurs des dosages avec la calcémie ionisée (Ca⁺⁺), puisqu'il s'agit de juger du caractère adapté ou non de la concentration de PTH trouvée. Elle est facile en général, puisque le système est régulé par un rétro-contrôle. Un Ca⁺⁺>1,35 mmol/l, accompagné d'une valeur de PTH normale ou élevée confirme l'hypercalcémie parathyroïdienne dans ses diverses variantes : HPT1, adénome ou hyperplasie, "crise hyperparathyroïdienne", hypercalcémie aiguë néonatale, dont le seul traitement est la parathyroïdectomie dès lors qu'il existe des complications, soit osseuses, soit lithiasiques, soit générales, ou enfin hypercalcémie familiale hypocalciurique pour laquelle la parathyroïdectomie est proscrite... Si la PTH est basse, adaptée à l'hypercalcémie, la sécrétion parathyroïdienne n'est pas en cause et il peut s'agir d'hypercalcémie tumorale due au PTHrp ou à tout autre facteur tumoral hypercalcémiant (myélome) ou d'hypervitaminose D par hyperhydroxylation (sarcoïdose, tuberculose, lymphome) ou par excès d'apport.

Le raisonnement est identique quand il s'agit d'interpréter la cause d'une hypocalcémie : à PTH basse, inadaptée, d'origine parathyroïdienne, ou à PTH élevée adaptée, confirmant l'origine extra-parathyroïdienne de l'hypocalcémie.

L'interprétation des résultats des dosages de vitamine D permet alors de chiffrer le déficit en cause dans l'hypocalcémie.

La seule réelle difficulté du diagnostic différentiel est entre les pseudo hypoparathyroïdies où la sécrétion de PTH est élevée, adaptée à la calcémie mais dont les messagers intracellulaires ne sont pas synthétisés et l'effet de la PTH sur le rein et/ou sur l'os ne peut pas s'exercer et l'HPT2 par inutilisation de la vitamine D (rachitisme vitamino-résistant). Certaines pathologies, qui étaient difficilement compréhensibles avec les dosages de 2^e génération, seront probablement plus interprétables avec les nouveaux dosages de PTH "BIO-intacte".

UTILISATION POUR LE SUIVI BIOLOGIQUE

Le dosage de PTH et de vitamine D est utilisé non seulement à titre diagnostique, mais il est indispensable pour envisager le traitement adapté, et pour suivre les résultats du traitement choisi, puisque celui-ci vise à corriger les valeurs de calcémie en maintenant ces résultats au plus près des valeurs souhaitables, par exemple :

- des chiffres normaux dans les suites opératoires de l'HPT1, de façon à détecter au plus vite un "hungry bone syndrom" du à une entrée considérable de calcium dans l'os avide, induisant une hypocalcémie avec hyperparathyroïdie secondaire
- des chiffres de PTH situés dans un intervalle de valeurs "idéal" entre 150 et 300 pg/mL pour éviter la survenue du syndrome de l'os adynamique (à faible remodelage osseux) lié à une insuffisance de sécrétion de PTH des patients insuffisants rénaux chroniques dont l'avenir osseux dépend d'un traitement calcique et vitaminique adapté.

APPLICATION À UN CAS CLINIQUE

Une jeune fille de 15 ans est adressée en Explorations Fonctionnelles Rénales pour le bilan d'une hypercalcémie de découverte récente : très déprimée, elle se plaint d'une grande fatigue, de vagues douleurs dans les poignets et dans les doigts, de nausées avec perte de l'appétit, ayant entraîné un amaigrissement de 3 kg en 15 jours sans véritable altération de l'état général. Après avoir d'abord évoqué un trouble du comportement, son médecin généraliste a prescrit entre autres examens un ionogramme sanguin avec calcémie dont voici les résultats:

Na^+ = 144 mmol/L, K^+ = 3,4 mmol/L, Protides = 81 g/L, Créatinine = 100 $\mu\text{mol/L}$,

Ca^{++} total = 2,96 mmol/L.

Les examens pratiqués le jour de sa consultation montrent:

Ca^{++} ionisé = 1,60 mmol/L, PO_4^- = 0,65 mmol/L, PTH"Intact" = 180 pg/mL, $25(\text{OH})\text{D}_3$ = 4 ng/mL, $1-25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ = 38 pg/mL.

La calciurie est de 10 mmol/24h (400 mg) et la fonction rénale est dans les limites de la normale. Le diagnostic porté est celui d' HPT1 chez une jeune fille dont l'apport en vitamine D est faible. Des radiographies osseuses sont effectuées montrant une grande déminéralisation diffuse avec un aspect en houppe typique des phalanges terminales, ce qui évoque une durée d'évolution de l'HPT1 déjà longue.

Le traitement est chirurgical et la patiente est opérée d'un volumineux adénome sur P1, les 3 autres glandes visualisées semblant normales. L'hypocalcémie per-opératoire est rapidement maîtrisée et un rendez-vous de contrôle auprès des chirurgiens doit avoir lieu 6 semaines plus tard. Trois semaines après l'intervention, la patiente revient en urgence pour des fourmillements des extrémités, des difficultés respiratoires et une sensation d'ébriété intermittente : les examens montrent que le calcium ionisé = 0,98 mmol/L, la phosphatémie est normale, la calciurie de 24 heures = 0, la PTH=150 pg/mL, la 25(OH)-D₃ = 3 ng/mL et la 1,25(OH)₂-D₃ = 12 pg/mL.

Sur ces valeurs, un "hungry bone syndrom" est suspecté dont l'explication est la suivante: l'HPT1 prolongée a entraîné une perte de calcium osseux très importante chez cette jeune fille en cours de croissance, son stock de vitamine D était très faible et après la suppression de l'hypersécrétion parathyroïdienne, l'hydroxylation de la 25(OH)-D₃ s'est effondrée. En conséquence, l'absorption digestive du calcium est devenue très insuffisante pour permettre au calcium plasmatique de réintégrer l'os sans qu'il en résulte une hypocalcémie majeure même aux dépens, maintenant, d'une HPT2.

Une "supplémentation" massive en calcium et en vitamine D a été nécessaire pour ramener à la normale les valeurs de calcium et de PTH et cette "supplémentation" a été poursuivie pendant 3 mois, tant que la calciurie est restée basse, témoin d'une importante consommation de calcium par l'os. L'éviction des cours d' Education Physique a été maintenue pendant six mois pour éviter tout accident.

Références bibliographiques

Brossard JH, Cloutier M, Roy L et al. (1996). Accumulation of a non (1-84) molecular form of PTH detected by intact PTH assay in renal failure: Importance in the interpretation of PTH values. *J Clin Endocrinol Metab*, **81** : 3823--3929.

Felig P, Frohman LA (2001). Calcium and bone metabolism. In : *Endocrinology and Metabolism*, IVth Edition 2001; Chap 22 : 1079-1151.

Gao P, Scheibel S, D'amour P et al. (2001). Development of a novel immunoradiometric assay exclusively for biologically active whole parathyroid hormone 1-84. Implications for improvement of accurate assessment of parathyroid function. *J Bone Min Res*, **16** : 605-614.

Schrier RW (1999). Calcium Metabolism. In : *Atlas of Diseases of the Kidney*, Dept of Medicine, University of Colorado School of Medicine, Denver.

Hyperhomocystéinémie, vitamines du groupe B et maladies cardiovasculaires

*Rosa-Maria Guéant-Rodriguez, Yves Juillière, Bernard Herbeth, Nicolas Danchin,
Jean-Louis Guéant*

INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont les causes les plus importantes de mortalité dans les pays industrialisés. En France, elles représentent la première cause avec 180 000 décès par an. Les MCV regroupent la maladie coronaire (MC), les accidents vasculaires cérébraux (AVC) et les artériopathies périphériques.

L'histoire de l'homocystéine comme facteur de risque potentiel des MCV commence dans les années 60. En 1964, Mudd *et al.* identifièrent l'accumulation de l'homocystéine dans le plasma et dans les urines chez un patient présentant un déficit de cystathionine bêta synthase (CBS) (Mudd et Levy, 1989). La même année, en Irlande, des anomalies du métabolisme de l'homocystéine furent décrites dans un groupe de patients présentant un retard mental et une artériopathie. Dès 1969, l'équipe de McCully (McCully et Wilson, 1975) postule que l'homocystéine elle-même, ou un de ses dérivés, est responsable de dommages artériels. Plus tard, la même équipe propose "L'homocystéine, théorie d'artériosclérose" sur la base des examens anatomopathologiques du matériel d'autopsie d'enfants homocystinuriques. Durant les années qui suivirent, l'homocystéine fut mesurée dans le plasma d'hommes et de femmes en bonne santé et bientôt différents auteurs émirent l'hypothèse d'un rôle possible d'anomalies du métabolisme de la méthionine dans la pathogenèse de l'athérosclérose, en particulier au niveau des coronaires et du cerveau.

De nombreuses études cas-témoins et prospectives ont été publiées sur l'homocystéine et la maladie vasculaire au cours de la dernière décennie. La grande majorité de ces études appuie l'observation qu'une augmentation de la concentration de l'homocystéine totale dans le plasma est associée à un plus grand risque de survenue et de récurrence de MCV. Cependant, les données sont parfois contradictoires (cf. chapitres suivants).

MÉTABOLISME DE L'HOMOCYSTEÏNE ET EFFETS CELLULAIRES

L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé soufré formé au niveau intracellulaire à partir de la méthionine apportée par l'alimentation. L'Hcy n'est pas codée génétiquement et est absente des protéines. Elle est synthétisée par toutes les cellules de l'organisme. Le métabolisme de l'Hcy comporte un cycle couplé au cycle des folates et la voie de la transsulfuration (Figure 1).

Les effets de l'homocystéine sont résumés dans la figure 2 et les mécanismes d'association avec les maladies cardiovasculaires dans la figure 3.

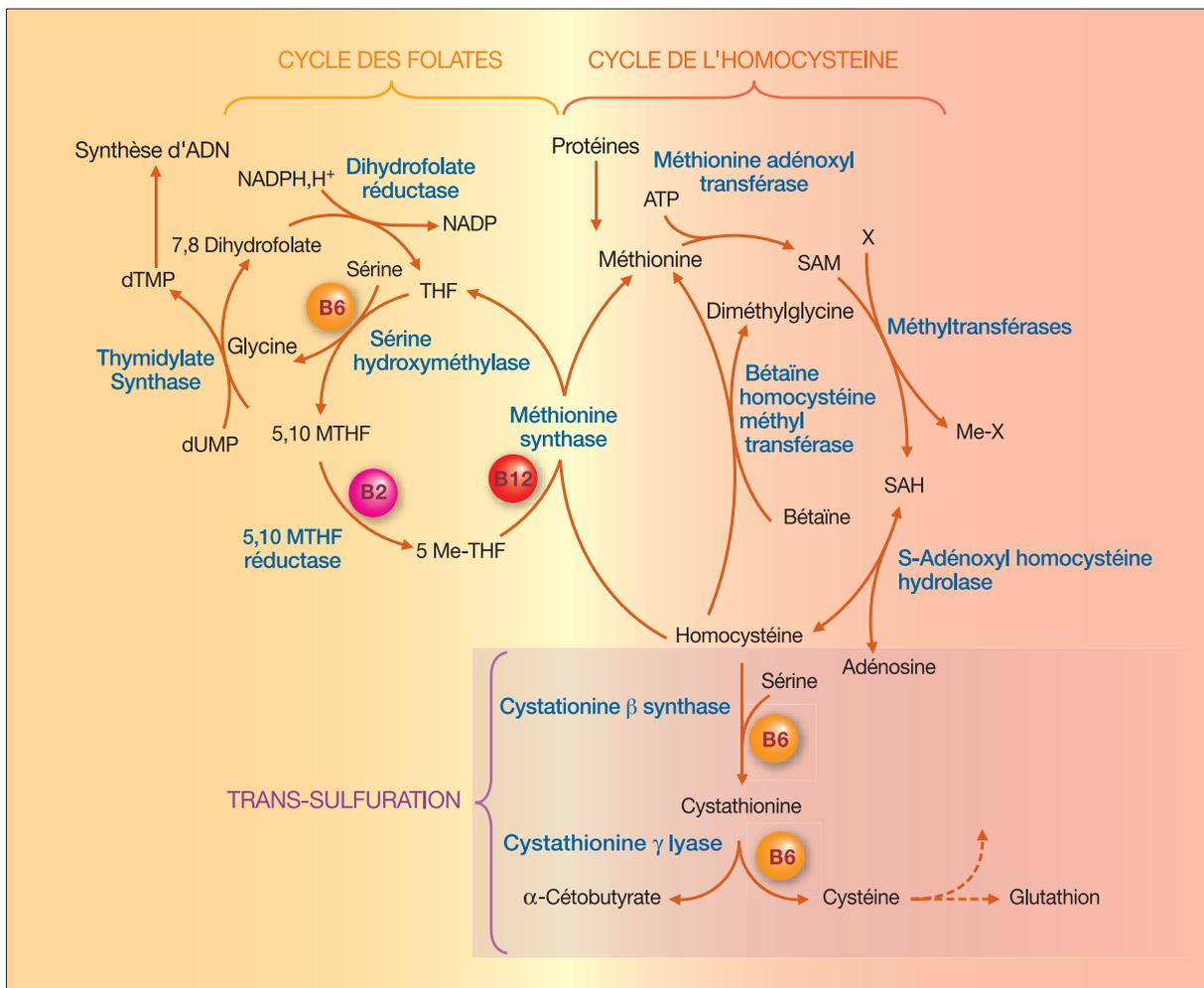


Figure 1 : Métabolisme de l'homocystéine.

dUMP : désoxyuracilemonophosphate ; dTMP : désoxythymidinemonophosphate ; SAH : S-Adénylhomocystéine ; FAD : Flavine-Adénosine dinucléotide ; NADP : Nicotinamide-Adénine-dinucléotide phosphate ; THF : Tétrahydrofolate ; DHF : Dihydrofolate ; MTHF : Méthylène-THF ; Me-THF : Méthyl-THF ; SAM : S-Adénylméthionine

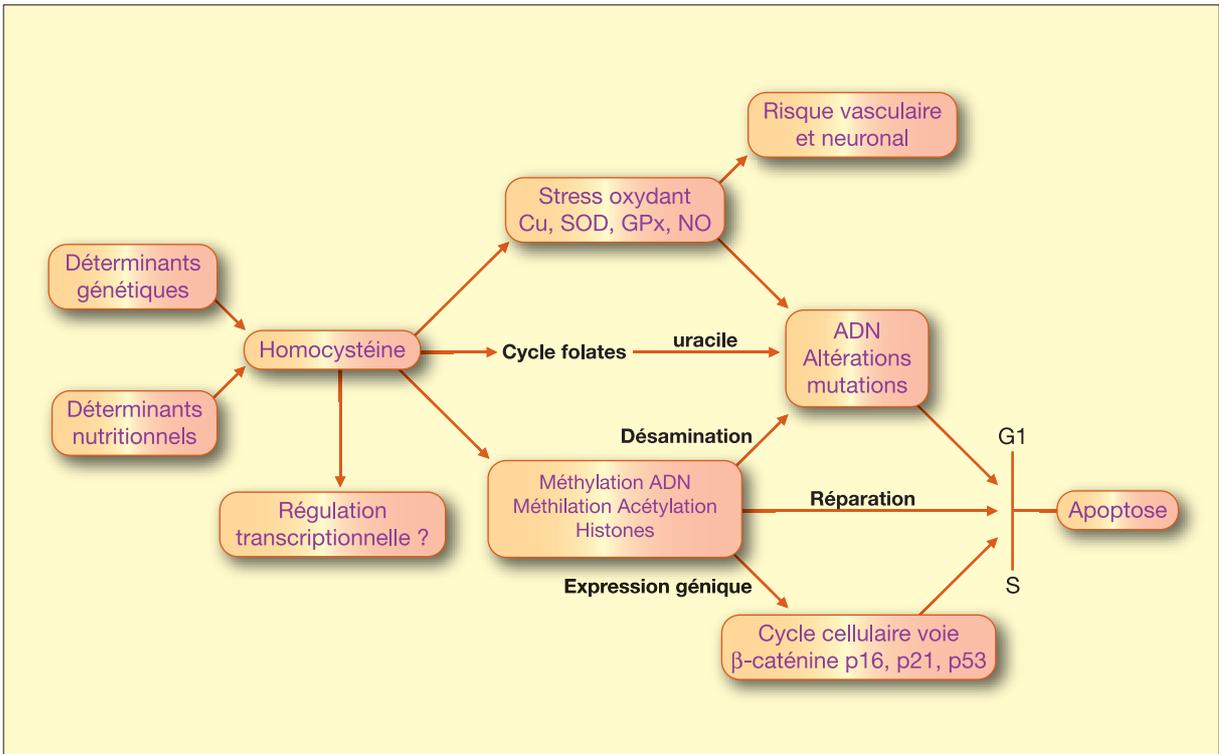


Figure 2 : Effets moléculaires et cellulaires de l'homocystéine.

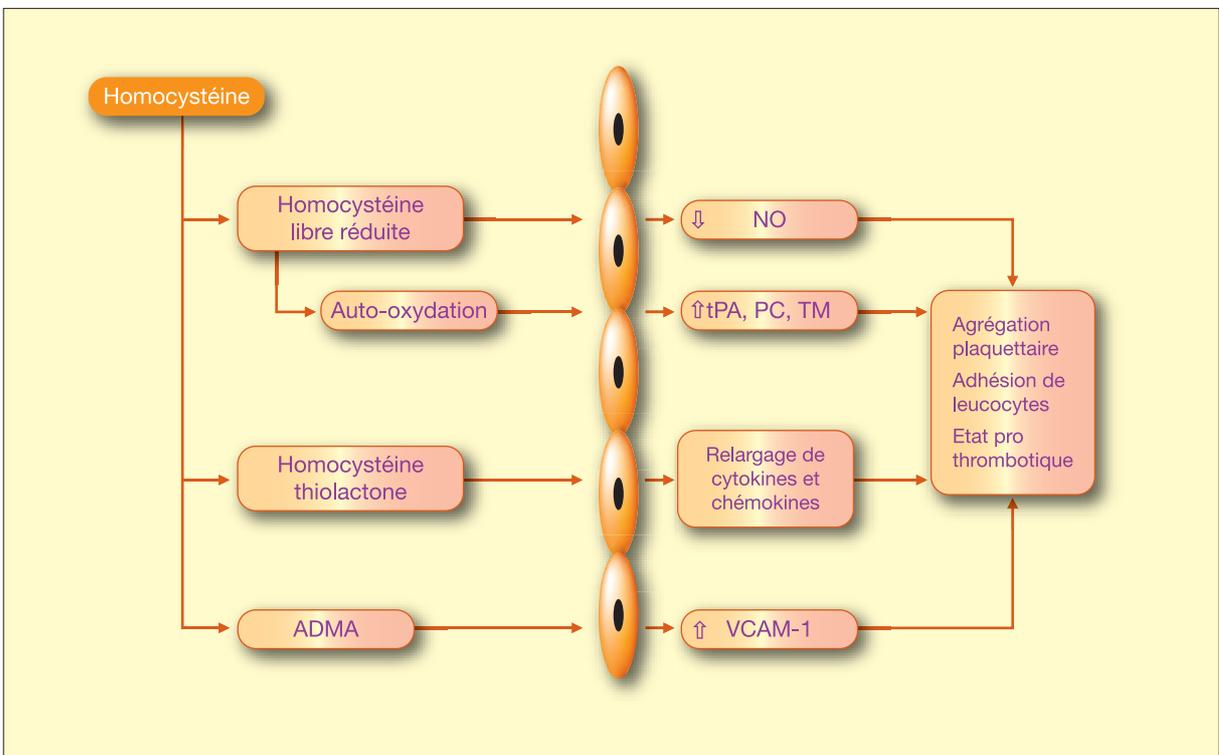


Figure 3 : Mécanismes d'association de l'homocystéine avec la dysfonction endothéliale.

(d'après Bollander-Gouaille, 2002)

L'HOMOCYSTÉINE CIRCULANTE

Les différentes formes physicochimiques d'homocystéine circulante

La plupart des études d'associations de l'homocystéine avec les MCV sont basées sur le dosage de l'homocystéine totale plasmatique, sans prendre en compte les différentes formes circulantes. Le plasma humain contient des quantités réduites et oxydées d'homocystéine (McCully et Wilson, 1975). Le sulfhydryle ou la forme réduite s'appelle "homocystéine" et le bisulfure ou la forme oxydée s'appelle "homocystine". Les formes du bisulfure existent également avec de la cystéine et avec des protéines contenant les résidus réactifs de cystéine (homocystéine liée aux protéines). Les formes oxydées d'homocystéine correspondant habituellement à 98–99 % de l'homocystéine totale dans le plasma humain, dont 80-90 % sont liés aux protéines (McCully et Wilson, 1975). L'homocystéine totale (t-Hcy) est donc la somme de toutes les formes d'homocystéine qui existent dans le plasma ou le sérum.

Sur la base des travaux menés, la gamme de la concentration totale en homocystéine dans le plasma "des adultes en bonne santé" est 5–15 $\mu\text{mol/L}$ (Tableau 1) (Ueland *et al.*, 1993).

L'augmentation de l'homocystéinémie observée chez des patients atteints de MCV est habituellement modérée (15–25 $\mu\text{mol/L}$) (Mayer *et al.*, 1996 ; Ueland *et al.*, 1992). Cependant, si la fonction rénale est altérée, le taux de t-Hcy peut atteindre les concentrations intermédiaires (25–50 $\mu\text{mol/L}$) (Bostom *et al.*, 1997 ; Dennis *et al.*, 1996). L'Hcy thiolactone, un thioester cyclique de l'homocystéine, a récemment suscité l'attention pour son rôle potentiel dans l'athérosclérose et la maladie thromboembolique (Jakubowski *et al.*, 1997 ; Jakubowski *et al.*, 2001).

Tableau 1 : Valeurs normales et pathologiques d'homocystéine

	Homocystéine $\mu\text{mol/L}$
Normal	5 - 15
Souhaitable	< 10
Hyperhomocystéinémie	
Modérée	16 - 25
Intermédiaire	26 - 50
Sévère	> 50

Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie

Les déterminants de t-Hcy sont nombreux et impliquent des facteurs environnementaux, nutritionnels et génétiques. Les facteurs environnementaux et nutritionnels qui contribuent à une hyperhomocystéinémie modérée, incluent le statut en folates, vitamine B₁₂, vitamine B₆, vitamine B₂, l'âge, le sexe, certains médicaments et différentes conditions pathologiques. Les personnes âgées ont des taux plus élevés d'Hcy que les adultes jeunes. Dans ce groupe d'âge, le statut vitaminique a une influence majeure (Selhub *et al.*, 1993). Les hommes ont une Hcy plus élevée que les femmes, du fait d'une plus grande masse musculaire ou des effets des hormones sexuelles (Anderson *et al.*, 1992 ; Jacobsen *et al.*, 1994). L'hyperhomocystéinémie modérée peut être liée à la prise des certains médicaments comme le methotrexate, la phénytoïne, la carbamazépine, qui interfèrent avec le métabolisme des folates, le dioxyde d'azote, qui inactive la vitamine B₁₂, l'azaribine, qui inhibe l'activité de la CBS (Ueland *et al.*, 1992). Les contraceptifs, la pénicillamine ou les œstrogènes oraux diminuent l'Hcy (Ueland *et al.*, 1989). Des conditions pathologiques comme l'hypothyroïdie, l'insuffisance rénale, les affections inflammatoires (notamment intestinales), l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, le diabète de type II, les maladies lymphoprolifératives et certains cancers (sein, ovaire, pancréas) peuvent aussi augmenter les taux d'Hcy (DeBree *et al.*, 2002).

Il existe plusieurs polymorphismes des enzymes intervenant dans le cycle des folates et la reméthylation de l'homocystéine. Il s'agit principalement de variants génétiques des enzymes 5, 10-méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR C677T, A1298C), méthionine synthase (MTR A2756G), méthionine synthase réductase (MTRR A66G). De plus, un polymorphisme portant sur une protéine de transport de la vitamine B₁₂, la transcobalamine (TCN C776G), a été rapporté et peut également s'associer à une hyperhomocystéinémie relative.

Le polymorphisme C677T (substitution d'une alanine pour une valine) rend la MTHFR thermolabile avec une diminution de 50 % de son activité (Frosst *et al.*, 1995). La fréquence des homozygotes 677TT est de 5 à 15 % dans la plupart des populations caucasiennes (Brattstrom *et al.*, 1998). La concentration de t-Hcy est d'autant plus élevée chez les porteurs du génotype 677TT que le statut en folates est déficient (Brattstrom *et al.*, 1998 ; de Bree, 2001). Le polymorphisme A2756G se traduit par une substitution d'un résidu d'acide aspartique par la glycine (Chen *et al.*, 1997 ; Leclerc *et al.*, 1996) mais ne semble pas entraîner de modification de l'activité enzymatique du variant mineur. La relation entre ce polymorphisme et les MCV a été peu étudiée (Zhang *et al.*, 2004). Un polymorphisme du gène de la MTRR (MTRR A66G) est associé à une augmentation de t-Hcy (Gaughan *et al.*, 2001), mais les résultats des autres études sont contradictoires (Brilakis *et al.*, 2003 ; Brown *et al.*, 2000 ; Jacques *et al.*, 2002). Le gène (TCN) de la TCII peut présenter plusieurs polymorphismes. L'allèle TCN 776 G diminue la transcription de la TCII et il existe par conséquent une diminution de la concentration plasmatique en TCII. Une influence faible de l'allèle TCN 776 G sur la concentration de l'Hcy a été documentée de manière inconstante dans des populations de Caucasiens (Miller *et al.*, 2002 ; Namour *et al.*, 2001).

ÉTUDES ÉPIDÉMIOLOGIQUES TRANSVERSALES, CAS-TÉMOINS ET PROSPECTIVES SUR LA RELATION HOMOCYSTÉINE/MALADIES CARDIOVASCULAIRES

Les travaux de recherche fondamentale ont permis de montrer que l'Hcy altère la fonction endothéliale, accélère la formation de thrombine, empêche la thrombolyse endogène, favorise la peroxydation des lipides par la formation de radicaux libres, et induit la chémoattractivité des monocytes et des cellules musculaires lisses par l'activation des substances inflammatoires (MCP-1, VCAM-1, IL-8). Cinq à sept % de la population générale ont une hyperhomocystéinémie modérée (McCully, 1996 ; Mudd et al., 1989) et donc, en théorie, un plus grand risque de développer des MCV. Les études d'associations réalisées sur des populations de patients ne confirment cependant qu'en partie les résultats expérimentaux.

Homocystéine

La plupart, mais pas toutes les études épidémiologiques et leurs méta-analyses (Anderson *et al.*, 2000 ; Christen *et al.*, 2000 ; Clarke *et al.*, 2002 ; Giles *et al.*, 2000 ; Nygård *et al.*, 1999 ; Omland *et al.*, 2000 ; Vollset *et al.*, 2001 ; Voutilainen *et al.*, 2000) indiquent que les individus avec des niveaux élevés d'homocystéine plasmatique ont un plus grand risque de développer des MCV. Les premières études transversales et cas-témoins montrent une plus forte relation entre l'Hcy et les MCV par rapport aux études prospectives plus récentes (Danesh *et al.*, 1998 ; Ford *et al.*, 2002 ; Ueland *et al.*, 2000). L'augmentation de ce risque varie approximativement de 20 % pour une augmentation de 5 $\mu\text{mol/L}$ d'Hcy dans les études de cohorte à plus de 50 % dans les études cas-témoins.

Les conclusions des dernières méta-analyses suggèrent que l'homocystéine est un facteur de risque prédictif indépendant des MCV faible et qu'il est nécessaire de réaliser des études qui prennent en compte tous les polymorphismes qui interfèrent avec le métabolisme de l'Hcy. D'autre part, des études randomisées d'intervention pour diminuer le taux d'Hcy sont nécessaires pour déterminer si l'Hcy est un vrai facteur de risque des MCV.

Homocystéine et folates

L'hypothèse d'un rôle spécifique des folates dans le développement des MCV, par l'intermédiaire du métabolisme de l'Hcy ou indépendamment de l'Hcy, a fait l'objet de nombreuses études transversales, cas-témoins et prospectives. En général, indépendamment des autres facteurs de risque cardiovasculaire, le statut en folates, évalué par les apports de l'alimentation ou venant des suppléments et les concentrations plasmatiques et/ou érythrocytaires en folates, est corrélé positivement à un risque réduit de la mortalité toutes causes confondues et de survenue de MCV, mais également à des signes cliniques d'atteinte vasculaire comme la sténose carotidienne (Bunout *et al.*, 2000 ; Ness *et al.*, 1999 ; Rimm *et al.*, 1998 ; Robinson *et al.*, 1998 ; Selhub *et al.*, 1995 ;

Silberberg *et al.*, 2001 ; Verhoef *et al.*, 1996). Le risque relatif de MCV peut atteindre 2,4 en comparant respectivement les quartiles inférieur et supérieur des apports en folates (Giles *et al.*, 1998). Cependant, l'association entre un régime riche en folates et un risque faible de MCV peut être confondue par d'autres facteurs diététiques cardioprotecteurs présents également dans les fruits et légumes.

ESSAIS DE SUPPLÉMENTATION EN VITAMINES DU GROUPE B

Supplémentation et évolution des plaques carotidiennes

Dans la plupart des laboratoires le seuil de "normalité" pour l'Hcy est autour de 14-15 $\mu\text{mol/L}$ (Tableau 1). Dans une étude réalisée par Hackam *et al.* (2000), le traitement de 101 patients ayant des plaques carotidiennes d'épaisseur variable par les vitamines B₆, B₉ et B₁₂ a réduit significativement le taux de progression de la plaque, en particulier chez les individus ayant des concentrations de t-Hcy >14 $\mu\text{mol/L}$. Ces observations suggèrent d'une part le rôle causal de l'Hcy dans les lésions d'athérosclérose, et d'autre part, que le seuil de valeur normale de l'Hcy devrait plutôt être inférieur à 14 $\mu\text{mol/L}$. Dans une cohorte de 38 patients présentant des plaques carotidiennes athéromateuses prématurées et une concentration de t-Hcy >14 $\mu\text{mol/L}$, Peterson et Spence (2002) ont montré qu'un traitement par les folates et les vitamines B₆ et B₁₂ réduit la taille des plaques. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour vérifier l'effet des folates et des vitamines du groupe B sur la réduction de la taille et l'évolution de plaques athéromateuses.

Supplémentation et fonction artérielle et endothéliale

La supplémentation en acide folique à doses élevées peut améliorer la fonction endothéliale (Bellamy *et al.*, 1999 ; Woo *et al.*, 1999) dans diverses situations physiopathologiques :

- En cas de maladie périphérique occlusive et d'hyperhomocystéinémie modérée et avec modification des concentrations circulantes de facteur von Willebrand et de thrombomoduline (Van den Berg *et al.*, 1995).
- Lors d'une charge orale en méthionine (Chao *et al.*, 1999 ; Usui *et al.*, 1999) ou en lipides (Wilmink *et al.*, 2000).

Les folates pourraient avoir un effet spécifique indépendamment du métabolisme de l'Hcy (Doshi *et al.*, 2001, 2002), une perfusion intra-artérielle de 5-MeTHF, le principal métabolite des folates, améliore la fonction endothéliale en absence de modification de t-Hcy (Doshi *et al.*, 2001).

D'autre part, un traitement par les folates même aux doses élevées ne semble pas améliorer la dysfonction endothéliale observée chez les patients en insuffisance rénale chronique (Thambyrajah *et al.*, 2000).

Supplémentation après angioplastie

Plusieurs études randomisées sur l'impact d'une supplémentation de 6 mois associant folates (1mg/j), vitamine B₁₂ (400 µg/j) et vitamine B₆ (10 mg/j) ou un placebo ont été réalisées chez les patients qui ont subi une angioplastie coronaire (Schnyder *et al.*, 2001, 2002). Le taux d'événements pathologiques est sensiblement inférieur chez les patients recevant des vitamines B par rapport au groupe placebo. Le taux de resténose y est également plus faible (19,6% vs. 37,6%). Cependant, aucun effet sur le taux de mortalité d'origine cardiovasculaire ni sur la récurrence d'infarctus du myocarde non mortel n'a été constaté. Dans une troisième étude comportant 593 patients ayant une maladie coronaire connue stable ou un angor stable, aucun effet de la supplémentation en folates n'a été observé après deux ans de suivi (Liem *et al.*, 2003).

Études en cours sur la prévention du risque secondaire

Bien que de nombreuses études montrent les effets bénéfiques d'une supplémentation en folates pour diminuer le taux d'Hcy, peu de données existent sur la survie de patients atteints de MCV. Quelques études cliniques randomisées à grande échelle sont actuellement en cours pour évaluer les effets bénéfiques de l'acide folique et des vitamines du groupe B sur le risque secondaire. La plupart de ces études utilisent des doses d'acide folique entre 0,2 et 5 mg/j. Dans l'étude CHAOS 2 d'intervention secondaire contre placebo, une dose élevée d'acide folique donnée à 1000 patients (5 mg/jour) fait baisser le taux d'Hcy de 11,2 à 9,7 µmol/L et réduit d'un facteur 2 le taux de récurrence de l'IDM (Baker *et al.*, 2002). En revanche, l'étude NORVIT vient récemment de conclure à l'absence d'effet bénéfique de la supplémentation en folates (Bonna *et al.*, 2006). Dans un futur proche, les résultats de nombreuses études randomisées à grande échelle telles que KS-2 WENBIT, PACIFIQUE, RECHERCHE, VITATOPS, HOPE-2, WACS, FAVORI et SU.FOL.OM3 (étude nationale) ajouteront des informations complémentaires sur l'intérêt d'une supplémentation en vitamines du groupe B pour réduire les risques de MCV.

ÉTUDES CLINIQUES D'ASSOCIATION DES DÉTERMINANTS GÉNÉTIQUES DE L'HOMOCYSTÉINE AVEC LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES

Plusieurs études épidémiologiques ont décrit une association entre les homozygotes pour C677T et/ou une augmentation de t-Hcy et le risque primaire de MCV (Kluijtmans *et al.*, 1997 ; Ueland *et al.*, 2001). Cependant, les résultats sont souvent contradictoires, suggérant des interactions complexes entre les facteurs environnementaux et génétiques (Girelli *et al.*, 1998 ; Guéant-Rodriguez *et al.*, 2005 ; Ueland *et al.*, 2000). Les résultats des études sur l'influence du polymorphisme de MTR A2756G sur les MCV sont également contradictoires. Quatre études n'ont pas trouvé d'association et une seule étude a trouvé un risque 4 fois plus élevé de MC entre les porteurs MTR 2756 GG comparés aux AG et AA. (Klerk *et al.*, 2003). Par contre, Hyndman *et al.* (2000) ont rapporté que les hétérozygotes pour le variant MTR 2756 AG ont une réduction des événements vasculaires secondaires.

Nous avons trouvé une association significative de l'allèle A du polymorphisme MTRR A66G avec l'Hcy et le risque de MC dans une série cas-témoins sans supplémentation et ni fortification en folates et vitamines B. Ces résultats diffèrent des évaluations précédentes dans les populations d'Amérique du Nord et le Nord de l'Europe, suggérant qu'ils puissent être conditionnés par le statut en folates et/ou en vitamine B₁₂ (Guéant-Rodriguez *et al.*, 2005).

CONCLUSION

De nombreux arguments expérimentaux suggèrent que l'homocystéine est impliquée dans les mécanismes physiopathologiques des MCV. Les résultats obtenus à l'aide de modèles cellulaires et d'animaux génétiquement modifiés contrastent avec le faible risque de MCV généré par l'hyperhomocystéinémie modérée et par les déterminants génétiques qui lui sont associés. Peu d'études ont évalué le risque chez des patients présentant une hyperhomocystéinémie intermédiaire car ceux-ci représentent une proportion faible de la population, ce qui limite les études épidémiologiques. De plus, la plupart des études de recrutement "partent" de la maladie et non de la valeur prédictive d'une hyperhomocystéinémie. Enfin, les populations étudiées sont hétérogènes du point de vue génétique et de l'environnement nutritionnel. Les études d'intervention actuellement en cours devraient apporter une contribution majeure pour déterminer si le dépistage des hyperhomocystéinémies et la supplémentation en vitamines du groupe B sont des stratégies à intégrer dans la prévention des MCV.

Références bibliographiques

- Andersson A, Brattström LE, Israelsson B et al.** (1992). Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender, and menopausal status. *Eur J Clin Invest*, **22** : 79-87.
- Anderson JL, Muhlestein JB, Home BD et al.** (2000). Plasma homocysteine predicts mortality independently of traditional risk factors and c-reactive protein in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Circulation*, **102** : 1227-1232.
- Baker F, Picton D, Blackwood S et al.** (2002). Blinded comparison of folic acid and placebo in patients with ischaemic heart disease: an outcome trial. *Circulation*, **106 Sup** : 741.
- Bellamy MF, McDowell IF, Ramsey MW et al.** (1999). Oral folate enhances endothelial function in hyperhomocysteinaemic subjects. *Eur J Clin Invest*, **29** : 659-662.
- Bollander-Gouaille C** (2002). *Focus on homocysteine and the vitamins involved in its metabolism*. Springer-Verlag, Paris.
- Bønaa KH, Njølstad I, Ueland PM et al.** (2006). Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, **354** : 1578-1588.
- Bostom AG, Lathrop L** (1997). Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney Int*, **52** : 10-20.
- Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L** (1998). Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation*, **98** : 2520-2526.
- Brilakis ES, Berger PB, Ballman KV et al.** (2003). Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677 C>T and methionine synthase reductase (MTRR) 66 A>G polymorphisms: association with serum homocysteine and angiographic coronary artery disease in the era of flour products fortified with folic acid. *Atherosclerosis*, **168** : 315-322.
- Brown CA, McKinney KQ, Kaufman JS et al.** (2000). A common polymorphism in methionine synthase reductase increases risk of premature coronary artery disease. *J Cardiovas Risk*, **7** : 197-200.
- Bunout D, Petermann M, Hirsch S et al.** (2000). Low serum folate but normal homocysteine levels in patients with atherosclerotic vascular disease and matched healthy controls. *Nutrition*, **16** : 434-438.
- Chao CL, Chien KL, Lee YT** (1999). Effect of short-term vitamin (folic acid, vitamins B₆ and B₁₂) administration on endothelial dysfunction induced by post-methionine load hyperhomocysteinemia. *Am J Cardiol*, **84** : 1359-1361.
- Chen LH, Liu ML, Hwang HY et al.** (1997). Human methionine synthase: cDNA cloning, gene localization, and expression. *J Biol Chem*, **272** : 3628-3634.
- Christen WG, Ajani UA, Glynn RJ, Hennekens CH** (2000). Blood levels of homocysteine and increased risks of cardiovascular disease: causal or casual? *Arch Intern Med*, **160** : 422-434.
- Clarke R, Collins R, Lewington S** (2002). Homocysteine studies collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA*, **288** : 2015-2022.
- Danesh J, Lewington S** (1998). Plasma homocysteine and coronary heart disease: systematic review of published epidemiological studies. *J Cardiovasc Risk*, **5** : 229-232.
- de Bree A, Verschuren WM, Blom HJ, Kromhout D** (2001). Association between B vitamin intake and plasma homocysteine concentration in the general Dutch population aged 20-65 y. *Am J Clin Nutr*, **73** : 1027-1033.

- De Bree A, Verschuren WM, Kromhout D et al.** (2002). Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. *Pharmacol Rev*, **54** : 599-618.
- Dennis VW, Robinson K** (1996). Homocysteinemia and vascular disease in end-stage renal disease. *Kidney Int*, **50 (Suppl 57)** : S11-S17.
- Doshi SN, McDowell IF, Moat SJ et al.** (2001). Folate improves endothelial function in coronary artery disease: an effect mediated by reduction of intracellular superoxide? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **21** : 1196-1202.
- Doshi SN, McDowell IF, Moat SJ et al.** (2002). Folic acid improves endothelial function in coronary artery disease via mechanisms largely independent of homocysteine lowering. *Circulation*, **105** : 22-26.
- Ford ES, Smith SJ, Stroup DF et al.** (2002). Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a systematic review of the evidence with special emphasis on case-control studies and nested case-control studies. *Int J Epidemiol*, **31** : 59-70.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R et al.** (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genet*, **10** : 111-113.
- Gaughan DJ, Kluijtmans LA, Barbaux S et al.** (2001). The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. *Atherosclerosis*, **157** : 451-456.
- Giles WH, Kittner SJ, Croft JB et al.** (1998). Serum folate and risk for coronary heart disease: results from a cohort of US adults. *Ann Epidemiol*, **8** : 490-496.
- Giles WH, Croft JB, Greenlund KJ et al.** (2000). Association between total homocysteine and the likelihood for a history of acute myocardial infarction by race and ethnicity: results from the third national health and nutrition examination survey. *Am Heart J*, **139** : 446-453.
- Girelli D, Friso S, Trabetti E et al.** (1998). Methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation, plasma homocysteine, and folate in subjects from northern Italy with or without angiographically documented severe coronary atherosclerotic disease: evidence for an important genetic-environmental interaction. *Blood*, **91** : 4158-4163.
- Guéant-Rodriguez RM, Juillièrè Y, Candito M et al.** (2005). Association of MTRR A66G polymorphism (but not of MTHFR C677T and A1298C, MTR A2756G, TCN C776G) with homocysteine and coronary artery disease in the French population. *Thromb Haemost*, **94** : 510-515.
- Hackam DG, Peterson JC, Spence JD** (2000). What level of plasma homocysteine should be treated? Effects of vitamin therapy on progression of carotid atherosclerosis in patients with homocysteine levels above and below 14 $\mu\text{mol/L}$. *Am J Hypertens*, **13** : 105-110.
- Hyndman ME, Bridge PJ, Warnica JW et al.** (2000). Effect of heterozygosity for the methionine synthase 2756 A \rightarrow G mutation on the risk for recurrent cardiovascular events. *Am J Cardiol*, **86** : 1144-1146.
- Jacobsen DW, Gatautis VJ, Green R et al.** (1994). Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. *Clin Chem*, **40** : 873-881.
- Jacques PF, Bostom AG, Selhub J et al.** (2002). Effects of polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase on total plasma homocysteine in the NHLBI family heart study. *Atherosclerosis*, **166** : 49-55.
- Jakubowski H** (1997). Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. *J Biol Chem*, **272** : 1935-1942.

- Jakubowski H, Ambrosius WT, Pratt HJ** (2001). Genetic determinants of homocysteine thiolactonase activity in humans: implications for atherosclerosis. *FEBS*, **491** : 35–39.
- Klerk M, Lievers KJ, Kluijtmans LA et al.** (2003). The 2756A >G variant in the gene encoding methionine synthase: its relation with plasma homocysteine levels and risk of coronary heart disease in a Dutch case-control study. *Thrombosis Research*, **110** : 87–91.
- Kluijtmans LA, Kastelein JJ, Lindemans J et al.** (1997). Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation*, **96** : 2573-2577.
- Leclerc D, Campeau E, Goyette P et al.** (1996). Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Molec Genet*, **5** : 1867-1874.
- Liem A, Reynierse-Buitenwerf GH, Zwinderman AH et al.** (2003). Secondary prevention with folic acid: effects on clinical outcomes. *J Am Coll Cardiol*, **41** : 2105–2113.
- Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K.** (1996). Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, **27** : 517-527.
- McCully KS, Wilson RB** (1975). Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis*, **22** : 215-227.
- McCully KS** (1996). Homocysteine and vascular disease. *Nat Med*, **2** : 386–389.
- Miller JW, Ramos MI, Garrod MG et al.** (2002). Transcobalamin II 775 G>C polymorphism and indices of vitamin B12 status in healthy older adults. *Blood*, **100** : 718-720.
- Mudd SH, Levy HL.** Disorders in transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (1989). *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, 693–734.
- Namour F, Olivier J, Abdelmoutaleb I et al.** (2001). Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. *Blood*, **97** : 1092-1098.
- Ness AR, Powles JW** (1999). The role of diet, fruit and vegetables and antioxidants in the aetiology of stroke. *J Cardiovasc Risk* , **6** : 229–234.
- Nygaard O, Vollset SE, Refsum H et al.** (1999). Total homocysteine and cardiovascular disease. *J Intern Med*, **246** : 425–454.
- Omland T, Samuelsson A, Hartford M et al.** (2000). Serum homocysteine concentration as an indicator of survival in patients with acute coronary syndromes. *Arch Intern Med*, **160** : 1834–1840.
- Peterson JC, Spence JD** (1998). Vitamins and progression of atherosclerosis in hyper-homocyst(e)inaemia. *Lancet*, **351** : 263.
- Rimm EB, Willett WC, Hu FB et al.** (1998). Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *JAMA*, **279** : 359–364.
- Robinson K, Arheart K, Refsum H et al.** (1998). Low circulating folate and vitamin B6 concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease and coronary artery disease. European COMAC Group. *Circulation*, **97** : 437–443.
- Schnyder G, Roffi M, Pin R et al.** (2001). Decreased rate of coronary restenosis after lowering plasma homocysteine levels. *N Engl J Med*, **345** : 1593–1600.
- Schnyder G, Roffi M, Y. Flammer Y et al.** (2002). Effect of homocysteine-lowering therapy with folic acid, vitamin B₁₂, and vitamin B₆ on clinical outcome after percutaneous coronary intervention. *JAMA*, **288** : 973–979.

- Selhub J, Jaques PF, Wilson PW et al.** (1993). Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA*, **270** : 2693–2698.
- Selhub J, Jacques PF, Bostom AG et al.** (1995). Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *N Engl J Med*, **332** : 286–291.
- Silberberg JS, Crooks RL, Wlodarczyk JH, Fryer JL** (2001). Association between plasma folate and coronary disease independent of homocysteine. *Am J Cardiol*, **87** : 1003–1004.
- Thambyrajah J, Landray MJ, McGlynn FJ et al.** (2000). Does folic acid decrease plasma homocysteine and improve endothelial function in patients with predialysis renal failure? *Circulation*, **102** : 871–875.
- Ueland PM, Refsum H** (1989). Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease and drug therapy. *J Lab Clin Med*, **144** : 450–473.
- Ueland PM, Refsum H, Brattström L.** Plasma homocysteine and cardiovascular disease. *In*: Francis RB. *Atherosclerotic cardiovascular disease* (1992). Marcel Dekker Inc, New York, 183-236.
- Ueland PM, Refsum H, Stabler SP et al.** (1993). Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem*, **39** : 1764-1779.
- Ueland PM, Refsum H, Beresford SA, Vollset SE** (2000). The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr*, **72** : 324-332.
- Ueland PM, Hustad S, Schneede J et al.** (2001). Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci*, **22** : 195-201.
- Usui M, Matsuoka H, Miyazaki H et al.** (1999). Endothelial dysfunction by acute hyperhomocyst(e)inaemia: restoration by folic acid. *Clin Sci*, **96** : 235–239.
- van den Berg M, Boers GHJ, Franken DG et al.** (1994). Hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction in young patients with peripheral arterial occlusive disease. *Eur J Clin Invest*, **25** : 176–181.
- Verhoef P, Stampfer MJ** (1995). Prospective studies of homocysteine and cardiovascular disease. *Nutr Rev*, **53** : 283-238.
- Vollset SE, Refsum H, Tverdal A et al.** (2001). Plasma total homocysteine and cardiovascular and noncardiovascular mortality: the Hordaland homocysteine study. *Am J Clin Nutr*, **74** : 130–136.
- Voutilainen S, Lakka TA, Hamelahti P et al.** (2000). Plasma total homocysteine concentration and the risk of acute coronary events: the Kuopio ischaemic heart disease risk factor study. *J Intern Med*, **248** : 217–222.
- Wilmink HW, Stroes ES, Erkelens WD et al.** (2000). Influence of folic acid on postprandial endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20** : 185–188.
- Woo KS, Chook P, Lolin YI et al.** (1999). Folic acid improves arterial endothelial function in adults with hyperhomocystinemia. *J Am Coll Cardiol*, **34** : 2002–2006.
- Zhang Y, Zhang M, Niu T et al.** (2004). D919G polymorphism of methionine synthase gene is associated with blood pressure response to benazepril in Chinese hypertensive patients. *J Hum Genet*, **49** : 296-301.

Vitamines & facteurs xénobiotiques : alcool, tabac

Bernard Herbeth, Alain Lemoine

Les effets néfastes de comportements individuels sur la santé sont connus depuis longtemps. Une partie de ces processus délétères est sous tendue par des perturbations du métabolisme des micronutriments, en particulier des vitamines. Ainsi, les expositions prolongées à des toxiques addictogènes divers sont-elles responsables de la majorité des pathologies évitables chez l'homme dans les pays développés. La toxicité cellulaire de ces produits, en particulier de l'alcool éthylique directement toxique, et celle du tabac, dont l'addiction est déclenchée par la nicotine qui est accompagnée de nombreux autres toxiques, sont souvent associés. Les éventuels effets sur le statut vitaminique des divers xénobiotiques environnementaux sont en revanche très mal connus chez l'homme. Les données expérimentales recueillies chez l'animal donnent à penser que ces divers polluants peuvent être responsables d'anomalies du statut vitaminique.

ALCOOL ET ALCOOLISME

La consommation excessive d'alcool s'accompagne souvent d'un déséquilibre alimentaire aussi bien quantitatif que qualitatif. En général, à niveau bas de consommation, les calories alcooliques s'ajoutent à la consommation énergétique totale. Quand la consommation s'élève, l'alcool se substitue partiellement aux glucides puis aux autres macronutriments, protéines et lipides (Colditz *et al.*, 1991). Du point de vue qualitatif, le buveur excessif a tendance à préférer certains aliments comme la viande et les produits carnés, le pain et les féculents et à délaisser les produits laitiers, et les fruits et légumes qui sont des sources importantes de micronutriments (Herbeth *et al.*, 1988). De plus, les boissons alcooliques contiennent très peu de vitamines à l'exception de la bière.

De ce fait, le sujet buveur excessif ou alcoolique, même en absence de lésion hépatique, peut présenter des signes cliniques et/ou biologiques de déficience en certaines vitamines, en particulier en vitamine B₁ (thiamine), B₂ (riboflavine), B₆ (pyridoxal) et C (acide ascorbique) et en folates. La sévérité de ces déficiences est directement liée à la quantité d'alcool consommée et à la durée de l'imprégnation. En cas de cirrhose et d'autres pathologies hépatiques, les déficits en ces vitamines sont particulièrement fréquents. Les mécanismes mis en jeu sont multiples : diminution des apports alimentaires, perturbation de l'absorption intestinale, du stockage et du métabolisme de la vitamine. C'est ce dernier mécanisme qui explique une partie des troubles de la coagulation souvent

observés sur ce terrain par modification du métabolisme de la vitamine K. De plus, le sujet alcoolique a des besoins en micronutriments augmentés du fait du métabolisme propre de l'alcool et de la réparation des tissus lésés.

Tous les stades du catabolisme de l'alcool vont interférer avec le métabolisme des vitamines (Lieber, 2000 ; Saverot-Dauvergne *et al.*, 1998) :

- **Production et accumulation d'acétaldéhyde**

Au niveau hépatique, les 3 voies du catabolisme de l'alcool, alcool déshydrogénase dans le cytosol des hépatocytes, système d'oxydation microsomal de l'éthanol (SOME ou MEOS pour les anglo-saxons) au niveau du réticulum endoplasmique et catalase dans les peroxysomes vont conduire à la production d'acétaldéhyde. Cet aldéhyde est très réactif et peut se combiner avec les groupements NH₂ des protéines pour former des bases de Schiff avec pour conséquences des altérations des fonctions des microtubules, des protéines de liaison et de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme des vitamines.

- **Accumulation de NADH**

Ces phénomènes vont conduire à une baisse du potentiel redox et à une modification du métabolisme cellulaire.

- **Productions de radicaux libres**

Cet accroissement des espèces réactives de l'oxygène peut modifier le métabolisme de certaines vitamines : dégradation des folates, oxydation du rétinol, diminution du pool des antioxydants et du glutathion. Ces anomalies jouent un rôle dans l'agression des hépatocytes et interviennent directement en cas d'hépatite alcoolique. Le catabolisme de l'alcool a aussi lieu dans d'autres organes, tractus gastro-intestinal, cerveau et coeur, et conduit également à la production d'acétaldéhyde et de radicaux libres expliquant en partie d'autres pathologies liées à l'alcool.

Au niveau de l'intestin, l'absorption des vitamines va être perturbée du fait des effets toxiques directs de l'alcool : atrophie des villosités, lésions ultrastructurales cellulaires, modifications de la fluidité membranaire, altérations de la synthèse enzymatique et des systèmes de transport. Par exemple, la diminution d'activité d'une hydrolase de la bordure en brosse (glutamate carboxypeptidase ou GCPII) et du transporteur spécifique des folates réduits (*reduced folate carrier* ou RFC) explique, en partie, les perturbations de l'absorption des folates dont la carence peut, à son tour, entraîner une atrophie villositaire qui aggrave la malabsorption (Hasted *et al.*, 2002).

De plus, les atteintes pancréatiques et hépatiques vont conduire à des perturbations digestives qui débouchent sur des malabsorptions diverses. Les manifestations les plus évidentes concernent d'une part, la sécrétion des bicarbonates et de certaines enzymes, et d'autre part, l'excrétion des sels biliaires dont la réduction perturbe la dispersion micellaire des graisses alimentaires. Dans ce cas de figure, c'est l'absorption des lipides et des vitamines liposolubles en particulier qui va être modifiée.

Nous avons résumé dans le **tableau 1**, les différentes situations physiopathologiques affectant le statut vitaminique en cas de consommation excessive d'alcool et d'alcoolisme chronique (Anonyme, 2001 ; Guiland et Lequeu, 1992 ; Lieber, 2000 ; Saverot-Dauvergne *et al.*, 1998).

Tableau 1 : Consommation excessive d'alcool, alcoolisme et statut vitaminique

<p>Vitamine B₁ (Bonjour, 1980c ; Day <i>et al.</i>, 2004 ; Thomson, 2000)</p>	<p>Déficit fréquent en thiamine</p> <p>Diagnostic biologique</p> <ul style="list-style-type: none"> • Baisse des esters phosphoriques de la thiamine intra-érythrocytaire. • Activité transcétolase érythrocytaire basse. • Coefficient d'activation de la transcétolase érythrocytaire augmenté. <p>Mécanisme d'action</p> <ul style="list-style-type: none"> • Apports alimentaires insuffisants. • Diminution de l'absorption dans le tractus gastro-intestinal, souvent secondaire au déficit en folates. • Réserve hépatique altérée. • Utilisation cellulaire modifiée par le métabolisme de l'éthanol. • Baisse des esters thiamine diphosphate (TDP) et triphosphate (TTP) au niveau cérébral. • La thiamine est un cofacteur de 3 enzymes impliquées dans 2 voies métaboliques des glucides, de ce fait la plupart des métabolismes biochimiques impliquant des glucides vont être perturbés (assemblage des protéines et de l'ADN, médiateurs du cerveau etc.). <p>Conséquences physiopathologiques : pathologies neurologiques</p> <ul style="list-style-type: none"> • Syndrome de Gayet-Wernicke, psychose de Korsakoff. • Le syndrome Gayet-Wernicke disparaît après l'administration parentérale précoce de fortes doses de thiamine. • Dans les autres atteintes du système nerveux central ou périphérique, la toxicité directe de l'alcool et les carences en vitamines B₆, PP et folates doivent être recherchées. <p>Conséquences physiopathologiques : cardiomyopathies carentielles en vitamine B₁</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fréquence rare, doivent être différenciées des cardiomyopathies dues à l'effet toxique propre de l'alcool. • Signes cliniques des atteintes cardiaques du béribéri. • L'administration de thiamine permet une régression des symptômes.
<p>Vitamine B₂ (Bonjour, 1980d ; Rosenthal <i>et al.</i>, 1973)</p>	<p>Déficit fréquent en riboflavine</p> <p>Diagnostic biologique</p> <ul style="list-style-type: none"> • Excrétion urinaire et concentration sanguine de riboflavine basse. • Coefficient alpha-EGR plus élevé que chez le non buveur. <p>Mécanisme d'action</p> <ul style="list-style-type: none"> • Apports alimentaires insuffisants. • Pas d'effet démontré sur l'absorption intestinale et le métabolisme propre de la vitamine. <p>Conséquences physiopathologiques : pas de pathologie spécifique</p> <ul style="list-style-type: none"> • Associations à des déficiences vitaminiques multiples. • Symptomatologie non spécifique comportant notamment des anomalies de la peau et des muqueuses.

<p>Vitamine B₆ (Bonjour, 1980b ; Halsted et Heise, 1987)</p>	<p>Déficit fréquent en vitamine B₆ en particulier si insuffisance hépatique</p> <p>Diagnostic biologique</p> <ul style="list-style-type: none"> • Chute du pyridoxal-5'-phosphate (PLP) plasmatique. • Augmentation de l'excrétion urinaire d'acide xanthurénique lors d'une épreuve de charge en tryptophane. <p>Mécanisme d'action</p> <ul style="list-style-type: none"> • Apports alimentaires insuffisants en vitamine B₆. • Troubles de l'absorption intestinale. • Formation d'adduit d'acétaldéhyde avec les protéines de liaison : diminution d'affinité pour le PLP, déphosphorylation par la PAL et oxydation en acide 4-pyridoxique. <p>Conséquences physiopathologiques : désordres hématologiques</p> <ul style="list-style-type: none"> • Synthèse de l'hème diminuée : la vitamine B₆ est le cofacteur de l'acide δ-amino-lévulinique synthétase. • Anémie microcytaire hypochrome avec surcharge en fer. • Troubles souvent associés à une déficience en folates. • Effet bénéfique d'un traitement par la pyridoxine ou le PLP.
<p>Folates (Bonjour, 1980a ; Colman et Herbert, 1980 ; Gloria <i>et al.</i>, 1997)</p>	<p>Carence en folates fréquente</p> <p>Diagnostic biologique</p> <ul style="list-style-type: none"> • Baisse des folates sériques et érythrocytaires. • Diminution de l'incorporation de thymidine tritiée. <p>Mécanisme d'action</p> <ul style="list-style-type: none"> • Apports alimentaires insuffisants. • Diminution de l'absorption intestinale. • Défaut d'accumulation hépatique. • Augmentation de l'excrétion urinaire. <p>Conséquences physiopathologiques : altérations de l'hématopoïèse et du métabolisme des muqueuses</p> <ul style="list-style-type: none"> • Souvent plurifactorielles : toxicité propre de l'alcool et carences en autres vitamines. • Anémie macrocytaire arégénérative avec mégaloblastose médullaire. • Diminution des polynucléaires neutrophiles avec hypersegmentation. • Thrombocytopénie. • Vacuolisation des érythroblastes et de la lignée granuleuse (plutôt due à la toxicité propre de l'alcool). • Altérations des muqueuses digestives et génitales.
<p>Vitamine B₁₂ (Bonjour, 1980a ; Lambert <i>et al.</i>, 1997)</p>	<p>Cas de carence en vitamine B₁₂ relativement rares</p> <p>Diagnostic biologique</p> <ul style="list-style-type: none"> • Les concentrations de vitamine B₁₂ sont le plus généralement élevées. <p>Mécanisme d'action</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diminution des capacités de stockage hépatique (défaut d'internalisation). • L'augmentation de la vitamine B₁₂ dans le plasma serait un signe de cytolysse hépatique (mauvais indicateur de statut chez le cirrhotique).

<p>Vitamine C (Bonjour, 1979 ; Gruchow <i>et al.</i>, 1985 ; Lecomte <i>et al.</i>, 1994b)</p>	<p>Statut en vitamine C généralement déficient</p> <p>Diagnostic biologique</p> <ul style="list-style-type: none"> • Les concentrations d'acide ascorbique, dans le plasma, les leucocytes et l'urine, sont diminuées. <p>Mécanisme d'action</p> <ul style="list-style-type: none"> • Apports alimentaires insuffisants. <p>Conséquences physiopathologiques</p> <ul style="list-style-type: none"> • Absence de scorbut au sens classique. • Fréquence de tableaux cliniques incomplets : lésions parodontales et fragilité capillaire, hypervascularisation conjonctivale reliées aux ascorbinémies particulièrement basses.
<p>Acide pantothénique (Bonjour, 1980d)</p>	<p>Concentrations sanguines basses Ce phénomène est dépendant de la sévérité des lésions hépatiques.</p>
<p>Biotine (Bonjour, 1980d)</p>	<p>Concentrations sanguines basses Expliquées par les altérations des capacités d'absorption intestinale.</p>
<p>Niacine (Bonjour, 1980d)</p>	<p>Concentrations sanguines basses La niacine serait transformée au niveau hépatique en NAD qui est le coenzyme de l'alcool déshydrogénase et de l'aldéhyde déshydrogénase.</p>
<p>Vitamine A (Bonjour, 1981a ; Lecomte <i>et al.</i>, 1994a ; Lieber, 2003)</p>	<p>Diminution du stock de rétinol hépatique</p> <p>Diagnostic biologique</p> <ul style="list-style-type: none"> • Réserves hépatiques de vitamine A effondrées. • Les concentrations de rétinol, RBP et préalbumine ne sont pas obligatoirement diminuées. Augmentation paradoxale du rétinol circulant en cas de cytolysé hépatique. <p>Mécanisme d'action</p> <ul style="list-style-type: none"> • Apports alimentaires abaissés. • Défaut d'absorption des lipides et des vitamines liposolubles. • Redistribution du rétinol hépatique vers d'autres organes. • Oxydation en acide rétinoïque par les enzymes à cytochrome P450 du système SOME des microsomes hépatiques (stimulation par l'éthanol). • Blocage de la conversion du β-carotène en rétinol. • Défaut d'internalisation du rétinol dans les hépatocytes. <p>Conséquences physiopathologiques : fibrose hépatique et autres symptômes de la carence en vitamine A (altération de la vision crépusculaire)</p> <ul style="list-style-type: none"> • La déficience en zinc peut potentialiser les effets de la carence en rétinol. • La supplémentation excessive par le rétinol peut conduire à une hépatotoxicité spécifique fibrosante potentialisée par l'alcool.
<p>β-carotène (Lecomte <i>et al.</i>, 1994a ; Lieber, 2003)</p>	<p>Baisse du β-carotène dans le plasma et le sérum</p> <ul style="list-style-type: none"> • Apports alimentaires plus faibles chez les buveurs. • Catabolisme probable induit par les phénomènes de stress oxydant. • Le β-carotène peut également interagir avec le métabolisme de l'alcool lors de la conversion en rétinol et aboutir également à une hépatotoxicité.

<p>Vitamine D (Bonjour, 1981b ; Gascon-Barre, 1985)</p>	<p>Statut en vitamine D perturbé</p> <p>Diagnostic biologique</p> <ul style="list-style-type: none"> • Concentrations de 25(OH)D diminuées dans le plasma. <p>Mécanisme d'action</p> <ul style="list-style-type: none"> • Apports alimentaires et durée d'ensoleillement insuffisants. • Défaut d'absorption des lipides et des vitamines liposolubles. • Défaut d'hydroxylation hépatique. <p>Conséquences physiopathologiques : pathologies osseuses</p> <ul style="list-style-type: none"> • Métabolisme phosphocalcique perturbé. • Minéralisation insuffisante et densité osseuse diminuée. • Susceptibilité aux fractures, ostéonécrose. • La supplémentation en vitamine D ne semble pas efficace vis-à-vis des signes d'ostéopénie qui est multifactorielle.
<p>Vitamine K (Bonjour, 1981b)</p>	<p>Carence possible en vitamine K</p> <p>Diagnostic biologique</p> <ul style="list-style-type: none"> • Perturbation du métabolisme de la prothrombine et des tests de coagulation (souvent altérés aussi par la thrombopénie). <p>Mécanismes d'action</p> <ul style="list-style-type: none"> • Défaut d'absorption des lipides et des vitamines liposolubles secondaire aux atteintes pancréatiques, biliaires et de la muqueuse intestinale. • Implication également de l'insuffisance hépatocellulaire qui perturbe le métabolisme. <p>Conséquences physiopathologiques : risque hémorragique élevé</p>
<p>Vitamine E (Bonjour, 1981b ; Lecomte <i>et al.</i>, 1994b ; Marotta <i>et al.</i>, 1994)</p>	<p>Carence possible en vitamine E</p> <p>Diagnostic biologique</p> <ul style="list-style-type: none"> • Concentrations en α-tocophérol abaissées dans le plasma ou le sérum. • Test d'hémolyse in vitro par le peroxyde d'hydrogène perturbé. <p>Mécanisme d'action</p> <ul style="list-style-type: none"> • Apports insuffisants. • Défaut d'absorption des lipides et des vitamines liposolubles secondaire aux atteintes pancréatiques, biliaires et de la muqueuse intestinale. • Altération de la synthèse des apolipoprotéines. • Déplétion hépatique par augmentation de l'oxydation. <p>Conséquences physiopathologiques : syndrome de Zieve</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hyperhémolyse et anémie hémolytique. • Une supplémentation en vitamine E permet la normalisation des taux d'α-tocophérol plasmatiques et des tests d'hémolyse in vitro. • Un statut déficient en vitamine E pourrait également favoriser la peroxydation lipidique et contribuer au développement de lésions hépatiques (sclérose et cirrhose) ou tissulaires comme le cancer primitif du foie qui dépend de nombreux autres facteurs.

TABAGISME ACTIF ET PASSIF

La fumée de tabac est une source non négligeable de stress oxydatif, un des mécanismes impliqués dans la physiopathologie des maladies chroniques cardiovasculaires, respiratoires, et des cancers. Parmi les systèmes de défense de l'organisme, les micronutriments antioxydants ont une place importante et de nombreuses études épidémiologiques ont évalué les relations entre l'exposition à la fumée de cigarette (active et passive) et le statut en vitamines antioxydantes : acide ascorbique, vitamine E et également les caroténoïdes. La dernière synthèse de la littérature publiée en 2002 (Alberg, 2002) est résumée dans le [Tableau 2](#). Comparativement aux non-fumeurs, non exposés à la fumée de cigarettes, les fumeurs actifs ont en moyenne des concentrations circulantes de vitamine C, α -carotène, β -carotène et cryptoxanthine plus basses (-25 % en moyenne). Chez les ex-fumeurs, les concentrations en ces micronutriments sont, en général, intermédiaires entre les non-fumeurs et les fumeurs. En ce qui concerne la vitamine E et les 3 caroténoïdes qui ne sont pas des provitamines A (lutéine/zéaxanthine et lycopène), les effets du tabagisme sont plus faibles et pas toujours démontrés.

Par ailleurs, la plupart des études montre que les fumeurs ont des apports en énergie, alcool et lipides totaux et saturés plus élevés que les non-fumeurs et, en revanche, des apports en fibres, vitamine C, vitamine E et β -carotène plus faibles (Dallongeville *et al.*, 1998 ; Marangon *et al.*, 1998). En général, les fumeurs consomment moins de fruits et légumes, lait et produits lactés que les non fumeurs. Malgré ce comportement alimentaire particulier vis-à-vis des aliments riches en micronutriments, la différence observée entre fumeurs et non-fumeurs pour les indicateurs du statut en vitamines antioxydantes semble due essentiellement à l'effet de la fumée de tabac car celui-ci est conservé après ajustement sur les apports alimentaires et les autres covariables de mode de vie. L'association observée pour le tabagisme actif est retrouvée également pour le tabagisme passif, démontrant ainsi que même des doses faibles de fumée de cigarettes peuvent interférer avec le statut vitaminique antioxydant.

Pour les autres vitamines, en ce qui concerne les indicateurs biologiques du statut, les différences observées entre fumeurs et non-fumeurs sont moins probantes (Benton *et al.*, 1997). Les concentrations plus basses en folates, vitamine B₆ et cobalamine sont, la plupart du temps, dues à une alimentation éloignée des recommandations et par conséquent à des apports moindres en vitamines et minéraux. C'est ce qui est également observé chez les non-fumeurs qui vivent avec des fumeurs (Trobs *et al.*, 2002).

AUTRES XÉNOBIOTIQUES

Nous ne disposons ici que de pistes de réflexion d'origine expérimentale animale. L'accumulation, au cours de la vie, des facteurs de risque favorise probablement les anomalies du métabolisme des vitamines. L'impact métabolique de ces produits est très varié, les durées d'exposition sont difficiles à mesurer, les pathologies éventuellement favorisées sont multifactorielles... ce qui explique la pauvreté de la littérature dans ce domaine. Les données disponibles sont hétérogènes et parfois paradoxales. A titre d'exemple, nous avons résumé quelques résultats portant principalement sur l'exposition au PCB (polychlorobiphényles).

Chez des rats traités pendant 50 jours avec, soit un mélange de PCB soit avec du DDT, les concentrations de thiamine sont abaissées dans la plasma ainsi que l'activité de la transcétolase érythrocytaire (Yagi *et al.*, 1979). L'exposition à un mélange de PCB chez la rate, 50 jours avant l'accouplement et jusqu'à la naissance des nouveaux-nés, conduit à une réduction des concentrations de 1-25(OH)₂ vitamine D dans le sérum des mères mais également des petits après le sevrage (Lilienthal *et al.*, 2000). L'administration orale de PCB chez le rat mâle, est associée à une baisse du pyridoxal phosphate hépatique, la forme biologiquement active de la vitamine B₆. Les concentrations de riboflavine dans le foie, le rein, le cerveau, le coeur et les testicules ne sont pas affectées, en revanche celle de l'acide ascorbique est significativement augmentée dans ces mêmes organes par activation de la biosynthèse au niveau de la transformation du galactose en acide D-glucuronique (Fujiwara et Kuriyama, 1977).

Il est difficile et aléatoire d'utiliser dans ce domaine des modèles animaux. Ainsi, par exemple les réactions du rat exposé vis-à-vis de l'acide ascorbique. Des xénobiotiques tels que les PCB, DDT, aminopyrine, chlorobutanol, BHT et BHA sont responsables d'augmentation de l'acide ascorbique dans le foie et l'urine de ces animaux. C'est probablement la stimulation des activités d'UDP-glucose déshydrogénase et d'UDP-glucuronyl transférase qui est responsable de ce phénomène (Horio *et al.*, 1983).

AU TOTAL

Il est relativement aisé de mettre en évidence les effets néfastes de l'exposition volontaire aux xénobiotiques comme l'alcool et le tabac. L'exposition aux xénobiotiques peut perturber le statut vitaminique et participer, par divers mécanismes, à certains des effets toxiques de ces produits.

Les effets néfastes ne sont mesurables qu'en cas d'exposition prolongée ou très importante de produits qui sont souvent associés et dont les marqueurs d'exposition sont plus ou moins valides.

Le tabagisme passif, qui représente une pollution environnementale importante dans certains cas, est responsable d'une morbidité importante mais difficile à apprécier rigoureusement. La responsabilité des anomalies micronutritionnelles dans ces pathologies est encore plus difficile à établir. Il en est sans doute de même pour d'autres produits toxiques qui n'agissent qu'à très long terme et dont il est impossible de surveiller l'impact par des enquêtes épidémiologiques classiques.

Tableau 2 : Consommation de tabac et statut vitaminique

<p>Vitamine B₆ (Giraud <i>et al.</i>, 1995 ; Vermaak <i>et al.</i>, 1990)</p>	<p>Tabagisme actif : ↓ de la teneur en pyridoxal 5'-phosphate (PLP) du plasma probablement due à une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline, pas d'effet sur les concentrations de pyridoxal, de pyridoxine, de pyridoxamine et d'acide 4-pyridoxique. Aucune modification du PLP et du pyridoxal (PL) intraérythrocytaire qui est un meilleur marqueur de statut.</p> <p>Ex-fumeurs : pas d'effet significatif sur les concentrations des vitamines de la vitamine B₆.</p>
<p>Vitamine C (Alberg, 2002 ; Marangon <i>et al.</i>, 1998)</p>	<p>Tabagisme actif : ↓ en moyenne de 27 % de la concentration d'acide ascorbique circulant comparativement aux non-fumeurs. La baisse est proportionnelle au nombre de cigarettes fumées et peut atteindre 47 %. Après ajustement sur les apports alimentaires en vitamine C la différence entre fumeurs et non-fumeurs reste significative.</p> <p>Ex-fumeurs : ↓ moyenne de 6 % de la concentration d'acide ascorbique dans le sérum ou le plasma, comparativement aux non-fumeurs.</p> <p>Tabagisme passif : ↓ en moyenne de 15 %.</p>
<p>Vitamine E (Alberg, 2002 ; Marangon <i>et al.</i>, 1998)</p>	<p>Tabagisme actif : ↓ faible de 1 % à 4 % en moyenne de la concentration de vitamine E totale ou d'α-tocophérol (-8 % pour le γ-tocophérol).</p> <p>Ex-fumeurs : ↓ de 3 % à 5 % (-16 % pour le γ-tocophérol).</p> <p>Tabagisme passif : Peu d'effets (souvent non significatifs) sur la vitamine E.</p>
<p>Caroténoïdes totaux α-carotène β-carotène Cryptoxanthine Lutéine et zéaxanthine Lycopène (Alberg, 2002 ; Marangon <i>et al.</i>, 1998)</p>	<p>Tabagisme actif : ↓ de 17 % en moyenne des caroténoïdes totaux circulants : -27 à -34 % pour l'α-carotène, le β-carotène et la cryptoxanthine, -14 % pour la lutéine et la zéaxanthine, -5 % pour le lycopène. L'effet est dépendant du nombre de cigarettes fumées et reste significatif après ajustement sur les apports alimentaires en caroténoïdes.</p> <p>Ex-fumeurs : ↓ plus faible de 6 % pour les caroténoïdes totaux : -22 % pour l'α-carotène et le β-carotène, -16 % pour la cryptoxanthine, -8 % pour le lycopène et -8 % pour le mélange lutéine/zéaxanthine.</p> <p>Tabagisme passif : ↓ en moyenne de 15 % pour l'α-carotène, le β-carotène et la cryptoxanthine, les effets sur le mélange lutéine/zéaxanthine, et le lycopène sont plus modestes.</p>
<p>Folates (Mannino <i>et al.</i>, 2003 ; Piyathilake <i>et al.</i>, 1994)</p>	<p>Tabagisme actif : ↓ de 17 % en moyenne des folates érythrocytaires après ajustement sur les apports alimentaires.</p> <p>Tabagisme passif : ↓ en moyenne de 10 % des folates érythrocytaires après ajustement sur les apports alimentaires .</p> <p>Ces données ne sont pas toujours confirmées.</p>
<p>Vitamine B₁₂ (Piyathilake <i>et al.</i>, 1994 ; Trobs <i>et al.</i>, 2002)</p>	<p>Tabagisme actif : peu d'effet sur la concentration de vitamine B₁₂ dans le plasma.</p>

Références bibliographiques

- Alberé A** (2002). The influence of cigarette smoking on circulating concentrations of antioxidant micronutrients. *Toxicology*, **180** : 121-137.
- Anonyme**. Consommation d'alcool et statut nutritionnel. In : Expertise collective INSERM (2001). *Alcool : Effets sur la santé*. Éditions INSERM, Paris, 251-266.
- Benton D, Haller J, Fordy J** (1997). The vitamin status of young British adults. *Int J Vitam Nutr Res*, **67** : 34-40.
- Bonjour JP** (1979). Vitamins and alcoholism. I. Ascorbic acid. *Int J Vitam Nutr Res*, **49** : 434-441.
- Bonjour JP** (1980a). Vitamins and alcoholism. II. Folate and vitamin B12. *Int J Vitam Nutr Res*, **50** : 96-121.
- Bonjour JP** (1980b). Vitamins and alcoholism. III. Vitamin B6. *Int J Vitam Nutr Res*, **50** : 215-230.
- Bonjour JP** (1980c). Vitamins and alcoholism. IV. Thiamin. *Int J Vitam Nutr Res*, **50** : 321-338.
- Bonjour JP** (1980d). Vitamins and alcoholism. V. Riboflavin, VI. Niacin, VII. Pantothenic acid, VIII. Biotin. *Int J Vitam Nutr Res*, **50** : 425-440.
- Bonjour JP** (1981a). Vitamins and alcoholism. IX. Vitamin A. *Int J Vitam Nutr Res*, **51** : 166-177.
- Bonjour JP** (1981b). Vitamins and alcoholism. X. Vitamin D, XI. Vitamin E, XII. Vitamin K. *Int J Vitam Nutr Res*, **51** : 307-318.
- Colditz GA, Giovannucci E, Rimm EB et al.** (1991). Alcohol intake in relation to diet and obesity in women and men. *Am J Clin Nutr*, **54** : 49-55.
- Colman N, Herbert V** (1980). Hematologic complications of alcoholism: Overview. *Semin Hematol*, **17** : 164-176.
- Dallongeville J, Marecaux N, Fruchart JC, Amouyel P** (1998). Cigarette smoking is associated with unhealthy patterns of nutrient intake: a meta-analysis. *J Nutr*, **128** : 1450-1457.
- Day E, Bentham P, Callaghan R, Kuruvilla T, George S** (2004). Thiamine for Wernicke-Korsakoff Syndrome in people at risk from alcohol abuse. *Cochrane Database Syst Rev*, **2004** : CD004033
- Fujiwara M, Kuriyama K** (1977). Effect of PCB (polychlorobiphenyls) on L-ascorbic acid, pyridoxal phosphate and riboflavin contents in various organs and on hepatic metabolism of L-ascorbic acid in the rat. *Jpn J Pharmacol*, **27** : 621-627.
- Gascon-Barre M** (1985). Influence of chronic ethanol consumption on the metabolism and action of vitamin D. *J Am Coll Nutr*, **4** : 565-574.
- Giraud DW, Martin HD, Driskell JA** (1995). Erythrocyte and plasma B-6 vitamin concentrations of long-term tobacco smokers, chewers, and nonusers. *Am J Clin Nutr*, **62** : 104-109.
- Gloria L, Cravo M, Camilo ME et al.** (1997). Nutritional deficiencies in chronic alcoholics: relation to dietary intake and alcohol consumption. *Am J Gastroenterol*, **92** : 485-489.
- Gruchow HW, Sobocinski KA, Barboriak JJ, Scheller JG** (1985). Alcohol consumption, nutrient intake and relative body weight among US adults. *Am J Clin Nutr*, **42** : 289-295.
- Guilland JC, Lequeu B**. Vitamines et environnement. In : Guilland JC, Lequeu B (1992). *Les vitamines : du nutriment au médicament*. Éditions Médicales Internationales, Paris, 248-267.
- Halsted CH, Heise C** (1987). Ethanol and vitamin metabolism. *Pharmacol Ther*, **34** : 453-464.

- Halsted CH, Villanueva JA, Devlin AM, Chandler CJ** (2002). Metabolic interactions of alcohol and folate. *J Nutr*, **132** : 2367S-2372S.
- Herbeth B, Didelot-Barthelemy L, Lemoine A, Le Devehat C** (1988). Dietary behavior of French men according to alcohol drinking pattern. *J Stud Alcohol*, **49** : 268-272.
- Horio F, Kimura M, Yoshida A** (1983). Effect of several xenobiotics on the activities of enzymes affecting ascorbic acid synthesis in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* (Tokyo), **29** : 233-247.
- Lambert D, Benhayoun S, Adjalla C et al.** (1997). Alcoholic cirrhosis and cobalamin metabolism. *Digestion*, **58** ; 64-71.
- Lecomte E, Grolier P, Herbeth B et al.** (1994a). The relation of alcohol consumption to serum carotenoid and retinol levels. Effects of withdrawal. *Int J Vitam Nutr Res*, **64** : 170-175.
- Lecomte E, Herbeth B, Pirolet P et al.** (1994b). Effect of alcohol consumption on blood antioxidant nutrients and oxidative stress indicators. *Am J Clin Nutr*, **60** : 255-261.
- Lieber CS** (2000). Alcohol: Its metabolism and interaction with nutrients. *Annu Rev Nutr*, **20** : 395-430.
- Lieber CS** (2003). Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. *Alcohol Res Health*, **27** : 220-231.
- Lilienthal H, Fastabend A, Hany J et al.** (2000). Reduced levels of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) in rat dams and offspring after exposure to a reconstituted PCB mixture. *Toxicol Sci*, **57** : 292-301.
- Mannino DM, Mulinare J, Ford ES, Schwartz J** (2003). Tobacco smoke exposure and decreased serum and red blood cell folate levels: Data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Nicotine Tob Res*, **5** : 357-362.
- Marangon K, Herbeth B, Lecomte E et al.** (1998). Diet, antioxidant status, and smoking habits in French men. *Am J Clin Nutr*, **67** : 231-239.
- Marotta F, Labadarios D, Frazer L, Girdwood A, Marks IN** (1994). Fat-soluble vitamin concentration in chronic alcohol-induced pancreatitis. Relationship with steatorrhea. *Dig Dis Sci*, **39** : 993-998.
- Piyathilake CJ, Macaluso M, Hine RJ, Richards EW, Krumdieck CL** (1994). Local and systemic effects of cigarette smoking on folate and vitamin B-12. *Am J Clin Nutr*, **60** : 559-566.
- Rosenthal WS, Adham NF, Lopez R, Cooperman JM** (1973). Riboflavin deficiency in complicated chronic alcoholism. *Am J Clin Nutr*, **26** : 858-860.
- Saverot-Dauvergne A, Cusson C, Gousson T.** Vitamines et alcool. In : Le Moël G, Saverot-Dauvergne A, Gousson T, Guéant JL (1998). *Le statut vitaminique : physiologie, exploration biologique et intérêt clinique*. Éditions Médicales Internationales, Paris, 411-424.
- Thomson AD** (2000). Mechanisms of vitamin deficiency in chronic alcohol misusers and the development of the Wernicke-Korsakoff syndrome. *Alcohol Alcohol*, **35 Suppl 1** : 2-7.
- Trobs M, Renner T, Scherer G et al.** (2002). Nutrition, antioxidants, and risk factor profile of nonsmokers, passive smokers and smokers of the Prevention Education Program (PEP) in Nuremberg, Germany. *Prev Med*, **34** : 600-607.
- Vermaak WJ, Ubbink JB, Barnard HC et al.** (1990). Vitamin B-6 nutrition status and cigarette smoking. *Am J Clin Nutr*, **51** : 1058-1061.
- Yagi N, Kamohara K, Itokawa Y** (1979). Thiamine deficiency induced by polychlorinated biphenyls (PCB) and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) administration to rats. *J Environ Pathol Toxicol*, **2** : 1119-1125.

Interférences des traitements médicamenteux au long court sur le statut vitaminique

Alain Jardel, Alain Lemoine

La demande de dosage d'une vitamine ou d'un de ses métabolites est généralement faite dans une hypothèse de carence, beaucoup plus rarement dans le cas d'une suspicion de prise abusive. Seulement dans le cas des vitamines A (liste I) et D (liste II), dont la délivrance nécessite une prescription médicale, la prise excessive d'une vitamine peut être à l'origine d'une toxicité pouvant avoir des conséquences graves pour la santé.

Un résultat dans la limite des valeurs de référence n'entraîne en général que peu de commentaires. Devant un résultat en dehors et en dessous des valeurs cibles, le biologiste ne doit pas ignorer, au delà des causes pathologiques signalées dans la monographie de chaque vitamine, l'interférence possible de certains traitements chroniques ou au long court, comme les médicaments antituberculeux, anti-convulsivants, anti-mitotique ou encore chez les patients sous dialyse.

Dans ce chapitre, nous ne traiterons pas des interférences analytiques qui peuvent modifier le résultat des dosages.

Schématiquement plusieurs types d'interférences dans le métabolisme d'une vitamine peuvent être envisagés :

- soit le médicament modifie l'absorption digestive, par dilution, chélation, compétition ou blocage des systèmes de passage actifs trans-membranaires, modification du transit intestinal, action sur les sels biliaires qui vont modifier l'absorption des vitamines liposolubles notamment.
- soit le traitement modifie la synthèse de la vitamine en détruisant par exemple la flore intestinale (par les antibiotiques pour les vitamines K ou B par exemple) ou la libération gastrique du facteur intrinsèque protecteur de la vitamine B₁₂ ou encore en créant un déficit en protéine transporteurs (DBP, RBP).
- soit le médicament bloque l'action de la vitamine (anti-vitamines K ou anti-foliques de différentes classes par exemple).
- soit le médicament accélère ou modifie le métabolisme ou la consommation de la vitamine (inducteurs enzymatiques et vitamine D).

L'alcoolisme, le tabagisme, les régimes alimentaires stricts ou monotones sont également des causes de déficit en certaines vitamines.

Le **tableau 1** à double entrée (soit par vitamine, soit par médicament par ordre alphabétique) présente les principales interférences citées dans la littérature (diminution du statut vitaminique, voire création de véritables états de carence) (Jardel et Pradeau, 1998 ; Lemoine *et al.*, 1989 ; Lemoine, 1998). L'essentiel des résultats est issu d'observations sur l'homme, cependant quelques uns proviennent de travaux sur l'animal ou parfois d'hypothèses vraisemblables mais non réellement prouvées chez l'humain.

Références bibliographiques

Jardel A, Pradeau D. Vitamines et interactions médicamenteuses. *In* : Le Moël G, Saverot-Dauvergne A, Gousson T, Guéant JL (1998). *Le statut vitaminique. Physiopathologie, exploration biologique et intérêt clinique*. EMI, Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 507-516.

Lemoine A, Le Devehat C, Vimeux M, Bermond P (1989). Interrelations médicaments - vitamines. *In* : *Encycl Med Chir - Thérapeutique*. Elsevier, Paris, 25152 L 10.

Lemoine A (1998). Vitamines dans la pratique clinique de tous les jours. *In* : *Encycl Med Chir - Thérapeutique*. Elsevier, Paris, 3-0890.

Tableau 1 : Interférences des traitements médicamenteux à long terme sur les résultats du dosage des vitamines :
 (↘) diminution probable, ↘ diminution faible, ↘↘ diminution modérée, ↘↘↘ état de carence possible

VITAMINES	A	B ₁	B ₂	B ₃	B ₆
Médicaments ou classes pharmacologiques	Rétinol	Thiamine	Riboflavine	PP, Nicotinamide	Pyridoxine
Anti-acides	↘	↘			
Anti H2					
Anti vit K /coumarine					
Anticonvulsivants*					
Amitriptyline			↘		
Chloramphénicol					
Cholestyramine (chélateurs)	↘			↘	
Colchicine					
Contraceptifs oraux					↘
Corticoides					
Huile de paraffine	↘				
Hydralazine					↘
Isoniazide				↘	↘
Kanamycine					
Metformine					
Méthotrexate					
Monoxyde d'azote					
Néomycine	↘				
Œstrogène					
Para aminosalicylate					
Penicillamine					↘
Phénothiazine			↘		
Phénylbutazone					
Polymyxine					
Pyriméthamine (antimalarien)					
Salicylates					
Sulfasalazine (antiinflammatoire)					
Sulfonamides					
Tetracycline					
Triamterène (diurétique)					
Trifluoropérazine					
Triméthoprime (Antibactérien)					
5FU		↘			
Mercaptopurine/Thioguanine/Azathioprine					
Divers					
Alcool		↘↘	↘	↘	↘↘
Tabac	↘				
Végétalisme					
Dialyse		↘	↘	↘	↘
Régime hypocalorique	↘	↘	↘	↘	↘

*(phénobarbital, diphénylhydantoïne)

B ₈	B ₉	B ₁₂	C	D	E	K
Biotine	Acide folique	Cobalamine	Acide ascorbique	Cholécalciférol Ergo-calciférol	Alpha-Tocophérol	Phyto-ménadione
		↘				
						↘↘
	↘↘			↘↘↘		
						↘
	↘	↘		↘	↘	↘
		↘				
	↘↘	↘↘	↘↘			
			↘			
				↘	↘	↘
	↘			↘		
		↘				
	(↘)	↘				
	↘↘↘	↘↘				
	↘	↘				
		↘		↘		
	↘					↘
		↘↘	↘↘			
	(↘)					
						↘
	↘↘					
		↘↘	↘↘			
	↘↘					
						↘
			↘			↘↘
	↘↘					
		↘				
	↘					
	↘					
	↘↘	↘		↘		↘↘
			↘		↘	
↘		↘	↘	↘		
↘	↘	↘	↘	↘		
↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘

Vitamines et dermatologie

Stéphanie Limbach, Jean-Claude Guillard, Sophie Dalac

Les manifestations cutanées survenant au cours des maladies nutritionnelles sont la traduction au niveau de la peau d'un dysfonctionnement cellulaire suscité par la diminution ou l'absence d'un nutriment. Les principales cellules touchées sont les kératinocytes, qui présentent des anomalies de leur prolifération et de leur différenciation au sein de l'épiderme. Les mélanocytes et les cellules de Langerhans peuvent également être touchés. Les principaux éléments nutritionnels dont la carence est associée à des lésions cutanées sont les acides gras, les vitamines et les oligoéléments (Dreno, 1999).

De nombreux travaux ont permis de préciser le rôle des vitamines en dermatologie, et notamment celui des vitamines A et D dans le traitement de certaines pathologies affectant la peau.

RAPPEL SUR LA MORPHOLOGIE DE LA PEAU HUMAINE

La peau est composée de 3 couches qui sont, de la superficie à la profondeur, l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Elles sont traversées par les annexes pilosébacées. Les deux composants majeurs de la peau de l'homme sont l'épiderme et le derme (figures 1 et 2). Les cellules principales, qui composent l'épiderme, sont les kératinocytes. Ces derniers, dans la couche basale de l'épiderme, subissent une division cellulaire, migrent en montant à travers les couches suprabasales et subissent une différenciation finale pour former la barrière protectrice. L'épiderme est divisé en 4 couches qui sont de la profondeur (naissance du kératinocyte) à la superficie (différenciation terminale du kératinocyte) :

- Couche basale : renouvellement, régénération.
- Couche épineuse (corps muqueux de Malpighi) : maturation.
- Couche granuleuse : grains de kératohyaline impliqués dans l'agrégation des filaments de kératine.
- Couche cornée : protection.

Les mélanocytes, localisés dans la couche basale, synthétisent la mélanine, pigment qui donne à la peau sa couleur et la protège des UV. L'épiderme est séparé du derme par la jonction dermo-épidermique, zone de la membrane basale d'amarrage des cellules basales composée essentiellement de collagène de types IV et VII, de laminine, d'entactine, de fibronectine et de

protéoglycane. Elle forme une barrière entre un épithélium et un tissu conjonctif ; c'est un lieu d'échanges nutritifs important (figure 3). Le derme est une matrice extracellulaire, constituée de collagène de types I et III et d'élastine, synthétisé par les fibroblastes (Fisher et Voorhees, 1996).

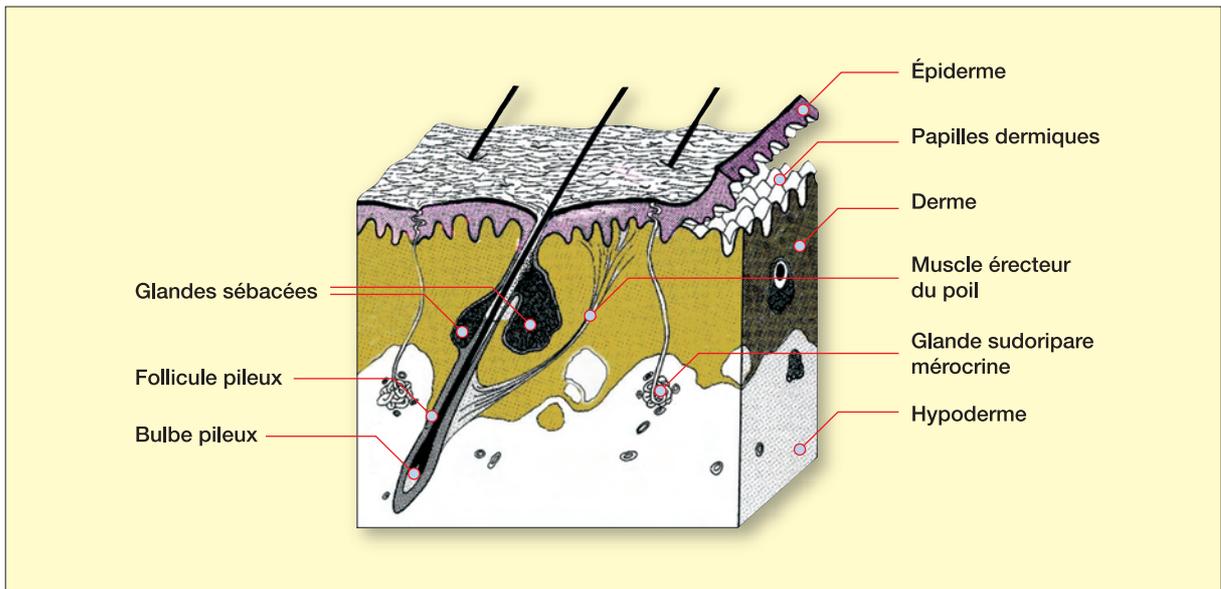


Figure 1 : Structure de la peau (schéma).

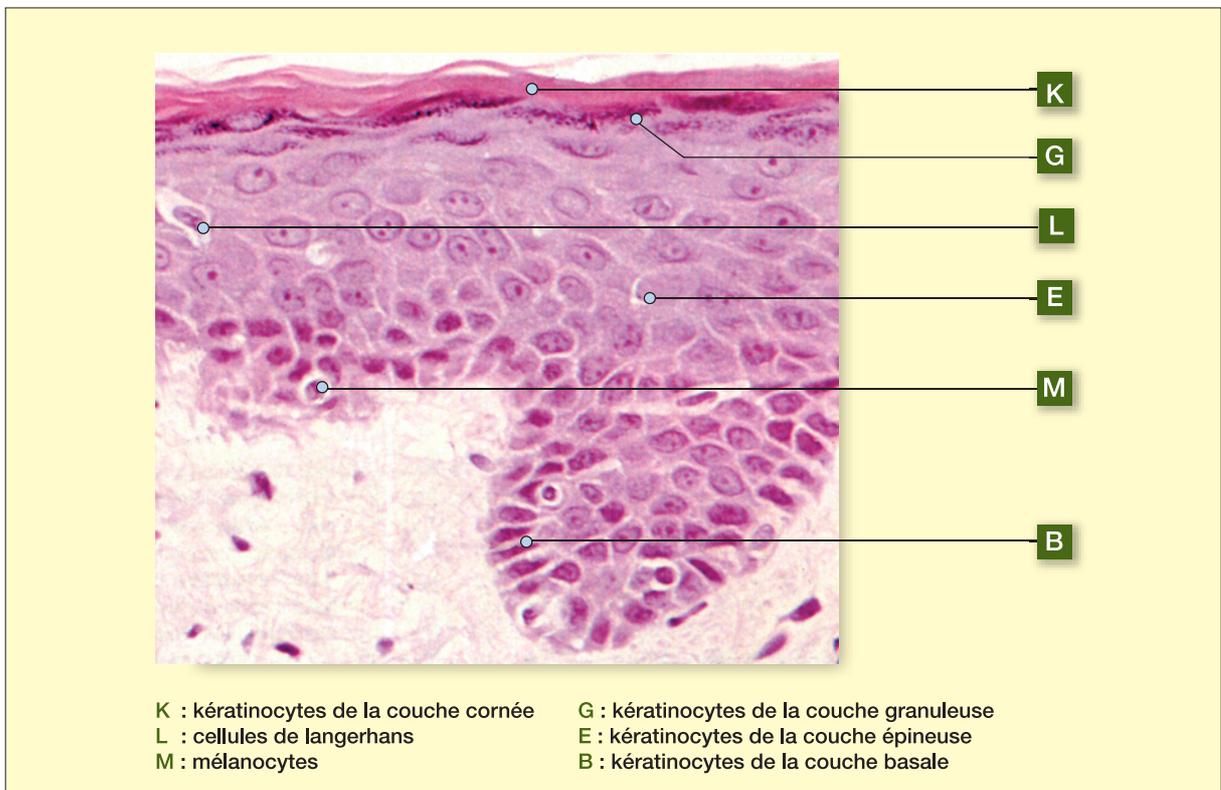


Figure 2 : Couches et cellules de l'épiderme.

LA VITAMINE D ET SES DÉRIVÉS

Découverte et isolée dans l'huile de foie de morue, la vitamine D, a été considérée, durant de nombreuses années, comme étant le principal facteur de l'absorption intestinale du calcium, de la minéralisation osseuse et de la prévention du rachitisme. Cependant, depuis les années 1970, les effets thérapeutiques de la vitamine D et de ses dérivés hydroxylés dans diverses dermatoses telles que le psoriasis, la sclérodermie, l'eczéma, l'acné ou le lupus tuberculeux, ont été démontrés. L'effet antiprolifératif et prodifférenciant des dérivés plus actifs, hydroxylés, fut rapidement mis en évidence, conduisant à des essais thérapeutiques dans les cas de leucémies et lymphomes. L'administration de ces composés étant délicate du fait de l'hypercalcémie induite, la recherche s'est orientée vers la synthèse de nouveaux dérivés moins hypercalcémiants (Guilhou, 2003).

Métabolisme et mécanisme d'action

La peau est l'organe de synthèse du cholécalférol (vitamine D₃), mais il existe également au niveau cutané une synthèse en faible quantité de 1-25(OH)₂ D₃, la forme active de la vitamine D (Amalric, 1993). La vitamine D endogène (synthèse cutanée) et exogène subit une première hydroxylation dans le foie conduisant à la 25-hydroxyvitamine D₃ [25(OH)D₃]. Une seconde hydroxylation a lieu dans le rein et conduit à la formation de 1-25 dihydroxyvitamine D₃ [1-25(OH)₂ D₃], ou calcitriol, le métabolite actif de la vitamine D. D'autres hydroxylations sont possibles, conduisant à d'autres

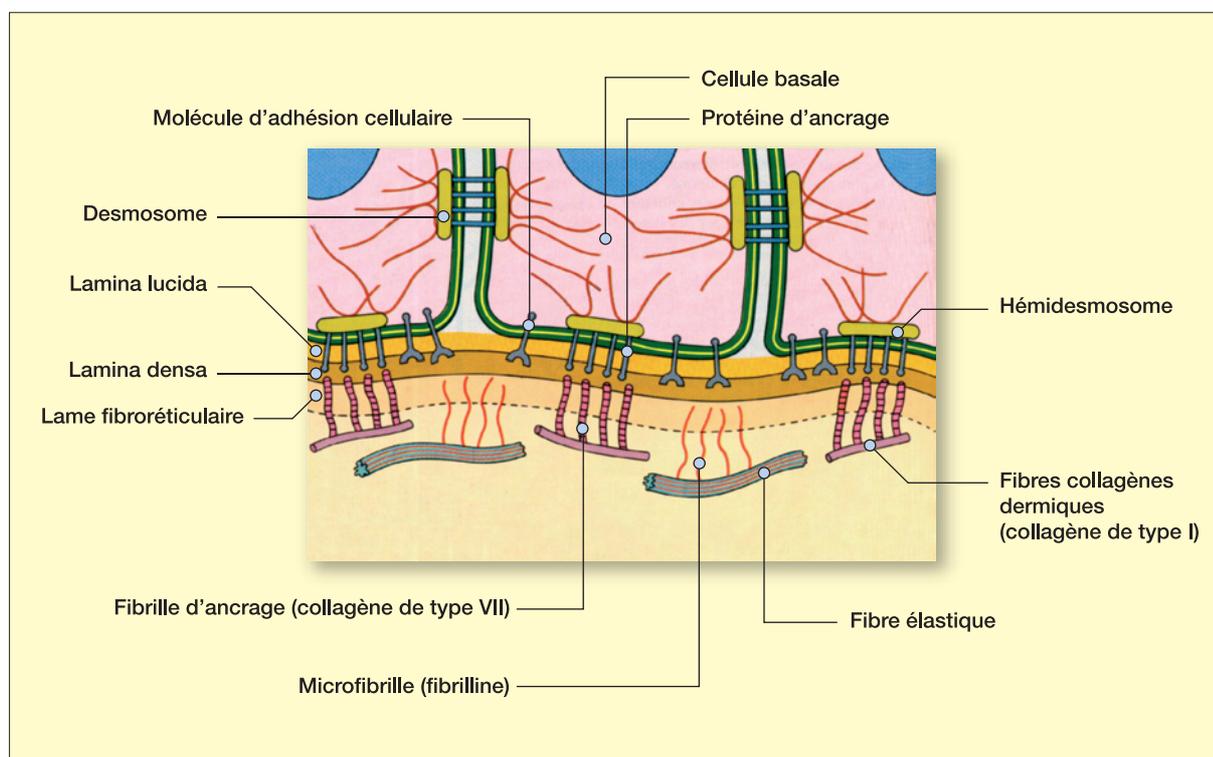


Figure 3 : Jonction dermo-épidermique (ME).

dérivés hydroxylés. Récemment, il a été démontré que les kératinocytes normaux sont capables de synthétiser la $25(\text{OH})\text{D}_3$ et la $1-25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sous irradiation par les UVB. La présence de 1-alpha hydroxylase, l'enzyme qui conduit à la formation de $1-25(\text{OH})_2\text{D}_3$, a été mise en évidence au niveau des kératinocytes basaux et des follicules pileux. Ces observations pourraient expliquer l'action bénéfique de la photothérapie dans certaines dermatoses par la synthèse induite de $1-25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Guilhou, 2003).

Le mécanisme d'action, le plus important, est nucléaire et met en jeu des récepteurs spécifiques, les VDR. Cependant, la vitamine D a aussi une action membranaire et cytoplasmique directe, indépendante de son action sur les gènes, dépendant de sa capacité à augmenter les taux de calcium intracellulaire (Paulin, 2001).

Effets biologiques

Un grand nombre de types cellulaires possèdent des récepteurs pour le calcitriol, en particulier les kératinocytes et les lymphocytes et il est maintenant établi que la vitamine D, en plus de ces effets bien connus sur le métabolisme phosphocalcique, est un important régulateur de la prolifération et de la différenciation cellulaires ainsi que des réponses immunitaires. En outre, elle modifie l'activité des fibroblastes entraînant une augmentation de l'activité collagénase (rôle possible dans la sclérodémie) et l'induction de l'expression de TGF bêta qui a des propriétés antiprolifératives. Une inhibition de la migration des cellules endothéliales a également été décrite.

La vitamine D inhibe la prolifération et induit la différenciation des kératinocytes normaux et tumoraux en culture, mais peut également induire une hyperplasie épidermique dans certaines conditions expérimentales. Son rôle paraît plus important dans la différenciation avec une augmentation du taux de cellules souches qui se différencient, une induction d'involucrine et de transglutaminase et une formation de l'enveloppe cornée. C'est aussi un inducteur d'apoptose, processus important dans la maturation et le renouvellement des kératinocytes.

La vitamine D a également d'importantes fonctions immuno-modulatrices et agit à des niveaux variés de la réponse immunitaire. Elle réduit la fonction présentatrice des cellules de Langerhans et la production de cytokines par les monocytes et les macrophages, en particulier la production de l'interleukine 1, de l'interleukine 6 et du $\text{TNF}\alpha$. Elle inhibe la prolifération des lymphocytes T et la libération d'interleukine 2 et d'interféron γ par ces cellules. Par ailleurs, elle régule la production de cytokines par les kératinocytes. Au final, la vitamine D a un effet immunosuppresseur pouvant expliquer son activité, non seulement dans le psoriasis, mais dans d'autres affections à composante immunitaire (Guilhou, 2003).

Vitamine D et psoriasis

Le psoriasis est défini comme une dermatose érythématosquameuse d'évolution chronique (Paulin, 2001). Il est établi depuis plusieurs décennies que la lésion psoriasique comporte une hyperprolifération des kératinocytes associée à des anomalies de leur différenciation mises en évidence par l'expression anormale de kératines, ainsi que de nombreux marqueurs de différenciation comme la filaggrine, l'involucrine et les transglutaminases. Il a été démontré que ces phénomènes épidermiques sont sous la dépendance de facteurs immunitaires complexes impliquant les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺. La vitamine D peut agir sur ces différents mécanismes. Elle agit sur la prolifération et la différenciation des kératinocytes, les phénomènes immunitaires cutanés et généraux et l'expression des gènes impliqués dans cette maladie.

Le psoriasis représente la seule indication dermatologique bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché pour l'utilisation de la vitamine D par voie locale. Du fait des effets secondaires potentiels de la voie orale, en particulier les risques d'hypercalcémie, il a été nécessaire de se tourner vers la synthèse d'analogues ayant une action moins importante sur le métabolisme phosphocalcique. Le calcipotriol (Daivonex[®]) et le tacalcitol (Apsor[®]), ou 1-24 dihydroxyvitamine D₃, entraînent une nette régression des lésions chez plus de la moitié des malades et peuvent être associés avec bénéfice à la corticothérapie locale, à la photothérapie et aux traitements systémiques du psoriasis (Delaure, 1993 ; Guilhou, 2003 ; Schmidt, 1993). Les phénomènes irritatifs secondaires en limitent l'utilisation dans 10 à 20 % des cas (Amalric, 1993). Au cours des divers essais thérapeutiques menés à ce jour avec le calcipotriol pommade en monothérapie, il a été noté que la réduction du *psoriasis area severity index* (PASI) variait entre 54,5 et 68,8 % (Guilhou, 2003). D'autres dérivés, comme le maxacalcitol (1-alpha 25 dihydroxy-22 oxacalcitriol), ou l'hexafluoro-vitamine D, qui ont une action plus importante sur la prolifération, sont actuellement à l'étude. La vitamine D pourrait également être utile dans le traitement d'autres troubles de la kératinisation, dans certaines affections cutanées à composante immunitaire (sclérodémie), et dans la prévention ou le traitement des cancers cutanés du fait de ses propriétés antinéoplasiques liées à sa capacité à inhiber la prolifération et à induire une différenciation normale.

LA VITAMINE A

La peau est connue pour être un organe cible de la vitamine A. Dans les années 30, il a été montré que certains signes cutanéomuqueux étaient liés à une carence ou à un surdosage en rétinol. Des analogies sont reconnues entre les signes cutanés de la carence en vitamine A et ceux des maladies cutanées héréditaires ou acquises. La carence en vitamine A s'exprime dans le tissu cutané par une xérose, une hyperkératose (prolifération de la couche cornée de l'épiderme) et une métaplasie squameuse des muqueuses buccales et nasales avec perte du goût et de l'odorat. Les lésions cutanées sont à type de kératose folliculaire. Cette symptomatologie traduit le rôle essentiel de la vitamine A dans la prolifération et la différenciation kératinocytaire (Dreno, 1999). La découverte des rétinoïdes a constitué un progrès majeur dans la prise en charge thérapeutique de

dermatoses telles que l'acné sévère, le psoriasis, les troubles de la kératinisation (ichtyoses) et les états précarcinomateux. Outre le rôle majeur du rétinol dans la vision, de nombreux travaux ont depuis démontré le rôle déterminant de la vitamine A et de ces dérivés dans les phénomènes de différenciation tissulaire, notamment au moment de l'embryogenèse (Berbis, 2001).

Métabolisme et mécanisme d'action des rétinoïdes

Les rétinoïdes naturels comprennent la vitamine A naturelle, ou rétinol (ROL), et ses métabolites, le rétinaldéhyde (RAL), l'acide rétinoïque tout-*trans* (ARTT) et l'acide 9-*cis*-rétinoïque.

Les cellules cibles des rétinoïdes sont les kératinocytes situés dans l'épiderme. Les rétinylesters et les caroténoïdes ingérés sont réduits en ROL. Le ROL se lie à une protéine de transport plasmatique, la RBP (*retinol binding protein*), synthétisée par le foie. Le complexe ROL-RBP circulant se fixe à des récepteurs membranaires spécifiques présents à la surface des cellules cibles et le ROL libre pénètre à l'intérieur de la cellule. Il se lie alors à un récepteur cytosolique, le CRBP (*cellular retinol binding protein*), ou le CRABP (*cellular retinoic acid binding protein*) et est transporté jusqu'au noyau où s'exerce son action biologique, après liaison avec des récepteurs nucléaires, les RAR (*retinoic acid receptors*) et les RXR (*retinoid X receptors*) (Berbis, 2001 ; Fisher et Voorhees, 1996).

Effets biologiques des rétinoïdes de synthèse

Action sur l'épiderme

En ce qui concerne l'épiderme normal, la différenciation épidermique apparaît significativement modulée par les rétinoïdes de synthèse. Cette modulation est en grande partie responsable des effets secondaires cutanéomuqueux observés en peau saine sous traitement par les rétinoïdes de synthèse.

Sous rétinoïdes, la synthèse de kératines de type I, caractéristique des épithéliums kératinisants, est réduite au profit de celle de kératines de poids moléculaire plus faible, caractéristique des épithéliums de type sécrétoire. Les rétinoïdes inhibent l'expression des transglutaminases et réduisent la synthèse des protéines de l'enveloppe (filaggrine, involucrine). L'acide rétinoïque inhibe l'expression des protéines constitutives du desmosome, fragilisant la cohésion kératinocytaire. Au plan structural, les modifications moléculaires et cellulaires fragilisent l'épiderme et sont responsables d'une sécheresse cutanée, ainsi que d'un état desquamatif plus ou moins important.

Au niveau des épidermes pathologiques, les rétinoïdes exercent une action pharmacologique complexe, qui aboutit à une modulation favorisant la différenciation et réduisant la multiplication cellulaire d'épidermes hyperprolifératifs (psoriasis, ichtyoses).

Action sur le derme

Les rétinoïdes stimulent la synthèse du TGF β , qui stimule la synthèse du collagène et de la fibronectine par les fibroblastes. *In vitro* cependant, l'action directe de l'acide rétinoïque est freinatrice sur la synthèse de collagène. Les rétinoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires complexes, avec inhibition de la synthèse des prostaglandines et du leucotriène B4. L'isotrétinoïne (acide 13-*cis*-rétinoïque) inhibe la libération d'acide arachidonique. *In vitro*, l'acide rétinoïque-tout-*trans* et l'isotrétinoïne réduisent la synthèse des métabolites 20:4 de l'acide arachidonique (voie de synthèse des prostaglandines) et de la lipo-oxygénase (leucotriènes) (Berbis, 2001).

Thérapeutique

À ce jour, de nombreux dérivés de la vitamine A ont été synthétisés et utilisés en thérapie. Les rétinoïdes, actuellement classés en molécules de 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} générations, rassemblent ainsi les formes naturelles dérivant de la vitamine A et leurs analogues synthétiques. Parmi ces rétinoïdes de synthèse, l'isotrétinoïne ou acide 13-*cis* rétinoïque (Roaccutane[®], Curacné[®], Procuta[®]), utilisée par voie orale, représente aujourd'hui l'anti-acnéique majeur, qui a transformé le traitement des formes les plus sévères d'acné, grâce à ses effets séboatrophiants et sébosuppresseurs. En effet, des récepteurs nucléaires à l'acide rétinoïque ont été identifiés au sein des sébocytes. Chez l'acnéique traité par l'isotrétinoïne, une atrophie des glandes sébacées pouvant aller jusqu'à 90 % du volume initial, ainsi qu'une réduction significative de la sécrétion sébacée, dose-dépendante, sont observées. Une autre molécule dite de deuxième génération, utilisée par voie orale, est l'acitrétine (Soriatane[®]). Elle normalise les processus de prolifération cellulaire, de différenciation et de kératinisation de l'épiderme chez le sujet atteint de psoriasis et de troubles sévères de la kératinisation (ichtyose, pyridiase rubra pileuse, kératodermie palmoplantaire...). Malgré l'efficacité de ces molécules dans le traitement des dermatoses, il n'en reste pas moins qu'il existe un certain nombre d'effets indésirables dose-dépendants. Parmi les effets secondaires observés, il existe un consensus quant à l'effet hautement tératogène des rétinoïdes, notamment ceux utilisés par voie orale. Les malformations fœtales sont dues à des atteintes du système nerveux central, du cœur, du squelette et des gros vaisseaux. Ils sont donc contre-indiqués non seulement chez la femme enceinte mais aussi chez toute femme en âge de procréer sans contraception efficace, ainsi que chez la femme en période d'allaitement. Une surveillance rapprochée est indispensable (test de grossesse mensuelle obligatoire chez les adolescentes acnéiques traitées par isotrétinoïne par exemple, contraception maintenue 1 mois après l'arrêt de l'isotrétinoïne et 2 ans après l'arrêt de l'acitrétine).

Les autres vitamines

Le déficit en vitamine B₆ se traduit sur le plan cutané par une dermatite séborrhéique du visage, associée à des sensations de brûlure et de sécheresse cutanée. Curieusement, les déficits en vitamine B₆ «induits» s'accompagnent rarement de lésions cutanées.

La pellagre, associée à une carence en niacine, survient essentiellement dans un contexte d'éthylisme chronique, et parfois au cours de la maladie de Crohn. Les lésions siègent essentiellement sur les zones photo-exposées (visage, bras et nuque) et débutent par un érythème qui très vite pigmente et s'accompagne d'une desquamation et de fissures de la peau. Dans certaines situations, des lésions hyperkératosiques peuvent aussi être associées.

Les déficits en vitamines B₂ et B₆ augmentent la solubilité et diminuent la solidité des fibres de collagène. Cette fragilité du collagène est liée à une altération des ponts d'union entre les fibres de collagène faisant intervenir la lysyl oxydase, qui requiert les vitamines B₆ et B₂ comme cofacteurs. Ainsi un déficit en vitamines B₂ et B₆ réduirait la synthèse du collagène et des ponts d'union, induisant une désunion de la jonction dermique qui fragilise l'épiderme (Dreno, 1999).

Concernant la vitamine E, la pratique clinique en dermatologie indique que l'acétate d'alpha-tocophérol est bénéfique dans le traitement de la xérose, de l'hyperkératose et plus généralement dans les maladies de la peau dans lesquelles le processus inflammatoire est activé. Les effets positifs de la vitamine E résultent de la combinaison de son activité biologique, de l'absence d'effets néfastes et de l'effet physique de l'huile d'acétate d'alpha-tocophérol.

L'utilisation des vitamines C et E dans les cas des dommages photo-induits de la peau sont actuellement à l'essai.

INDICATIONS DE L'EXPLORATION DU STATUT VITAMINIQUE EN DERMATOLOGIE

Les principales indications de l'exploration du statut vitaminique en dermatologie sont représentées par les états carentiels : carence globale, carence sélective et malnutrition protéino-énergétique qu'il faut savoir évoquer devant certains signes cliniques non spécifiques. Les déficits en vitamine A se traduisent essentiellement par des troubles de la kératinisation, en vitamines PP et B₁₂ par des troubles de la pigmentation et des signes muqueux, en vitamine C par un syndrome hémorragique, en vitamines B₁, B₂ et B₆ par des éruptions du visage, en biotine par une desquamation et un eczéma craquelé.

Les carences globales touchent 20 % de la population des pays en voie de développement et sont représentées par

- le marasme (déficit calorique global) dont le 1^{er} signe est un arrêt de la croissance staturo-pondérale (< 60 % poids corporel sans œdème). Les signes cutanés sont une peau flasque, fripée avec perte du pannicule adipeux du visage (faciès de «singe»).
- le kwashiorkor, par déficit protéique alors que l'apport calorique est correct. (< 60 % poids corporel avec œdème par hypoalbuminémie, ascite). Il touche principalement les enfants d'Afrique tropicale (alimentation à base de féculents) mais des cas ont été décrits dans les pays occidentaux aux cours de la mucoviscidose par malabsorption, de régime d'exclusion trop sévère chez les enfants atopiques, chez des enfants de familles végétariennes et chez les adolescents présentant une anorexie mentale sévère. Les signes cutanés sont une dépigmentation par perte du pigment cutané et atrophie associée à des plaques violines, d'aspects cireux réalisant un aspect en mosaïque. La peau est fine, sèche avec des érosions dans les formes graves ; les ongles sont cassants, fragiles, les cheveux fins et clairsemés. Apathie, diarrhée, parotidite et sensibilité aux infections (tuberculose) sont fréquemment présentes.

L'alcoolisme chronique une cause essentielle de dénutrition, souvent méconnue, par déséquilibre de l'apport alimentaire, malabsorption, insuffisance pancréatique. Des éruptions pellagroïdes ou d'acrodermatite entéropathique sont fréquemment retrouvées. Des carences en vitamines A, B et en zinc doivent être recherchées et traitées.

La malnutrition protéino-énergétique des sujets âgés et des patients atteints de cancer est souvent méconnue et non recherchée. Elle résulte de l'association de syndrome dépressif, d'isolement social, de trouble de mastication (appareillage), de dégoût de la nourriture. Les carences protéiniques entraînent des retards de cicatrisation majeurs (ulcères chroniques ou escarres douloureux aggravant les difficultés alimentaires et impliquant des hospitalisations). Des cas de scorbut ont été décrits chez les personnes âgées ne se nourrissant que de conserves : un purpura, une gingivite inexplicée doivent faire évoquer ce diagnostic et demander un dosage de vitamine C. La malnutrition protéino-énergétique est évoquée par l'interrogatoire du patient et confirmé par les dosages de préalbumine et d'albumine. Elles est le plus souvent associée à des carences multiples (B₁ : 10 à 15 % ; B₂ : 5 à 10 % ; B₆ : 5 à 26 % ; B₉ : 10 à 15 % ; B₁₂ : 2 à 8 % ; E : très rare ; C : 5 à 10 % ; β-carotène : 2 à 5 %). La xérose et le prurit des personnes âgées pourraient être secondaires à des carences en vitamine C, fer ou acides gras essentiels.

Les malabsorptions intestinales sont responsables également des différentes carences (protéiques, vitaminiques et minérales) ; le tableau clinique commun dermatologique doit les faire évoquer : xérose cutanée, eczéma sec, atrophie cutanée, hyperpigmentation, alopecie diffuse. Certains signes sont plus évocateurs : pseudo-acrodermatite entéropathique (purpura, papules des extrémités) dans la mucoviscidose, érythème pellagroïde dans la maladie coeliaque. Il faudra toujours évoquer une anorexie mentale devant ces signes cliniques de carences par défaut d'apport.

Les carences sélectives ont souvent des signes cliniques au 1^{er} plan, permettant un diagnostic biologique rapide :

- vitamine C : Les carences touchent dans les pays occidentaux principalement les hommes célibataires, ayant un régime inadéquat (raison budgétaire, alcoolisme...). Des observations ont été rapportées chez des adultes suivant un régime «macrobiotique». Le scorbut sera évoqué devant une hyperkératose folliculaire, des ecchymoses, un purpura, des hémorragies unguéales ou conjonctivales sous-périostées douloureuses associés à une hypertrophie gingivale hémorragique. Les signes extra-cutanés sont une faiblesse généralisée, une perte de poids, un syndrome dépressif, des arthralgies. Les radiographies osseuses retrouvent une bande métaphysaire sombre.
- vitamine A : Les malabsorptions, l'alcoolisme sont les principales causes de carence. Cliniquement, elle se traduit par une «phrynodermie» ou peau de crapaud (papules kératosiques folliculaires des coudes et genoux s'étendant parfois aux faces d'extension des membres), une xérose, des rides profondes, une atrophie cutanée et sudorale, une alopecie. Les signes extra-cutanés sont une hépatite cytolitique, des douleurs osseuses, des céphalées et des anomalies de la vision crépusculaire associées à une xérophtalmie.
- vitamine B₂ : L'ariboflavine, essentiellement au cours de l'alcoolisme chronique, se manifeste par une perlèche, une chéilite, une glossite, un érythème pigmenté périnéo-génital, une dermatite séborrhéique associés à une atteinte oculaire.
- vitamine B₃ : La pellagre est décrite depuis 1735. Les zones d'endémie actuelles se situent en Afrique, Asie, Inde (alimentation basée sur le maïs). Dans les pays occidentaux des cas sont

rapportés au cours des grandes carences chez les sujets âgés vivant seuls ou les patients présentant un grand syndrome de malabsorption (gastrectomisés...). Dermatose, Diarrhée, Démence caractérisent cette maladie. Les signes dermatologiques associent aphtes, érythème violacé des zones photoexposées avec parfois éruption bulleuse. Une chéillite, une glossite, une perlèche, des érosions buccales et anales complètent parfois le tableau clinique. Diarrhée et syndrome neuro-psychiatrique associés font évoquer rapidement le diagnostic.

- vitamine B₅ : Alopécie, canitie et ulcérations des extrémités sont décrites au cours des carences en vitamine B₅.
- vitamine B₆ : L'alcool et certains médicaments peuvent induire une carence en vitamine B₆ (isoniazide, hydralazine, pénicillamine). Les signes cutanés sont proches de la pellagre avec peu d'atteinte viscérale.
- vitamine B₉ : Alcoolisme, malabsorption intestinale, et certains médicaments (méthotrexate, sulfadiazine, anticonvulsivants, antituberculeux) sont responsables d'une carence en folates. Grossesse, hémodialyse, prématurité, syndromes myéloprolifératifs, anémies hémolytiques chroniques augmentent les besoins en folates ; les signes cliniques sont proches de la carence en vitamine B₁₂. Une hyperpigmentation des zones photoexposées a été décrite ; les signes cutanés sont toujours associés à une anémie macrocytaire arégénérative.
- vitamine B₁₂ : Anémie de Biermer (malabsorption due à l'absence de facteur intrinsèque), achlorhydries, infections microbiennes du tube digestif, syndrome de Zollinger-Ellison sont les principales causes de carence en vitamine B₁₂. Certains cas ont été décrits chez les végétaliens. Les signes cliniques au 1^{er} plan sont buccaux : langue dépaillée, plages érythémateuses mal limitées, douloureuses, variables de la langue et des muqueuses jugales ou labiales, aphtes, perlèche. Une hyperpigmentation des pulpes des doigts et en regard des articulations métacarpophalangiennes est secondaire à l'augmentation de mélanine. Acroparesthésies, asthénie, anorexie, neuropathie sensitive complètent le tableau clinique.

Références bibliographiques

- Amalric I** (1993). Intérêt des dérivés de la vitamine D (calcipotriol ou Daivonex[®]) dans le psoriasis. *bedc*, **1** : 44-46.
- Berbis P** (2001). Rétinoïdes. *Encycl Méd Chir, Dermatologie*, **98-938-A-10**, 14 p.
- Delaure S** (1993). Calcipotriol : un traitement efficace du psoriasis. *bedc*, **1** : 253-255.
- Dreno B**. Maladies Nutritionnelles. In : Bessis D, Guillhou JJ (1999). *La Pathologie Dermatologique en Médecine Interne*. Arnette Iltiatives Santé, Rueil Malmaison.
- Fisher GJ, Voorhees JJ** (1996). Molecular mechanisms of retinoid actions in skin. *FASEB J*, **10** : 1002-1013.
- Guillhou JJ** (2003). Dérivés de la vitamine D. *Encycl Méd Chir, Dermatologie*, **98-918-A-10**, 8 p.
- Paulin S** (2001). Physiopathologie du psoriasis et rôle des analogues de la vitamine D. Thèse d'Université, Université de Franche-Comté.
- Schmidt B** (1993). Psoriasis : nouvelles stratégies thérapeutiques. *bedc*, **1** : 424-426.

Vitamine et neurologie

*S. Limbach, A. Dauvergne, G. Le Moel, J.-C. Guillard,
J.-L. Guéant, M. Hervieux, M. Giroud*

Les connaissances biochimiques actuelles permettent d'envisager de façon certaine l'implication des vitamines du groupe B en neurologie et en particulier les vitamines B₁, B₂, B₆, B₉ et B₁₂. Celles-ci jouent un rôle de cofacteur dans de nombreuses activités enzymatiques, le transfert de protons et d'électrons et toute déficience ou carence en ces vitamines peut entraîner une altération des métabolismes cellulaires. Ces vitamines interviennent aussi très tôt dans le développement du cerveau (Ramakrishna, 1999).

Toutes les vitamines sont indispensables au fonctionnement normal du cerveau. Toutefois, certaines d'entre elles participent très étroitement au fonctionnement des neurones et des autres cellules cérébrales. Il est même possible d'affecter à chaque vitamine une activité cognitive. Ainsi, la thiamine, la riboflavine, la niacine et les folates sont en relation avec un meilleur niveau d'abstraction ; la vitamine C permet de meilleures performances visuo-spatiales ; les vitamines B₁₂, B₆, A et E assurent une meilleure mémoire visuo-spatiale et des tests d'abstraction plus performants (Bourré, 2004).

VITAMINE A

La vitamine A intervient dans la synthèse des pigments visuels, le contrôle de la différenciation et de la prolifération des cellules cérébrales pendant la vie fœtale. La vitamine A et les rétinoïdes sont également impliqués dans la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe, suggérant leur rôle dans la mise en place et le maintien des fonctions cognitives (Bourré, 2004).

Le précurseur de la vitamine A, le bêta-carotène, contribue à la stabilisation des membranes biologiques. Enfin, la vitamine A et les caroténoïdes (parmi lesquels le bêta-carotène), participent avec d'autres micro-nutriments (notamment les vitamines E et C et le sélénium) à la protection du système nerveux contre les agressions par les radicaux libres ou par les formes actives de l'oxygène.

VITAMINE B₁

Les formes actives de la vitamine B₁ sont le diphosphate de thiamine, ou TDP, et le triphosphate de thiamine, ou TTP. Le TDP intervient comme coenzyme de nombreux systèmes enzymatiques tels que les complexes de décarboxylation oxydative des acides α -cétoniques et la transcétolase.

Le TTP semble jouer un rôle dans l'excitabilité membranaire des cellules nerveuses. Il a une fonction de neuromédiateur par son action de modulateur des canaux chlore présents au niveau du cerveau.

Les enzymes thiamino-dépendantes - la transcétolase (TK), l' α -cétoglutarate deshydrogénase (KGDH) et la sous unité 1 β de la pyruvate deshydrogénase (PDH) - sont impliquées dans le métabolisme du glucose et dans le cycle de Krebs (Kern *et al.*, 1997). Le métabolisme cérébral étant gluco-dépendant strict, les enzymes thiamino-dépendantes jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité cérébrale.

La réaction de transcétolisation cytoplasmique est une étape clé de la voie des pentoses ; la TK assure ainsi un rôle métabolique et structurel au niveau du cerveau. La TK permet d'une part la régénération du NADPH₂, contribuant ainsi au maintien des équivalents réducteurs nécessaires à la synthèse des lipides, à la production de glutathion réduit et probablement à la synthèse et au transport des neurotransmetteurs (Lavoie *et al.*, 1995) ; d'autre part, la TK concourt par l'intermédiaire du ribose 5-phosphate à la synthèse des acides nucléiques.

La décarboxylation des acides α -cétoniques est réalisée par des complexes multienzymatiques comportant entre autre une décarboxylase dont le cofacteur est le TDP. Ainsi, une carence cellulaire en TDP entraîne une diminution de la production d'ATP et une accumulation de lactate, ces deux phénomènes contribuant en particulier à la mort cellulaire neuronale (Bettendorff *et al.*, 1995).

Une action anti-oxydante de la thiamine a été mise en évidence *in vitro*, lui attribuant un rôle protecteur dans la peroxydation lipidique (Lukienko *et al.*, 2000).

La première description d'avitaminose B₁ en 1890 correspond au tableau clinique du béribéri fréquent à l'époque dans le Sud Est asiatique du fait d'une alimentation à base de riz poli ; elle se traduit par une atteinte spécifique des nerfs périphériques, atrophique ou paralytique, pouvant être associée à une atteinte cardiaque avec œdèmes des membres inférieurs. Dans les trois maladies métaboliques héréditaires présentant des troubles neurologiques, la leucinoase thiamino-sensible, l'acidose lactique thiamino-sensible et l'anémie mégaloblastique thiamino-sensible, une amélioration clinique après une supplémentation massive en vitamine B₁ est notée.

Dans les pays industrialisés, les manifestations de carence en vitamine B₁ chez l'adulte sont rares et sont observées principalement chez les éthyliques chroniques. Des cas d'encéphalopathies et /ou de cardiomyopathies ont été décrits lors de nutrition parentérale exclusive en néonatalogie (Thauvin-Robinet *et al.*, 2004) ou chez des nouveaux-nés nourris exclusivement avec du lait en poudre à base de soja (Fattal-Valevski *et al.*, 2005). Les complications de la carence thiaminique sont principalement neurologiques : neuropathies périphériques (troubles de la sensibilité, de la motricité et des réflexes) et/ou syndrome de Gayet-Wernicke. Ce dernier associe à des paralysies oculomotrices remplacées le plus souvent par une hypertonie extra-pyramidale, une désorientation temporospatiale et un alitement. En l'absence de traitement, l'évolution vers le syndrome de

Korsakoff caractérisé par une amnésie antérograde et rétrograde, ou une démence de type frontal est irréversible (Verstichel, 2000). Pendant longtemps, le diagnostic du syndrome de Wernicke-Korsakoff n'a pu être établi avec certitude que sur l'étude histologique *post mortem* du cerveau ; les lésions histologiques consistent en des suffusions hémorragiques des tubercules mamillaires et/ou des noyaux gris centraux, une perte neuronale, en particulier des cellules de Purkinje et une prolifération gliale prédominant dans la substance grise péri-aqueducale (Baker *et al.*, 1999 ; Kril, 1996). À l'heure actuelle, l'imagerie neuroradiologique est utile pour un diagnostic *in vivo*. Le scanner peut montrer les hémorragies des tubercules mamillaires et/ou des noyaux gris centraux. L'imagerie en résonance magnétique montre une augmentation du signal T2 dans la région thalamique moyenne, une atrophie du noyau thalamique et des corps mamillaires (Jauhar *et al.*, 2000 ; Park *et al.*, 2001). Le délai d'apparition des signes cliniques varie beaucoup d'un sujet à un autre. Les effets de la précarité du statut thiaminique et de l'alcool semblent être synergiques ; en effet, l'alcool déshydrogénase a comme cofacteur le TDP et le principal métabolite de l'alcool, l'acétaldéhyde, rend l'apotrascétolase instable (Martin *et al.*, 1995). Mounier *et al.* (1998) ont évalué 35 malades alcooliques présentant une neuropathie sensitive et ont retrouvé une carence en thiamine chez 20 % d'entre eux sans pouvoir mettre en évidence une corrélation entre les anomalies biochimiques et électrophysiologiques (mesure des vitesses de conduction sensitive).

VITAMINE B₂

Le FMN et le FAD, les coenzymes dérivés de la riboflavine, jouent un rôle de transporteurs d'électrons et sont impliqués dans le contrôle de l'activité de nombreuses protéines : les flavoprotéines. Le FMN et le FAD interviennent comme groupements prosthétiques de nombreuses déshydrogénases et oxydases qui jouent un rôle majeur dans plusieurs réactions d'oxydoréduction impliquées dans le métabolisme intermédiaire. Les déshydrogénases participent à l'oxydation des acides gras (succinyl déshydrogénase, acyl-CoA déshydrogénase) et des acides aminés (glycocolle déshydrogénase).

Les premiers signes de carence en riboflavine sont des signes cutanéomuqueux, oculaires, puis neurologiques, n'apparaissant qu'après 3 ou 4 mois d'apports nutritionnels très faibles. Les symptômes sont frustrés et non spécifiques car souvent associés à des carences polyvitaminiques.

Les neuropathies périphériques sont observées dans les cas de carences sévères et régressent lentement avec l'administration de riboflavine. L'alcoolisme chronique est la cause la plus fréquente. À l'insuffisance des apports, s'ajoute une modification de la biodisponibilité de la riboflavine. Enfin, l'alcool inhibe la FAD- et la FMN pyrophosphatase et altère l'hydrolyse du FAD.

VITAMINE B₃

La carence en vitamine B₃ (PP ou niacine) fut dénommée « mal de la teste », témoignant de son effet psychiatrique ; et, accessoirement, du nom du village où vivaient les malades qui ont contribué à la première description de la maladie. La pellagre peut être la conséquence directe de la carence en cette vitamine, ou bien accompagner l'alcoolisme (Bourré, 2004). Mais, entre la déprime, conséquence du défaut de vitamine B₁, et l'excitation provoquée par le déficit en B₃, le juste équilibre ne peut être trouvé qu'avec la vitamine B₂ (riboflavine). Cette vitamine assure l'utilisation harmonieuse des deux autres.

VITAMINE B₆

Le pyridoxal 5'-phosphate (PLP), la forme active de la vitamine B₆, est le coenzyme de nombreuses enzymes jouant un rôle dans le métabolisme des acides aminés et des protéines.

Dans le métabolisme du tryptophane, le PLP est le coenzyme de deux enzymes : la cinuréninase, qui permet la synthèse endogène de la niacine à partir du tryptophane, et la 5-hydroxytryptophane décarboxylase, qui catalyse la conversion du 5-hydroxytryptophane en 5-hydroxytryptamine ou sérotonine. D'autres neurotransmetteurs, tels que la taurine, la dopamine, la noradrénaline, l'histamine et l'acide γ -aminobutyrique, sont synthétisés par des enzymes PLP-dépendantes. L'implication du PLP dans la synthèse de plusieurs neurotransmetteurs et l'observation de troubles neurologiques chez les nouveau-nés (Coursin, 1954) et les animaux carencés en vitamine B₆ suggèrent que cette vitamine joue un rôle important dans le fonctionnement du système nerveux central.

Chez les nouveau-nés nourris avec un lait artificiel ne contenant plus de vitamine B₆, des convulsions et un électroencéphalogramme (EEG) anormal furent observés (Coursin, 1954). Le traitement des nouveau-nés par 100 mg de pyridoxine améliora significativement l'électroencéphalogramme. Dans les études cliniques rapportées par Coursin, la teneur en protéines de la ration est apparue corrélée à la carence en vitamine B₆ et à l'ampleur des symptômes. L'observation de convulsions pyridoxino-dépendantes est un autre argument en faveur de l'importance de la vitamine B₆ en neurologie. La dépendance vis-à-vis de la vitamine B₆, une cause rare de convulsions, a été rapportée par plusieurs auteurs (Garry *et al.*, 1962). Des convulsions surviennent au tout début de la vie et l'administration de 30 à 100 mg de pyridoxine est suffisante pour prévenir ces convulsions et corriger l'électroencéphalogramme (Baniker *et al.*, 1983). Le tableau clinique varie considérablement d'un patient à l'autre mais les symptômes observés répondent toujours à la pyridoxine (Goutieres et Aicardi, 1985). Le traitement par vitamine B₆ fait partie de l'arsenal thérapeutique des états de mal convulsifs du nourrisson.

La carence en vitamine B₆ chez l'adulte résulte aussi en des anomalies de l'électroencéphalogramme principalement en présence d'un apport protéique élevé (> 100g/24h) (Kretsch *et al.*, 1991). Dans une étude réalisée dans des conditions contrôlées (Grabow et

Linkswiler, 1969), les sujets reçurent une ration contenant 150 g de protéines et 0,16 mg de vitamine B₆ (soit environ dix fois moins que l'apport nutritionnel conseillé pour la vitamine B₆) pendant 21 jours. Aucune anomalie de l'EEG ne fut observée ; de même, la vitesse de conduction nerveuse ne fut pas modifiée. À l'opposé, Kretsch *et al.* (1991) enregistrent un EEG anormal chez deux femmes parmi un groupe de huit femmes ayant eu un apport journalier de 0,05 mg de vitamine B₆ pendant 12 jours. L'EEG redevint normal lorsque les sujets consommèrent 0,5 mg de vitamine B₆ par jour. De nombreux facteurs peuvent expliquer la discordance existant entre ces deux études : la durée de la période de déplétion mais aussi les doses utilisées et vraisemblablement le niveau d'apport en protéines.

VITAMINES B₉ ET B₁₂

La forme biologiquement active de la vitamine B₉ est le tétrahydrofolate (THF). Le THF est greffé de groupements monocarbonés plus ou moins oxydés sur N5 et N10 donnant naissance à des coenzymes aux activités très spécifiques : synthèse des bases de l'ADN, métabolisme de la méthionine, synthèse de neurotransmetteurs. La teneur du LCR est 4 fois plus élevée que celle du sérum.

Les deux formes actives de la vitamine B₁₂ chez l'homme sont la méthyl-cobalamine et l'adénosyl-cobalamine, qui sont mises en jeu dans le métabolisme des tissus à renouvellement rapide et des cellules nerveuses. L'adénosyl-cobalamine permet la conversion du méthylmalonyl coenzyme A en méthylsuccinylcoenzyme A tandis que la méthylcobalamine permet le transfert du groupement méthyle provenant du THF-CH₃ sur l'homocystéine pour la synthèse de la méthionine.

Le déficit en folates entraîne une diminution de la synthèse des bases purique et pyrimidique et donc de l'ADN. Le déficit en cobalamine a pour conséquence une réduction de l'activité de la méthionine synthétase vitamine B₁₂-dépendante et un blocage du cycle de méthylation : le 5-méthyl THF s'accumule et inhibe la synthèse des autres formes de THF.

Des troubles neurologiques ont été associés aux états de déficience ou de carence en vitamines B₉. Yukawa *et al.* (2001) ont dosé le folatémie chez des malades présentant des troubles neurologiques ; 10,5 % d'entre eux avaient un taux sérique de vitamine B₉ abaissé et 67 % des malades déficients en folates eurent leurs signes cliniques neurologiques améliorés par la prise orale de 15 mg/jour de vitamine B₉. Dans cette population, la dysgueusie et l'anémie furent améliorées chez tous les sujets après «supplémentation». La présence d'une démence ou d'une encéphalopathie diminue l'efficacité de la «supplémentation». Il s'agit d'une des causes de démences curables par les vitamines B₉ et B₁₂. Le syndrome combiné de moelle est la complication classique de la carence en vitamine B₁₂. Ce syndrome est combiné car associant un syndrome pyramidal et un syndrome sensitif lemniscal des 4 membres. Il s'agit de la conséquence d'une démyélinisation des faisceaux pyramidaux antéro-latéraux et des cordons postérieurs de Goll et Burdach. Ces anomalies sont maintenant bien lisibles sur l'Imagerie en Résonance Magnétique qui montre un hypersignal T2 de la moelle cervicale étendue sur plusieurs étages.

L'hyperhomocystéinémie, qui résulte d'une déficience en folates, est considérée comme un facteur de risque des accidents vasculaires cérébraux (Sacco *et al.*, 1999). Ce désordre métabolique est également fortement évoqué dans les neuropathies optiques non artéritiques ischémiques (NAION) corrélé à un taux sérique (Kawasaki *et al.*, 1999) et du liquide céphalorachidien (Eells *et al.*, 2000) bas en vitamine B₉ indépendamment de la mutation MTHFR C677T (Weger *et al.*, 2001). Une supplémentation orale en vitamine B₉ de l'ordre de 1 mg/jour permet de constater une amélioration clinique de la neuropathie optique au bout de 2 mois (Golnik et Schaible, 1994). La neuropathie optique peut être secondaire à un déficit isolé en folates sans facteur aggravant associé (Hsu *et al.*, 2002). Un taux modérément élevé d'homocystéine est retrouvé dans les démences vasculaires ainsi que dans la maladie d'Alzheimer. Le déficit cérébral en cobalamine effectivement active serait secondaire à une oxydation délétère de la molécule dans le cadre d'un stress oxydant ; ainsi, la forme glutathionylcobalamine serait indiquée chez ces patients (McCaddon *et al.*, 2002). Chez le diabétique de type II, le taux d'homocystéine est plus élevé chez ceux présentant une neuropathie (Ambrosch *et al.*, 2001).

Un syndrome neuropsychiatrique caractéristique peut être retrouvé chez 40 % des patients déficients en cobalamine (Savage et Lindenbaum, 1995), associé souvent à une anémie mégalo-blastique.

Un déficit en folates peut contribuer au développement d'une polyneuropathie chez le sujet alcoolique (Gimsing *et al.*, 1989). L'exploration de ce déficit fonctionnel par les dosages sériques ou érythrocytaires est parfois difficile, le déficit fonctionnel en vitamine B₁₂ n'étant alors pas toujours retrouvé.

Weir et Scott (1999) insistent sur l'importance de l'apport synergique de cobalamine et de folates afin d'éviter la survenue de neuropathie chez le sujet âgé déficient. Un apport de 50 µg de cobalamine par jour permet d'augmenter le taux sérique de vitamine B₁₂ chez le sujet âgé qui présente une concentration basale basse sans signe clinique de déficit fonctionnel (Seal *et al.*, 2002). Rajan *et al.* (2002) mettent en évidence un déficit fonctionnel en vitamine B₁₂ chez 13 % de 315 sujets âgés (65-100 ans). Le taux d'homocystéine est inversement corrélé aux taux de folates et de vitamine B₁₂ et aux paramètres de tests cognitifs pratiqués dans plusieurs cohortes de sujets anglais (Duthie *et al.*, 2002).

La «supplémentation» de 211 femmes par 750 µg de folates, 15 µg de vitamine B₁₂ et 75 mg de vitamine B₆ par jour durant 35 jours améliore les capacités mnésiques mais ne modifie pas l'humeur (Bryan *et al.*, 2002).

La population sidéenne peut présenter des signes hématologiques et neurologiques de carence en vitamine B₁₂. Ce déficit est à relier à des troubles de l'absorption mais également à des anomalies des protéines de liaison de la vitamine B₁₂ (Remacha et Cadafalch, 1999).

VITAMINE C

Les rôles de la vitamine C sont multiples. L'acide ascorbique exerce de subtiles influences sur l'élaboration et le fonctionnement du tissu nerveux. La biosynthèse de certains neurotransmetteurs (catécholamines : adrénaline et noradrénaline) requiert sa présence. À très fortes doses, du moins chez le rat, la vitamine C posséderait même un effet anti-stress.

Chez les personnes âgées, la consommation de vitamine C est associée à une moindre prévalence des altérations sévères des performances cognitives. Le quotient intellectuel augmenterait de quatre unités lorsque la concentration plasmatique de vitamine C augmente de moitié. Avec la vitamine C, les caroténoïdes pourraient amoindrir les pertes cognitives au cours du vieillissement (Bourré, 2004).

LA VITAMINE D

La vitamine D fait actuellement l'objet de recherches actives au niveau de la structure et de la fonction du cerveau : cette vitamine ou certains analogues seraient intéressants dans la prévention de quelques aspects de maladies neurodégénératives ou neuro-immunes (Bourré, 2004). Elle protège les neurones de l'hippocampe (Langub *et al.*, 2001) et module le transport du glucose vers le cerveau. Son intérêt dans les modèles de la Sclérose en Plaques fait l'objet d'investigations, suite aux résultats positifs obtenus, en particulier sur la durée et l'intensité des crises (Bourré, 2004).

LA VITAMINE E

La vitamine E protège particulièrement contre le vieillissement, en particulier cérébral, en coopération avec le sélénium, entre autres. L'alpha-tocophérol est en relation avec le niveau des fonctions cognitives (Bourré, 2004). Le terme «vitamine E» correspond à un mélange de nombreuses substances, les tocotriénols et les tocophérols (alpha, bêta, gamma, delta). Mais seul le *RRR*-alpha-tocophérol – et non pas le gamma-tocophérol – est biodisponible et intégré dans les membranes biologiques du cerveau. La carence en vitamine E altère le profil en acides gras poly-insaturés du cerveau (Bourré, 2004).

De ce fait, à composition équivalente en acides gras poly-insaturés, le choix devra se porter sur l'huile qui contient de l'alpha-tocophérol plutôt que sur celle contenant du gamma-tocophérol, ce dernier n'étant pas capté par les membranes. Toutefois, les rôles spécifiques du gamma-tocophérol font l'objet de recherches.

Globalement, à l'échelle moléculaire, les tocophérols jouent de nombreux rôles. Ils neutralisent en particulier les formes actives et toxiques de l'oxygène, ils annihilent les radicaux libres ; c'est-à-dire qu'ils protègent les acides gras insaturés contre les peroxydations, et contribuent ainsi à maintenir

l'intégralité et la stabilité des structures cellulaires cérébrales. Ils agissent en phase lipidique et à très faible concentration (une molécule de vitamine E pour deux mille molécules d'acides gras environ) et s'intègrent dans un vaste système protecteur complexe et interactif, en coopération avec le bêta-carotène, la vitamine A, la vitamine C et diverses enzymes fonctionnant avec le sélénium, le cuivre, le zinc et le manganèse.

DÉFICIT GLOBAL

Il se voit chez le patient dénutri, alcoolique ou chez un nouveau patient, qui est obèse, traité par gastroplastie par anneau donnant essentiellement un déclin mnésique et des neuropathies surtout lorsqu'il maigrit trop rapidement.

INDICATIONS DE L'EXPLORATION DU STATUT VITAMINIQUE EN NEUROLOGIE

Les indications de l'exploration du statut vitaminique en neurologie sont bien codifiées car reposant sur des données cliniques, thérapeutiques et scientifiques validées. Il s'agit des tableaux suivants :

1- devant une démence :

Quel que soit l'aspect de la démence de type frontal, fronto-temporal, postérieur ou de type Alzheimer, un dosage des vitamines B₉ et B₁₂ est nécessaire car il s'agit d'une complication spécifique et surtout curable par le traitement suppléatif.

2- Devant une confusion mentale :

Après avoir confirmé le diagnostic devant le tableau de désorientation temporo-spatiale, le dosage des vitamines B₁, B₆, B₉ et B₁₂ est nécessaire, quel que soit le contexte nutritionnel.

3- Devant une confusion mentale avec hypertonie extra-pyramidale et nystagmus :

On doit évoquer le syndrome de Gayet-Wernicke spécifiquement associé à une carence en vitamine B₁ et dont la «supplémentation» est une urgence médicale afin d'éviter ou surtout d'atténuer la démence.

4- Devant une amnésie :

Quelle soit progressive et isolée, ou de type antérograde (syndrome de Korsakoff) ou associée à d'autres symptômes (démences), un dosage de vitamines B₁, B₆, B₉ et B₁₂ est nécessaire à cause du pronostic.

5- Devant une crise convulsive :

On n'injectera de la vitamine B₆ que chez le nourrisson.

6- Devant une polynévrite des membres inférieurs :

Essentiellement sensitive, on fera appel au dosage des vitamines B₁, B₆, B₉, B₁₂. Par contre, devant une mononévrite, une multinévrite ou une polyradiculonévrite, une carence vitaminique est inhabituelle.

7- Devant un syndrome combiné de moelle :

Outre les causes infectieuses, compressives, inflammatoires, le classique syndrome neuro-anémique de Biermer impose la recherche d'une macrocytose et d'une carence en vitamine B₁₂ et en facteur intrinsèque.

8- Devant une névrite optique bilatérale :

On recherche une carence en vitamines B₁, B₆, B₉ et B₁₂ surtout chez le patient alcool-tabagique.

CONCLUSION

Ce sont principalement les vitamines du groupe B qui sont impliquées dans les troubles neurologiques. Elles sont essentielles au bon fonctionnement axonal, synaptique et myoclonique du système nerveux central (cortex hémisphérique, noyaux gris centraux, faisceaux pyramidaux et cordons postérieurs de la moelle), et du système nerveux périphérique (myéline de la partie distale des nerfs périphériques).

Références bibliographiques

- Alton-Mackey MG, Walker BL** (1973). Graded levels of pyridoxine in the rat diet during gestation and the physical and neuromotor development of offspring. *Am J Clin Nutr*, **26** : 420-428.
- Ambrosch A, Dierkes J, Lobmann R et al.** (2001). Relation between homocysteinaemia and diabetic neuropathy in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med*, **18** : 185-192.
- Ambrose ML, Bowden SC, Whelan G** (2001). Thiamin treatment and working memory function of alcohol-dependent people: preliminary findings. *Alcohol Clin Exp Res*, **25** : 112-116.
- Baker KG, Harding AJ, Halliday GM et al.** (1999). Neuronal loss in functional zones of the cerebellum of chronic alcoholics with and without Wernicke's encephalopathy. *Neuroscience*, **91** : 429-438.
- Bankier A, Turner M, Hopkins IJ** (1983). Pyridoxine dependent seizures – a wider clinical spectrum. *Arch Dis Child*, **58** : 415-418.
- Bourré JM** (2004). Effets des nutriments sur les structures et les fonctions du cerveau : le point sur la diététique du cerveau. *Rev Neurol (Paris)*, **160** : 767-792.
- Beck WS** (1990). Cobalamin as coenzyme: a twisting trail for research. *Am J Hematol*, **34** : 83-89.
- Benton D, Griffiths R, Haller J** (1997). Thiamin supplementation mood and cognitive functioning. *Psychopharmacology*, **129** : 66-71.
- Bettendorff L, Goessens G, Sluse F** (1995). Thiamine deficiency in cultured neuroblastoma cells: effect on mitochondrial function and peripheral benzodiazepine receptors. *J Neurochem*, **64** : 2013-2021.
- Bosy-Westphal A, Holzapfel A, Czech N, Muller MJ** (2001). Plasma folate but not vitamin B₁₂ or homocysteine concentrations are reduced after short-term vitamin B₆ supplementation. *Ann Nutr Metab*, **45** : 255-258.
- Bryan J, Calvaresi E, Hughes D** (2002). Short-term folate, vitamin B₁₂ or vitamin B₆ supplementation slightly affects memory performance but not mood in women of various age. *J Nutr*, **132** : 1345-1356.
- Canham JE, Baker EM, Harding RS et al.** (1969). Dietary protein: its relationship to vitamin B₆ requirements and function. *Ann N Y Acad Sci*, **166** : 16-29.
- Coursin DB** (1954). Convulsive seizures in infants with pyridoxine-deficient diet. *J Am Med Assoc*, **154** : 406-408.
- Dakshinamurti K.** Neurobiology of pyridoxine. In : HH Draper (1982). *Advances in Nutritional Research*, Vol. 4, Plenum Press, New York, 143-179.
- Duthie SJ, Whalley LJ, Collins AR et al.** (2002). Homocysteine, B vitamin status, and cognitive function in the elderly. *Am J Clin Nutr*, **75** : 908-913.
- Eells JT, Gonzalez-Quevedo A, Santiesteban Freixas R et al.** (2000). Folic acid deficiency and increased concentrations of formate in serum and cerebrospinal fluid of patients with epidemic optical neuropathy. *Rev Cubana Med Trop*, **52** : 21-23.
- Elmadfa I, Majchrzak D, Rust P, Genser D** (2001). The thiamine status of adult humans depends on carbohydrate intake. *Int J Vitam Nutr Res*, **71** : 217-221.

- Fattal-Valevski A, Kesler A, Sela BA et al.** (2005). Outbreak of life-threatening thiamine deficiency in infants in Israel caused by a defective soy-based formula. *Pediatrics*, **115** : 233-238.
- Garty R, Yonis Z, Braham J, Steinitz K** (1962). Pyridoxine-dependent convulsions in an infant. *Arch Dis Child*, **37** : 21-24.
- Gimsing P, Melgaard B, Andersen K et al.** (1989). Vitamin B₁₂ and folate function in chronic alcoholic men with peripheral neuropathy and encephalopathy. *J Nutr*, **119** : 416-424.
- Golnik KC, Schaible ER** (1994). Folate-responsive optic neuropathy. *J Neuroophthalmol*, **14** : 163-169.
- Goutieres F, Aicardi J** (1985). Atypical presentations of pyridoxine-dependent seizures: a treatable cause of intractable epilepsy in infants. *Ann Neurol*, **17** : 117-120.
- Grabow JD, Linkswiler H** (1969). Electroencephalographic and nerve-conduction studies in experimental vitamin B₆ deficiency in adults. *Am J Clin Nutr*, **22** : 1429-1434.
- Greb A, Bitsch R** (1998). Comparative bioavailability of various thiamine derivatives after oral administration. *Int J Clin Pharmacol Ther*, **36** : 216-221.
- Hunt AD, Stokes J, McCrory WW, Stroud HH** (1954). Pyridoxine dependency: report of a case of intractable convulsions in an infant controlled by pyridoxine. *Pediatrics*, **13** : 140-145.
- Hsu CT, Miller NR, Wray ML** (2002). Optic neuropathy from folic acid deficiency without alcohol abuse. *Ophthalmologica*, **216** : 65-67.
- Iinuma K, Narisawa K, Yamauchi N et al.** (1971). Pyridoxine dependent convulsion: effect of pyridoxine therapy on electroencephalograms. *Tokohu J Exp Med*, **105** : 19-26.
- Jauhar P, Montaldi D** (2000). Wernicke-Korsakoff syndrome and the use of brain imaging. *Alcohol Alcohol*, **35** Suppl (1) : 21-23.
- Kawasaki A, Purvin VA, Burgett RA** (1999). Hyperhomocysteinaemia in young patients with non-arteritic anterior ischaemic optic neuropathy. *Br J Ophthalmol*, **83** : 1287-1290.
- Kern D, Kern G, Neef H et al.** (1997). How thiamine diphosphate is activated in enzymes. *Science*, **275** : 67-70.
- Kretsch MJ, Sauberlich HE, Newburn E** (1991). Electroencephalographic changes and periondotal status during short-term vitamin B₆ depletion of young nonpregnant women. *Am J Clin Nutr*, **53** : 1266-1274.
- Kril JJ** (1996). Neuropathology of thiamine deficiency disorders. *Metab Brain Dis*, **11** : 9-17.
- Lavoie J, Butterworth RF** (1995). Reduced activities of thiamine-dependent enzymes in brains of alcoholics in the absence of Wernicke's encephalopathy. *Alcohol Clin Exp Res*, **19** : 1073-1077.
- Lukienko PI, Melnichenko NG, Zverinskii IV, Zabrodskaya SV** (2000). Antioxidant properties of thiamine. *Bull Exp Biol Med*, **130** : 874-876.
- Maloney CJ, Parmalee AH** (1954). Convulsions in young infants as a result of pyridoxine deficiency. *J Am Med Assoc*, **154** : 405-406.
- Martin PR** (1993). Genetic sensitivity to thiamin deficiency and development of alcoholic organic brain disease. *Alcohol Clin Exp Res*, **17** : 31-37.
- Martin PR, McCool BA, Singleton CK** (1995). Molecular genetics of transketolase in the pathogenesis of the Wernicke - Korsakoff syndrome. *Metab Brain Dis*, **10** : 45-55.

- Mounier E, Samid Muhand, Hervé C, Mallecourt J** (1998). Carence en vitamine B₁ et anomalies électrophysiologiques chez les alcoolodépendants. *Alcoologie*, **20** : 349-354.
- McCaddon A, Regland B, Hudson P, Davies G** (2002). Functional vitamin B₁₂ deficiency and Alzheimer disease. *Neurology*, **58** : 1395-1399.
- Park SH, Kim M, Na DL, Jeon BS** (2001). Magnetic resonance reflects the pathological evolution of Wernicke encephalopathy. *J Neuroimaging*, **11** : 406-411.
- Pruthir K, Tefferi A** (1994). Pernicious anemia revisited. *Mayo Clin Proc*, **69** : 144-150.
- Rajan S, Wallace JI, Beresford SA et al.** (2002). Screening for cobalamin deficiency in geriatric outpatients: prevalence and influence of synthetic cobalamin intake. *J Am Geriatr Soc*, **50** : 624-30.
- Ramakrishna T** (1999). Vitamins and brain development. *Physiol Res*, **48** : 175-187.
- Remacha AF, Cadafalch J** (1999). Cobalamin deficiency in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Semin Hematol*, **36** : 75-87.
- Sacco RL, Wolf PA, Gorelick PB** (1999). Risk factors and their management for stroke prevention: outlook for 1999 and beyond. *Neurology*, **53** (7 suppl 4) : S15-S24.
- Savage DG, Lindenbaum J** (1995). Neurological complications of acquired cobalamin deficiency: clinical aspects. *Baillieres Clin Haematol*, **8** : 657-678.
- Scott JM** (1999). Folate and vitamin B₁₂. *Proc Nutr Soc*, **58** : 441-448.
- Scriver CR** (1960). Vitamin B₆ dependency and infant convulsions. *Pediatrics*, **26** : 62-74.
- Seal EC, Metz J, Flicker L, Melny J** (2002). A randomized, double blind, placebo-controlled study of oral vitamin B₁₂ supplementation in older patients with subnormal or borderline serum vitamin B₁₂ concentrations. *J Am Geriatric Soc*, **50** : 146-151.
- Singleton CK, Martin PR** (2001). Molecular mechanisms of thiamine utilization. *Curr Mol Med*, **1** : 197-192.
- Stephens MC, Havlicek V, Dakshinamurti K** (1971). Pyridoxine deficiency and development of the central nervous system in the rat. *J Neurochem*, **18** : 2407-2416.
- Thauvin-Robinet C, Faivre L, Barbier ML et al.** (2004). Severe lactic acidosis and acute thiamin deficiency: a report of 11 neonates with unsupplemented total parenteral nutrition. *J Inherit Metab Dis*, **27** : 700-704.
- Toth C, Voll C** (2001). Wernicke's encephalopathy following gastroplasty for morbid obesity. *Can J Neurol Sci*, **28** : 89-92.
- Verstichel P** (2000). Korsakoff amnesia syndrome. *Presse Med*, **29** : 1670-1676.
- Weger M, Stanger O, Deutschmann H et al.** (2001). Hyperhomocysteinaemia, but not MTHFR C677T mutation, as a risk factor for non-arteritic ischaemic optic neuropathy. *Br J Ophthalmol*, **85** : 803-806.
- Weir DG, Scott JM** (1999). Brain function in the elderly: role of vitamin B₁₂ and folate. *Br Med Bull*, **55** : 669-682.
- Yukawa M, Naka H, Murata Y et al.** (2001). Folic acid-responsive neurological diseases in Japan. *J Nutr Sci Vitaminol*, **47** : 181-187.

Vitamines liposolubles et malabsorptions lipidiques · mucoviscidose · maladie de Crohn maladie cœliaque · pancréatites pathologies hépatobiliaires

Claude Galabert, Laurent Mely

La malabsorption des lipides affecte très souvent l'assimilation des vitamines liposolubles A, D, E, et K. Plusieurs affections peuvent être à l'origine, à un degré variable, d'une malabsorption lipidique, soit par un trouble de la digestion, soit par un trouble de l'absorption. Les étiologies sont nombreuses et peuvent être classées en fonction de leurs mécanismes (tableau 1).

Certaines des pathologies en cause, comme la mucoviscidose, la maladie de Crohn, la maladie cœliaque... seront abordées plus en détail, du fait de l'importance ou de la fréquence des déficits vitaminiques qu'elles peuvent entraîner.

Tableau 1 : Maldigestions et malabsorptions, mécanismes et étiologies.

	Mécanisme	Etiologie
ÉTAPE LUMINALE - maldigestion - trouble de la solubilisation micellaire - biodisponibilité réduite	Mélange insuffisant	Séquelles de gastrectomies
	Insuffisance en facteurs digestifs : enzymes, sels biliaires, bicarbonates	Mucoviscidose ou fibrose kystique du pancréas Pancréatite chronique Carcinome pancréatique Obstruction biliaire, cirrhoses biliaires Insuffisance hépatique chronique
	Milieu inadéquat : modification du pH, captation bactérienne	Syndrome de Zollinger-Ellison (pH duodéal bas) Pullulation bactérienne-anse borgne (déconjugaison des sels biliaires)
ÉTAPE PARIETALE Troubles de l'absorption liés au : - transport cellulaire - passage lymphatique	Anomalies épithéliales aiguës	Infections intestinales aiguës Néomycine Alcool
	Anomalies épithéliales chroniques	Maladie de Crohn Maladie cœliaque Sprue tropicale Maladie de Whipple Amylose Ischémie
	Intestin court	Résection intestinale pour Crohn ou autres Volvulus, invagination, infarctus
	Trouble du transport	Abetalipoprotéïnémie Lymphangectasie Blocage chylifère, lymphome

MUCOVISCIDOSE

Physiopathologie de la malabsorption lipidique dans la mucoviscidose :

L'atteinte digestive de la mucoviscidose (MV) est complexe et présente la particularité de toucher, dans environ 85 % des cas, tous les organes intervenant dans la digestion et l'absorption des graisses : foie et voies biliaires, pancréas exocrine, muqueuse intestinale. De ce fait, la MV est un exemple physiopathologique remarquable de malabsorption lipidique et de ses conséquences sur le statut en vitamines liposolubles (figure 1).

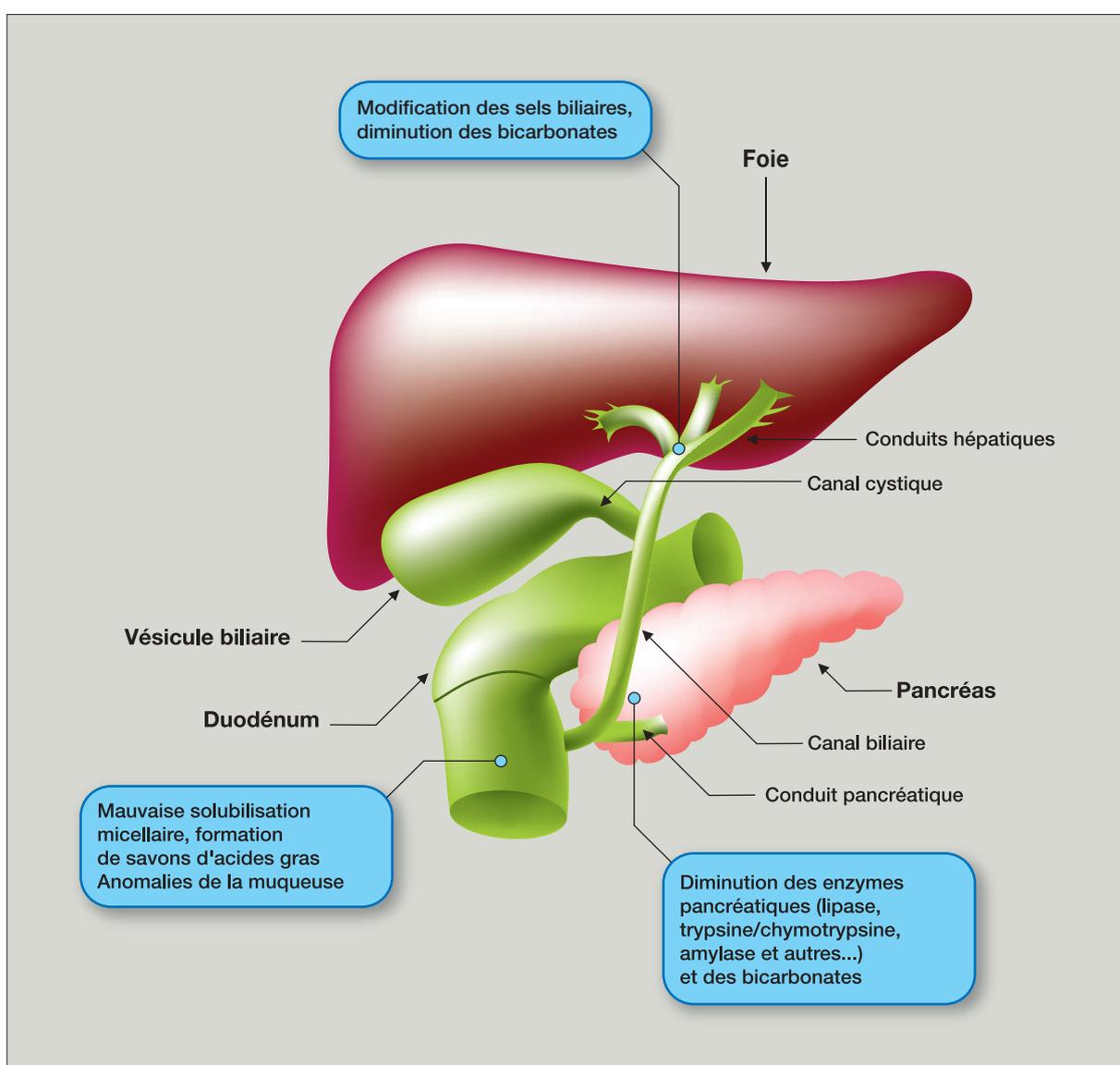


Figure 1 : L'atteinte digestive de la mucoviscidose (MV) est complexe et présente la particularité de toucher, dans environ 85 % des cas, tous les organes intervenant dans la digestion et l'absorption des graisses : foie et voies biliaires, pancréas exocrine, muqueuse intestinale.

Différentes atteintes sont associées, à des degrés variables selon les patients et leur génotype.

- L'atteinte hépatobiliaire, caractérisée par des anomalies de la sécrétion des sels biliaires (fuite intestinale, déconjugaison accrue, cytotoxicité des acides biliaires hydrophobes) et une diminution de la sécrétion hydrogencarbonate, évolue vers une cirrhose biliaire multifocale.

- L'insuffisance pancréatique exocrine (IPE) totale ou partielle associe une diminution de la sécrétion enzymatique (lipases, phospholipases, estérases, trypsinogène, chymotrypsinogène, amylase...) et de la sécrétion des bicarbonates. Présente chez environ 85 % des patients, l'IPE nécessite un traitement substitutif par extraits pancréatiques.

- Le pH intraduodéal trop acide, à cause du défaut de sécrétion des bicarbonates, inactive les enzymes pancréatiques et entraîne la précipitation du calcium et la formation de savons d'acides gras. L'anomalie de sécrétion biliaire perturbe la solubilisation micellaire ce qui entrave l'absorption entérocytaire des molécules lipophiles.

- Au niveau pariétal, la présence d'un mucus épais recouvrant la muqueuse intestinale entraîne un défaut d'activation des enzymes pancréatiques par l'entérokinase. Il y a d'autre part une diminution du transfert intra-entérocytaire des lipides (Peretti *et al.*, 2006).

- Toutes ces anomalies entraînent une maldigestion et une malabsorption majeure des graisses et des nutriments hydrophobes dont les vitamines liposolubles, se traduisant par une stéatorrhée majeure, souvent incomplètement corrigées par le traitement substitutif (extraits pancréatiques). Les patients qui ont une malabsorption sévère ont un risque très élevé de présenter des carences en vitamines A, D, E et K, et ceci précocement.

Conséquences sur le statut vitaminique :

Vitamine A (rétinol) et provitamines A (caroténoïdes) :

La vitamine A, apportée par l'alimentation sous forme de rétinyl palmitate (produits animaux) ou de caroténoïdes provitamines A (produits végétaux), a une biodisponibilité de l'ordre de 21 à 60 % chez un individu normal. La biodisponibilité des caroténoïdes provitamines A est encore plus faible : de l'ordre de 20 % pour le β -carotène. Cependant, le β -carotène, l' α -carotène et la β -cryptoxanthine constituent une source non toxique de vitamine A et, classiquement, il est conseillé qu'environ 60 % des apports en vitamine A soient sous forme de caroténoïdes (ANC, 2001). Le rétinyl palmitate est hydrolysé en faible proportion par la lipase gastrique, en forte proportion par la lipase pancréatique. Son absorption, comme celle des caroténoïdes, dépend étroitement de la solubilisation micellaire. La circulation du rétinol et sa distribution tissulaire se font sous forme liée à sa protéine de transport, la RBP (*Retinol binding protein*). Le relargage dans la circulation à partir du stock hépatique est limitée par la disponibilité de la RBP, et par le statut en zinc.

Dans la MV, la digestion et l'absorption des esters de rétinol et des caroténoïdes sont fortement diminuées en raison de l'IPE et de l'anomalie de solubilisation micellaire. La carence en vitamine A peut être très précoce : dès six semaines chez 21 % des nourrissons (Sokol *et al.*, 1991), d'où la proposition d'une supplémentation dès le plus jeune âge. Le risque de carence est accru en cas d'atteinte hépatique et de carence en zinc. Les carences profondes sont exceptionnelles chez les

patients bien pris en charge (Sinaasappel *et al.*, 2002) ; elles entraînent une atteinte ophtalmologique (héméralopie, xérose conjonctivale) et des troubles de la réparation cellulaire. L'un des premiers signes cliniques est une diminution de la vision nocturne (héméralopie) (Huet *et al.*, 1997).

La synthèse hépatique de la protéine de transport de la vitamine A, la RBP, fortement réprimée lors des épisodes inflammatoires aigus, est très diminuée lors des surinfections bronchiques chez les patients MV. Ceci provoque un effondrement du taux sérique de rétinol par manque de protéine de transport. Au cours de l'évolution de la maladie, des taux abaissés de rétinol et RBP sont souvent associés à une détérioration de l'état clinique. En conséquence, l'interprétation du taux sérique de vitamine A doit toujours distinguer la diminution due à la chute de RBP circulante de la diminution du stock hépatique en vitamine A. L'indicateur le plus praticable pour la surveillance est le rapport molaire rétinol/RBP ($\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$) : normalement de $1,0 \pm 0,3$, on suspecte une insuffisance de stock hépatique s'il est inférieur à 0,7. L'épreuve de charge en rétinol (RDR = *relative dose response*) n'est pas utilisable dans la MV en raison de la maldigestion-malabsorption (Gousson *et al.*, 1998). Lors de suppléments, il faut éviter une hypervitaminose A, qui peut provoquer des troubles graves. Une étude récente (Graham-Maar *et al.*, 2006), chez des patients MV préadolescents met en garde contre les risques d'une supplémentation excessive pouvant entraîner une atteinte hépatique et des complications osseuses, d'où la nécessité d'effectuer un contrôle régulier du taux de rétinol et de RBP en cas de supplémentation. Le dosage du rétinyl palmitate à jeun peut être un indicateur de surdosage (il doit être $<0,2 \mu\text{mol/l}$). Une supplémentation en β -carotène est pratiquée par certaines équipes. Elle évite théoriquement le risque de surdosage en rétinol tout en bénéficiant du rôle antioxydant du β -carotène. En pratique, on retiendra que (Sinaasappel *et al.*, 2002) :

- La surveillance biologique est nécessaire à deux niveaux : pour dépister une éventuelle carence et pour vérifier que la supplémentation est adaptée et n'entraîne pas de surdosage.
- Il faut associer systématiquement le dosage de la RBP et le calcul du ratio rétinol / RBP.
- Il existe des variations interindividuelles, d'où la nécessité de contrôler les taux au moins une fois par an et 3 à 6 mois après toute modification de posologie.
- Les apports doivent être suffisants pour obtenir un taux sérique de rétinol normal.
- Il est préférable d'effectuer les contrôles en dehors des épisodes d'exacerbation broncho-pulmonaires.
- Lorsque l'on supplémente avec du rétinol, compte tenu de la toxicité, on ne doit jamais dépasser la dose de 20 000 UI si la RBP est basse. Si l'on supplémente avec du β -carotène, les taux plasmatiques de celui-ci doivent être surveillés pour être sûr de ne pas atteindre des valeurs trop élevées compte tenu d'éventuels effets adverses.

Vitamine E (α -tocophérol) :

Chez un individu normal, la biodisponibilité de la vitamine E apportée par l'alimentation est très faible, en moyenne 20 à 30 %, et dépend très étroitement de la solubilisation micellaire. Son assimilation nécessite la présence de sélénium. La vitamine E plasmatique est associée aux lipoprotéines et dépend étroitement du taux de lipides circulants. La vitamine E est dénuée de toxicité, avec une réserve cependant chez le prématuré en fonction de la dose ou de la forme galénique.

Dans la MV, la biodisponibilité de la vitamine E est effondrée et la carence biologique est fréquente et précoce ; à six semaines, il existe un déficit chez 38 % des nourrissons (Sokol *et al.*, 1992). Cette carence associe souvent des anomalies complexes de tout le système protégeant les lipides membranaires contre la peroxydation : vitamine E et sélénium plasmatiques et membranaires, activité glutathion peroxydase..., ce qui entraîne une augmentation de la production de radicaux libres. Cependant, l'expression clinique de la carence est rare. Elle peut se traduire par une hémolyse chez les patients les plus jeunes, et une atteinte dégénérative neurologique (dégénérescence neuromusculaire, ataxie cérébelleuse) chez les plus âgés. L'absorption de la vitamine E est insuffisamment corrigée par la prise d'extraits pancréatiques et améliorée par la prise d'UDCA (acide urodésoxycholique), acide biliaire utilisé dans le traitement de l'atteinte hépatobiliaire de la MV. La supplémentation est systématique chez les patients présentant une insuffisance pancréatique (IPE). Il y a peu de risque de toxicité en cas de surdosage, à part chez le nourrisson. Cependant, une surveillance biologique est de règle pour dépister les carences et vérifier l'adaptation de la supplémentation. En pratique, on retiendra que :

- La fréquence du suivi n'est pas définie, elle est en général calquée sur celle de la vitamine A (au moins une fois par an), les deux dosages HPLC étant simultanés.
- Les dosages plasmatiques doivent toujours être interprétés par rapport aux lipides circulants en faisant le rapport vitamine E / cholestérol ou le rapport vitamine E / somme (cholestérol + triglycérides) ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$). Il y a carence si ce rapport est inférieur à 1,6.
- La détermination de la vitamine E au niveau des membranes érythrocytaires est un meilleur indicateur du statut en vitamine E que le dosage sérique, mais difficilement réalisable en pratique.
- Il faut augmenter l'apport en vitamine E en cas d'apports importants en acides gras polyinsaturés (AGPI) pour protéger ceux-ci contre la peroxydation : 10 à 15 mg/jour de tocophérol pour 10 à 15 g/jour d'AGPI.

Vitamine K

La vitamine K est apportée par l'alimentation (phylloquinone absorbée au niveau du grêle après solubilisation micellaire), elle est également produite par synthèse endogène par la flore intestinale (ménaquinones, absorbées au niveau du colon). C'est un cofacteur de réactions de γ -carboxylation des protéines de la coagulation vitamine K-dépendantes, et de certaines protéines de la trame osseuse, comme l'ostéocalcine, qui interviennent dans la fixation du calcium dans les os.

Dans la MV, la biodisponibilité est réduite du fait de la maldigestion-malabsorption et de perturbation éventuelle de la flore intestinale par une antibiothérapie par voie orale. Chez le nouveau-né, selon la recommandation générale, la supplémentation en vitamine K est systématique, particulièrement en cas d'allaitement maternel exclusif (les laits pour nourrissons sont supplémentés). On observe parfois des accidents hémorragiques liés à une carence dans la première année de vie. Au-delà de cette période, il peut exister un déficit, objectivé par une baisse du taux de prothrombine et la présence de PIVKA-2 (protéine des- γ -carboxylée induite par l'absence de vitamine K). Ce déficit est en général modéré même au cours d'antibiothérapies, cependant il peut être plus marqué et entraîner des troubles de l'hémostase au cours des cirrhoses décompensées.

Sur le plan osseux, l'influence du statut en vitamine K sur la déminéralisation osseuse est discutée. Une augmentation de la forme des- γ -carboxylée, c'est-à-dire non fonctionnelle, de l'ostéocalcine a été décrite chez les patients MV (van Hoorn *et al.*, 2003). En pratique on retiendra que :

- La supplémentation en vitamine K n'est pas systématique.
- La surveillance est basée sur le taux de prothrombine et, en cas de perturbation, le dosage différentiel des facteurs. Les facteurs vitamine K dépendant VII et X, à demi-vie plus courte, sont utiles pour juger de l'efficacité de la supplémentation.
- Le dosage ELISA des PIVKA-2 reste un examen de recours en cas de difficulté d'interprétation de la baisse du taux de prothrombine et des facteurs (insuffisance hépatocellulaire associée).
- Le dosage de vitamine K (phylloquinonémie) n'est pas recommandé car sa valeur diagnostique reste très discutée dans ce cadre.

Vitamine D

La vitamine D provient à la fois des apports alimentaires et d'une synthèse endogène par la peau lors de l'exposition au soleil. La surcharge en vitamine D doit être évitée et provoque des troubles rénaux et une hypercalcémie.

Dans la MV, la stéatorrhée entraîne une malabsorption intestinale de la vitamine D ainsi qu'une malabsorption du calcium (par formation de savons d'acides gras). Les anomalies de minéralisation osseuse peuvent apparaître précocement ; elles ont tendance à s'aggraver avec l'âge et sont particulièrement à craindre chez l'adolescent (Giniès, 2006) ; cependant, on observe rarement un rachitisme carenciel. Les besoins en vitamine D sont très augmentés (au moins doublés) et varient en fonction du taux d'exposition solaire. En l'absence de supplémentation, un quart des nourrissons de moins de trois mois présentent une hypovitaminose (Sokol *et al.*, 1991). Quel que soit l'âge, les patients supplémentés ont fréquemment un taux de 25(OH)D₃ abaissé et une augmentation de la parathormone (Giniès, 2006). La supplémentation n'est ni systématique, ni continue ; elle concerne les patients à risque d'ostéoporose et elle est adaptée en fonction des taux sériques de 25(OH)D₃. La définition du seuil minimum de 30 ng/ml de 25(OH)D₃ est actuellement rediscuté car probablement trop bas (Boyle *et al.*, 2005). En pratique on retiendra que :

- Un dosage de 25(OH)D₃ est à pratiquer une fois par an, ou plus fréquemment, s'il existe des facteurs de risques (corticothérapie, défaut d'exposition au soleil).

Physiopathologie de la malabsorption lipidique dans la maladie de Crohn (MC) :

Rapportée avec une fréquence croissante, la maladie de Crohn (MC), maladie inflammatoire chronique, affecte généralement l'iléon distal et le colon mais peut être localisée à un niveau quelconque du tube digestif (iléite, jéjuno-iléite, iléocolite, colite...). L'inflammation transmurale, les ulcérations profondes, l'œdème et la fibrose sont responsables d'occlusions, de fistules profondes et d'abcès mésentériques, nécessitant souvent des résections iléales plus ou moins étendues. La malnutrition, fréquemment observée, résulte à la fois d'apports alimentaires inadéquats, d'une maldigestion - malabsorption, d'une déperdition des nutriments lors du stress oxydatif et d'une fuite entérale (Zurita *et al.*, 1995). Le degré de malnutrition est influencé par l'étendue et l'évolutivité de la maladie (Geerling *et al.*, 1998). La malabsorption, liée aux désordres intraluminaux et pariétaux, plus marquée en cas de résection iléale étendue ou de surinfection par occlusion chronique du grêle, affecte entre autres les graisses et les sels biliaires (interruption du cycle entérohépatique). Elle se traduit entre autres par une stéatorrhée et une diminution d'absorption des vitamines liposolubles.

Conséquences sur le statut vitaminique :

En phase de rémission, la vitamine A circulante n'est pas affectée (Geerling *et al.*, 1998) ; par contre, le β -carotène est diminué ainsi que la vitamine E, dont la diminution semble liée à l'hypolipémie. De rares cas d'hypovitaminose E avec ataxie ont cependant été décrits (Walker et Samii, 2004), ainsi que des hypovitaminoses A en cas de résection étendue (Gousson *et al.*, 1998). Globalement, les antioxydants nutritionnels circulants, β -carotène, vitamine C, vitamine E, sélénium, zinc sont bas et des suppléments, notamment en vitamine E, ont été proposés pour améliorer un statut antioxydant très détérioré.

La prévalence de l'ostéoporose est élevée dans la MC, sa pathogénie est multifactorielle et en partie liée à des déficits vitaminiques. L'ostéopénie et le risque fracturaire semblent corrélés avec le taux de 25(OH)D₃ sérique (Geerling, 1998) qui pourrait être un indicateur de risque. Un déficit en vitamine D est fréquemment observé en cas de MC avec résection intestinale (Haderslev *et al.*, 2003) et associé à une augmentation de sécrétion de parathormone. Dans ce contexte, une supplémentation en vitamine D peut être proposée chez l'adulte. Chez l'enfant, les taux de 25(OH)D₃ sont également abaissés (Sentongo *et al.*, 2002). La diminution de la vitamine K (Duggan *et al.*, 2004 ; Schoon *et al.*, 2001), cofacteur de la carboxylation de l'ostéocalcine, pourrait être un autre facteur pathogénique de l'ostéoporose dans la MC. Lors de la prise en charge de la MC, le maintien d'un statut vitaminique adéquat doit être assuré, en particulier chez les patients qui ont subi des résections intestinales étendues ; cela implique des contrôles biologiques réguliers notamment de 25(OH)D₃. Enfin, outre les vitamines liposolubles évoquées, il faut rappeler le risque élevé de carence en vitamine B₁₂ et folates dans cette maladie.

MALADIE CŒLIAQUE

Physiopathologie de la malabsorption lipidique dans la maladie cœliaque :

Cette malabsorption intestinale chronique provoquée par une intolérance au gluten est caractérisée par une atrophie de la muqueuse jéjunale. Elle est améliorée histologiquement et cliniquement par la suppression du gluten dans l'alimentation. La gliadine, composant du gluten, forme des immunocomplexes dans la muqueuse, provoquant un infiltrat lymphocytaire avec destruction des villosités et hypertrophie des cryptes glandulaires. Cette perte de l'intégrité épithéliale entraîne un syndrome de malabsorption globale. Une stéatorrhée plus ou moins importante peut être présente.

Conséquences sur le statut vitaminique :

Cette malabsorption globale affecte en premier lieu des vitamines hydrosolubles, les statuts en folates, B₆, B₁₂ notamment sont une préoccupation de premier plan. Cependant, le statut en vitamines liposolubles peut également être compromis. Des hypovitaminoses A et K sont décrites (Gousson *et al.*, 1998). De rares cas de carence sévère en vitamine E sont rapportés (Kleopa *et al.*, 2005). Des troubles de la minéralisation osseuse chez l'enfant et l'adolescent sont souvent décrits et le risque fracturaire est accru chez l'adulte (Giniès, 2006). Des concentrations sériques abaissées de calcium et de 25(OH)D₃ associées à une hyperparathyroïdie ont été rapportées chez les patients nouvellement diagnostiqués avant l'instauration du régime sans gluten. En pratique, les taux sériques de 25(OH)D₃ et de parathormone doivent faire partie de l'appréciation de l'évolutivité de la maladie.

Lors de la prise en charge de la maladie, le régime sans gluten instauré peut entraîner des déséquilibres d'apports vitaminiques. Des supplémentations en vitamines sont prescrites (acide folique, préparations polyvitaminées, vitamine K...) selon le degré des carences, établi par la surveillance biologique.

PANCREATITES

Au cours des pancréatites chroniques, quelle qu'en soit l'étiologie, la destruction progressive des cellules acineuses aboutit à une atteinte fonctionnelle du pancréas exocrine. La sécrétion enzymatique est fortement diminuée, ainsi que celle des bicarbonates. À un certain degré de l'insuffisance pancréatique (sécrétion de lipase inférieure à 10 % de la normale), une stéatorrhée apparaît accompagnée d'une malabsorption des vitamines liposolubles.

Les conséquences semblent particulièrement marquées en ce qui concerne le statut en vitamine D : le risque de déminéralisation osseuse est accru ; le taux de 25(OH)D₃ est diminué en corrélation avec la baisse de densité osseuse et le degré d'insuffisance pancréatique (Haaber *et al.*, 2000 ; Mann *et al.*, 2003a). Les pancréatites chroniques peuvent également entraîner une hypovitaminose A par défaut d'absorption intestinale (Gousson *et al.*, 1998). D'une manière générale, un traitement par extrait pancréatique est instauré chez ces patients et en cas de stéatorrhée persistante une supplémentation en vitamines A, D (Mann *et al.*, 2003b) et K est proposée.

MALADIES HEPATOBILIAIRES

Toutes les maladies hépatobiliaires chroniques avec perturbation de la sécrétion des sels biliaires peuvent entraîner une malabsorption lipidique par trouble de la solubilisation micellaire. Chez l'adulte, le risque de carence en vitamines liposolubles dans la cirrhose biliaire primitive (Szalay, 2001) est à surveiller. Chez l'enfant, des formes sévères de stéatorrhée avec carences en vitamines liposolubles sont rapportées dans certaines cholestases intrahépatique avec fonction pancréatique normale (Walkowiak *et al.*, 2006). L'hypovitaminose A est commune lors des cholestases chroniques de l'enfant et nécessite une surveillance par dosage du rétinol (et RDR test en seconde intention) (Ferenchak *et al.*, 2005). Une hypovitaminose K, objectivée par l'augmentation des PIVKA-2, avec TP normal, est aussi décrite dans les maladies cholestatiques de l'enfant (Mager *et al.*, 2006). D'autre part, diverses hépatopathies chroniques, telles que les cirrhoses alcooliques ou post hépatitiques, aboutissent à une diminution de la capacité de stockage de la vitamine A du foie (sous forme d'esters de rétinyle), et un défaut de synthèse de la RBP ; le statut en vitamine E serait également altéré chez ces patients (Look *et al.*, 1999).

Références bibliographiques

- Apports nutritionnels conseillés pour la population française** (2001). Martin A. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.
- Boyle MP, Noschese L, Watts SL *et al.*** (2005). Failure of high-dose ergocalciferol to correct vitamin D efficiency in adults with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, **172** : 212-217.
- Duggan P, O'Brien M, Kiely M *et al.*** (2004). Vitamin K status in patients with Crohn's disease and relationship to bone turnover. *Am J Gastroenterol*, **99** : 2178-2185.
- Feranchak AP, Gralla J, King R *et al.*** (2005). Comparison of indices of vitamin A status in children with chronic liver disease. *Hepatology*, **42** : 782-792.
- Geerling BJ, Badart-Smook A, Stockbrügger RW, Brummer RJ** (1998). Comprehensive nutritional status in patients with long-standing Crohn disease currently in remission. *Am J Clin Nutr*, **67** : 919-926.
- Giniès JL** (2006). Retentissement osseux des maladies digestives chroniques chez l'enfant. *Méd Thérap Péd*, **9** : 99-106.
- Gousson T, Saverot-Dauvergne A, Cusson C.** Vitamine A. In : Le Moel G *et al.* (1998). *Le statut vitaminique : physiopathologie, exploration biologique et intérêt clinique*. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 3 -28.
- Graham-Maar RC, Schall JI, Stettler N *et al.*** (2006). Elevated vitamin A intake and serum retinol in preadolescent children with cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr*, **84** : 174-182.
- Haaber AB, Rosenfalck AM, Hansen B *et al.*** (2000). Bone mineral metabolism, bone mineral density, and body composition in patients with chronic pancreatitis and pancreatic exocrine insufficiency. *Int J Pancreatol*, **27** : 21-27.

- Haderslev KV, Jeppesen PB, Sorensen HA et al.** (2003). Vitamin D status and measurements of markers of bone metabolism in patients with small intestinal resection. *Gut*, **52** : 653-658.
- Huet F, Semama D, Maingueneau C et al.** (1997). Vitamin A deficiency and nocturnal vision in teenagers with cystic fibrosis. *Eur J Pediatr*, **156** : 949-951.
- Kleopa KA, Kyriacou K, Zamba-Papanicolaou E, Kyriadikes T** (2005). Reversible inflammatory and vacuolar myopathy with vitamin E deficiency in celiac disease. *Muscle Nerve*, **31** : 260-265.
- Look MP, Reichel C, von Falkenhausen M et al.** (1999). Vitamin E status in patients with liver cirrhosis: normal or deficient? *Metabolism*, **48** : 86-91.
- Mager DR, Mc Gee PL, Furuya KN, Roberts EA** (2006). Prevalence of vitamin K deficiency in children with mild to moderate chronic liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **42** : 71-76.
- Mann ST, Stracke H, Lange U et al.** (2003a). Alterations of bone mineral density and bone metabolism in patients with various grades of chronic pancreatitis. *Metabolism*, **52** : 579-585.
- Mann ST, Stracke H, Lange U et al.** (2003b). Vitamin D3 in patients with various grades of chronic pancreatitis, according to morphological and functional criteria of the pancreas. *Dig Dis Sci*, **48** : 533-538.
- Peretti N, Roy CC, Drouin E et al.** (2006). Abnormal intracellular lipid processing contributes to fat malabsorption in cystic fibrosis patients. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **290** : G609-G615.
- Schoon EJ, Muller MC, Vermeer C et al.** (2001). Low serum and bone vitamin K status in patients with longstanding Crohn's disease: another pathogenetic factor of osteoporosis in Crohn's disease? *Gut*, **48** : 473-477.
- Sentongo TA, Semaio EJ, Settler N et al.** (2002). Vitamin D status in children, adolescents, and young adults with Crohn disease. *Am J Clin Nutr*, **76** : 1077-1081.
- Sinaasappel M, Stern M, Littlewood J et al.** (2002). Nutrition in patients with cystic fibrosis: a European Consensus. *J Cystic Fibrosis*, **1** : 51-75.
- Sokol RJ, Reardon MC, Accurso FJ et al.** (1991). Fat soluble vitamins in infants identified by cystic fibrosis newborn screening. *Pediatr Pulmonol Suppl*, **7** : 52-55.
- Szalay F** (2001). Treatment of primary biliary cirrhosis. *J Physiol*, **95** : 407-412.
- Van Hoorn JH, Hendricks JJ, Vermeer C, Forget PP** (2003). Vitamin K supplementation in cystic fibrosis. *Arch Dis Child*, **88** : 974-975.
- Walker M, Samii A** (2004). Delayed onset of ataxia in a patient with short bowel syndrome: a case of vitamin E deficiency. *Nutr Neurosci*, **7** : 191-193.
- Walkowiak J, Jankowska I, Pawlowska J et al.** (2006). Exocrine pancreatic function in children with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **42** : 416-418.
- Zurita VF, Rawls DE, Dyck WP** (1995). Nutritional support in inflammatory bowel disease. *Dig Dis*, **13** : 92-107.

Vitamines & micronutriments dans le diabète

Dominique Bonnefont-Rousselot

L'hyperglycémie associée au diabète conduit à un stress oxydant intracellulaire, d'autant plus marqué que le contrôle glycémique est médiocre. Les principaux mécanismes impliqués dans le développement d'un stress oxydant au cours du diabète sont l'auto-oxydation du glucose, la glycation des protéines, la formation de produits de glycation avancée (AGE), l'activation de la voie des polyols, l'activation de la NAD(P)H oxydase dépendante de la protéine kinase C et la surproduction de radicaux superoxydes par la chaîne respiratoire mitochondriale (Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2000). Les espèces radicalaires dérivées de l'oxygène (ERO) sont considérées comme des médiateurs de la signalisation intracellulaire et peuvent ainsi moduler plusieurs fonctions biologiques en stimulant des signaux de transduction, parmi lesquels certains sont impliqués dans la pathogenèse du diabète et de ses complications, ce qui peut être mis à profit pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques (Bonnefont-Rousselot, 2002). Par ailleurs, la déficience en antioxydants a pu être reliée à une plus grande incidence de complications diabétiques (Opara *et al.*, 1999).

Les micronutriments antioxydants peuvent ainsi être proposés en tant que thérapeutique adjuvante chez ces patients (Bonnefont-Rousselot, 2004). Il s'agit de vitamines ou de minéraux fonctionnant généralement en tant que coenzymes ou cofacteurs de réactions métaboliques ; ils peuvent ainsi participer indirectement à la réduction du stress oxydant en améliorant le contrôle glycémique des sujets diabétiques et/ou directement grâce à d'éventuelles propriétés antioxydantes. Il est préférable d'administrer les micronutriments en combinaison plutôt que sous forme de suppléments uniques (Opara, 2002), car certains antioxydants pourraient se révéler pro-oxydants en cas de supplémentation à forte dose chez des sujets déficients en d'autres antioxydants.

UTILISATION DE MINÉRAUX MICRONUTRIMENTS DANS LE DIABÈTE

Vanadium

Le vanadium est un élément trace dont l'intérêt dans le diabète repose sur ses actions insulino-mimétiques et insulino-sensibilisantes. Son mécanisme d'action semble passer par un effet sur les voies de signalisation de l'insuline, conduisant à une expression accrue du récepteur de l'insuline. Il présente aussi des activités antioxydantes, ce qui peut avoir un intérêt dans le cadre des complications du diabète. Toutefois, de trop fortes concentrations peuvent conduire à un effet pro-

oxydant. Chez l'homme, les effets rapportés dans le diabète de type 2 sont divergents. En revanche, dans le diabète de type 1, l'administration de vanadium a permis aux patients de diminuer leurs doses d'insuline (Goldfine *et al.*, 1995) et d'abaisser leur valeur d'hémoglobine glyquée (Cohen *et al.*, 1995). Une limite supérieure recommandée journalière a été fixée à 100 µg/jour. Il est cependant difficile d'apprécier précisément un éventuel déficit chez l'homme ; par conséquent des apports répétés, même à petites doses, sont susceptibles de présenter une toxicité. Diverses formes chimiques sont disponibles, telles que le sulfate ou l'orthovanadate de vanadium, ou le bis(éthylmaltoato)oxovanadium IV [BMOV] ainsi que des formes organiques qui sont mieux absorbées.

Chrome

Cet élément trace intervient dans la régulation du métabolisme du glucose en tant qu'agent sensibilisant de l'action de l'insuline, probablement en accroissant le nombre de récepteurs de l'insuline (Anderson, 1998). Une étude de supplémentation montre que 200 ou 1000 µg de picolinate de chrome/jour pendant 4 mois chez des diabétiques de type 2 induisent une diminution significative de la glycémie à jeun, améliorent le test de tolérance au glucose, de même que les valeurs d'hémoglobine glyquée, d'insuline et de cholestérol comparativement à un placebo (Anderson *et al.*, 1997). Cependant, d'autres études présentent des résultats moins probants. Le risque toxique d'une supplémentation semble faible, si l'on ne dépasse pas 1mg/kg poids par jour.

Magnésium

Le magnésium est un cofacteur essentiel à l'activité de nombreuses enzymes, en particulier celles impliquées dans le métabolisme des glucides. Ainsi, le [tableau I](#) présente les enzymes impliquées dans la glycolyse et qui nécessitent le glucose comme cofacteur. Le déficit en magnésium au cours du diabète est bien documenté; il serait en relation avec des pertes urinaires augmentées et serait accru en cas d'acidocétose (De Valk, 1999). La magnésémie semble inversement corrélée avec les paramètres du contrôle glycémique, à la fois dans le diabète de type 1 et dans celui de type 2, bien que la supplémentation en magnésium ne conduise pas toujours à une amélioration du contrôle glycémique. La concentration de magnésium libre intracellulaire s'est avérée inversement corrélée à la glycémie à jeun. De même, un déficit en magnésium s'est révélé associé à une insulino-résistance (De Valk, 1999). L'insuline pourrait jouer un rôle dans le transport du magnésium en favorisant le passage du magnésium depuis le compartiment extracellulaire vers le compartiment intracellulaire, ce qui conduit à une diminution de sa concentration plasmatique et à un enrichissement des érythrocytes en magnésium... Toutefois, la supplémentation en magnésium n'a que peu d'effet sur la sensibilité à l'insuline (De Valk, 1999). En revanche, une forte relation inverse a été mise en évidence entre la concentration de magnésium sérique et le syndrome métabolique, en particulier avec la dyslipidémie et l'hypertension artérielle (Guerrero-Romero et Rodriguez-Moran, 2002). Il a même été récemment suggéré que le déficit en magnésium intracellulaire pourrait sous-tendre l'association entre hypertension et maladies métaboliques telles que le diabète de type 2 (Barbagallo *et al.*, 2003). Certaines études rapportent par ailleurs une relation entre la survenue de

Tableau 1 : Enzymes de la glycolyse nécessitant le magnésium en tant que cofacteur

Enzyme	Action
Hexokinase	Glucose + ATP → glucose-6-phosphate + ADP
Phosphofructokinase	Fructose-6-phosphate + ATP → fructose 1,6-bisphosphate + ADP
Aldolase	Fructose-1,6-biphosphate → dihydroxyacétone-phosphate + glycéraldéhyde-3-phosphate
Phosphoglycérate kinase	1,3-diphosphoglycérate + ADP → 3-phosphoglycérate + ATP
Énolase	2-phosphoglycérate → phosphoénolpyruvate
Pyruvate kinase	Phosphoénolpyruvate + ADP → pyruvate + ATP

complications microvasculaires du diabète (rétinopathie, neuropathie, néphropathie) et une faible concentration de magnésium (De Valk, 1999). Bien que le magnésium ne soit pas toxique, la prudence est recommandée chez les sujets souffrant d'insuffisance rénale, car la supplémentation en magnésium pourrait entraîner une hypermagnésémie associée à de l'hypotension, des nausées, des maux de tête... "L'American Diabetes Association" (ADA) recommande une supplémentation seulement chez les patients ayant un déficit documenté et jusqu'à 350 mg par jour.

Zinc

Le déficit en zinc est classiquement décrit au cours du diabète (Faure *et al.*, 1992). Le zinc joue un rôle dans la stabilité d'une enzyme antioxydante, la Cu,Zn-superoxyde dismutase (Cu,Zn-SOD), qui contrôle la concentration des radicaux superoxydes. De plus, il existe une relation étroite entre zinc, métabolisme du glucose et physiologie de l'insuline (Salgueiro *et al.*, 2001). Cependant, la supplémentation en zinc chez les sujets diabétiques de type 2 peut conduire à une aggravation de leur intolérance au glucose (Raz et Havini, 1989). En revanche, elle semble efficace dans le diabète de type 1 où elle corrige le déficit en zinc et diminue la peroxydation des lipides (Faure *et al.*, 1995).

Sélénium

Les concentrations sériques ou plasmatiques de sélénium sont significativement plus basses chez les patients diabétiques que chez les sujets sains (Ruiz *et al.*, 1998). Une corrélation négative a été rapportée entre le sélénium plasmatique et le taux d'hémoglobine glyquée (Ruiz *et al.*, 1998). Dans le diabète expérimental, l'administration de sélénium peut conduire à une amélioration de la tolérance au glucose et à une diminution du stress oxydant. En ce qui concerne ce dernier point, une concentration suffisante de sélénium est nécessaire pour assurer une activité correcte d'une enzyme qui détoxifie les hydroperoxydes produits par la peroxydation lipidique, la glutathion peroxydase (GSH-Px), qui contient de la sélénocystéine dans son site actif.

Cuivre

Le cuivre est nécessaire à l'activité de la Cu,Zn-SOD. Le déficit en cuivre aggrave l'intolérance au glucose, augmente les concentrations d'insuline circulante, et, chez le rat diabétique, est associé à des taux élevés d'hémoglobine glyquée (Saari, 1996). Le déficit en cuivre majore l'intolérance au glucose et augmente les concentrations d'insuline. Chez la souris dont le diabète a été induit par la streptozotocine, la supplémentation par du sulfate de cuivre conduit à une préservation de la fonction des cellules bêta pancréatiques, ainsi qu'à une diminution de la glycémie et de la peroxydation lipidique (Sitasawad *et al.*, 2001). Il faut toutefois souligner que les apports de cuivre doivent se faire sous forme de chélates afin que les ions cuivre n'induisent pas la production d'ERO par une réaction de Fenton.

Manganèse

Le manganèse présente une importante fonction antioxydante par l'intermédiaire de l'activité de la Mn-SOD, enzyme qui protège les mitochondries contre les radicaux superoxydes, notamment ceux produits *in situ* par la chaîne respiratoire mitochondriale. Ceci explique que le déficit en manganèse survenant au cours du diabète expérimental conduise à une diminution de l'activité de la Mn-SOD dans le rein et le cœur, associée à une peroxydation lipidique accrue dans l'érythrocyte. Ces données suggèrent un rôle physiologique pour le manganèse en tant que nutriment antioxydant. Les concentrations de manganèse sont habituellement basses dans le diabète, bien que cette observation ne soit pas générale.

UTILISATION DE VITAMINES ANTIOXYDANTES

ET DE COFACTEURS DANS LE DIABÈTE

Vitamine E

Des concentrations basses de vitamine E ont été rapportées chez les sujets diabétiques, représentant même un facteur de risque pour le développement du diabète, mais les résultats en ce domaine sont hétérogènes (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2000). Chez l'homme, puisque la vitamine E est capable de diminuer l'activation de la protéine kinase C (PKC) induite par l'hyperglycémie, activation associée à des anomalies rénales, rétiniennes et vasculaires dans des modèles de diabète expérimental, la vitamine E a été proposée pour la prévention des complications microvasculaires du diabète (Bursell et King, 1999). Certaines études cliniques ont bien montré un effet bénéfique de la supplémentation par la vitamine E sur le contrôle glycémique et l'insulinorésistance (Paolisso *et al.*, 1993), mais d'autres n'ont rapporté aucun effet, voire même des effets négatifs. La vitamine E semble en revanche efficace dans la prévention ou la limitation des complications microvasculaires du diabète (Bursell *et al.*, 1999). Les complications macrovasculaires pourraient aussi être limitées par la vitamine E, puisqu'elle s'avère capable de

diminuer l'oxydabilité des lipoprotéines de basse densité (LDL) et l'adhésion des monocytes, d'améliorer la fonction endothéliale et qu'elle possède des propriétés anti-inflammatoires à forte dose. À part les précautions recommandées chez les patients traités par des anticoagulants, en raison du risque de saignements induits par de fortes doses de vitamine E (supérieures à 800 UI par jour), la vitamine E est relativement non toxique (Jain, 1999), classiquement jusqu'à des doses de 400 UI par jour. En particulier, il n'y a pas eu de preuve d'un éventuel pouvoir pro-oxydant de la vitamine E *in vivo*, contrairement à ce qui peut être observé *in vitro*. En ce qui concerne l'efficacité de la "supplémentation" en vitamine E, l'étude "Heart Outcomes Prevention Evaluation Trial" (Lonn *et al.*, 2002), incluant 3654 sujets diabétiques, a montré qu'un traitement par 400 UI de vitamine E/jour pendant 4,5 ans ne conduit pas à un bénéfice significatif sur les pathologies cardiovasculaires ou sur la néphropathie diabétique. Des hypothèses ont été proposées pour expliquer ce manque d'efficacité, parmi lesquelles le fait que la vitamine E soit administrée chez des individus adultes ou âgés, avec une pathologie déjà avancée, alors que la vitamine E exerce essentiellement son action sur des lésions précoces.

Ubiquinol (coenzyme Q)

Le coenzyme Q est un autre antioxydant hydrophobe présentant des concentrations abaissées au cours du diabète, essentiellement de type 1, de façon indépendante de la présence de complications. Malgré les propriétés antioxydantes de l'ubiquinol, une étude récente ne montre pas de relation entre son pouvoir antioxydant (mesuré par la concentration d'isoprostanes, marqueurs de la peroxydation lipidique) et les effets bénéfiques obtenus sur la pression artérielle et sur le contrôle glycémique à long terme (mesuré par l'hémoglobine glyquée) chez 74 diabétiques de type 2 traités par 100 mg de coenzyme Q, 2 fois/jour (Hodgson *et al.*, 2002). Une "supplémentation" par l'ubiquinol permet en revanche d'améliorer la fonction endothéliale au niveau de l'artère brachiale chez des patients diabétiques de type 2 présentant une dyslipidémie (Watts *et al.*, 2002), peut-être grâce à une meilleure biodisponibilité du monoxyde d'azote.

Vitamine C

Selon les études considérées, des concentrations élevées ou abaissées de vitamine C ont été rapportées chez les sujets diabétiques de types 1 et 2 (Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2000). En réalité, il semble qu'après ajustement pour des variables telles que la prise alimentaire de vitamine C, l'activité physique, le nombre de cigarettes consommées, la concentration sérique de vitamine C ne diffère pas significativement chez des sujets récemment diagnostiqués comme diabétiques comparativement à des sujets non diabétiques. La vitamine C normaliserait les concentrations intracellulaires de sorbitol, ce qui pourrait être bénéfique dans la prévention des complications du diabète. Un essai randomisé en double aveugle chez des patients diabétiques de type 2 présentant une micro/macroalbuminurie persistante a montré qu'un traitement par la vitamine C et la vitamine E à des doses pharmacologiques (1250 mg and 680 UI/jour, respectivement) pendant 4 semaines conduisait à une réduction de l'albuminurie (Gaede *et al.*, 2001).

Nicotinamide

La “supplémentation” par le nicotinamide a été utilisée en raison de son bénéfice potentiel dans la prévention et le traitement (Vissali *et al.*, 1999) du diabète. Bien qu’il ne soit pas considéré comme un antioxydant, le nicotinamide joue un rôle dans l’homéostasie cellulaire. En effet, son mécanisme d’action impliquerait une enzyme mise en jeu dans la réparation de l’ADN, la poly(ADP-ribose)polymérase (PARP), et dans le maintien de concentrations cellulaires suffisantes de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺), conduisant ainsi à prévenir la mort des cellules bêta pancréatiques par apoptose. Il y a peu d’effets secondaires mais les études cliniques ne concluent pas à des améliorations significatives du contrôle métabolique (doses comprises généralement entre 25 et 50 mg/kg par jour) (O’Connell, 2001).

Riboflavine (vitamine B₂)

La vitamine B₂ est un antioxydant, qui régénère le glutathion impliqué dans la détoxification des ERO, en particulier par le biais de l’activité de la glutathion réductase. La déficience en riboflavine a été observée dans le diabète expérimental aussi bien que dans le diabète de type 2 chez l’homme, en relation avec des altérations fonctionnelles des cellules bêta pancréatiques, ce qui pose la question d’une supplémentation qui permettrait d’assurer une détoxification correcte des ERO (Lenti *et al.*, 1980).

“Supplémentation” par plusieurs vitamines

Étant donné le risqué accru de maladies cardiovasculaires dans le diabète et la corrélation positive entre les maladies coronariennes et l’hyperhomocystéinémie, la question du bénéfice d’une supplémentation par les folates, la pyridoxine (vitamine B₆) et la cobalamine (vitamine B₁₂) a été soulevée. Toutefois, ces vitamines n’exercent pas d’effet sur le stress oxydant ou sur le contrôle de la glycémie. De nombreuses préparations commerciales contiennent néanmoins des mélanges de vitamines et de minéraux (Opara, 2002).

Acide lipoïque

L’acide lipoïque est un cofacteur essentiel de deshydrogénases des acides alpha cétoniques. Comme la vitamine E, il se comporte comme un piègeur puissant d’ERO et d’espèces réactives de l’azote (ERN) (peroxyde d’hydrogène, oxygène singulet, radical hydroxyle, monoxyde d’azote, acide hypochloreux, peroxydrite) (Packer *et al.*, 2001). La forme prédominante, qui interagit avec les ERO, est la forme réduite (acide dihydrolipoïque, DHLA), mais la forme oxydée peut aussi inactiver des radicaux libres. Le DHLA est particulièrement intéressant, car il est un réducteur puissant capable de régénérer des antioxydants oxydés, tels que le glutathion, l’ascorbate, le coenzyme Q10 et la vitamine E. De plus, l’acide lipoïque présente des propriétés d’hydrosolubilité et de solubilité des membranes lipidiques, ce qui lui permet d’agir à l’interface entre lipides et eau. Le traitement par l’acide lipoïque présente aussi l’avantage d’accroître les concentrations de glutathion réduit, important antioxydant hydrosoluble endogène dont les concentrations sont abaissées au cours du diabète. L’acide lipoïque est capable d’augmenter le transport du glucose dans des cellules

musculaires en culture, en stimulant la translocation du transporteur GLUT4 depuis les pools intracellulaires jusqu'à la membrane plasmique (Konrad *et al.*, 2001). L'administration orale d'acide lipoïque à des patients diabétiques de type 2 accroît la capture du glucose médiée par l'insuline, probablement en modulant la sensibilité à l'insuline (Jacob *et al.*, 1999). L'acide lipoïque semble avoir un intérêt particulier dans la prévention de la neuropathie (Nagamatsu *et al.*, 1995), qui est l'une des principales complications du diabète, car il stimule la régénération des fibres et les facteurs de croissance, en partie grâce à ses capacités de piègeur de radicaux libres. L'acide lipoïque améliore les déficits neurologiques après 3 semaines de traitement. Après 4 à 24 mois de traitement, il réduit la neuropathie et améliore la conduction dans les fibres nerveuses motrices et sensorielles au niveau des membres inférieurs (Ziegler *et al.*, 1999a). Dans un essai multicentrique randomisé en double aveugle versus placebo (*Deutsche Kardiak Autonome Neuropathie [DEKAN] Study*), l'acide α -lipoïque à la dose orale de 800 mg/jour pendant 4 mois améliore légèrement mais de façon significative la neuropathie au niveau cardiaque chez les patients diabétiques de type 2 (Ziegler *et al.*, 1999b).

Polyphénols

Les flavonoïdes sont des antioxydants polyphénoliques retrouvés dans les fruits, les légumes, le vin rouge et le thé. Ils inhibent la peroxydation des lipides et protègent contre l'oxydation des antioxydants liposolubles. Les recommandations diététiques chez le diabétique encouragent la consommation de fruits et légumes (*Diabetes and Nutrition Study Group*, 1995). Une étude récente a montré la protection de l'ADN contre le stress oxydant chez des diabétiques de type 2 après 2 semaines de régime supplémenté en flavonols (essentiellement quercétine) (Lean *et al.*, 1999). Les patients diabétiques pourraient bénéficier d'une consommation modérée de boissons alcoolisées seulement dans le cas où le risque d'hypoglycémie est écarté. En effet, le vin rouge contient des polyphénols à effet antioxydant et l'alcool est métabolisé en acétaldéhyde dont il a été montré qu'il inhibe la formation des produits de glycation avancée et l'oxydation des lipoprotéines.

CONCLUSION

Les sujets diabétiques présentent une production accrue d'ERO et une réduction marquée de leurs défenses antioxydantes. La génération de radicaux libres au-delà des capacités de piégeage des défenses antioxydantes endogènes conduit à un stress oxydant, en partie responsable des complications diabétiques, telles que le dysfonctionnement macro- et microvasculaire et la polyneuropathie. Dans le diabète de type 2, certains médicaments antihyperglycémiques peuvent réduire le stress oxydant indirectement en abaissant la glycémie et directement en piégeant des radicaux libres ; c'est le cas du gliclazide et de la troglitazone (Bonfont-Rousselot, 2002). Des micronutriments antioxydants pourraient constituer un complément à ces thérapeutiques classiques en réduisant le stress oxydant, indirectement en améliorant le contrôle glycémique, et/ou en piégeant directement des radicaux libres ou en stimulant les défenses antioxydantes. La

supplémentation alimentaire en micronutriments antioxydants pourrait ainsi aider à diminuer le stress oxydant associé au diabète et à prévenir les complications du diabète. Certains antioxydants, tels que la vitamine E ou l'acide lipoïque, sont particulièrement intéressants dans la prévention et le traitement des complications diabétiques. De fortes doses de suppléments contenant des micronutriments antioxydants, tels que la vitamine E, pourraient être bénéfiques. En revanche, de fortes doses d'un seul type de micronutriment antioxydant présente des risques potentiels en perturbant l'équilibre antioxydants/pro-oxydants (Opara, 2002). En ce qui concerne ce dernier point, l'acide lipoïque est une molécule intéressante car elle occupe une position centrale dans le réseau des antioxydants, grâce à sa capacité à régénérer des antioxydants oxydés tels que l'ascorbate, le glutathion, le coenzyme Q10 et la vitamine E (Packer *et al.*, 2001).

Beaucoup d'études cliniques ont rapporté des effets bénéfiques chez les individus même non déficients en micronutriments, mais souvent ces études étaient menées sur de petites populations et à court terme. La difficulté d'obtenir des résultats probants après supplémentation par des antioxydants pourrait venir du fait que les antioxydants sont essentiellement capables de protéger les tissus et les défenses endogènes contre le stress oxydant, plutôt que de participer à la réparation de tissus déjà âgés ou endommagés. Il serait intéressant d'évaluer le statut en micronutriments des sujets diabétiques, mais ceci nécessite une étude clinique et nutritionnelle soignée, d'autant plus que l'évaluation du statut en micronutriments est confrontée à des problèmes méthodologiques, ce qui rend les déficiences en micronutriments difficiles à définir.

Références bibliographiques

- Anderson RA** (1998). Chromium, glucose intolerance and diabetes. *J Am Coll Nutr*, **17**: 548-555.
- Anderson RA, Cheng N, Bryden NA et al.** (1997). Beneficial effects of chromium for people with diabetes. *Diabetes*, **46** : 1786-1791.
- Barbagallo M, Dominguez LJ, Galiato A et al.** (2003). Role of magnesium in insulin action, diabetes and cardio-metabolic syndrome X. *Mol Aspects Med*, **24** : 39-52.
- Bonnefont-Rousselot D** (2002). Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **5** : 561-568.
- Bonnefont-Rousselot D** (2004). The role of antioxidant micronutrients in the prevention of diabetic complications. *Treatments Endocrinol*, **3** : 41-52.
- Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC et al.** (2000). Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab*, **26** : 163-176.
- Bursell SE, Clermont AC, Aiello LP et al.** (1999). High-dose vitamin E supplementation normalizes retinal blood flow and creatinine clearance in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, **22** : 1245-1251.
- Bursell SE, King GL** (1999). Can protein kinase C inhibition and vitamin E prevent the development of diabetic vascular complications? *Diabetes Res Clin Pract*, **45** : 169-182.
- Cohen N, Halberstam M, Shlimovich P et al.** (1995). Oral vanadyl sulfate improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*, **95** : 2501-2509.
- De Valk HM** (1999). Magnesium in diabetes mellitus. *J Med*, **54** : 139-146.
- Diabetes and Nutrition Study Group (DNSG) of the European Association for the Study of Diabetes (EASDF)**: Recommendations for the nutritional management of patients with diabetes mellitus (1999). *Diabetes Nutr Metab*, **8** : 186-189.
- Faure P, Roussel A, Coudray C et al.** (1992). Zinc and insulin sensitivity. *Biol Trace Elem Res*, **32** : 305-310.
- Faure P, Benhamou PY, Perard A et al.** (1995). Lipid peroxidation in insulin-dependent diabetic patients with early retina degenerative lesions: effects of an oral zinc supplementation. *Eur J Clin Nutr*, **49** : 282-288.
- Gaede P, Poulsen HE, Parving HH, Pedersen O** (2001). Double-blind, randomized study of the effect of combined treatment with vitamin C and E on albuminuria in type 2 diabetic patients. *Diabet Med*, **18** : 756-760.
- Goldfine A, Simonson D, Folli F et al.** (1995). Metabolic effects of sodium metavanadate in humans with insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus: in vivo and in vitro studies. *J Clin Endocrinol Metab*, **80** : 3311-3320.
- Guerrero-Romero F, Rodriguez-Moran M** (2002). Low serum magnesium levels and metabolic syndrome. *Acta Diabetol*, **39** : 209-213.
- Hodgson JM, Watts GF, Playford DA et al.** (2002). Coenzyme Q(10) improves blood pressure and glycaemic control: a controlled trial in subjects with type 2 diabetes. *Eur J Clin Nutr*, **56** : 1137-1142.
- Jacob S, Ruus P, Herman R et al.** (1999). Oral administration of RAC-alpha-lipoic acid modulates insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled pilot trial. *Free Radic Biol Med*, **27** : 309-314.
- Jain SK** (1999). Should high-dose vitamin E supplementation be recommended to diabetic patients? *Diabetes Care*, **22** : 1242-1244.

- Konrad D, Somwar R, Sweeney G et al.** (2001). The antihyperglycemic drug α -lipoic acid stimulates glucose uptake via both GLUT4 translocation and GLUT4 activation. Potential role of p38 mitogen-activated protein kinase in GLUT4 activation. *Diabetes*, **50** : 1464-1471.
- Lean ME, Noroozi M, Kelly I et al.** (1999). Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. *Diabetes*, **48** : 176-181.
- Lenti G, Lombardi A, Pagano G** (1980). Prophylactic and therapeutic use of vitamins in diabetes. *Acta Vitaminol Enzymol*, **2** : 67-74.
- Lonn E, Yusuf S, Hoogwerf B et al.** (2002). Effects of vitamin E on cardiovascular and microvascular outcomes in high-risk patients with diabetes. Results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Diabetes Care*, **25** : 1919-1927.
- Nagamatsu M, Nickander KK, Schmelzer JD et al.** (1995). Lipoic acid improves nerve blood flow, reduces oxidative stress and improves distal nerve conduction in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes Care*, **18** : 1160-1167.
- O'Connell BS** (2001). Select vitamins and minerals in the management of diabetes. *Diabetes Spectrum*, **14** : 133-148.
- Opara EC** (2002). Oxidative stress, micronutrients, diabetes mellitus and its complications. *J R Soc Health* **122** : 28-34.
- Opara EC, Abdel-Rahman E, Soliman S et al.** (1999). Depletion of total antioxidant capacity in type 2 diabetes. *Metabolism*, **48** : 1414-1417.
- Packer L, Kraemer K, Rimbach G** (2001). Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*, **17** : 888-895.
- Paolisso G, D'Amore A, Giugliano D et al.** (1993). Pharmacological doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non-insulin dependent diabetic patients. *Am J Clin Nutr*, **57** : 650-656.
- Raz I, Havivi E** (1989). Trace elements in blood cells of diabetic subjects. *Diabetes Res*, **10** : 21-24.
- Ruiz C, Alegria A, Barbera R et al.** (1998). Selenium, zinc and copper in plasma of patients with type 1 diabetes mellitus in different metabolic control states. *J Trace Elem Med Biol*, **12** : 91-95.
- Saari JT** (1996). Evidence that dimethylsulfoxide inhibits defects of copper deficiency by inhibition of glycation. *Nutr Res*, **16** : 467-477.
- Salgueiro MJ, Krebs N, Zubillaga MB et al.** (2001). Zinc and diabetes mellitus: is there a need of zinc supplementation in diabetes mellitus patients? *Biol Trace Elem Res*, **81** : 215-228.
- Sitasawad S, Deshpande M, Katdare M et al.** (2001). Beneficial effect of supplementation with copper sulfate on STZ-diabetic mice (IDDM). *Diabetes Res Clin Pract*, **52** : 77-84.
- Visalli N, Cavallo MG, Signore A et al.** (1999). A multi-centre, randomized trial of two different doses of nicotinamide in patients with recent-onset type 1 diabetes (the IMDIAB VI). *Diabetes Metab Res Rev*, **15** : 181-185.
- Watts GF, Playford DA, Croft KD et al.** (2002). Coenzyme Q(10) improves endothelial dysfunction in the brachial artery in type II diabetes mellitus. *Diabetologia*, **45** : 420-426.
- Ziegler D, Hanefeld M, Ruhnau KJ et al.** (1999a). Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a 7-month multicenter randomized trial (ALADIN III Study). ALADIN III Study Group. Alpha-lipoic acid in diabetic neuropathy. *Diabetes Care*, **22** : 1296-1301.
- Ziegler D, Reljanovid M, Mehnert H et al.** (1999b). Alpha-lipoic acid in the treatment of diabetic polyneuropathy in Germany: current evidence from clinical trials. *Exp Clin Endocrin Diabet*, **107** : 421-430.

Les vitamines et les caroténoïdes impliqués dans la vision

Patrick Borel, Sébastien Bonnel

L'œil, comme les autres organes, contient de nombreuses vitamines qui sont nécessaires aux divers processus métaboliques. Néanmoins, une vitamine est plus particulièrement associée à la fonction visuelle, il s'agit de la vitamine A. Ceci s'explique par le fait que la phototransduction (conversion de l'énergie lumineuse en influx nerveux) nécessite un pigment photosensible constitué d'une apoprotéine, l'opsine, liée de manière covalente à un chromophore, le 11-*cis*-rétinal, dont la vitamine A est le précurseur.

Bien que la vitamine A soit la principale vitamine associée à la vision, des données récentes montrent que d'autres vitamines (les vitamines C et E), et des pigments de la famille des caroténoïdes (la lutéine et la zéaxanthine), jouent aussi un rôle essentiel au niveau oculaire en intervenant dans la photoprotection (défense contre les dommages induits par la lumière). Ces vitamines et caroténoïdes, de par leurs propriétés antioxydantes et leur capacité à filtrer la lumière bleue, pour ce qui est des caroténoïdes, semblent protéger la rétine et le cristallin des effets du stress oxydatif ; ils pourraient ainsi contribuer à diminuer l'incidence de la cataracte et de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).

LA VITAMINE A ET SON IMPLICATION DANS LA CASCADE VISUELLE DES PHOTORÉCEPTEURS

Le rôle de la vitamine A, et plus particulièrement du rétinal (la forme aldéhyde de la vitamine A), dans la vision est établi depuis de nombreuses années. La rhodopsine, pigment photosensible des bâtonnets, est constituée d'une apoprotéine, l'opsine, liée de manière covalente à un chromophore, le 11-*cis*-rétinal. L'excitation lumineuse (un photon excite une molécule de rhodopsine) induit une dissociation de l'opsine et du chromophore résultant en une isomérisation du 11-*cis*-rétinal en tout-*trans*-rétinal. Ce changement de conformation au niveau de l'opsine expose les sites de liaison aux protéines G des photorécepteurs qui, après amplification biochimique, entraîne une chute des concentrations de guanosine monophosphate cyclique. Ceci conduit à une hyperpolarisation de la membrane plasmique et à la libération de glutamate qui, après activation d'autres neurones, va aboutir à l'activation du cortex visuel. La vision des couleurs fait appel aux mêmes mécanismes grâce à la présence, au niveau des cônes, de trois opsines ayant des spectres d'absorption spécifiques. Les mutations dans le gène codant pour l'opsine (*RHO*) représentent 20 % des formes de rétinopathies pigmentaires autosomiques dominantes ; quantitativement, il s'agit du second gène en importance impliqué dans les dystrophies rétiniennes après *ABCA4* impliqué dans la maladie de Stargardt.

LES VITAMINES E ET C : DES VITAMINES ANTIOXYDANTES PARTICIPANT À LA LUTTE CONTRE LE STRESS OXYDATIF

La rétine externe est exposée à la lumière et à une forte pression partielle d'oxygène (proche de celle retrouvée au niveau du sang artériel). Les membranes des photorécepteurs sont très riches en acides gras polyinsaturés. La conjonction de ces trois éléments explique que ce tissu soit particulièrement sensible au stress oxydatif. Dans la rétine, comme dans la plupart des tissus, les défenses antioxydantes se subdivisent en deux catégories : les défenses enzymatiques (superoxydes dismutases, catalase, hème oxygénase, glutathion peroxydase...) et les défenses non enzymatiques (vitamines E et C, caroténoïdes...). Le rôle de la vitamine E dans la protection de la rétine vis-à-vis des dégradations oxydatives a été décrit il y a une dizaine d'années (Fryer, 1993). Il a été conforté par une étude épidémiologique montrant une corrélation inverse entre le statut plasmatique en α -tocophérol et le risque de développer une pathologie oculaire dans laquelle le stress oxydatif semble fortement impliqué : la DMLA (Delcourt *et al.*, 1999). Par ailleurs, l'étude AREDS a montré l'intérêt d'une "supplémentation" en micronutriments antioxydants (vitamine C : 500 mg/j, vitamine E : 400 UI/j, β -carotène : 15 mg/j) associée à une "supplémentation" en cuivre et en zinc (cofacteurs d'enzymes antioxydantes) pour atténuer la progression de la DMLA chez les patients à risque (*Age-Related Eye Disease Study Research Group*, 2001).

LES CAROTÉNOÏDES, DES MICROCONSTITUANTS ALIMENTAIRES IMPLIQUÉS DANS LES MÉCANISMES DE PHOTOPROTECTION

L'œil humain a la particularité, avec l'œil de quelques espèces animales comme les primates, la caille et la grenouille (Khachik *et al.*, 2002), d'être très riche en caroténoïdes. Ces pigments lipophiles sont présents dans notre alimentation, essentiellement dans les fruits et légumes. Les principaux caroténoïdes que nous consommons sont le β -carotène, le lycopène, la lutéine, la β -cryptoxanthine, l' α -carotène et la zéaxanthine. En France, la consommation moyenne de caroténoïdes est d'environ 4 mg/j. La compréhension des propriétés biologiques des caroténoïdes, leur rôle éventuel pour moduler le vieillissement rétinien et la survenue des pathologies oculaires, font l'objet de nombreuses études.

Distribution oculaire des caroténoïdes

Malgré la présence de nombreux caroténoïdes dans notre alimentation (plusieurs centaines de molécules différentes), seulement deux sont présents en quantité significative dans la rétine et le cristallin : la lutéine et la zéaxanthine (Bernstein *et al.*, 2001 ; Bone *et al.*, 1993 ; Khachik *et al.*, 1997). Ces deux caroténoïdes font partie de la sous-famille des xanthophylles, qui sont les caroténoïdes possédant des groupements oxygénés. Les xanthophylles ne sont pas réparties de manière uniforme dans la rétine. Elles sont particulièrement concentrées au niveau de la macula. La

concentration des xanthophylles au centre de la macula peut atteindre jusqu'à une millimole, alors que les concentrations sanguines sont de l'ordre de 1 à 2 micromoles. Les xanthophylles sont localisées principalement au niveau des cônes et des bâtonnets (Rapp *et al.*, 2000 ; Snodderly *et al.*, 1984). La densité optique du pigment maculaire varie de 0,10 à 0,80 suivant les individus (Werner *et al.*, 1987). La densité du pigment maculaire est corrélée aux apports alimentaires et aux niveaux plasmatiques de lutéine et de zéaxanthine (Broekmans *et al.*, 2002). Les deux pigments xanthophylles ne sont pas répartis de manière uniforme au niveau de la macula. En effet, la zéaxanthine est prépondérante dans la partie centrale de la macula (dans une proportion zéaxanthine/lutéine d'environ 2/1) alors que la lutéine est plus importante en périphérie où le rapport est inversé. Par ailleurs, la diminution de la concentration en lutéine s'accompagne de l'augmentation de celle d'un autre caroténoïde (la méso-zéaxanthine) dont la concentration est maximale au centre de la macula (où elle représente 22 % des pigments maculaires). La méso-zéaxanthine est probablement issue du métabolisme de la lutéine car ce caroténoïde n'est pas présent dans notre alimentation et une étude récente, effectuée chez des primates carencés en xanthophylles, a montré que de la méso-zéaxanthine apparaissait dans la rétine suite à la consommation de lutéine mais n'apparaît pas suite à la consommation de zéaxanthine (Johnson *et al.*, 2005). Bone *et al.* (1997) ont émis l'hypothèse qu'une enzyme catalyse la conversion de la lutéine en méso-zéaxanthine. Cette enzyme serait moins active chez les enfants, ce qui expliquerait que leur macula contienne plus de lutéine et moins de méso-zéaxanthine que les adultes (Bone *et al.*, 1997).

Mécanismes d'action de la lutéine et de la zéaxanthine au niveau oculaire

L'accumulation des xanthophylles au niveau de la macula (concentration 300 à 10 000 fois plus élevée que dans les autres tissus) suggère un rôle spécifique de ces substances dans ce tissu. Les mécanismes d'action des xanthophylles au niveau de l'œil ne sont pas encore totalement élucidés (Krinsky *et al.*, 2003), mais par analogie avec ce qui se passe chez les plantes, où les caroténoïdes protègent la chlorophylle de la dégradation photo-oxydative, et connaissant les propriétés physico-chimiques de ces molécules, on propose deux mécanismes d'action.

Premier mécanisme en rapport avec la capacité des xanthophylles à filtrer la lumière

La perception visuelle résulte d'une réponse aux radiations visibles atteignant la rétine et ayant une longueur d'onde comprise entre 380 et 760 nm. Les longueurs d'ondes courtes telles que les UV-A et les UV-B sont en effet filtrées par la cornée et le cristallin. Parmi les radiations du spectre visible pour l'homme, celles comprises entre 400 et 450 nm (lumière bleue) sont particulièrement agressives pour le tissu neuro-rétinien et peuvent provoquer des dommages photochimiques. Les pigments visuels contenus dans les photorécepteurs ne représentent pas les seuls chromophores rétiniens capables d'interagir avec la lumière. D'autres chromophores interagissent avec la lumière visible : lipofuscine, mélanine, hémoglobine, flavines...(Boulton *et al.*, 2001). La photo-excitation de ces différents chromophores peut générer des molécules très réactives (oxygène singulet, radicaux

libres oxygénés, di-rétinal conjugués...) susceptibles d'engendrer un stress oxydatif. La lipofuscine (dont le substrat majeur est la dégradation incomplète des articles externes des photorécepteurs) est un générateur d'espèces oxygénées réactives pouvant compromettre l'activité lysosomale, induire la peroxydation lipidique et l'apoptose de l'épithélium pigmentaire. Les xanthophylles, en filtrant la lumière bleue (absorption de 40 à 90 % de l'intensité), auraient un rôle antioxydant indirect en prévenant l'activation des molécules photosensibles. Tous les caroténoïdes sont capables d'absorber la lumière bleue grâce à leurs pics d'absorption situés entre 445 nm et 472 nm, mais la lutéine et la zéaxanthine présentent le meilleur pouvoir filtrant (Junghans *et al.*, 2001). Par ailleurs, ces deux caroténoïdes ont une orientation transmembranaire différente de celle du β -carotène (Sujak *et al.*, 2000) qui leur conférerait des propriétés particulières. Ceci pourrait expliquer pourquoi la nature a "sélectionné" ces deux caroténoïdes au niveau maculaire.

Second mécanisme en rapport avec les propriétés antioxydantes propres aux xanthophylles

Des espèces oxygénées réactives (EOR) sont formées au cours de certains processus physiologiques (respiration notamment) et jouent un rôle essentiel dans le métabolisme. Néanmoins, il y a des situations où la production d'EOR est supérieure aux besoins de l'organisme et dépasse les capacités de contrôle de celui-ci ; c'est le stress oxydatif. Dans ces conditions, les EOR peuvent réagir avec l'ADN, les protéines et les lipides, et provoquer des dommages considérables. Les caroténoïdes, grâce à leur longue chaîne polyinsaturée, sont d'excellents piègeurs d'espèces oxygénées réactives ($RO\cdot$, 1O_2 , $\cdot NO_2$, radicaux thiyle et sulfonyle). Ils sont particulièrement efficaces pour neutraliser l'oxygène singulet (1O_2) et les radicaux libres oxygénés (Young et Lowe, 2001). L'activité anti- 1O_2 des caroténoïdes dépend du nombre de leurs doubles liaisons, de leurs extrémités cycliques ou non et des substituants éventuellement présents sur leurs cycles. L' 1O_2 transfère son énergie vers la molécule de caroténoïde. L'énergie absorbée se répartit sur l'ensemble des doubles liaisons du caroténoïde puis est dissipée sous forme de chaleur. Ce processus physique laisse les molécules de caroténoïdes intactes. Elles peuvent donc intervenir dans plusieurs cycles de captation de l' 1O_2 . Bien que plausible, ce mécanisme n'a été démontré qu'*in vitro* et des preuves définitives *in vivo* restent à établir.

VITAMINES, CAROTÉNOÏDES ET PATHOLOGIES OCULAIRES

Vitamine A et vision

Étant donné le rôle essentiel de la vitamine A dans la vision, il est aisément compréhensible qu'une carence en vitamine A se manifeste, entre autre, par des signes oculaires. La première manifestation de la carence est une diminution de la vision crépusculaire (ou héméralopie). En dépit du recyclage permanent de la vitamine A libérée lors du cycle visuel, une faible proportion n'est pas recyclée et nécessite d'être remplacée par les apports alimentaires. Une carence expérimentale en vitamine A

chez le rongeur induit la mort cellulaire au niveau des photorécepteurs et de l'épithélium pigmentaire. Les autres manifestations de la carence en vitamine A concernent les structures épithéliales. Cette vitamine est en effet nécessaire au maintien de l'intégrité des épithéliums et en particulier de l'épithélium des muqueuses. Au niveau oculaire, la carence entraîne des remaniements conjonctivaux associés à une sécheresse conjonctivale. Une atteinte cornéenne à type d'ulcération, voire une kératomalacie, s'installe en cas de déficit sévère. La carence en vitamine A n'existe quasiment plus dans les pays industrialisés mais elle reste un problème majeur dans les pays en voie de développement. Elle est responsable de plusieurs centaines de milliers de nouveaux cas de cécité chaque année et représente l'une des priorités de l'OMS.

Caroténoïdes et pathologies oculaires liées à l'âge

La cataracte et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) sont les deux principales pathologies oculaires associées au vieillissement. Certaines données suggèrent qu'il serait possible de moduler la survenue et la gravité de ces deux pathologies grâce à des "supplémentations" en vitamines antioxydantes et en xanthophylles.

Dégénérescence maculaire liée à l'âge

"La ou les" DMLA représentent la première cause de cécité légale dans les pays industrialisés (Klein *et al.*, 1992). Les différentes formes de DMLA présentent des caractéristiques communes : une atteinte maculaire (Drusen, anomalies de l'épithélium pigmentaire, perte neuronale et/ou néovascularisation) pouvant aboutir à la perte de vision centrale. Il est important de dissocier les modifications maculaires précoces liées au vieillissement (early ARM : "Aged Related Maculopathy" des anglo-saxons) et les modifications plus évoluées (late ARM) regroupant à proprement parler les formes de DMLA atrophiques et néo-vasculaires (Bird *et al.*, 1995). Les formes évoluées sont responsables des baisses d'acuité visuelle ; les formes atrophiques (sèches) sont caractérisées par la perte de neurones et d'épithélium pigmentaire ; les formes néo-vasculaires (humides) par le développement de vaisseaux choroïdiens anormaux. La prévalence de la maladie augmente de façon importante avec l'âge, les formes précoces touchent 30 % de la population après 75 ans (5 % pour les formes plus évoluées). La compréhension des mécanismes initiateurs et amplificateurs de la maladie se heurte au caractère hétérogène de son étiologie. Le rôle des différents facteurs de risques (pathologie cardiovasculaire, vieillissement, tabagisme, antécédents familiaux...) associés à l'augmentation de prévalence de la maladie est mis en parallèle avec les modifications qui surviennent lors du vieillissement rétinien pour tenter de comprendre et moduler les mécanismes de la maladie.

Au niveau de l'alimentation, il semble exister des facteurs aggravants (cholestérol et acides gras saturés) et des facteurs protecteurs (vitamines antioxydantes, caroténoïdes et acides gras ω -3). Plusieurs études épidémiologiques ont montré qu'une faible consommation d'aliments riches en micronutriments antioxydants (dont les caroténoïdes et les vitamines C et E) est associée à un risque plus important de développer une DMLA (Moeller *et al.*, 2000 ; Pratt, 1999). En 1993, une étude américaine montrait une réduction de plus de 50 % du risque de DMLA pour le quintile le plus élevé des apports alimentaires en lutéine et zéaxanthine (environ 6 mg/j) et de manière concordante, pour le quintile le plus élevé de leur concentration plasmatique (Beatty *et al.*, 1999 ; Seddon *et al.*, 1994).

Ces associations entre statut alimentaire ou plasmatique en caroténoïdes et incidence de la DMLA sont confortées par des associations entre teneur en pigment maculaire et DMLA. Ainsi, l'analyse de tissus oculaires *post-mortem* a révélé que les teneurs en pigments maculaires de personnes atteintes de DMLA étaient plus faibles que celles de sujets ne souffrant pas de cette pathologie (Bone *et al.*, 2001). De même, la densité du pigment maculaire était plus faible dans les yeux à haut risque de DMLA (Beatty *et al.*, 2001).

Ces associations ne permettent pas toutefois d'établir des preuves définitives de causalité sans les résultats d'études d'intervention. Les études d'intervention sont d'autant plus longues, avec la nécessité d'avoir de grands effectifs, que l'effet préventif et/ou thérapeutique attendu est faible et que l'évolution de la maladie est lente et variable. Les résultats les plus démonstratifs découlent de l'étude AREDS (*Age-Related Eye Disease Study Research Group*, 2001). Cette étude d'intervention effectuée sur près de 5 000 sujets pendant 6 ans a montré qu'une "supplémentation" quotidienne en vitamine C (500 mg), vitamine E (400 mg), β -carotène (15 mg), et zinc (80 mg) diminuait le risque de développer une DMLA de 25 % chez les personnes à risque. Concernant la "supplémentation" alimentaire en pigments xanthophylles, l'étude LAST (*Lutein Antioxidant Supplementation Trial*) a montré des résultats bénéfiques sur une petite cohorte de patients après un an de "supplémentation" (Richer *et al.*, 2004). Néanmoins, ces résultats restent à confirmer par une étude d'intervention plus longue incluant un nombre de patients plus important.

L'ensemble des résultats des études épidémiologiques et d'intervention, ainsi que les données sur les propriétés antioxydantes et photoprotectrices de ces molécules et sur l'étiologie des DMLA, forment un tout cohérent qui suggère que les micronutriments antioxydants, et plus particulièrement les vitamines C et E, la lutéine et la zéaxanthine, peuvent moduler la survenue et le devenir des DMLA. Cependant, l'effet attendu de ces micronutriments antioxydants pourrait être atténué par la multiplicité des mécanismes mis en jeu dans la survenue des DMLA (facteurs génétiques, environnementaux et nutritionnels).

Cataracte

La cataracte est liée à une opacification du cristallin résultant de modifications oxydatives de ses protéines de structure, les cristallines. Celles-ci sont normalement organisées en superstructures, permettant d'assurer la transparence du cristallin. Les modifications oxydatives des cristallines entraînent leur agrégation, une augmentation de la diffusion de la lumière et l'opacification du cristallin. La principale source de stress oxydatif au niveau du cristallin provient de l'exposition aux UV. De nombreuses études épidémiologiques ont montré une relation entre le taux d'ensoleillement et l'augmentation de l'incidence de la cataracte. Le tabac, la consommation d'alcool, le diabète et certains comportements alimentaires sont aussi des facteurs de risque.

Le cristallin est particulièrement riche en lutéine, zéaxanthine, vitamines E et C (Gale *et al.*, 2001 ; Moeller *et al.*, 2000 ; Taylor et Hobbs, 2001). Plusieurs études ont récemment montré, de manière concordante, une réduction du risque de cataracte chez les personnes ayant des apports alimentaires importants en lutéine et zéaxanthine (environ 6 mg/j) (Brown *et al.*, 1999 ; Chasan-Taber *et al.*, 1999 ; Hankinson *et al.*, 1992 ; Lyle *et al.*, 1999).

CONCLUSION

L'apport de vitamine A est essentiel pour que l'œil remplisse sa fonction neuro-sensorielle. La vitamine A est un chromophore indispensable à la phototransduction et une carence en cette vitamine se traduit par une altération de la vision nocturne puis par une cécité.

L'apport en vitamines antioxydantes (C et E) et en caroténoïdes (lutéine et zéaxanthine) semble essentiel pour protéger les tissus oculaires des dommages radicalaires induits par la lumière. Une subdéficience en ces micronutriments semble être un facteur de risque dans la survenue des maladies oculaires dégénératives (DMLA et cataracte). Néanmoins, l'intérêt d'une "supplémentation" par ces micronutriments reste à démontrer sur un plus grand nombre de patients.

Références bibliographiques

- Age-Related Eye Disease Study Research Group** (2001). A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta-carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol*, **119** : 1417-1436.
- Beatty S, Boulton M, Henson D et al.** (1999). Macular pigment and age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*, **83** : 867-877.
- Beatty S, Murray IJ, Henson DB et al.** (2001). Macular pigment and risk for age-related macular degeneration in subjects from a Northern European population. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **42** : 439-446.
- Bernstein PS, Khachik F, Carvalho LS et al.** (2001). Identification and quantitation of carotenoids and their metabolites in the tissues of the human eye. *Exp Eye Res*, **72** : 215-223.
- Bird AC, Bressler NM, Bressler SB et al.** (1995). An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol*, **39** : 367-374.
- Bone RA, Landrum JT, Hime GW et al.** (1993). Stereochemistry of the human macular carotenoids. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **34** : 2033-2040.
- Bone RA, Landrum JT, Friedes LM et al.** (1997). Distribution of lutein and zeaxanthin stereoisomers in the human retina. *Exp Eye Res*, **64** : 211-218.
- Bone RA, Landrum JT, Mayne ST et al.** (2001). Macular pigment in donor eyes with and without AMD: a case-control study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **42** : 235-240.
- Boulton M, Rozanowska M, Rozanowski B** (2001). Retinal photodamage. *J Photochem Photobiol B*, **64** : 144-161.
- Broekmans WM, Berendschot TT, Klopping-Ketelaars IA et al.** (2002). Macular pigment density in relation to serum and adipose tissue concentrations of lutein and serum concentrations of zeaxanthin. *Am J Clin Nutr*, **76** : 595-603.
- Brown L, Rimm EB, Seddon JM et al.** (1999). A prospective study of carotenoid intake and risk of cataract extraction in US men. *Am J Clin Nutr*, **70** : 517-524.
- ChasanTaber L, Willett WC, Seddon JM et al.** (1999). A prospective study of carotenoid and vitamin A intakes and risk of cataract extraction in US women. *Am J Clin Nutr*, **70** : 509-516.
- Delcourt C, Cristol J-P, Tessier F et al.** (1999). Age-related macular degeneration and the antioxidant status in the POLA Study. Pathologies Oculaires Liées à l'Age. *Arch Ophthalmol*, **117** : 1384-1390.
- Fryer MJ** (1993). Evidence for the photoprotective effects of vitamin E. *Photochem Photobiol*, **58** : 304-312.
- Gale CR, Hall NF, Phillips DI, Martyn CN** (2001). Plasma antioxidant vitamins and carotenoids and age-related cataract. *Ophthalmology*, **108** : 1992-1998.
- Hammond BR, Wooten BR, CurranCelentano J** (2001). Carotenoids in the retina and lens: Possible acute and chronic effects on human visual performance. *Arch Biochem Biophys*, **385** : 41-46.
- Hankinson SE, Stampfer MJ, Seddon JM et al.** (1992). Nutrient intake and cataract extraction in women: a prospective study. *British Med J*, **305** : 335-339.

- Johnson EJ, Neuringer M, Russell RM et al.** (2005). Nutritional manipulation of primate retinas, III: Effects of lutein or zeaxanthin supplementation on adipose tissue and retina of xanthophyll-free monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **46** : 692-702.
- Junghans A, Sies H, Stahl W** (2001). Macular pigments lutein and zeaxanthin as blue light filters studied in liposomes. *Arch Biochem Biophys*, **391** : 160-164.
- Khachik F, Bernstein PS, Garland DL** (1997). Identification of lutein and zeaxanthin oxidation products in human and monkey retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **38** : 1802-1811.
- Khachik F, de Moura FF, Zhao DY et al.** (2002). Transformations of selected carotenoids in plasma, liver, and ocular tissues of humans and in nonprimate animal models. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **43** : 3383-3392.
- Klein R, Klein BE, Linton KL** (1992). Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*, **99** : 933-943.
- Krinsky NI, Landrum JT, Bone RA** (2003). Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Annu Rev Nutr*, **23** : 171-201.
- Lyle BJ, Maresperlman JA, Klein BEK et al.** (1999). Serum carotenoids and tocopherols and incidence of age-related nuclear cataract. *Am J Clin Nutr*, **69** : 272-277.
- Moeller SM, Jacques PF, Blumberg JB** (2000). The potential role of dietary xanthophylls in cataract and age-related macular degeneration. *J Am Coll Nutr*, **19** : 522S-527S.
- Pratt S** (1999). Dietary prevention of age-related macular degeneration. *J Am Optom Assoc*, **70** : 39-47.
- Rapp LM, Maple SS, Choi JH** (2000). Lutein and zeaxanthin concentrations in rod outer segment membranes from perifoveal and peripheral human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **41**: 1200-1209.
- Richer S, Stiles W, Statkute L et al.** (2004). Double-masked, placebo-controlled, randomized trial of lutein and antioxidant supplementation in the intervention of atrophic age-related macular degeneration: the Veterans LAST study (Lutein Antioxidant Supplementation Trial). *Optometry*, **75** : 216-230.
- Seddon JM, Ajani UA, Sperduto RD et al.** (1994). Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. *J Am Med Assoc*, **272** : 1413-1420.
- Snodderly DM, Auran JD, Delori FC** (1984). The macular pigment. II. Spatial distribution in primate retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **25** : 674-685.
- Sujak A, Okulski W, Gruszecki WI** (2000). Organisation of xanthophyll pigments lutein and zeaxanthin in lipid membranes formed with dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta*, **1509** : 255-263.
- Taylor A, Hobbs M** (2001). 2001 assessment of nutritional influences on risk for cataract. *Nutrition*, **17** : 845-857.
- Werner JS, Donnelly SK, Kliegl R** (1987). Aging and human macular pigment density. Appended with translations from the work of Max Schultze and Ewald Hering. *Vision Res*, **27** : 257-268.
- Young AJ, Lowe GM** (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys*, **385** : 20-27.

Interrelations entre statut vitaminique et vieillissement

Marie-Josèphe Cals

L'état de santé des sujets âgés de plus de 70 ans résulte non seulement du vieillissement des organes et des modifications métaboliques liées à l'âge mais aussi de différents facteurs de risque, notamment génétiques, environnementaux et nutritionnels. Ainsi, la nutrition est un élément important de la santé du sujet âgé, un bon état nutritionnel prévenant l'apparition et/ou retardant l'aggravation d'un certain nombre de processus et maladies liés à l'âge comme l'ostéoporose, l'athérosclérose, la cataracte, la démence ou le cancer...

Les vitamines ont un rôle de plus en plus reconnu dans l'immunité du sujet âgé, le risque d'anémie carencielle, le risque fracturaire, et en tant que systèmes de protection antioxydants, notamment dans l'ischémie, les maladies neurodégénératives, etc. L'évaluation du statut vitaminique est donc désormais courante en pratique gériatrique et ses résultats confirment la fréquence des déficits, notamment chez les personnes institutionnalisées. Les principales causes des carences vitaminiques sont le manque de ressources, l'isolement social, la dépression, l'anorexie, les troubles digestifs et de l'absorption, les handicaps physiques et mentaux ainsi que les situations d'hypercatabolisme.

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats d'enquêtes et évaluations qui établissent les relations entre vieillissement et vitamines. Nous rapportons également différentes études épidémiologiques et essais d'intervention, notamment pour les vitamines antioxydantes.

MÉTHODES D'ÉTUDE DU STATUT VITAMINIQUE

Le statut vitaminique peut être évalué d'après les apports moyens journaliers (AMJ) en vitamines, estimés d'après les résultats d'une enquête alimentaire répétée plusieurs jours. Ces derniers sont alors comparés aux apports nutritionnels conseillés (ANC). Selon la population âgée considérée, les AMJ sont assez variables et dépendent des critères de sélection appliqués et du statut socio-économique. Plus celui-ci est élevé, plus les apports sont satisfaisants ; l'auto-supplémentation n'est pas rare (Succari et Cals, 1998). Dans les études où la sélection de la population est moins rigoureuse, les apports peuvent être inférieurs aux ANC, en particulier pour les vitamines B₁, B₆, C et D.

L'autre méthode d'évaluation est la détermination des concentrations sanguines qui permettent de détecter les éventuelles carences biochimiques. La prévalence des carences biochimiques est importante en ce qui concerne les vitamines B₂, B₆, C et D. Le pourcentage de sujets carencés en vitamine D peut atteindre 50 %, même dans les populations en bonne santé.

STATUT VITAMINIQUE DES SUJETS ÂGÉS

Vitamine A

La vitaminémie A du sujet âgé n'est pratiquement jamais inférieure à la valeur limite de carence retenue pour l'adulte jeune dans les pays industrialisés. En effet, les réserves hépatiques de vitamine A, qui augmentent avec l'âge en raison d'un accroissement de l'absorption intestinale et d'une diminution de la clairance plasmatique du rétinol et des esters de rétinyl ingérés, compensent des apports irréguliers ou temporairement insuffisants. De ce fait, différents auteurs ont proposé de retenir une valeur seuil de rétinolémie plus élevée chez les sujets âgés que chez les adultes jeunes (0,70 contre 0,35 $\mu\text{mol/L}$).

Des apports en vitamine A trop importants [par exemple, 25 000 UI ou 5 000 μg ER/j (ER : équivalent rétinol)] peuvent donner lieu à des manifestations toxiques non spécifiques - anorexie, perte de poids, céphalées, douleurs osseuses - passant inaperçues. En cas de déficit protéique ou d'insuffisance rénale, le risque de toxicité existe chez le sujet âgé pour des apports de 5 000 UI ou 1 000 μg ER/j. Pour ces raisons, les apports recommandés ont été abaissés chez les sujets de plus de 70 ans : 700 μg ER pour les hommes et 600 pour les femmes.

Vitamine D

L'âge altère le métabolisme de la vitamine D endogène : l'absorption intestinale des vitamines D₂ et D₃ est réduite et, par ailleurs, la synthèse de la vitamine D₃ est moins efficace dans les cellules des couches profondes de l'épiderme en raison d'une diminution avec l'âge de la concentration du 7-déhydrocholestérol.

Le maintien d'un statut adéquat en vitamine D est lié essentiellement aux apports et à l'exposition au rayonnement ultraviolet. Cependant, même quand les apports nutritionnels sont satisfaisants et équilibrés, la prévalence de carences biochimiques en vitamine D peut être élevée chez les sujets âgés. Pour Cals *et al.* (1996), le facteur important à considérer pour expliquer les 48 % de sujets en bonne santé avec des vitamines D inférieures à la valeur limite de carence (25 nmol/L), est la faible exposition à la lumière solaire, surtout chez les femmes âgées : 19 % seulement marchent 1 heure par jour et pratiquent une activité extérieure contre 40 % des hommes. La prévalence de carence biochimique en vitamine D serait encore plus élevée chez les sujets institutionnalisés, de l'ordre de 30 à 90 %. Il a été montré que la carence subclinique en vitamine D chez les hommes de plus de 60 ans était le facteur de risque le plus important de fracture du col du fémur, en raison de la survenue d'un hyperparathyroïdisme secondaire, à l'origine d'une augmentation de perte osseuse.

Une supplémentation de 400 UI/j (1 UI = 0,025 μg) chez des femmes post-ménopausées prévient la diminution saisonnière de la vitaminémie D, l'augmentation concomitante de la PTH et la perte osseuse qui lui est associée. Les apports recommandés doivent être élevés, de 600 à 800 UI/j, et associés à des apports convenables en calcium (1000 mg/j). Chez les hommes, des apports continus de 500 à 600 UI/j semblent suffisants en raison de la pratique d'activités de plein air.

Vitamines antioxydantes

Vitamine E

Les sujets âgés sains ne présentent pas de carences biochimiques en vitamine E, alors même que les apports journaliers sont fréquemment inférieurs aux ANC. Une étude réalisée dans le Val-de-Marne (Hercberg *et al.*, 1991) a en effet montré que 40 à 90 % des sujets de l'enquête se situaient en dessous des apports recommandés. La vitamine E étant transportée par les HDL, LDL et VLDL, l'augmentation générale du cholestérol chez les sujets âgés [intervalles de valeurs fréquentes chez 193 hommes (H) et femmes (F) de plus de 70 ans : H: 4,7-8,0, F: 5,2-8,7 mmol/l vs adultes jeunes : 4,0-6,5 mmol/l] influe sur les valeurs sériques des vitamines liposolubles. Il est donc important de quantifier, et d'augmenter si nécessaire, les AMJ en cette vitamine, étant donné son rôle important dans la protection contre les agressions des espèces radicalaires oxygénées, qui se multiplient au cours du vieillissement.

Carotènes

Le statut biochimique en carotènes est considéré comme normal en ce qui concerne les sujets âgés en bonne santé. Les caroténémies sont fréquemment plus élevées chez les femmes que chez les hommes en raison d'apports plus importants et d'un cholestérol plus élevé : les différences en fonction du sexe disparaissent quand les résultats sont exprimés sous forme de rapport carotènes totaux/cholestérol. Cependant, les valeurs sériques reflètent essentiellement la consommation récente en caroténoïdes et un régime pauvre en ces produits conduit à une diminution très rapide (50 % en deux semaines) de ces valeurs. Par contre, le statut en lycopène, caroténoïde principalement présent dans la tomate et fortement antioxydant, est très fréquemment déficient chez le sujet âgé, en raison d'une diminution de son absorption au cours du vieillissement [valeurs inférieures à la limite de carence (0,25 mmol/l) chez 66 % des sujets d'une population gériatrique tout venant].

Vitamine C

Les apports journaliers en vitamine C sont généralement satisfaisants chez les sujets âgés autonomes et compris entre 58 (France) et 197 (USA) mg/jour. Cependant, ils peuvent être inférieurs aux ANC, c'est le cas de 20 % des sujets dans l'enquête du Val-de-Marne dont les apports se situaient en-dessous des 2/3 recommandés. Le statut biochimique est assez fréquemment déficient, notamment chez les sujets âgés hospitalisés et/ou présentant des désordres cognitifs (vit C < 5mg/l, limite inférieure de l'intervalle de référence, chez 48, 52, et 22,5 % de trois groupes de sujets hospitalisés, l'un sans déficit cognitif, le second atteint de démence vasculaire, le troisième développant une maladie d'Alzheimer) (Morineau *et al.*, 2002).

Intérêt des suppléments en vitamines antioxydantes dans le vieillissement

Différents travaux ont montré qu'une supplémentation en vitamines antioxydantes restaure un statut antioxydant normal chez le sujet âgé présentant des déficits. Ainsi, dans l'étude de Girodon *et al.* (1997), après 6 mois de supplémentation par un mélange vitamine C (120 mg/jour), β -carotène (6 mg/jour) et α -tocophérol (15 mg/jour), le pourcentage de sujets carencés en β -carotène (20 %) et vitamine C (80 %) a diminué de 75 %. Une supplémentation journalière relativement faible (150 mg/jour) en vitamine C pendant 30 jours est d'ailleurs suffisante pour augmenter la concentration plasmatique en cette vitamine de 9,1 $\mu\text{mol/l}$ à environ 40 $\mu\text{mol/l}$. Des apports supplémentaires de 750 mg/jour sont rapidement inefficaces en raison de la saturation du mécanisme d'absorption intestinale de la vitamine C (Birlouez-Aragon *et al.*, 1995).

Vitamines antioxydantes et vieillissement immunitaire

Le vieillissement immunitaire se traduit par des modifications importantes parmi les lymphocytes T (moins de CD3+, plus de cellules *natural killer* et diminution du rapport TH1/TH2), une augmentation de sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, notamment de l'IL-6. Les propriétés antioxydantes de la vitamine E, des carotènes et de la vitamine C pourraient donc avoir des effets bénéfiques sur l'immunité du sujet âgé.

Plusieurs essais de supplémentation en double insu ont été réalisés. Les groupes supplémentés ont reçu entre 60 et 800 mg/j d' α -tocophérol pendant 1 et 8 mois. Une augmentation de la prolifération lymphocytaire, de la réaction d'hypersensibilité retardée cutanée et de la production d'IL2 a été observée (De Waart *et al.*, 1997).

Si la survenue d'affections intercurrentes génère un stress oxydant et donc diminue les moyens de protection antioxydants, les bénéfices d'une supplémentation dans les infections du sujet âgé sont très discutés et diffèrent notamment en fonction de l'état de santé initial de la population, de la prescription et de la durée du traitement (El-Kadiki et Sutton, 2005). Ainsi, après deux ans de supplémentation par le mélange vitamine C (250 mg), β -carotène (7,5 mg) et vitamine E (200 mg/j), une diminution du nombre d'infections et de décès dans le groupe supplémenté (24 et 5 versus 35 et 7 dans le groupe placebo) a été observée (Cynober *et al.*, 2000). Par contre, chez des sujets âgés en bonne santé, une supplémentation par la vitamine E (Graat *et al.*, 2002) ou multivitaminique (Avenell *et al.*, 2005), à doses moins élevées en antioxydants a été sans effet sur la morbidité.

Vitamines antioxydantes, vieillissement cardio-vasculaire et cancer

Les phénomènes oxydatifs jouent un rôle important dans l'athérogenèse. Véhiculés dans le plasma par les lipoprotéines, la vitamine E et les carotènes peuvent donc protéger celles-ci de l'oxydation. La vitamine C, bien que n'étant pas transportée par les lipoprotéines, les protège en éliminant les radicaux $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet\text{OH}$, et ROO^\bullet . De même, les espèces radicalaires oxygénées étant impliquées dans la cancérogenèse, les vitamines antioxydantes ont été étudiées dans la prévention et la survenue de cancers.

Les relations entre statut vitaminique et mortalité globale et/ou cardiovasculaire ont été étudiées chez 11 178 personnes âgées (67-105 ans) autonomes : une réduction significative du risque de mortalité globale et par coronaropathie est apparue dans le groupe supplémenté par la vitamine E et les vitamines E + C (Cynober *et al.*, 2000). En revanche, dans une autre étude où les AMJ en vitamines C et E étaient très supérieurs aux ANC, aucune relation n'a pu être établie entre statut vitaminique et risque de mortalité globale ou spécifique.

En 2003, après une analyse exhaustive des résultats des études réalisées entre 1966 et fin 2001 dans des populations âgées de 45 à 85 ans, les services de prévention américains [*U.S. Preventive Services Task Force*, 2003 (USPSTF)] ont conclu qu'en raison de l'hétérogénéité des résultats, ils ne pouvaient se prononcer pour ou contre l'usage de suppléments vitaminiques (vitamines E, C, E+C, et β -carotène) en prévention des cancers ou des maladies cardiovasculaires. Les travaux récents [*Women's Health Study* (Lee *et al.*, 2005) et Hope-2 Trial (Lonn *et al.*, 2005)], réalisés sur des temps plus longs, ne montrent pas d'effet significatif d'une supplémentation par la vitamine E (400 à 600 UI/J) dans la prévention des maladies cardio-vasculaires et des cancers. Cependant, ils ne sont pas réalisés spécifiquement sur des populations âgées, dont les déficits vitaminiques peuvent être plus importants.

En ce qui concerne les caroténoïdes, l'USPSTF s'est prononcée contre son utilisation, à la suite notamment des études ATBC (Albanes *et al.*, 1995) et CARET (*Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial*) (Omenn *et al.*, 1996) dans lesquelles une incidence plus élevée des cancers bronchiques et des décès a été constatée chez des fumeurs recevant du β -carotène (20 ou 30 mg/j).

Vitamines antioxydantes et vieillissement cognitif

Il est de plus en plus reconnu que les maladies neurodégénératives ont pour origine un stress oxydant induisant des altérations dans la conformation des protéines, la formation d'agrégats protéiques responsables à terme de la neurodégénérescence.

Plusieurs études réalisées chez des patients présentant un *mild cognitive impairment* (MCI) ou une démence, dont les apports recommandés ont été contrôlés, ont montré que les taux des vitamines A, C, E et des caroténoïdes étaient diminués, laissant à penser que le processus de stress oxydant serait à l'origine d'une déplétion particulière en ces molécules. Par ailleurs, il a été démontré un risque plus important de développer une démence chez les patients présentant les valeurs de vitamines anti-oxydantes dans les quartiles les plus bas par rapport à ceux ayant les vitaminémies les plus élevées. Ces données sont à l'origine de nombreux travaux de supplémentation pour évaluer le rôle des vitamines E et C dans la prévention et le développement du MCI et de la maladie d'Alzheimer. Là encore, les résultats sont hétérogènes : tandis qu'un ralentissement de la détérioration fonctionnelle chez des patients Alzheimer recevant des doses très fortes de vitamine E (2 000 UI/J) pendant 2 ans était observé, dans une autre étude, l'utilisation de vitamine E ou C ou E + C n'a pas retardé l'incidence de la maladie (Fillenbaum *et al.*, 2005). Boothby et Doering (2005) ont conclu qu'en l'absence d'essais randomisés contrôlés avec bénéfices, une supplémentation par la vitamine E ne pouvait pour le moment être recommandée pour la prévention de la maladie d'Alzheimer.

Vitamines du groupe B

Thiamine (B₁)

La prévalence de la carence en vitamine B₁ est très variable, selon les enquêtes, chez le sujet âgé. L'étude *Euronut Seneca* (1992) a montré que 8 à 42 % des sujets ont des apports inférieurs aux ANC ; il s'agit essentiellement de sujets dénutris ou consommateurs d'alcool. La plupart des sujets âgés en bonne santé ont un apport de vitamine B₁ proche ou supérieur à l'apport nécessaire (0,5 mg/1000 kcal) pour permettre une saturation tissulaire en thiamine. En utilisant le dosage sérique comme marqueur, on estime que 3 à 15 % des sujets ont un déficit en thiamine. Une alimentation équilibrée et suffisante couvre normalement les ANC (1,3 mg/j).

Riboflavine (B₂)

Les apports sont généralement suffisants pour couvrir les besoins d'une population âgée autonome, ainsi que l'a montré l'examen du statut biochimique des sujets sélectionnés.

La prévalence d'hypovitaminose varie entre 0 et 15 %, tous les sujets concernés ayant alors des apports alimentaires bas. Il faut que l'alimentation apporte au moins 0,5 mg/1000 kcal pour éviter une déplétion des stocks de l'organisme, ce qui est assuré par une alimentation variée. Généralement, les populations âgées des pays à faible production de produits laitiers présentent les risques les plus élevés de faible consommation de vitamine B₂, et ceci concerne surtout les pays du Sud de l'Europe.

Pyridoxine (B₆)

Des apports inférieurs aux apports recommandés, associés à des besoins augmentés, ont été rapportés chez les sujets âgés ambulatoires. Dans *Euronut 2* (1996), parmi les 546 sujets de 74 à 76 ans étudiés, 27 % des hommes et 42 % des femmes ne consommaient pas les ANC et 22 % de la population présentaient des concentrations plasmatiques basses en vitamine B₆. Les suppléments ne corrigent le statut qu'avec de fortes doses (10 à 20 fois les ANC).

Il semble que les apports recommandés soient trop faibles chez les sujets âgés, d'autant que les études d'intervention montrent des résultats intéressants sur le plan immunitaire et des fonctions cognitives, la vitamine B₆ intervenant dans le métabolisme de l'homocystéine, elle-même impliquée dans les désordres cognitifs et les maladies cardiovasculaires.

Les apports et les besoins sont étroitement liés à l'apport en protéines. Ceci explique qu'en cas de déficit en protéines (dont la fréquence est non négligeable dans la population âgée ambulatoire française), il existe une carence associée en vitamine B₆, d'où la prévalence de l'hypovitaminose.

Folates (B₉)

La carence en folates est très fréquente dans la population âgée institutionnalisée. Par contre, chez les sujets âgés ambulatoires en bonne santé, les déficits sévères en folates globulaires ne sont que de 1,5 %, avec 9 % de déficits marginaux.

Des travaux récents concernant le métabolisme des folates, de l'homocystéine et la prévention des maladies cardiovasculaires, montrent qu'un apport de 350 µg de vitamine B₉/100 g de céréales réduit de 5 % le risque de sténose carotidienne et de 9 % le risque coronarien. D'autres travaux montrent également l'étroite relation entre les déficits en folates (mais aussi en vitamines B₆, B₁₂ et vitamines antioxydantes) et les troubles du comportement chez les sujets âgés (Cynober *et al.*, 2000).

L'analyse de la ration alimentaire journalière et des performances cognitives [*Mini-Mental State Examination de Folstein* (MMSE) et *Pfeiffer's Mental Status Questionnaire* (PMSQ)] de sujets âgés ambulatoires a montré que les sujets ayant un MMSE > 28 et aucune erreur au PMSQ avaient des AMJ en vitamine C, folates et β-carotène supérieurs à ceux des autres sujets (Ortega *et al.*, 1997). De même, chez des sujets vieillissant de haut niveau d'éducation, vivant à domicile, indemnes de dysfonctionnements cognitifs et suivis pendant 6 ans, des relations significatives ont été observées entre les capacités d'abstraction de certains d'entre eux, leurs apports alimentaires et leur statut en thiamine, niacine, riboflavine et folates. Pour ces raisons, chez les sujets âgés, les ANC en folates ont été augmentés à 400 µg/j.

Cobalamines (B₁₂)

Il a été rapporté que chez les sujets âgés en bonne santé, le statut vitaminique en vitamine B₁₂ était soit semblable à celui des sujets jeunes, soit très modérément altéré. Selon les études et la sélection effectuée, la prévalence des déficits en vitamine B₁₂ varie de 2,6 à 14 % dans les populations âgées. Le déficit peut avoir pour origine un défaut d'apport alimentaire ou la prévalence de gastrites atrophiques.

La vitamine B₁₂ est, comme les folates, très impliquée dans le métabolisme de l'homocystéine, son déficit induisant une hyperhomocystéinémie, d'ailleurs réversible par supplémentation en folates et vitamine B₁₂. L'association déficit en vitamine B₁₂/hyperhomocystéinémie est un facteur indépendant de risque cardiovasculaire. Enfin, les apports alimentaires en folates et vitamine B₁₂ nécessaires à la prévention d'une anémie sont moins importants que ceux nécessaires au maintien des concentrations normales d'homocystéine.

CONCLUSION

Cette revue nous a montré que le statut vitaminique des sujets âgés varie selon les vitamines considérées et surtout en fonction, non seulement de l'état de santé des sujets considérés, mais également de leurs conditions de vie. En raison des nombreuses propriétés des vitamines susceptibles d'agir sur le vieillissement ou les processus qui lui sont liés, de nombreux travaux, études de cohorte ou essais d'intervention, ont été réalisés. Cependant, les résultats, en termes de restauration de différentes fonctions, réduction des risques et efficacité clinique sont hétérogènes et plutôt décevants. D'autres essais doivent être effectués ou sont en cours sur des populations mieux sélectionnées et sur des durées plus longues qui permettront peut-être de conclure plus positivement.

Références bibliographiques

- Albanes D, Heinonen OP, Huttunen JK et al.** (1995). Effects of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on cancer incidence in the Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Cancer Prevention Study. *Am J Clin Nutr*, **62 suppl** : 1427S-1430S.
- Avenell A, Campbell MK, Cook JA et al.** (2005). Effect of multivitamin and mineral supplements on morbidity from infections in older people (MAVIS trial): pragmatic, randomised, double blind, placebo controlled trial. *BMJ*, **331** : 324-329.
- Birlouez-Aragon I, Girard F, Ravelontseho L et al.** (1995). Comparison of two levels of vitamin C supplementation on antioxidant vitamin status in elderly institutionalized subjects. *Internat J Vit Nutr Res*, **65** : 261-266.
- Boothby LA, Doering PL** (2005). Vitamin C and vitamin E for Alzheimer's disease. *Ann Pharmacother*, **39** : 2073-2080.
- Cals MJ, Bories PN, Devanlay M et al.** (1996). Intervalles de référence et profil biologique d'une population de sujets âgés en bonne santé habitant la région parisienne. *Ann Biol Clin*, **54** : 307-315.
- Cynober L, Alix E, Arnaud-Battandier F et al.** (2000). Apports nutritionnels conseillés chez la personne âgée. *Nutr Clin Metabol*, **14 suppl1** : 3 – 60.
- De Waart FG, Portengen L, Doekes G et al.** (1997). Effect of 3 months vitamin E supplementation on indices of the cellular and humoral immune response in elderly subjects. *Br J Nutr*, **78** : 761-774.
- El-Kadiki A, Sutton AJ** (2005). Role of multivitamins and mineral supplements in preventing infections in elderly people: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*, **331** : 137-143.
- Fillenbaum GG, Kuchibhatla MN, Hanlon JT et al.** (2005). Dementia and Alzheimer's disease in community-dwelling elders taking vitamin C and/or vitamin E. *Ann Pharmacother*, **39** : 2009-2014.
- Girodon F, Lombard D M, Galan P et al.** (1997). Effect of micronutrient supplementation on infection in institutionalized elderly subjects: a controlled trial. *Ann Nutr Metab*, **41** : 98-107.
- Graat JM, Schouten EG, Kok FJ** (2002). Effect of daily vitamin E and multivitamin-mineral supplementation on acute respiratory tract infections in elderly persons: a randomized controlled trial. *JAMA*, **288** : 715-721.
- Hercberg S, Preziosi P, Galan P et al.** (1991). Apports nutritionnels d'un échantillon représentatif de la population du Val-de Marne : III. Les apports en minéraux et vitamines. *Rev Epidém et Santé publique*, **39** : 245-261.
- Lee IM, Cook NR, Gaziano JM et al.** (2005). Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial. *JAMA*, **294** : 56-65.
- Lonn E, Bosch J, Yusuf S et al.** (2005). Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *JAMA*, **293** : 1338-1347.
- Morineau G, Succari M, David PH et al.** (2002). Nutritional status and dementia in elderly subjects. *Clin Chem Lab*, **40** : A 91.
- Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD et al.** (1996). Effects of a combination of beta-carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med*, **334** : 1150-1155.

Ortega R, Requejo AM, Andres P et al. (1997). Dietary intake and cognitive function in a group of elderly people. *Am J Clin Nutr*, 66 : 803-809.

SENECA Investigators (1991). Nutritional status: blood vitamins A, E, B6, B12, folic acid and carotene. *Eur J Clin Nutr*, 45 : 63-82.

SENECA Investigators (1996). Changes in the vitamin status of elderly Europeans: plasma vitamins A, E, B-6, B--12, folic acid and carotenoids. *Eur J Clin Nutr*, 50 suppl. 2 : S32-S46.

Succari M, Cals MJ. Influence du vieillissement normal et pathologique sur le statut vitaminique. *In* : Le Moel G (1998). *Le statut vitaminique : physiopathologie, exploration biologique et intérêt clinique*. Editions médicales internationales, 355-370.

U S Preventive Services Task Force (2003). Routine vitamin supplementation to prevent cancer and cardiovascular disease: recommendations and rationale. *Ann Intern Med*, 139 : 51-55.

Vitamine, grossesse et prématurité



Dominique Bouglé, Michel Vidailbet

VITAMINES ET GROSSESSE

Aspects généraux

Le nombre de travaux dévolus au sujet nous oblige à privilégier les références à des revues générales. Malgré cette abondance, les connaissances restent parcellaires, particulièrement en ce qui concerne les modalités de transport transplacentaire et les mécanismes d'action des vitamines chez l'embryon et le fœtus. Un statut vitaminique optimal est particulièrement important. Dans les pays pauvres, la cause essentielle des défauts d'apports vitaminiques est le manque d'aliments d'origine animale comme le lait, les laitages, la viande, le poisson, les œufs, mais, dans les pays industrialisés, les régimes restrictifs et/ou déséquilibrés suivis par un grand nombre de jeunes femmes, le tabagisme, la consommation d'alcool, de drogues, ou de certains médicaments, peuvent être à l'origine de déficits. Certains polymorphismes géniques, altérant l'absorption, le métabolisme ou l'action de telle ou telle vitamine (B₉ et B₁₂ en particulier) conduisent à un statut insuffisant. Cette prédisposition particulière peut être aussi le fait d'auto-anticorps à l'égard de récepteurs vitaminiques.

D'une façon générale, et à l'exception de la vitamine E, les concentrations plasmatiques des vitamines chez la femme enceinte diminuent en cours de grossesse (Bruinse et Van den Berg, 1995). Cette diminution est, au moins partiellement, liée à l'hémodilution, peut être à une augmentation de la clairance rénale, mais surtout à une séquestration des vitamines par le fœtus. Ces concentrations se normalisent rapidement chez la mère, dans le post-partum, à l'exception des vitamines B₆ et B₉ qui se normalisent lentement.

Évolution selon le stade de la grossesse

Avant la grossesse

Avant même le début de la grossesse, certaines vitamines pourraient jouer un rôle dans la fertilité et la maturation des ovocytes et la formation des ovules pourraient en dépendre (Asworth et Antipatis, 2001). Ainsi, les accidents de la mitose réductionnelle, la non disjonction de 2 chromosomes 21, 13 ou 18, au stade diplotène de la méiose, pourraient être corrigés par une supplémentation vitaminique ; mais les études comparant la fréquence des trisomies 21, selon qu'il y a eu ou non supplémentation, ont donné des résultats contradictoires (Botto *et al.*, 2004 ; Czeizel et Puho, 2005).

Début de l'embryogenèse

Par la suite, dès le début de l'embryogenèse, les études expérimentales ont montré la nécessité des vitamines dès les premiers stades, avant et après la nidation (vitamines A, E, B₂, B₅, B₉, B₁₂) et surtout durant l'organogenèse (vitamines A, E, B₂, B₆, B₉, B₁₂) (Asworth et Antipatis, 2001). Chez l'homme, l'implication particulière de la vitamine A, par son métabolite actif, l'acide rétinoïque, est démontrée depuis longtemps, qu'il s'agisse de malformations induites par une carence ou par un excès d'apport. Depuis le début des années 90 a été souligné le rôle joué par un déficit en acide folique dans la survenue de malformations sévères et fréquentes (1/1000 naissances) myélo-méningocèles et anencéphalies, dues à un défaut de fermeture du tube neural (DFTN), malformations précoces, dès 4 à 5 semaines de grossesse, à une période où la femme ignore encore, le plus souvent, qu'elle est enceinte.

Durant la période fœtale

Durant la période fœtale, la croissance très rapide du fœtus, la synthèse et le renouvellement protéiques très actifs nécessitent des apports vitaminiques suffisants (en particulier A, B₁, B₂, PP, B₆, B₈, B₉, B₁₂, C et D) ; cette dépendance à l'égard du statut vitaminique maternel se poursuit après la naissance chez l'enfant nourri au sein.

Après la naissance

Après la naissance, une carence vitaminique maternelle, n'ayant induit chez la mère aucune pathologie cliniquement apparente, peut s'extérioriser chez le nouveau-né. Il en est ainsi de la carence en vitamine D, n'induisant généralement pas d'hypocalcémie maternelle grâce à la réaction parathyroïdienne et se révélant, chez l'enfant, par des accidents d'hypocalcémie (Hellouin de Menibus *et al.*, 1990).

Accidents materno-fœtaux du dernier trimestre de la grossesse

Une question est de savoir si une supplémentation en micronutriments minéraux et vitaminiques pourrait réduire la fréquence de pathologies propres à la grossesse, pré-éclampsie, éclampsie, hématome rétro-placentaire et de pathologies fœtales telles que le retard de croissance intra-utérin (RCIU) et la prématurité. La fréquence des RCIU est élevée dans les pays du tiers-monde où elle

concerne 15 à 50 % des nouveau-nés, alors qu'elle n'affecte que 5 % des enfants des pays industrialisés (Keen *et al.*, 2003). De même, la mortalité maternelle est beaucoup plus élevée dans les pays du tiers-monde où elle peut atteindre 500 pour 100 000 naissances alors qu'elle est de 5 pour 100 000 dans les pays industrialisés (Keen *et al.*, 2003). Dans cette situation, il est important de rappeler qu'une supplémentation en vitamine A (ou en bêta-carotène) a pu réduire la mortalité maternelle de 40 % au Népal, et qu'une supplémentation en vitamines C et E pourrait réduire la fréquence des pré-éclampsies (Chappell *et al.*, 1999).

Pour la pré-éclampsie, dont l'étiologie exacte reste mystérieuse, beaucoup de facteurs, inflammation, production de cytokines, dyslipémie, hyperhomocystéinémie, défaut d'apport calcique, déséquilibre entre thromboxane et prostacycline, ont été mis en cause. Au cours de la grossesse, il existe une production accrue de pro-oxydants, contre-balançée par une synthèse accrue d'antioxydants (Toescu *et al.*, 2002). Une théorie actuelle met en cause le stress oxydatif résultant d'une production excessive de radicaux libres. Un travail récent, montrant une excrétion urinaire accrue d'isoprostane et une production diminuée d'antioxydants, avant l'apparition des signes de pré-éclampsie, milite pour un rôle étiologique du stress oxydatif (School *et al.*, 2005). Deux études ont montré, l'une la possibilité d'augmenter les taux plasmatiques de vitamine E grâce à une supplémentation spécifique (Pressman *et al.*, 2003), l'autre une diminution de l'incidence des pré-éclampsies chez les femmes supplémentées en vitamine C et E à partir du deuxième trimestre de grossesse (8 % versus 17 % dans le groupe placebo) (Chappell *et al.*, 1999). En fait, 2 évaluations reprenant de façon critique les études de supplémentation en vitamine E et en vitamine C (Rumbold et Crowther, 2005 : CD 004069 et CD : 004072), isolées ou associées, concluent qu'à l'heure actuelle rien ne justifie ces suppléments chez les femmes enceintes, qu'elles soient ou non à risque de pré-éclampsie.

Un autre facteur, impliquant 3 vitamines, et qui a été mis en cause dans certaines pathologies de la grossesse, comme les avortements à répétition, l'éclampsie, l'hématome rétro-placentaire, le RCIU, les morts *in utero*, les thromboses veineuses, est l'hyperhomocystéinémie (Aubard *et al.*, 2000). Des déficits en vitamines, cofacteurs des enzymes permettant la reméthylation de l'homocystéine en méthionine ou sa transsulfuration en cystathionine, à savoir les vitamines B₉, B₁₂ et B₆ peuvent être en cause. Ces déficits pourraient être favorisés par des polymorphismes géniques concernant ces enzymes [polymorphismes 677 C>T et 1298 A>C de la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR), polymorphisme 66 A>C de la méthionine synthase réductase (MTRR), polymorphisme 1420 C>T de la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT), polymorphisme 844 ins 68 de la cystathionine bêta-synthase (C β S)], les protéines impliquées dans la captation cellulaire de l'acide folique (protéine RFC1 : polymorphisme 80 G>A) ou le transport de la B₁₂ (transcobalamine : polymorphisme 776 C>G). Ces déficits peuvent encore être liés à des thérapeutiques interférant avec le métabolisme des folates, ou à des auto-anticorps contre leurs récepteurs cellulaires. Dans ces situations, une hyperhomocystéinémie peut apparaître à l'égard de laquelle une forte dose d'acide folique (de 0,5 à 15 mg/jour), associée ou non à de la vitamine B₁₂ et de la vitamine B₆, peut s'avérer efficace. La recherche d'une hyperhomocystéinémie devrait donc être systématique en présence de pathologies telles qu'avortements à répétition, pré-éclampsie, hématome rétro-placentaire. Le tabagisme favorise également le développement d'une hyperhomocystéinémie (Van Wersch *et al.*, 2002).

La vitamine B₉

Si les hypothèses ne manquent pas pour expliquer l'efficacité de l'acide folique dans la prévention des malformations sévères consécutives à un DFTN (synthèse de la thymine, méthylation de l'ADN, baisse de l'homocystéine, etc.), le mécanisme exact n'en est pas encore compris. Ce rôle particulier de l'acide folique dans la survenue de ces malformations a été découvert, en 1964, par Hibbard qui mit en évidence une fréquence anormale d'anomalies du métabolisme des folates chez les mères d'enfants porteurs de ces malformations, travaux confirmés par Smithells l'année suivante (Butterworth et Bendich, 1996). Ce dernier montra, 10 ans plus tard, que les femmes concernées avaient, durant le 1^{er} trimestre de la grossesse, des folates érythrocytaires abaissés, résultats confirmés par Hall et Kirke (Butterworth et Bendich, 1996). D'autres auteurs comme Magnus, Weeks, Adams mettaient plutôt en avant un déficit en vitamine B₁₂ ; certains enfin comme Mills, Steegers-Theunissen mettaient en évidence une hyperhomocystéinémie pouvant impliquer l'une ou l'autre des deux vitamines (Butterworth et Bendich, 1996). En l'absence fréquente d'un déficit d'apport vitaminique patent, c'est à des perturbations du métabolisme ou de l'activité de l'acide folique liées à des polymorphismes génétiques (énumérés dans le paragraphe précédent) que l'on a essayé de rattacher une tératogénèse susceptible d'être prévenue, dans la moitié des cas, par une supplémentation en acide folique. Le plus étudié a été le polymorphisme 677 C>T de la MTHFR, mais avec des résultats contradictoires. L'association de deux polymorphismes comme le polymorphisme 677 C>T et le polymorphisme 1298 A>C de la MTHFR entraîne par contre un risque élevé (Relton *et al.*, 2004) et serait aussi responsable d'avortements spontanés (Shane, 2003). Plus récemment, un mécanisme auto-immun a été mis en cause, Rothenberg *et al.* (2004) ayant mis en évidence, chez 9 femmes sur 12 ayant eu un premier enfant atteint de DFTN, des anticorps anti-récepteurs de l'acide folique, dont la pathogénicité a été démontrée chez l'animal.

De 1981 à 1996, six études interventionnelles utilisant l'acide folique (seul ou en association dans un mélange multivitaminique) à des doses allant de 0,36 à 4 mg/jour ont démontré son effet préventif vis-à-vis d'une récurrence, chez les femmes ayant déjà eu un enfant atteint de DFTN. L'étude diligentée par le *Medical Research Council* a même démontré, dans cette situation, la supériorité de l'acide folique seul à la dose de 4 mg/jour, par rapport à un mélange multivitaminique n'en apportant que 0,36 mg/jour (Butterworth et Bendich, 1996). Même à cette dose pharmacologique, de 4 mg/jour, 30 % des DFTN s'avèrent rebelles à l'acide folique.

Cette efficacité préventive, remarquable vis-à-vis des récurrences, conduisit à l'évaluer dans la population générale des femmes gestantes. Butterworth et Bendich (1996) ont repris ainsi six études rétrospectives cas/contrôles, une étude rétrospective conduite chez 22 000 femmes et surtout l'importante étude hongroise interventionnelle, conduite pendant 8 ans et comparant 2471 femmes recevant un mélange multivitaminique apportant 0,8 mg/j d'acide folique à 2391 femmes recevant un placebo. Toutes ces études ont montré une importante réduction du risque de DFTN. Par ailleurs, les résultats ont montré une certaine efficacité préventive vis-à-vis d'autres malformations, comme les malformations cardio-vasculaires ; l'efficacité préventive vis-à-vis des fentes labio-palatines ou des syndromes polymalformatifs est plus controversée (Czeizel, 2004 ; Rouget *et al.*, 2005).

Toutes ces données ont conduit certaines autorités de santé, comme aux USA et au Canada, à recommander un apport quotidien de 0,4 mg/jour d'acide folique en période péri-conceptionnelle. La moitié des grossesses environ n'étant pas planifiée et 9 % des DFTN correspondant à des cas isolés, il apparaissait nécessaire de compléter toutes les jeunes femmes en âge de procréer. Trois méthodes étant envisageables : une incitation forte de toutes les jeunes femmes en âge de procréer à modifier suffisamment leur comportement alimentaire pour consommer les folates nécessaires, une supplémentation médicamenteuse de toutes ces femmes, ou enfin la supplémentation d'un aliment de base, largement consommé comme les farines de céréales. Les deux premières méthodes ayant fait la preuve de leur insuffisance (Ward *et al.*, 2004), la troisième fut retenue. Cependant, la crainte d'éventuels effets négatifs pour d'autres segments de la population, en particulier le risque de masquer les signes hématologiques révélateurs d'un déficit en vitamine B₁₂ (Shane, 2003) conduisirent les autorités à retenir une supplémentation des céréales à hauteur de 1,4 à 1,5 ppm (*US Food and Drug Administration*, 1996) permettant d'espérer un apport supplémentaire moyen de 100 µg par jour sans dépasser 1 mg chez les grands consommateurs (Shane, 2003). Plusieurs publications nord-américaines ont confirmé depuis l'efficacité de cette mesure, effectivement mise en route en janvier 1998, avec une réduction des DFTN de 2,5 à 1,12 %. Aucun effet négatif n'a été observé malgré les millions de Nord-américains ayant consommé les produits ainsi enrichis. Différents auteurs ont souligné au contraire d'autres effets qui pourraient en être espérés, dont la réduction des anémies carencielles et la diminution des hyperhomocystéinémies pouvant faire espérer, d'après Wald *et al.* (2002), une réduction de 25 % des accidents vasculaires cardiaques et cérébraux. Cependant, la comparaison avec une étude chinoise (Berry *et al.*, 1999) ayant pu ramener la fréquence des DFTN à 0,6 % avec une supplémentation quotidienne de 0,4 mg/jour a conduit certains auteurs à estimer que la supplémentation instituée aux USA et au Canada était quantitativement insuffisante et devrait être portée à 2,5 ppm, la fréquence des DFTN persistants à 1,25 % étant encore 2 fois trop élevée (Oakley, 2003). En fait, le niveau d'enrichissement à retenir reste l'objet de débats, d'autres auteurs estimant que les résultats obtenus vis-à-vis des DFTN sont sous estimés et que la supplémentation obtenue est en fait double (200 µg/jour) de celle initialement espérée (Shane, 2003).

En France, un groupe de travail diligenté par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) a proposé la mise en place d'un programme pilote de supplémentation des farines dans la région Alsace qui permettrait d'évaluer sur 5 ans bénéfices et risques d'une telle supplémentation (Czernichow *et al.*, 2004). Le bien fondé de cet enrichissement systématique des farines risque d'être remis en cause par la publication récente d'un travail épidémiologique suédois portant sur 85 000 adultes et montrant un risque significativement plus faible de cancers colo-rectaux chez les sujets ayant des folatémies basses (Van Guelpen *et al.*, 2006). En attendant la décision qui sera prise, dans les pays comme la France qui ne la pratiquent pas, il faudrait engager les femmes en âge et en situation de procréer à consommer 0,4 mg/jour sous forme d'aliments riches en acide folique et/ou une supplémentation médicamenteuse (Oakley *et al.*, 2004).

En dehors de l'intérêt de la supplémentation en folates dans la prévention des DFTN et d'autres malformations, différents travaux ont insisté sur son intérêt dans la prévention de la prématurité dont le risque est plus élevé quand l'apport quotidien est inférieur à 500 µg/jour (risque relatif de 1,8 ; intervalle de confiance : 1,4 à 2,6) (Siega-Riz *et al.*, 2004)

Vitamine A

L'implication majeure de la vitamine A dans le développement de l'embryon est connue depuis les années 30 et sa carence a été le premier exemple de tératogénèse nutritionnelle induite expérimentalement. Les malformations intéressent le système nerveux central, le massif cranio-facial, les yeux, les oreilles, le thymus, le cœur, les poumons et les organes génitaux et ceci dans un grand nombre d'espèces animales (Maden, 2001). Le caractère tératogène de son excès a été démontré 20 ans plus tard, dans les années 50, avec un spectre de malformations assez proche, ainsi que de celui induit par un de ses dérivés métaboliques, l'isotrétinoïne (acide 13-*cis*-rétinoïque) utilisé dans le traitement des acnés et hautement tératogène (Lammer *et al.*, 1985). La sensibilité particulière du cerveau postérieur et des structures dérivées de la crête neurale, avec une relation effet/dose, a même permis à Hendrickx *et al.* (2000) de définir, chez le macaque des doses limites : celle à laquelle on n'observe encore aucun effet délétère (NOAEL) et celle à laquelle on commence à en observer (LOAEL), respectivement 7500 et 20 000 UI/kg/jour. Le métabolite actif du rétinol, l'acide rétinoïque se lie à 2 classes de récepteurs, les récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR) et les récepteurs X des rétinoïdes (RXR), chacune comportant 3 types distincts α , β et γ . Activés par l'acide rétinoïque ceux-ci forment différents hétérodimères (par exemple RAR α /RXR β) qui se lient à des séquences de DNA spécifiques, en amont du promoteur du gène appelées "*retinoic and response element*". L'acide rétinoïque active, ou inhibe, l'expression de nombreux gènes, comme les gènes HOX, intervenant ainsi dans l'embryogénèse, l'établissement de la polarité axiale, les différenciations cellulaires, l'organogénèse (Azais-Braesco et Pascal, 2000). Les études au moyen de souris "knock-out" pour un ou plusieurs de ces gènes, ou les gènes qui codent pour les enzymes responsables de la synthèse et du catabolisme de l'acide rétinoïque, montrent la complexité et le caractère parfois surprenant des phénotypes obtenus (Maden, 2001). L'importance d'un apport alimentaire adapté de vitamine A, pour assurer un développement embryonnaire, adéquat, et les risques d'un apport excessif, apparaissent aujourd'hui évidents et contrastent avec l'absence de tératogénéicité de ses précurseurs caroténoïdes, comme le bêta-carotène. Certains ont émis l'hypothèse que des déficits modérés en acide rétinoïque pourraient entraîner des altérations du cerveau antérieur pouvant s'exprimer beaucoup plus tard par une schizophrénie (Maden, 2001).

Les données épidémiologiques vont dans le même sens que les données expérimentales. Dans les pays du tiers-monde l'inquiétude porte surtout sur les déficits en vitamine A, non seulement dans la période embryonnaire, mais aussi plus tard, en raison des morbidité et mortalité materno-fœtales. Les rôles essentiels joués par la vitamine A dans l'hématopoïèse, les défenses anti-infectieuses, expliquent les complications materno-fœtales de la carence en vitamine A.

Cinq études interventionnelles, ayant touché 23 426 femmes dans le tiers-monde, ont été analysées par van der Broek *et al.* (2002). Celle conduite au Népal a montré une réduction de la mortalité maternelle et de la cécité nocturne. Celle conduite en Indonésie a montré, chez les femmes enceintes anémiques, une correction de l'anémie dans 35 % des cas dans le groupe supplémenté en vitamine A, dans 68% des cas dans le groupe supplémenté en fer et dans 97 % des cas dans le groupe ayant bénéficié de ces deux suppléments, contre 16 % dans le groupe placebo. Deux études conduites au Malawi n'ont pas retrouvé ces résultats et les auteurs de l'analyse ont conclu à la nécessité d'autres études avant de pouvoir conclure.

Dans les pays industrialisés, au contraire, l'accent est mis sur les risques d'apports excessifs, non seulement par des compléments vitaminiques intempestifs, mais aussi par certains aliments comme les foies de veau ou de volaille dont la teneur en vitamine A est élevée (Azais-Braesco et Pascal, 2000) amenant à recommander, aux femmes en âge et en situation de procréer, de ne pas en consommer plus d'une fois par semaine.

L'étude épidémiologique de Rothman *et al.* (1995) portant sur près de 23 000 femmes enceintes a montré qu'au-delà de 10 000 UI/j la supplémentation en vitamine A augmentait le risque malformatif de 4,8 fois (intervalle de confiance : 2,2 à 10,5) par rapport aux femmes n'en consommant que 5 000 UI/j ou moins. Azais-Braesco et Pascal (2000) résument les recommandations de l'OMS qui tiennent surtout compte des problèmes posés dans le tiers-monde de la façon suivante :

- Durant la grossesse, une supplémentation quotidienne ne doit pas dépasser 10 000 UI/jour [3 000 équivalents-rétinol (ER)] et une supplémentation hebdomadaire, 25 000 UI.
- Durant les six premiers mois suivant la grossesse, la supplémentation est plus sûre si la mère allaite ce qui réduit la fertilité. Sinon, une supplémentation donnée au-delà de 6 semaines après l'accouchement, ne doit pas dépasser 10 000 UI par jour.
- Durant ses six premiers mois de vie, un nourrisson peut recevoir une supplémentation de 50 000 UI en une prise ou, mieux, fractionnée en deux prises de 25 000 UI, quand il n'est pas nourri au sein.

Un recours au bêta-carotène s'avère aussi efficace que la vitamine A, sans en comporter les risques.

Vitamine D

La vitamine D joue un rôle important dans la minéralisation du squelette fœtal qui nécessite une accréation quotidienne de 200 mg de calcium durant le dernier trimestre de la grossesse, la quantité totale de calcium fixée par le fœtus étant de 30 grammes (Salle *et al.*, 2000). Celui-ci est totalement dépendant de sa mère pour son approvisionnement en vitamine D (D₃ ou cholécalciférol et D₂ ou ergocalciférol) et en 25 hydroxyvitamine D [25 OH (D)]. Celle-ci traverse le placenta, avec une très bonne corrélation des valeurs maternelles et fœtales, ces dernières se situant légèrement en dessous des valeurs maternelles (Salle *et al.*, 2000). La concentration sérique en 25 (OH) D, qui est la forme circulante de la vitamine D et le meilleur indice du statut vitaminique D, dépend de l'ensoleillement cutané et de l'apport oral. L'habillement, la latitude élevée, la pollution atmosphérique, la vie à l'intérieur des habitations expliquent que le cholécalciférol soit devenu une vitamine. En dehors de quelques produits de consommation peu courante comme l'huile de foie de morue, les aliments même les plus riches (lait, œuf, poisson) ont une teneur en vitamine D trop faible pour satisfaire aux besoins et une supplémentation soit médicamenteuse (quotidienne ou trimestrielle par doses de charge), soit par fortification d'aliments adaptés comme le lait et les laitages, est devenue indispensable.

En France, l'enrichissement des laits adaptés pour nourrissons et enfants en bas-âge n'a été commencé qu'à partir de 1991 et celle des laits et des produits laitiers frais de grande consommation que depuis octobre 2001. Encore cette dernière ne touche-t-elle qu'une fraction de ces laits avec une

consommation par les femmes enceintes insuffisante. Mc Kenna (1992) considère qu'on peut distinguer deux types de pays industrialisés : ceux d'Amérique du Nord et de Scandinavie où le statut vitaminique D est satisfaisant, ceux d'Europe Centrale et Occidentale comme l'Allemagne, la Belgique, la Suisse, les Pays-Bas, le Royaume-Uni et la France où le statut vitaminique D est mauvais. L'enquête SUVIMAX a confirmé, en France, ce mauvais statut vitaminique des adultes (Chapuy *et al.*, 1997). Les taux de 25 OH (D) maternels baissent durant les 10 dernières semaines de grossesse et le statut vitaminique D devient franchement déficient, en l'absence de supplémentation, quand la grossesse s'achève en hiver ou au début du printemps (Salle *et al.*, 2000 Zeghoud *et al.*, 1988). De nombreux travaux ont montré la relation existant entre ces taux maternels et au sang du cordon trop faibles d'une part et les hypocalcémies néonatales d'autre part (Hellouin de Ménibus *et al.*, 1990). Plusieurs travaux ont démontré l'efficacité préventive d'une supplémentation quotidienne de 400 UI/j (Markestad *et al.*, 1986) durant la grossesse ou d'une supplémentation par dose de charge unique de 100 000 ou 200 000 UI au début du 7^{ème} mois (Mallet *et al.*, 1986 ; Zeghoud *et al.*, 1988). Les situations radicalement différentes aux U.S.A. et en France expliquent certainement les différences dans les apports recommandés (Tableau I). Cependant pour certains spécialistes américains les apports recommandés aujourd'hui aux U.S.A. seraient notoirement insuffisants, un apport quotidien 10 fois supérieur aux recommandations américaines (soit 4 000 UI/jour) étant nécessaire aux femmes enceintes pour maintenir leur taux plasmatique de 25 (OH) D à une valeur satisfaisante de 40 ng/ml (Hollis et Wagner, 2004). Cette question est d'autant plus importante que les récents travaux du groupe de Mc Grath (Mc Grath *et al.*, 2004) sur cultures cellulaires et animal entier (rates gestantes) démontrent le rôle du dérivé activé de la vitamine D dans le développement cérébral.

Les autres vitamines, l'inositol et la choline

Le [tableau I](#) indique les apports recommandés en France et aux U.S.A. Les différences les plus marquantes concernent l'acide folique et la vitamine D que nous avons déjà abordés. Pour les autres vitamines, l'augmentation des apports recommandés, liée à la croissance fœtale et à l'augmentation des dépenses énergétiques, est facilement satisfaite par l'alimentation normale.

En ce qui concerne les vitamines C et E, dont on a vu qu'elles ont pu être recommandées par certains en compléments nutritionnels pour aider à prévenir la survenue de pathologies materno-fœtales comme la pré-éclampsie, le RCIU, la prématurité, les analyses faites au niveau de la *Cochrane Data Base Review* (Rumbold et Crowther, 2005 : CD004069 et CD004072) ont montré qu'en l'état actuel, les résultats des études correctement conduites ne justifiaient pas ces propositions.

Il en est de même pour les vitamines B₁₂ et B₆.

En ce qui concerne la vitamine K₁, son faible passage transplacentaire ne permet pas d'espérer une prévention des accidents de la maladie hémorragique néonatale par administration maternelle avant l'accouchement ; cette prévention ne peut donc reposer que sur l'administration de 2 mg de vitamine K₁ à chaque enfant, le jour de sa naissance.

Bien qu'il ne s'agisse pas, à proprement parler, de vitamines il est intéressant d'évoquer aussi l'inositol et la choline.

Tableau I : Comparaison des apports recommandés en France (Apports Nutritionnels Conseillés : ANC) et aux USA (Dietary Reference Intakes : DRI) chez les femmes enceintes.

	A µg ER	D µg	E mg	K µg	B ₁ mg	B ₂ mg	PP mg	B ₅ mg	B ₆ mg	B ₈ µg	B ₉ µg	B ₁₂ µg	B ₁ mg
ANC (2001)	600 : 1 ^{er} et 2 ^e trimestres 700 : 3 ^e trimestre	10	12	45	1,8	1,6	16	5**	2	50**	400	2,6	120
Différence vs ; Femmes adultes non enceintes	+100	+5	0	0	+0,7	+0,1	+5	0	+0,5	0	+100	+0,2	+10
DR (2000)	800*	5	15	65*	1,4	1,4	18	6**	1,9	30**	600	2,6	85
Différence vs ; Femmes adultes non enceintes	0	0	0	0	+0,3	+0,3	+4	+1	+0,6	0	+200	+0,2	+10

* Valeurs correspondant aux "Recommended Dietary Allowances" (RDA, 1989)

** Apports adéquats (*Adequate intake*)

Des travaux récents montrent l'intérêt que pourrait présenter l'inositol, à doses pharmacologiques, dans les formes de DFTN résistant à l'acide folique. Cet espoir repose sur une étude expérimentale chez des souris mutantes pour le gène "curly tail" qui, contrairement aux souris mutantes pour les gènes PAX 3, CART 1 et "crooked tail", sont résistantes à l'acide folique mais sensibles au myo-inositol. Des premiers résultats chez l'homme laissent espérer, qu'à une dose de 500 mg, l'inositol, administré pendant 3 mois avant et 2 mois après le début de la grossesse, pourrait permettre de prévenir la récurrence des DFTN résistants à l'acide folique. Ces résultats préliminaires doivent cependant être confirmés (Cavalli et Copp, 2005).

En ce qui concerne la choline et son métabolite, la bétaine, l'augmentation régulière de la choline plasmatique en cours de grossesse et son caractère prédictif de l'homocystéinémie laisse espérer qu'elle pourrait faciliter la reméthylation de l'homocystéine en méthionine et réduire ainsi les hyperhomocystéinémies (Velzing-Aarts *et al.*, 2005). En fait, la choline est abondante dans l'alimentation (en particulier sous forme de phosphatidyl-choline) et aucune étude interventionnelle n'a jusqu'ici confirmé cet intérêt.

VITAMINES ET PRÉMATURÉ

Le prématuré (PT) présente un risque élevé de carences en raison de la faiblesse voire de l'absence de ses réserves, de son immaturité digestive et de sa croissance accélérée.

De nombreuses publications ont rapporté des cas de carences ou de surdosages ; les données précises sur les besoins réels manquent souvent ; c'est pourquoi les recommandations d'apport sont souvent des estimations faites à partir des besoins des nouveau-nés à terme et de

l'observation de sujets nourris avec les formules commercialisées (*European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition*, 1987 ; *American Academy of Pediatrics*, 1998 ; Klein, 2002) (tableau 2)

Vitamines liposolubles

Vitamine A

Ses fonctions les plus importantes pour le prématuré concernent la différenciation des épithélia, la protection antiradicalaire, et l'utilisation du fer absorbé.

Au cordon, les concentrations de rétinol et de RBP sont égales à 50-70 % de celles de la mère et encore inférieures chez le PT. Le niveau des réserves hépatiques du nouveau né à terme est de 15-40 % de celles de l'adulte ; il est encore inférieur chez le PT.

Seuls les apports alimentaires peuvent donc satisfaire les besoins nutritionnels du PT. La rétinolémie du PT est basse dès les premiers jours de vie, surtout en cas de nutrition parentérale, indiquant une carence ; l'augmentation temporaire qui suit l'exposition à un traitement corticoïde en période périnatale n'a pas de valeur nutritionnelle.

Tableau 2 : Besoins vitaminiques journaliers des prématurés.

	Unités d'expression	ESPGAN, 1987	AAP-CON, 1998	Expert Panel
Vitamine A	µg ER ou UI/100 kcal	90-150 µg ER	75-225 UI	204-380 µg ER
D	Allaités UI	20-40 µg 3/100 ml + 400	- 270/100 kcal	- 75-270/100 kcal
E	/ 100 kcal / g AGPI	0,6 mg 0,9 mg	> 1,1 UI	2-8 mg ET > 1,5
K ₁ (phylloquinone)	Prophylaxie néonatale IM Alimentation : µg/100 kcal Allaités > 1 semaine	0,5-1 mg 4-15 2-3 µg/kg	0,3-1 mg (< 1000 g-1000g) 4 -	- 4,25 -
C	mg/100 kcal	7-40	35	8,3-37
B ₁	µg/100 kcal	20-250	> 40	30-250
B ₂	µg/100 kcal	60-600	> 60	80-260
Niacine (B ₃)	µg/100 kcal	800-5 000	> 250	550-5 000
B ₆	µg/100 kcal µg/100 g protéines	35-250 15	>35 -	30-250 -
B ₁₂	µg/100 kcal	0,15	> 0,15	0,08-0,70
Acide pantothénique	µg/100 kcal	300	> 300	300-1 900
Biotine	µg/100 kcal	1,5	> 1,5	1-37
Acide folique	µg/100 kcal	60	33	-

ESPGAN : *European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition* ; *Committee on Nutrition of the preterm infant*.

AAP-CON : *American Academy of Pediatrics, Committee on Nutrition*.

Expert panel (Klein, 2002).

Une carence en vitamine A peut contribuer au développement de la bronchodysplasie (DBP), en raison de son implication dans la maturation pulmonaire et la différenciation épithéliale. Une rétinolémie basse est ainsi associée à une augmentation du risque immédiat et prolongé (6 mois) de DBP (Spears *et al.*, 2004). Par contraste, seuls des apports parentéraux élevés et répétés de vitamine A (1500-5000 UI, IM, 3/semaine ; 2500 UI, IV, /j, pendant un mois) ont permis d'obtenir une réduction modérée mais significative de la mortalité et de l'incidence des pathologies pulmonaires chroniques à 36 semaines d'âge gestationnel corrigé ; une diminution de la rétinopathie du PT a également été observée de façon inconstante (Atkinson, 2001). Cet effet de la vitamine A sur le développement des pathologies pulmonaires chroniques chez le prématuré est à considérer plus comme un effet pharmacologique que nutritionnel.

Il n'a pas été observé de relation entre le statut en vitamine A et les fonctions visuelles du PT, appréciées par l'électrorétinogramme (ERG), ni avec sa croissance ou la morbidité autre que pulmonaire. Le rôle de la vitamine A dans le métabolisme du fer n'a pas été abordé chez le prématuré.

On note une baisse des vitamines antioxydantes A, E et C au cours de l'ictère du PT, ce qui suggère que le mauvais statut antioxydant du PT serait un facteur favorisant de l'ictère (Turgut *et al.*, 2004).

La vitamine A s'adsorbe sur les parois des systèmes de perfusion et est dégradée par la lumière.

Durant l'hospitalisation, un début précoce d'alimentation digestive, associé à un complément par voie parentérale, tant que l'alimentation par voie digestive n'est pas complète permet de stopper la dégradation du statut en vitamine A.

Après la sortie du service, de nombreux PT continuent à présenter une rétinolémie basse, sans retentissement sur leur croissance.

Toxicité : les seuils de toxicité de la vitamine A ont été peu étudiés chez le PT ; une toxicité chez le nourrisson a été trouvée pour des apports de 800-3 200 µg ER/kg/j pendant 1-3 mois ; des PT ayant reçu des apports quotidiens de 4 000 UI/kg/j pendant 4 semaines avaient des rétinolémies doubles de celles des contrôles non supplémentés et encore plus élevées en cas de traitement corticoïde, sans signe clinique de toxicité.

Apports recommandés : les valeurs en ont été déterminées de façon empirique, essentiellement à partir des données recueillies au cours d'alimentations réalisant différents niveaux d'apports ; les limites inférieures sont celles qui sont connues pour prévenir la dégradation des rétinolémies après la naissance ; les limites supérieures correspondent aux concentrations les plus élevées des laits pour prématurés qui n'ont pas donné de signes de toxicité. Les besoins diminuent certainement au cours du 2^{ème} semestre, sans que des valeurs précises aient pu être formulées.

Vitamine D (Salle *et al.*, 2000)

Comme chez l'enfant plus âgé, les principales fonctions physiologiques de la vitamine D chez le PT sont de maintenir les concentrations de calcium et de phosphore dans des limites qui satisfassent le métabolisme cellulaire, les fonctions neuromusculaires et la minéralisation osseuse.

Le PT dépend uniquement du transfert placentaire en 25(OH) vitamine D et donc des réserves de la mère pour constituer les siennes. Une hypocalcémie néonatale précoce mais de courte durée

touche 75 % des PT dans les premiers jours de vie ; elle a été attribuée à une immaturité de l'activation de la vitamine D et à un hypoparathyroïdisme transitoire ; cependant, à la naissance, les mécanismes d'absorption et le métabolisme de la vitamine D sont fonctionnels chez le PT : dès les premiers jours de vie, l'apport de vitamine D entraîne une augmentation des taux circulants de 25(OH) vitamine D, proportionnelle aux apports et dépassant les valeurs usuelles pour les doses supérieures à 400 UI.

Durant les premières semaines de vie, les besoins en vitamine D nécessaires à l'absorption du calcium par le PT sont minimes car l'absorption du calcium est essentiellement passive et indépendante de l'apport en vitamine D. Il n'y a pas de relation entre la concentration plasmatique de 25(OH) vitamine D et l'absorption de calcium ou de phosphore.

Il est maintenant admis que l'ostéopénie tardive du PT est due à un défaut d'apports en minéraux et n'est pas liée à l'apport ou au métabolisme de la vitamine D. Le suivi des anciens prématurés pendant l'enfance ne montre pas non plus de bénéfice d'apports de vitamine D en période néonatale supérieurs à 500 UI/j (Backstrom *et al.*, 1999).

L'absence d'exposition du PT au soleil et la faiblesse des réserves accumulées pendant la grossesse le rendent dépendant des apports.

Vitamine E (tocophérol)

La vitamine E a essentiellement des fonctions de protection contre les phénomènes de peroxydation : c'est le principal agent de protection des phospholipides des membranes. Les besoins en vitamine E dépendent donc des apports en acides gras essentiels (AGE) constitutifs de ces phospholipides.

Les réserves en vitamine E du PT sont faibles, en liaison avec le développement du tissu adipeux ; à la naissance, les concentrations de vitamine E circulantes sont en moyenne 20-30 % des concentrations maternelles, suggérant une carence ; mais elles sont équivalentes lorsqu'elles sont rapportées aux lipides circulants, car la vitamine E plasmatique est liée aux lipoprotéines.

La vitamine E agit en synergie avec la glutathion peroxydase, qui prévient également l'accumulation de peroxydes ; l'activité de cette enzyme dépend du statut en sélénium ; le radical tocophéryle produit par l'activité de la vitamine E peut être régénéré par des agents réducteurs dont la vitamine C, les thiols, le glutathion.

La vitamine E est donc un excellent exemple des interactions multiples entre les différents constituants de l'alimentation et de la nécessité de leur équilibre.

Le métabolisme de la vitamine E est non seulement influencé par l'apport en AGE qu'elle protège, mais aussi par celui des agents peroxydants, comme le fer, qui augmentent sa consommation par l'organisme. Cependant, si les apports recommandés en vitamine E prennent généralement en compte ses interactions avec le métabolisme des acides gras poly-insaturés et leurs apports, seule la Société Canadienne de Pédiatrie tient compte des apports en fer.

Chez l'enfant et l'adulte, la carence prolongée en vitamine E est responsable de lésions nerveuses progressives.

Dans les années 60, des PT alimentés avec des laits infantiles pauvres en vitamine E, mais riches en AGE et en fer ont développé une hémolyse et un syndrome associant une anémie à des œdèmes ; cette symptomatologie a disparu avec l'enrichissement actuel des laits infantiles pour PT.

Plusieurs pathologies graves du PT sont potentiellement liées ou aggravées par la peroxydation (rétinopathie à l'oxygène, dysplasie broncho-pulmonaire, hémorragie intra-crânienne) ; les effets positifs de la vitamine E dans ces pathologies n'ont été observés qu'à doses pharmacologiques, qui dans certains cas ont été à l'origine de complications propres. Elle diminue le risque d'hémorragies intra-crâniennes, augmente celui d'infections et d'entérocolites ulcéro-nécrosantes et la concentration en hémoglobine ; chez les enfants de très petit poids de naissance, les taux plasmatiques > 3,5mg/100ml sont associés à une augmentation du risque infectieux et à une diminution du nombre de formes graves de rétinopathie du PT (Brion *et al.*, 2003)

En effet, la toxicité de la vitamine E résulte de l'inhibition de synthèse plaquettaire des prostaglandines et de la diminution de l'agrégation plaquettaire.

Les apports réalisés par le lait de mère sont suffisants. Les laits infantiles adaptés actuellement sur le marché donnent également des taux plasmatiques de vitamine E normaux mais la simple augmentation des apports en fer entraîne leur diminution, signant la fragilité du statut en vitamine E du PT.

Vitamine K

La vitamine K est nécessaire à la conversion des résidus d'acide glutamique des protéines en acide γ carboxyglutamique ; en l'absence de vitamine K, les protéines vitamine K-dépendantes sont inactives ; il s'agit des protéines impliquées dans la coagulation et dans la minéralisation osseuse (ostéocalcine).

La synthèse de la vitamine K par la flore digestive, couvre environ 50 % des besoins sauf en cas d'antibiothérapie et d'allaitement au sein. Le renouvellement de la vitamine K est rapide ; le PT est donc exposé aux carences.

Chez le nouveau-né cette carence est responsable de syndromes hémorragiques ; ce risque a quasiment disparu, en raison de l'administration systématique de vitamine K au nouveau-né et à sa poursuite chez le nourrisson au sein.

Bien que la démonstration clinique de la relation entre statut en vitamine K et minéralisation osseuse n'ait pas été étudiée chez le prématuré, il est vraisemblable qu'une carence subclinique puisse la perturber.

Toxicité : il n'a pas été décrit de toxicité de la vitamine K, même à des doses atteignant 500 fois les apports nutritionnels conseillés (ANC).

Recommandations : les PT sont plus sensibles à la carence en vitamine K et à ses complications hémorragiques que le nouveau-né à terme ; il peut être nécessaire d'administrer une deuxième dose prophylactique 5-7 jours après la dose initiale aux PT recevant une alimentation parentérale et des antibiotiques, en raison d'une activité insuffisante du facteur II.

Si les apports recommandés permettent de prévenir les risques hémorragiques, appréciés par le dosage des facteurs de coagulation, on manque de marqueurs fiables de ses autres fonctions.

Vitamines hydrosolubles

Vitamine C

La vitamine C est impliquée dans la synthèse du collagène, le métabolisme de l'adrénaline, du tryptophane et de l'acide folique et dans le métabolisme de la tyrosine ; c'est également un antioxydant plasmatique puissant. Cette propriété et son pouvoir de liaison au fer en font le facteur alimentaire le plus efficace de promotion de l'absorption du fer.

Le transfert placentaire de la vitamine C est le plus élevé durant les dernières semaines de gestation. À la naissance, les taux plasmatiques sont plus élevés chez le PT que chez le nouveau-né à terme ; la signification clinique de leur baisse ultérieure n'est pas établie. Les variations des taux plasmatiques doivent être interprétées avec précaution en période néonatale : des valeurs élevées à la naissance suivies d'une baisse rapide sont souvent observées sans qu'elles correspondent forcément à des variations vraies du statut.

La survenue d'un scorbut ne peut être observée que tardivement, car les réserves sont généralement bonnes à la naissance.

Les besoins du PT sont supérieurs à ceux du nouveau-né à terme en raison de l'apport en protéines élevé et de l'exposition au stress oxydatif lié à l'hyperoxie. Les PT alimentés avec un lait riche en caséine peuvent développer une augmentation des concentrations circulantes et urinaires de la tyrosine et de la phénylalanine ; malgré le rôle de la vitamine C dans le métabolisme de la tyrosine, ses liens avec l'hypertyrosinémie du PT sont complexes ; en effet, seuls des apports élevés de vitamine C (≥ 20 mg/kg/j) augmentent le catabolisme de la tyrosine.

Toxicité : des apports quotidiens de 100 mg ont été donnés pendant de longues périodes (jusqu'à 14 semaines), sans effets secondaires apparents.

Folates

Les enzymes, dont les folates sont le cofacteur, servent d'accepteur des chaînons monocarbonés dans le métabolisme des acides aminés, des polyamines et des nucléotides ; un déficit en folates peut donc perturber la différenciation cellulaire, l'hématopoïèse (surtout en cas de carence associée en vitamine B₁₂), la croissance et le développement, en particulier cérébral.

Il existe un transfert actif des folates de la mère vers le fœtus, mais les réserves du PT ne satisfont ses besoins que pendant quelques semaines. Ces réserves faibles, la fréquence des problèmes digestifs et des infections favorisent la survenue de la carence en folates chez le PT. De plus, l'acide folique est sensible à la lumière (pertes possibles en cours de nutrition entérale continue).

Les besoins sont élevés en raison de la croissance rapide ; ils sont majorés par les médicaments inducteurs hépatiques qui utilisent l'acide folique comme coenzyme, comme les anti-convulsivants.

Une anémie mégalo-blastique, conséquence d'une carence, peut donc être observée chez le PT. Des anomalies morphologiques des globules rouges et surtout la baisse de leur contenu en folates sont des signes plus précoces de carences.

Il n'a pas été décrit de toxicité des folates chez le PT même à des doses dépassant 150 µg/j.

Vitamine B₆

La vitamine B₆ est le cofacteur de nombreuses enzymes impliquées principalement dans le métabolisme des acides aminés (transamination, décarboxylation, transsulfuration de la méthionine en cystéine, métabolisme du tryptophane), la neurotransmission et la synthèse des sphingolipides. Elle joue donc un rôle important dans le développement des fonctions cérébrales du PT.

On considère que les besoins du PT sont supérieurs à ceux du nouveau-né à terme, en raison de l'interruption précoce de l'accumulation fœtale et de ses apports élevés en protéines.

Les besoins en vitamine B₆ sont généralement exprimés en fonction des apports en protéines, bien que des études récentes mettent en doute cette présentation.

Il n'a jamais été décrit de carences chez des enfants nés à terme nourris au lait de mère, mais il n'y a pas de données concordantes sur le statut de PT au lait de mère.

Toxicité : des doses de 300-980 µg/kg ont été administrées à des PT par voie parentérale sans apparition d'effets secondaires.

Besoins : ils sont mal connus quoiqu'on estime qu'ils sont supérieurs à ceux des nouveau-nés à terme.

Riboflavine

Le métabolisme de la vitamine B₂ chez le nouveau-né est mal connu ; il n'a pas été décrit de toxicité ou de carence chez le nouveau-né.

Sous ses deux formes phosphorylées, la riboflavine est le coenzyme de nombreuses réactions d'oxydo-réduction ; elle est donc nécessaire à tous les processus de croissance cellulaire. Ses propriétés de fluorescence sont cause d'une grande sensibilité à la lumière, responsable de pertes importantes dans les produits de nutrition et, *in vivo*, chez le nourrisson soumis à une photothérapie.

On estime que les besoins du PT sont supérieurs à ceux du nouveau-né à terme, en raison de réserves faibles, des besoins protéiques élevés, d'une absorption faible et des pertes par photodégradation durant la photothérapie.

Le lait de mère non supplémenté semble ne pas pouvoir satisfaire les besoins du PT.

Aucun cas de toxicité par la riboflavine n'a été décrit chez le PT, pour des doses atteignant 617µg/100kcal, mais ces doses semblent excessives.

Thiamine, Niacine, Vitamine B₁₂, Acide Pantothénique, Biotine.

En l'absence de travaux spécifiques, on considère qu'il n'est pas possible de formuler pour ces vitamines des recommandations distinctes de celles des nouveau-nés à terme. Les apports réalisés par le lait de mère couvrent les besoins du PT.

Ces vitamines n'ont pas de toxicité aux niveaux d'apports réalisés par l'alimentation.

Thiamine : une carence clinique (béribéri) n'est que très rarement observée chez le nouveau né : elle ne peut survenir qu'en cas de consommation de formule à base de soja non supplémentée ou d'allaitement par une mère carencée.

Biotine : sa synthèse par la flore intestinale et sa bonne absorption digestive rendent improbable la survenue d'une carence.

CONCLUSION

Une attention toute particulière doit être portée aux apports vitaminiques durant la grossesse, en particulier aux apports de l'acide folique et des vitamines A et D. La difficulté d'assurer pour une majorité de femmes, par supplémentation médicamenteuse ou modification de l'alimentation, l'apport en folates utile pour prévenir la survenue de DFTN à une période très précoce de la grossesse où beaucoup ne se savent pas enceintes, a conduit plusieurs pays à enrichir systématiquement leurs produits céréaliers avec une innocuité et une efficacité aujourd'hui démontrées. Cette politique devrait logiquement être adoptée en France aujourd'hui. Le problème posé par la vitamine A dans les pays industrialisés est inverse et montre le danger de compléments vitaminiques volontiers consommés aujourd'hui par beaucoup de femmes adultes et comportant de la vitamine A. Pour la vitamine D enfin, en l'absence d'une consommation suffisante de laits et de produits laitiers frais enrichis, une complémentation médicamenteuse est à recommander soit à raison de 400 UI par jour durant toute la grossesse, soit par une dose de charge unique de 100 000 UI au début du 7^{ème} mois de gestation.

Le statut vitaminique du prématuré devrait bénéficier de plus d'attention ; en effet, si les apports réalisés par les laits infantiles adaptés préviennent les carences et les surdosages manifestes, les relations plus fines avec son développement optimal restent à définir.

Références bibliographiques

- American Academy of Pediatrics, Committee on Nutrition.** Nutritional Needs of Premature Infants. *In*: Kleinman R (1998). *Pediatric Nutrition Handbook 4th edition*. Academy of Pediatrics, Elk Grove Village, IL, 55-87.
- Ashworth CJ, Antipatis C** (2001). Micronutrients programming of development throughout gestation. *Reproduction*, **122** : 527-535.
- Atkinson SA** (2001). Special nutritional needs of infants for prevention of and recovery from bronchopulmonary dysplasia. *J Nutr*, **131** : 942S-946S.
- Aubard Y, Darodes N, Cantaloube M et al.** (2000). Hyperhomocystéinémie et grossesse : une association dangereuse. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, **29** : 363-372.
- Azais-Braesco V, Pascal G** (2000). Vitamin A in pregnancy: requirements and safety limits. *Am J Clin Nutr*, **71** : 1325S-1333S.
- Backstrom MC, Maki R, Kuusela AL et al.** (1999). The long-term effect of early mineral, vitamin D, and breast milk intake on bone mineral status in 9- to 11-year-old children born prematurely. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **29** : 575-582.
- Berry RJ, Li Z, Erickson JD et al.** (1999). Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-US collaborative project for Neural Tube Defects Prevention. *New Engl J Med*, **341** : 1485-1490.
- Botto LD, Mulinare J, Yang Q et al.** (2004). Autosomal trisomy and maternal use of multivitamin supplements. *Am J Med Genet*, **125** : 113-116.
- Brion LP, Bell EF, Raghuvver TS** (2003). Vitamin E supplementation for prevention of morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*, (3):CD003665. Update in: *Cochrane Database Syst Rev*. 2003; (4) : CD003665.
- Bruinse HW, Van Den Berg H** (1995). Changes of some vitamin levels during and after normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **61** : 31-37.
- Butterworth CE, Bendich A** (1996). Folic acid and the prevention of birth defects. *Annu Rev Nutr*, **16** : 73-97.
- Cavalli P, Copp AJ** (2002). Inositol and folate resistant neural tube defects. Electronic letter. *J Med Genet*, **39** : E5.
- Chappell LC, Seed PT, Briley AL et al.** (1999). Effects of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: a randomised trial. *Lancet*, **354** : 810-816.
- Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M et al.** (1997). Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporosis Int*, **7** : 439-443.
- Crowther CA, Henderson-Smart DJ** (2001). Vitamin K prior to preterm birth for preventing neonatal periventricular haemorrhage. *In* : The Cochrane Database of Systematic Reviews ; Issue 1 : CD 000229.
- Czeizel AE** (2004). Folic acid and the prevention of neural tube defects. Letter to the editor. *N Engl J Med*, **350** : 2210.
- Czeizel AE, Puho E** (2005). Maternal use of nutritional supplements during the first month of pregnancy and decreased risk of Down's syndrome : case control study. *Nutrition*, **21** : 698-704.
- Czernichow S, Blacher J, Ducimetière P** (2004). Prévention des D.F.T.N. par les folates : conseils nutritionnels, supplémentation médicamenteuse... ou enrichissement des farines. *Méd Nutr*, **40** : 123-127.
- European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition; Committee on nutrition of the preterm infant** (1987). Nutrition and feeding of preterm infants. *Acta Paediatr Scand*, Suppl 336.

- Hellouin de Menibus C, Mallet E et al.** (1990). Hypocalcémie néonatale. Résultats de la supplémentation de la mère en vitamine D. Etude portant chez 13377 nouveau-nés. *Bull Acad Natl Méd*, **174** : 1051-1060.
- Hendrickx AG, Peterson P, Hartmann D, Hummler H** (2000). Vitamin A teratogenicity and risk assessment in the macaque retinoid model. *Reprod Teratol*, **14** : 311-323.
- Hibbard BM** (1964). The role of folic acid in pregnancy with particular reference to anaemia, abruption and abortion. *J Obstet Gynaecol Br Commonw*, **71** : 529-542.
- Hollis BW, Wagner CL** (2004). Assessment of dietary vitamin D requirements during pregnancy and lactation. *Am J Clin Nutr*, **79** : 717-726.
- Keen CL, Clegg MS, Hanna LA et al.** (2003). The plausibility of micronutrient deficiencies being a significant contributing factor to the occurrence of pregnancy complications. *J Nutr*, **133** : 1597S-1605S.
- Klein CJ** (2002). Nutrient requirements for preterm infant formulas. *J Nutr*, **132** : 1395S-577S.
- Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM et al.** (1985). Retinoic acid embryopathy. *New Engl J Med*, **313** : 837-841.
- Maden M** (2001). Vitamin A and the developing embryo. *Postgrad Med J*, **77** : 489-491.
- Mallet E, Gügi B, Brunelle P et al.** (1986). Vitamin D supplementation in pregnancy : a controlled trial of two methods. *Obstet Gynecol*, **68** : 300-304.
- Markestad T, Ulstein M, Aksnes L, Aarskog D** (1986). Serum concentrations of vitamin D metabolites in vitamin D supplemented pregnant women. *Acta Obstet Gynecol Scand*, **65** : 63-67.
- McGrath JJ, Feron FP, Burne TH et al.** (2004). Vitamin D₃-implications for brain development. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **89-90** : 557-560.
- McKay JA, Williams EA, Mathers JC** (2004). Folate and DNA methylation during in utero development and aging. *Biochem Soc Trans*, **32** : 1006-1007.
- McKenna MJ** (1992). Differences in vitamin D status between countries in young adults and the elderly. *Am J Med*, **93** : 69-77.
- Mills JL, Signore CC** (2004). Folic acid and the prevention of neural-tube defects. Letter to the editor. *N Engl J Med*, **350** : 2209-2211.
- Oakley GP** (2003). Folate deficiency is an "imminent health hazard" causing a worldwide birth defects epidemic. *Birth Defects Res*, **67** : 903-904.
- Oakley GP, Bell KN, Weber MB** (2004). Recommendations for accelerating global action to prevent folic acid-preventable birth defects and other folate-deficiency diseases: meeting of experts on preventing folic acid-preventable neural tube defects. *Birth Defects Research (part A)*, **70** : 835-837.
- Pressman EK, Cavanaugh JL, Mingione M et al.** (2003). Effects of maternal antioxidant supplementation on maternal and fetal antioxidant levels: a randomized, double blind study. *Am J Obstet Gynecol*, **189** : 1720-1725.
- Relton CL, Wilding CS, Laffling AJ et al.** (2004). Low erythrocyte folate status and polymorphic variation in folate-related genes are associated with risk of neural tube defect pregnancy. *Mol Genet Metab*, **81** : 273-281.
- Rothenberg SP, Da Costa MP, Sequeira JM et al.** (2004). Autoantibodies against folate receptors in women with a pregnancy complicated by a neural-tube defect. *New Engl J Med*, **350** : 134-142.
- Rothman KJ, Moore LL, Singer MR et al.** (1995). Teratogenicity of high vitamin A intake. *N Engl J Med*, **333** : 1369-1373.

- Rouget F, Monfort C, Bahuaud M et al.** (2005). Folate en période péri-conceptionnelle et prévention du risque de fente orofaciale : rôle des apports alimentaires en France. *Rev Epidemiol Santé Publique*, **53** : 351-360.
- Rumbold A, Crowther CA** (2005a). Vitamin C supplementation in pregnancy (Review). In : The Cochrane Database of Systematic Reviews. Issue 2 : CD004072.
- Rumbold A, Crowther CA** (2005a). Vitamin E supplementation in pregnancy (Review). In : The Cochrane Database of Systematic Reviews, Issue 2 : CD 004069.
- Salle BL, Delvin EE, Lapillonne A et al.** (2000). Perinatal metabolism of vitamin D. *Am J Clin Nutr*, **71 (Suppl)** :1317S-1324S.
- Shane B** (2003). Folate fortification: enough already ? *Am J Clin Nutr*, **77** : 8-9.
- Siegea-Riz AM, Savitz DA, Zeisel SH et al.** (2004). Second trimester folate status and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*, **191** : 1851-1857.
- Spears K, Cheney C, Zerzan J** (2004). Low plasma retinol concentrations increase the risk of developing bronchopulmonary dysplasia and long-term respiratory disability in very-low-birth-weight infants. *Am J Clin Nutr*, **80** : 1589-1594.
- Toescu V, Nuttall SL, Martin U et al.** (2002). Oxidative stress and normal pregnancy. *Clin Endocrinol*, **57** : 609-613.
- Turgut M, Basaran O, Cekmen M et al.** (2004). Oxidant and antioxidant levels in preterm newborns with idiopathic hyperbilirubinaemia. *J Paediatr Child Health*, **40** : 633-637.
- U.S. Food and Drug Administration** (1996). Food standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. *Fed Regist*, **61** : 8781-8807.
- Van Der Broek N, Kulier R, Gülmezoglu AM, Villar J** (2002). Vitamin A supplementation during pregnancy (Review). In : The Cochrane Database of Systematic Reviews. Issue 4 : CD 001996.
- Van Guelpen B, Hultdin J, Johansson I et al.** (2006). Low folate levels may protect against colorectal cancer. *Gut*, **55** : 1461-1466.
- Van Wersch JW, Janssens Y, Zandvoort JA** (2002). Folic acid, vitamin B₁₂ and homocysteine in smoking and non-smoking pregnant women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **103** : 18-21.
- Velzing-Aarts FV, Holm PI, Fokkema MR et al.** (2005). Plasma choline and betaine and their relation to plasma homocysteine in normal pregnancy. *Am J Clin Nutr*, **81** : 1383-1389.
- Wald NJ, Law MR, Morris JK, Wald DS** (2001). Quantifying the effect of folic acid. *Lancet*, **358** : 2069-2073.
- Wald DS, Law MR, Morris JK** (2002). Homocysteine and cardiovascular disease: evidence of causality from a meta-analysis. *Brit Med J*, **325** : 1202.
- Ward M, Hutton J, Mc Donnell R et al.** (2004). Folic acid supplements to prevent neural tube defects: trends in East of Ireland 1996-2002. *Ir Med J*, **97** : 274-276.
- West KP, Katz J, Khattry SK et al.** (1999). Double blind, cluster randomised trial of low dose supplementation with vitamin A or beta-carotene on mortality related to pregnancy in Nepal. The NNIPS-2 Study Group. *Brit Med J*, **318** : 570-575.
- Zeghoud F, Garabedian M, Jardel A et al.** (1988). Administration d'une dose unique de 100 000 UI de vitamine D₃ chez la femme enceinte en hiver. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, **17** : 1099-1105.



Vitamines et cancers

Alain Favier

Les cancers sont une des principales causes de décès dans la plupart des pays industrialisés où l'espérance de vie est suffisamment longue pour laisser se développer ces pathologies liées à l'âge. Les cancers demeurent des maladies complexes mal comprises, présentant de nombreuses formes selon l'étiologie et les tissus atteints, et dépendants d'un grand nombre de facteurs. Les anomalies de la nutrition sont supposées représenter 40 % de l'ensemble des facteurs à l'origine des cancers. Le poids exact des déficits en vitamines reste à établir mais ils sont un des nombreux troubles nutritionnels carcinogènes.

CERTAINES VITAMINES AGISSENT SUR LA PRÉVENTION DES CANCERS

Comment peuvent agir les vitamines

Les vitamines peuvent agir sur une ou plusieurs des nombreuses étapes de la carcinogénèse, soit comme antioxydants en prévenant l'excès de radicaux libres carcinogènes, soit par d'autres mécanismes liés directement à la régulation du cycle cellulaire ou la différenciation.

La méthylation de l'ADN

La méthylation contrôlée des cytosines des sites CpG dans l'ADN est un moyen capital pour empêcher la lecture de gènes devenus inutiles dans la cellule différenciée et pour freiner la prolifération. Cette activité nécessite des enzymes particulières, les méthylases, et des protéines reconnaissant les cytosines méthylées, mais aussi des substrats donneurs de méthyles. Or, de nombreuses vitamines participent aux échanges de méthyles, dont les vitamines B₉, B₁₂ et B₆ qui alimentent la cellule en S-adénosylméthionine, le principal donneur de méthyle (figure 1).

Ces mécanismes expliquent la relation inverse entre le risque de cancers colorectaux et les apports nutritionnels en folates. Le rôle des folates dans la reméthylation de l'homocystéine en méthionine pour former la S-adénosylméthionine est essentiel dans la méthylation de l'ADN contrôlant l'expression des gènes, l'intégrité de l'ADN, les modifications des chromosomes et le développement des mutations (Kim *et al.*, 2004). Toutefois, les effets des déficits en folates sont complexes et dépendent du type cellulaire, de l'organe cible, du stade de différenciation et du gène ciblé. Le déficit en folates joue aussi un rôle dans la réparation de l'ADN dont la resynthèse

nécessite une méthylation des néonucléotides et de l'ADN néoformé, démontrée par la diminution de la réactivation de plasmides endommagés dans les lymphocytes des sujets déficitaires en folates (Wei *et al.*, 2003). La carence en folates augmente ainsi le contenu en uracile et les cassures de chaîne de l'ADN des leucocytes humains (Blount et Ames, 1995). La carence en folates pourrait par cet effet jouer un rôle crucial dans les cancers cervicaux en facilitant l'incorporation du génome des virus HPV sur un site chromosomique fragile (Butterworth *et al.*, 1992). Les modèles expérimentaux sont ambigus en ce qui concerne les liens entre folates et carcinogénèse. Ainsi l'appauvrissement en folates du milieu de culture entraîne le passage en apoptose de la majorité des cellules CHO (*chinese hamster ovary*) cultivées, mais les clones résistants au déficit en folates montrent une grande fréquence de mutation du site adénine phosphoribosyle transférase indiquant une anomalie de la réparation de l'ADN induite par le déficit en folates (James, 1994).

Le métabolisme des folates peut être perturbé non seulement du fait d'un niveau d'apport insuffisant, mais aussi par des dérégulations d'expression des gènes ou des polymorphismes défectueux. Ainsi, l'expression des gènes du récepteur des folates se fait différemment dans des lignées normales ou cancéreuses (Ross *et al.*, 1994). Des cellules de carcinome montrent une faible expression du récepteur des folates qui n'est plus capable de lier l'acide folique ou le méthyl-

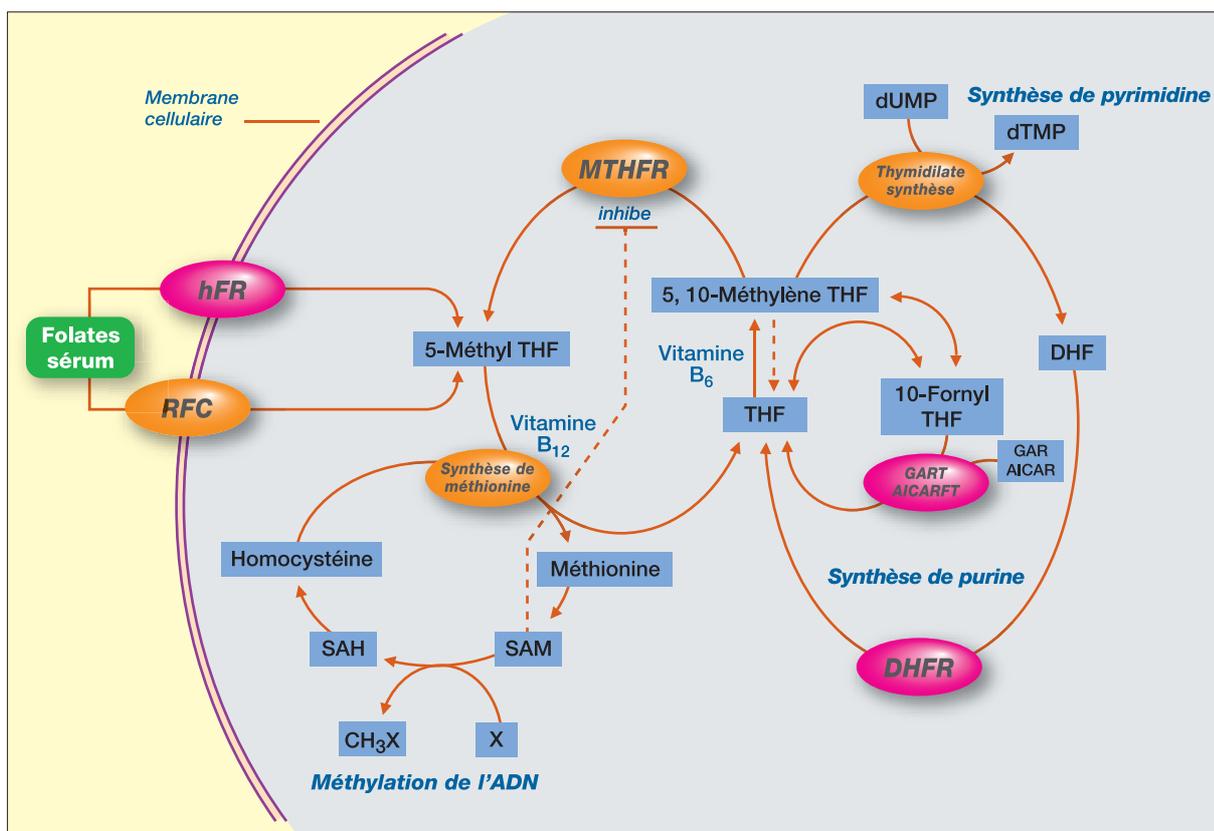


Figure 1 : Mécanismes de méthylation de l'ADN dépendant des folates d'après (Ulrich *et al.*, 2005).

AICAR = aminoimidazole-carboxamide-ribose ; DHF= dihydrofolate ; DHFR = dihydrofolate réductase ; dUMP = déoxyuridilate ; dTMP = thymidilate ; GART = glycinamide-ribose transformylase ; hFR = folate receptor ; MTHFR = méthylène tétrahydrofolate réductase ; RFC = reduced folate carrier ; SAH = S-adénosylhomocystéine ; SAM = S-adénosylméthionine ; THF= tétrahydrofolate.

tétrahydrofolate. Trois mutations ponctuelles différentes ont pu être identifiées dans le cadre de lecture du récepteur, l'une d'entre elles ayant un phénotype dominant négatif (Orr, 1995). Un site fragile folates-sensible est révélé avec une grande fréquence chez le cancéreux par la culture de lymphocytes périphériques dans un milieu pauvre en folates et contenant de l'aphidicoline (Murata *et al.*, 1992).

Les sites folates-sensibles induits par l'aphidicoline 8q22, 8Q24, 11q13 et 18Q21 sont retrouvés chez des malades atteints de lymphome non-Hodgkiniens (Charry-Reddy *et al.*, 1994) Ces sites sont situés dans les mêmes régions des chromosomes que les oncogènes *mos*, *myc* *bcl1* et *bcl2*. L'effet sur l'incidence des cancers des nombreux polymorphismes des gènes du métabolisme des folates sera traité dans un chapitre suivant.

L'attaque de l'ADN par les radicaux libres

L'exposition à des facteurs de risque, dits facteurs carcinogènes, qu'elle soit due à des comportements à risque comme le tabagisme, à une pollution importante ou à la vie professionnelle, est une des principales causes des cancers. Or, dans leur quasi-totalité, ces facteurs carcinogènes, qui vont créer des lésions dans nos gènes, sont des générateurs directs ou indirects de radicaux oxygénés et d'espèces réactives de l'oxygène.

L'air pollué apporte ainsi directement des espèces pro-oxydantes comme l'ozone ou les NOx (D'Yaz-Llera *et al.*, 2002). Les rayonnements ionisants comme les rayons X durs ou les rayons gamma peuvent directement générer des radicaux hydroxyles par radiolyse, alors que les rayonnements Ultra Violets-A génèrent des radicaux superoxydes et de l'oxygène singulet, par photoactivation de molécules présentes dans la peau (Pathak *et al.*, 1969). De même, la fumée de tabac apporte directement des radicaux oxygénés au niveau pulmonaire (Pryor *et al.*, 1983), mais en libère aussi par des mécanismes indirects (Murphy *et al.*, 1992). Au total, la fumée de cigarette contiendrait plus de 200 molécules organiques pro-oxydantes, tout comme les goudrons, particules de diesel ou rejets d'hydrocarbures aromatiques polycycliques. Les métaux carcinogènes comme le nickel ou le chrome 6+, se lient directement à l'ADN et endommagent *in situ* les bases de l'ADN en présence de superoxydes ou d'H₂O₂, par réaction de Fenton. Beaucoup de produits organiques carcinogènes, pour devenir dangereux, doivent subir au préalable une activation par des mécanismes biochimiques paradoxalement destinés à neutraliser les composés étrangers à l'organisme. Un facteur comme le fer, capable de transformer les espèces actives produites par ces mécanismes en radicaux hydroxyles très réactifs (Gutteridge, 1984), est d'ailleurs capable d'augmenter la carcinogénèse expérimentale (Toyokuni, 1996) et apparaît comme favorisant le risque de cancers digestifs dans plusieurs enquêtes épidémiologiques récentes (Stevens *et al.*, 1988). Nous avons retrouvé ce facteur de risque chez les femmes de la cohorte SUVIMAX qui ont 1,88 fois plus de risque de faire un cancer lorsque leur ferritinémie est élevée.

Les radicaux libres, et surtout le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$), considéré comme l'espèce réactive la plus impliquée dans les phénomènes d'oxydation endogènes de l'ADN cellulaire, altèrent l'ADN soit en l'oxydant soit en formant des adduits avec celui-ci. Au bas mot, cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par $\bullet\text{OH}$ peuvent être générées. Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténaires, des cassures de brins et des pontages

ADN–protéines (Cadet *et al.*, 1995). Les lésions oxydatives touchent de nombreuses bases, mais la lésion la plus étudiée, est de loin la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxo-dGua). En effet, la guanine étant la cible privilégiée des réactions d'oxydation, cette base oxydée est aujourd'hui considérée comme un bon marqueur du stress oxydant. Ces modifications de base par oxydation sont des lésions courantes au niveau de l'ADN et sont induites de manière physiologique au niveau cellulaire par le métabolisme aérobie. Certains travaux estiment que l'ADN nucléaire subirait environ 1 000 attaques oxydatives par jour, et l'ADN mitochondrial environ 10 fois plus.

Heureusement, les mécanismes de réparation des bases endommagées de l'ADN sont suffisamment efficaces pour maintenir l'intégrité de l'information génétique. Conservés de la bactérie jusqu'à l'homme, ces systèmes de réparation sont multiples et complexes. Il en existe cinq principaux (Friedberg, 1995) : le système de réparation par excision de bases (BER) (Sancar, 1995), le système de réparation des misappariements (Modrich, 1994), le système de réparation par excision de nucléotides (NER), la réparation des cassures double brins non homologues (NHEJ) et la réparation par recombinaison homologues. Souvent, la réparation est couplée à la transcription, car les gènes en cours de transcription sont les plus exposés, l'ADN étant décompacté (Hanawalt, 1994). Les mutations interviennent lorsque l'excès de lésions ou une déficience de réparation laissent persister ces anomalies au moment où le cycle cellulaire repart et que des polymérases infidèles recopient mal cet ADN lésé (Beckman et Ames, 1997) (figure 2). Encore faut-il que la protéine P53, gardienne du génome, soit en plus déficiente pour ne pas déclencher à cet instant l'autodestruction par apoptose. Les tissus cancéreux produisent eux mêmes des radicaux (Keshavarian *et al.*, 1992) dus à une génération directe de peroxyde d'hydrogène par les cellules tumorales, qui pourrait conférer à ces cellules une capacité de croissance supérieure et, en favorisant les mutations, augmenter l'hétérogénéité, le caractère invasif et les métastases (Galeotti *et al.*, 1992).

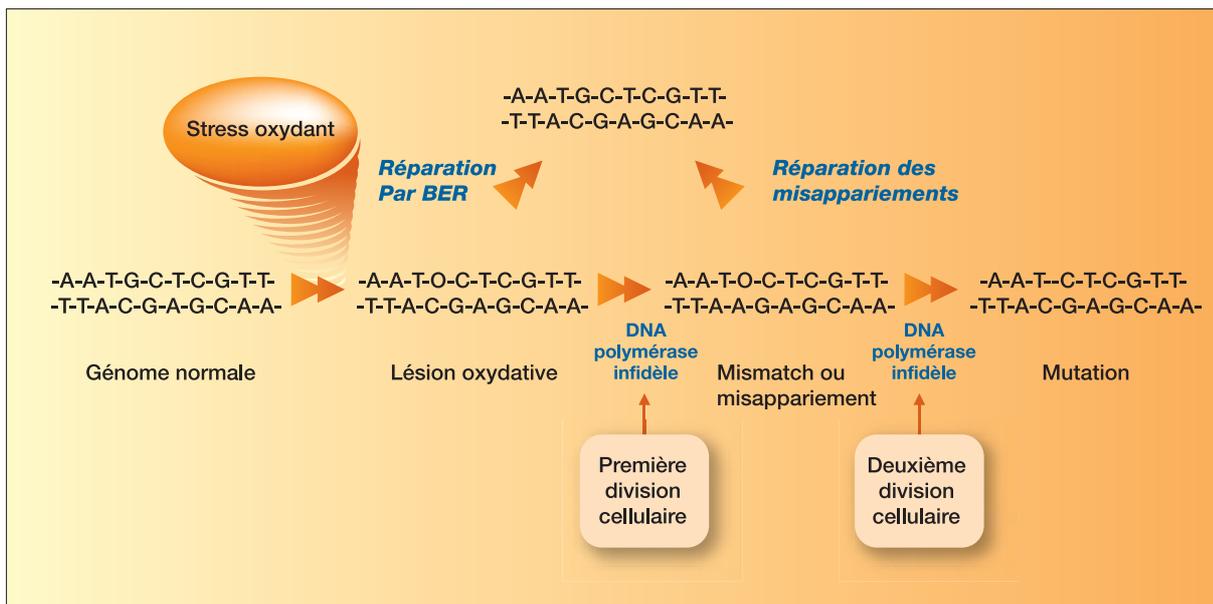


Figure 2 : Mécanisme de formation des mutations induites par l'oxydation de l'ADN.

Des dérivés d'oxydation signant la production de radicaux libres sont d'ailleurs retrouvés dans le sang et les tissus des malades cancéreux : dérivés d'oxydation de l'ADN (Malins et Haimanot, 1991) et malondialdéhyde (Boyd et Mac Guire, 1991) dans le cancer du sein (Boyd et Mc Guire, 1990). L'augmentation de la peroxydation lipidique est même retrouvée au stade précancéreux chez des femmes atteintes de dysplasie mammaires ou cervicales (Singer *et al.*, 1987).

Les vitamines antioxydantes (C, E, caroténoïdes) vont donc protéger l'ADN en diminuant le taux de radicaux libres. La vitamine E est un puissant antioxydant inhibant l'induction chimique de tumeurs chez l'animal (Shklar *et al.*, 1987). Les taux sériques de vitamine C sont effondrés dans plusieurs types de cancer ce qui a attiré très tôt l'attention des chercheurs sur son lien avec cette maladie. L'addition d'ascorbate inhibe la croissance des cellules de mélanome BL6, mais non des cellules normales LLCMK et, chez l'animal, il diminue la croissance de mélanome BL6 implantés dans des souris C 57 (Gardiner et Duncan, 1989). Les très nombreux caroténoïdes colorant les fruits et légumes protègent les cellules des effets néfastes de l'oxygène singulet généré par la lumière et des radicaux peroxydes d'acides gras. Cet effet explique l'action anti-carcinogène du β -carotène sur un nombre considérable de modèles cellulaires ou animaux (Rousseau *et al.*, 1992).

Action de certaines vitamines comme cofacteurs de facteurs de transcription et de signalisation

Parmi les facteurs de transcription impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, un certain nombre appartiennent à la famille des protéines à doigt de zinc et nécessite un cofacteur vitaminique. L'exemple le plus connu est celui des acides rétinoïques. Ces molécules ont un effet antiprolifératif et inducteur de différenciation cellulaire (Lotan, 1980). Le mécanisme antiprolifératif se fait par arrêt du cycle en G1, alors que l'effet sur la différenciation passe par un mécanisme différent (Lippman *et al.*, 1987). La canthaxanthine, un caroténoïde, donne naissance dans l'organisme à un produit d'oxydation disposant de récepteurs spécifiques, l'acide 4-oxorétinoïque, qui en induisant l'expression du gène de la connexine est un inducteur des gaps-junctions permettant les communications intercellulaires (Hanusch *et al.*, 1995).

La vitamine D et ses analogues agissent sur des récepteurs nucléaires de même type (VDR) et présentent un effet antiprolifératif sur des lignées tumorales de kératinocytes (Yu *et al.*, 1995). Le récepteur VDR non seulement active les gènes liés au métabolisme phosphocalcique, mais interagit sur le gène de p21 ou de la fibronectine et sur la signalisation dirigée par les rétinoïdes. Sur des cellules de carcinome humain SCC13, un dérivé de synthèse de la vitamine D normalise non seulement la prolifération mais aussi la différenciation (Cho *et al.*, 1996). D'autres vitamines peuvent agir directement en modifiant la structure des facteurs protéiques de transcription. Ainsi, le phosphate de pyridoxal modifie l'affinité du récepteur cytosolique des glucocorticoïdes en se fixant sur les lysines du domaine de liaison à l'ADN (Litwack *et al.*, 1991). Cette action se retrouve avec d'autres facteurs de la super famille des récepteurs stéroïdiens dont l'expression est réduite par un niveau élevé et augmentée par un niveau bas de vitamine B₆ (Allgood *et al.*, 1992).

La protéine cellulaire de transport du tocophérol TAP (*tocopherol associated protein*) possède des propriétés antiprolifératives dans les cellules de la prostate. Ainsi, sa surexpression dans des cellules Hpr1 entraîne une baisse de prolifération en absence de tocophérol et des siRNA antiTAP

augmentent la croissance cellulaire (Ni et al., 2005). TAP agirait en freinant la signalisation induite par la phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt. Sa teneur est d'autre part diminuée dans les tissus prostatiques cancéreux. Elle jouerait donc un double rôle antitumoral, en apportant et stockant la vitamine E antioxydante dans les cellules et en freinant les signaux de prolifération par une voie non vitamine dépendante. La vitamine E sous forme de succinate de tocophérol est d'ailleurs capable de renforcer le passage en apoptose induit dans des cellules de cancer de la prostate par l'acide méthyle séléneux (Zu et al., 2003).

L'immunité antitumorale est améliorée par les vitamines

L'organisme utilise différentes populations leucocytaires pour éliminer les cellules transformées tumorales et qui expriment à leur surface des protéines inhabituelles. Les lymphocytes de la lignée T comme les NK tuent les cellules possédant certains antigènes de surface, alors que les cellules K anticorps dépendantes ne détruiront que les cellules contre lesquelles des anticorps ont été produits par les lymphocytes B. Bien que la production de radicaux oxygénés fasse partie de la mise en route de l'immunité, les lymphocytes, et particulièrement ceux de la lignée T, sont très sensibles au stress oxydant (Grever et al., 1980). C'est pourquoi les activités tueuses K anticorps dépendante (Dallergri et al., 1985) et NK (El-Hag et al., 1989) sont supprimées par des stress oxydants et améliorées par des antioxydants de type SOD ou catalase. Le traitement d'adultes sains durant 28 jours par les vitamines C ou E augmente la production *in vitro* de TNF-alpha et d'IL1-bêta par les leucocytes périphériques stimulés par le LPS. L'effet est plus marqué encore chez les sujets traités par une association des deux vitamines (Jeng et al., 1996). La vitamine E est capable de diminuer les effets causés par le stress oxydant dans les phénomènes d'immunosuppression et de carcinogenèse (Anderson et al., 1990) et la supplémentation en cette vitamine améliore l'immunité cellulaire des sujets âgés (Meydani et al., 1990). Chez la souris l'injection de β -carotène augmente le nombre et l'activité tueuse, vis-à-vis de cellules leucémiques, des lymphocytes NK. Cet effet est retrouvé chez l'homme ou l'apport de 30 mg de β -carotène durant 3 mois chez des malades atteints de leucoplasie buccale entraîne une augmentation des cellules mononuclées NK(CD16), concomitante à la régression des cellules orales précancéreuses (Watson, 1991). Aussi, un mélange de ces vitamines s'avère bénéfique pour l'immunité cellulaire diminuée lors du vieillissement (Bogden et al., 1990).

Malheureusement, l'action des lymphocytes sur les cellules cibles passe en partie par l'action des cytokines comme le TNF- α , qui déclenche l'apoptose de ces cellules tumorales par un stress oxydant. Les antioxydants vont donc avoir un effet pervers sur la cellule cible cancéreuse en augmentant sa résistance vis-à-vis de la cytotoxicité induite par les lymphocytes NK (Riondel et al., 1998).

Autres mécanismes

La vitamine D protège aussi l'intestin du cancer du colon en modifiant le métabolisme local du calcium qui est important pour neutraliser l'effet carcinogène des lipides et des sels biliaires du colon. La vitamine C prévient, dans l'estomac, la formation des nitrosamines et nitrosamides carcinogènes à partir des nitrates (Mirvish, 1986).

Effet des vitamines sur la carcinogenèse animale

De très nombreux modèles animaux de cancer utilisant l'application ou l'ingestion de produits chimiques [benzopyrène, diméthylbenzanthrène (DMBA), diméthyl-hydrazine, N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanine, 3-méthylcholanthrène...], l'inhalation de fumée de cigarette ou de particules d'amiante, l'exposition à des rayons ionisants ou ultraviolets ont montré un effet protecteur des vitamines qu'il s'agisse de la vitamine A et de ses dérivés (Bollag, 1983), des vitamines C (Gardiner et Duncan, 1989) ou E (Prasad et Edwards-Prasad, 1992), des caroténoïdes (Lee *et al.*, 1999) ou des polyphénols. Dans une revue consacrée à la vitamine E et la prévention des cancers, Prasad et Edwards-Prasad (1992) recensent de nombreuses études ayant montré son effet protecteur vis-à-vis de la carcinogenèse chimique au benzopyrène, au méthylcholanthrène ou au DMBA. Seul le tocotriénol, et non le tocophérol, retarde significativement l'induction de tumeurs par le 7,12-diméthyl benzanthrène (50mg/kg) chez la souris. Par contre, sur un modèle de tumeur induite par la N-nitroso-méthylurée, aucun des dérivés de la vitamine E ne modifie le temps d'induction, le tocotriénol augmentant même la multiplication cellulaire (Gould *et al.*, 1991). Cet effet est retrouvé sur cellules irradiées et s'explique par l'effet sur les signaux cellulaires, les oncogènes et l'existence de protéines liant le tocophérol (TBPS) dans les cellules tumorales. La vitamine E supprime les aberrations chromosomiques dues au chrome (Sugiyama *et al.*, 1991).

Il est important de noter que l'apport des vitamines dans les régimes animaux enrichis se fait, soit avant, soit simultanément à l'exposition à l'agent carcinogène, alors que la prise de supplément chez l'homme se fait souvent plusieurs années après le début de l'exposition au tabac ou à d'autres facteurs de risque.

Les déficits en vitamines favorisent les cancers

Un nombre considérable d'études épidémiologiques descriptives démontre un lien fort entre des apports ou des statuts biologiques bas en certaines vitamines et des fréquences accrues de divers cancers.

Un tel lien est retrouvé dans l'étude de Shanghai entre les apports bas en folates et le risque de cancer du sein (Martha *et al.*, 2001). Inversement, des apports élevés en folates par des régimes riches en légumes, céréales et végétaux sont retrouvés associés à des incidences faibles des carcinomes (Jennings, 1995). Une étude cas-contrôle, menée entre 1991 et 2002 sur 1294 cas de cancers de la prostate, montre une forte diminution du risque de cancer dans le quintile le plus élevé d'apports en folates [OR 0,66 (95 % CI, 0,51-0,85)] (Pelucchi *et al.*, 2001). La diminution du risque est encore plus forte chez les sujets ayant des apports élevés en folates et bas en alcool, atteignant alors 50 %.

De très nombreuses études ont recherché les liens entre le risque de cancer et le statut en vitamine A, qu'il s'agisse d'études descriptives ou prospectives. En fait un lien net existe entre les apports bas en β -carotène et le risque de cancers de l'endomètre, de l'œsophage, de l'estomac ou du sein, mais surtout de cancer du poumon. Le risque accru en cas de déficit en vitamine A retrouvé dans certaines études provient en fait d'un défaut de la provitamine A, le β -carotène, comme le montre la revue des études rétrospectives décrivant les relations entre les apports alimentaires en vitamine A ou β -carotène et le risque de cancer du poumon (Gaby *et al.*, 1991). Les études épidémiologiques prospectives retrouvent le même lien avec les taux circulants de β -carotène, mais ce lien n'existe pas avec les taux de rétinol. Cette relation entre β -carotène et risque de cancer a été confortée par l'observation d'un effondrement des taux plasmatiques en ce composé chez les sujets à risque accru que sont les fumeurs (Thurnham, 1990). Nous avons d'ailleurs récemment montré qu'un apport supplémentaire quotidien en carottes suffit à remonter ces teneurs chez les fumeurs et à normaliser la teneur des érythrocytes en glutathion réduit. La consommation de β -carotène est la variable diététique la plus significative associée à la survie chez les femmes atteintes de cancer du sein (Ingram, 1994)

Plus de 50 études portant sur le lien entre les apports en vitamine C et l'incidence des cancers ont été réalisées au cours des dernières années (Block et Hartman, 1989). Sur les 46 études portant sur des cancers d'origine épithéliale, dans lesquelles les apports en vitamine C ont été évalués, 33 ont mis en évidence un effet protecteur. Les résultats sont plus nets pour les cancers de l'œsophage, du larynx, des voies aéro-digestives supérieures et du pancréas. Pour les cancers de l'estomac, du rectum et du col de l'utérus, un effet protecteur a été trouvé dans la plupart des études. Des travaux récents sur les relations entre alimentation et cancer du poumon ont aussi mis en évidence un effet protecteur significatif de la vitamine C. Par ailleurs le taux de vitamine C est abaissé chez les fumeurs, et l'étude *National Health and Nutritional Examination Survey* (11582 sujets) montre que le taux d'ascorbate sérique reste inférieur chez les fumeurs après supplémentation en vitamine C, par rapport aux non fumeurs recevant les mêmes apports, ceci même à un niveau d'apport de 200 mg par jour (Schecman *et al.*, 1991). Les fumeurs passifs présentent eux aussi une teneur en ascorbate sérique abaissée et intermédiaire entre celle des sujets fumeurs actifs et des sujets non fumeurs, ceci malgré des apports alimentaires identiques.

Toutefois ces relations ne suffisent pas à prouver la responsabilité des déficits en vitamines dans l'apparition des cancers. Ces vitamines étant toutes apportées par des aliments végétaux qui contiennent des milliers de molécules originales, elles démontrent essentiellement le bénéfice d'une alimentation riche en fruits et légumes.

Les déficits en vitamines interagissent avec les facteurs d'exposition et le terrain génétique

De nombreux gènes de susceptibilité aux cancers ont été décrits : P53, Bcl2, BRCA1, XPC.... Certaines mutations très délétères entraînent des cancers héréditaires comme le *Xeroderma pigmentosum* (cancer de la peau chez des enfants atteints de mutations sur le gène de réparation de l'ADN XPA). Mais d'autres variantes génétiques existantes dans l'espèce humaine ont moins de pénétrance et leur polymorphisme se traduit simplement comme un facteur supplémentaire de

risque de cancers, susceptible d'amplifier l'effet délétère des expositions anormales et des déficits en vitamines. Parmi ces gènes un certain nombre diminue les capacités de réparation de l'ADN et la mauvaise efficacité de ces variantes est amplifiée si le sujet porteur est exposé en plus à des agents carcinogènes ou soumis à un stress oxydant génotoxique. À titre d'exemple, le polymorphisme Lys/Gln ou Gln/Gln à la position 751 de l'exon 23 du gène XPD augmente le risque de cancer du sein de 20 % dans la population générale par rapport à la variante Lys/Lys, mais de 61 % chez les sujets exposés aux hydrocarbures polycycliques (Terry *et al.*, 2004). De même, une substitution de la sérine 326 par la cystéine dans le gène OGG1 est associée à un risque doublé (OR = 1,9) de cancer du poumon, mais chez les fumeurs l'association augmente le risque d'un facteur 4,9 par rapport aux fumeurs possédant la variante cystéine (Le Marchand *et al.*, 2002).

Il est donc capital de croiser dans les futures recherches épidémiologiques sur l'origine des cancers ces données génétiques de polymorphisme avec l'exposition aux carcinogènes et avec le risque de déficit en vitamines protectrices. Ainsi, le risque de cancer de la prostate entraîné par la variante 399 Arg/Arg du gène XRCC1 par rapport aux variantes 399 (Arg/Gln ou Gln/Gln) ne s'exprime fortement que chez les sujets qui sont simultanément déficitaires en vitamine C ou en vitamine E (Van Gils *et al.*, 2002).

Dans l'étude *Nurses' Health Study*, soit une cohorte de 88 744 sujets suivis durant 20 ans, un apport nutritionnel élevé en folates est associé à un risque diminué de cancer du sein uniquement chez les sujets ER (Récepteur des œstrogènes) négatifs (ER-) mais pas chez les sujets ER+ / (Zhang *et al.*, 2005). La comparaison du risque dans le plus haut quintile en folates par rapport au quintile le plus bas montre un RR de 0,81 (0,66-0,99) chez les sujets dont la tumeur est ER-, et de 1,00 (0,89-1,14) chez les sujets dont la tumeur est ER+. Chez les femmes consommant au moins 15 g/J d'alcool, le risque est encore accru (multivariable RR, 0,46), sans doute du fait de la perturbation de l'absorption des folates par l'alcool. Or, l'expression du récepteur des œstrogènes est fortement régulée par l'épigénétisme et principalement par méthylation des CpG. La méthylation excessive entraîne le défaut d'expression de ce récepteur. Le génotype MTHFR 1298CC comparé à 1298AA est associé à une augmentation significative du risque de cancer du poumon chez les femmes mais pas chez les hommes (Shi *et al.*, 2005). Par contre, le génotype MTHFR 677TT est associé à une baisse de risque du cancer mais lui aussi uniquement chez les femmes. Ces effets chez les femmes s'observent chez les sujets tabagiques ou ayant des apports bas en folates. Une relation entre ce polymorphisme C677T de la MTHFR et le risque de cancer du sein est retrouvée chez les femmes sous hormonothérapie substitutive au sein d'une cohorte américaine multiethnique (Le Marchand *et al.*, 2004). Par contre, aucune interaction avec un apport bas en folates n'est observée dans cette étude. Une synergie existe entre différents gènes impliqués dans le métabolisme des folates. Les génotypes diminuant l'activité MTHFR associés à ceux diminuant l'expression de la thymidine synthase (TS) sont associés à une diminution du risque de cancer du colon (Cornelia *et al.*, 2005). L'allèle de thymidine synthase T5ER diminue le risque de cancer chez les sujets à apports bas en folates.

La variante *Fos1* (ff) du gène du récepteur de la vitamine D, qui code, pour une protéine plus longue de trois acides aminés que celle du gène de référence *FF* mais moins active, est retrouvée associée à un risque accru de cancer du sein dans l'étude *Nurses' Health Study* (Chen *et al.*, 2005).

Les suppléments en vitamines préviennent-elles certains cancers ?

Depuis plusieurs années des essais randomisés, mesurant l'efficacité des vitamines ou des oligo-éléments dans la prévention des cancers, ont été mis en place, utilisant différents protocoles, différentes doses et ciblant des populations à risques particulières ou la population générale (tableau 1). La durée nécessaire pour pouvoir mettre en évidence un effet préventif ayant été estimée, selon la taille de la population étudiée, entre 4 à 10 ans, les résultats ne sont connus pour les plus anciens d'entre ces essais que depuis peu d'années. La diversité des protocoles utilisés rend nécessaire l'obtention et l'analyse d'un plus grand nombre de résultats pour en retirer une opinion définitive sur l'efficacité des vitamines par une méta-analyse.

Au sein des études *Nurses' Health Study* portant sur 87 998 femmes et *Health Professionals Follow-up Study* portant sur 47 344 hommes, l'effet des auto-supplémentations en vitamine E sur l'apparition des cancers a été évalué. Si aucun effet n'a été observé chez les femmes, une tendance à une baisse de 30 % a été observée chez les hommes sur l'incidence des cancers du colon pour des suppléments supérieures à 300 UI (Wu *et al.*, 2002). Par contre, cet effet préventif des auto-supplémentations en vitamine E n'est pas retrouvé lors d'une enquête sur 2 481 cas de cancers de la prostate dans la cohorte *Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort* (Rodriguez *et al.*, 2004). Seule une tendance non significative à la baisse de 13 % du risque est observée chez les fumeurs prenant le supplément.

Etude	Nombre de sujets	Produits testés	Lieux	Période	Effet
Physician's Health Study	22 000 hommes	Aspirine puis β -carotène	Harvard USA	1980-1996	aucun
Women's Health Study	40 000 femmes de plus de 50 ans	β -carotène vitamine E aspirine	Harvard USA	début 1992	aucun
ATBC (Alpha Tocopherol, Beta-carotene Cancer Prevention Study)	29 000 hommes fumeurs de 50 à 69 ans	β -carotène et/ou α -tocophérol	Finlande	1985-1994	négatif
Etude du Linxian (Chinese Cancer Prevention Trial)	30 000 sujets, en milieu, + dénutris	Rétinol, vit B ₂ , Zn, Niacine, vit C, Mo β -carotène, vit E, Se	Chine	1987-1992	positif
NPC Trial	1300 hommes adultes	Sélénium	USA	1993-1996	positif
CARET	18 000 fumeurs	β -carotène et rétinol	Seattle USA	1992-1996	négatif
HOPE-2	4000 diabétiques ou exposés à l'amiante	α -tocophérol	USA	2003-2005	aucun
SU.VI.MAX	15 000 adultes 40 à 60 ans	α -tocophérol, β -carotène, vitamine C sélénium, zinc	France	1994-2003	positif chez les hommes

Tableau 1 : Principaux essais randomisés en double aveugle contre placebo portant sur l'effet de la supplémentation en vitamines.

Les suppléments en double aveugle sont plus rigoureux et mieux contrôlés quant au niveau de vitamines ingérées et éliminent l'effet placebo. Une supplémentation en vitamine E et vitamine C durant 15 mois ne modifie pas le niveau des adduits de benzopyrène chez des fumeurs masculins volontaires par rapport à un placebo. Par contre, chez les sujets de sexe féminin, une baisse du taux d'adduits de 31 % est observée (LaVerne *et al.*, 2005). L'effet est encore plus net (baisse de 43 %) chez les femmes de phénotype GSTM1. Un tel effet du tocophérol est retrouvé dans l'étude ATBC montrant une réduction du risque de cancer chez les fumeurs recevant le supplément en vitamine E, alors que dans la même étude l'apport du β -carotène est au contraire délétère (Heinonen *et al.*, 1998). Les études de supplémentation en vitamine E n'ont montré aucun bénéfice dans la prévention des cancers de la prostate. L'apport de 400 UI de tocophérol durant 3 mois ne modifie ni le PSA, ni l'IGF1 ni le taux de testostérone chez des sujets possédant un PSA élevé à l'entrée dans l'étude (Hernandez *et al.*, 2005). La *Women Health Study*, dans laquelle 39 876 femmes de 35 ans furent supplémentées durant 10 ans avec 600 UI de tocophérol naturel ou un placebo, ne montre aucun effet de la supplémentation en vitamine E ni sur l'incidence des cancers du sein, du colon ou du poumon, ni sur la mortalité par cancer (Lee *et al.*, 2005). De même, l'étude *HOPE-2* n'observe aucune modification de l'incidence ou de la mortalité par cancer chez 4 000 patients diabétiques ou atteints de maladie vasculaire mis sous vitamine E par rapport à un placebo durant 7 ans (Lonn *et al.*, 2005). Par contre, une aggravation du risque d'insuffisance cardiaque est observée sous vitamine E. Cet effet paradoxal des hautes doses de vitamine E est mis en évidence par une méta-analyse réalisée par Miller (2005) ([figure 3](#)).

L'apport de vitamine C a fait régresser le nombre et la surface des polypes du colon (Bussey *et al.*, 1982). Cet effet correspond à une diminution des mutagènes fécaux après supplémentation (Dion *et al.*, 1982). La vitamine C s'avère aussi efficace à réduire la prolifération de cellules cryptiques du colon chez des malades souffrants de polypes adénomateux, alors que le β -carotène a un effet plus faible et que le tocophérol est sans effet bénéfique dans cette étude (Cahill *et al.*, 1993). L'apport oral d'ascorbate diminue les lésions de l'ADN des cellules de la muqueuse gastrique chez 28 des 43 malades atteints de gastrite atrophique (Dyke *et al.*, 1994).

Le β -carotène entraîne une régression des lésions pré-néoplasiques comme la leucoplasie qui correspond à une métaplasie de la muqueuse buccale (Garewal *et al.*, 1990). Dans une étude de prévention du cancer du poumon chez des sujets non-fumeurs, la consommation de fruits et légumes riches en β -carotène est associée à une réduction du risque de cancer (Mayne *et al.*, 1994). Par contre, un apport de β -carotène, chez 143 fumeurs durant 14 semaines, comparé à un placebo ne corrige pas les dommages de l'ADN induits par le tabagisme tels que mesurés par les échanges de chromatides sœurs dans les lymphocytes (Van Poppel *et al.*, 1992), alors que les mêmes auteurs, dans une autre étude, observent une diminution, significative par rapport au groupe placebo, des cellules micronuclées dans les crachats de fumeurs après 14 semaines de supplémentation par du β -carotène (Van Poppel *et al.*, 1992). L'apport de 30 mg de β -carotène durant 3 mois chez des malades atteints de leucoplasie buccale entraîne une augmentation des cellules mononuclées NK(CD16), concomitante à la régression des cellules orales

précancéreuses (Watson, 1991). L'apport chez des fumeurs de 100 mg de vitamine C, 280 mg de tocophérol et 25 mg de β -carotène par jour, diminue les lésions de l'ADN mesurés par la technique Comète (Duthie *et al.*, 1996).

Des résultats bénéfiques ont aussi été observés par apport d'un mélange de vitamines et minéraux antioxydants. Ainsi, une étude réalisée en Chine et poursuivie durant 5 ans chez 30 000 adultes, dans la région du Linxian, au centre nord de la Chine, région qui possède un taux très élevé de mortalité par cancer de l'œsophage, montre que le mélange β -carotène (15 mg) – α -tocophérol (30 mg) - sélénium (50 μ g) entraîne une baisse de 9 % du taux de décès ($p < 0,03$) et une baisse de la mortalité par tous types de cancers de 13 % et surtout une baisse de la mortalité par cancers de l'estomac de 21 % (Blot *et al.*, 1993).

Enfin, l'étude SU.VI.MAX que nous avons conduite en France, a utilisé un mélange à des doses nutritionnelles de vitamine E, C, β -carotène, zinc et sélénium. Ces doses ont permis de retrouver l'effet, expérimentalement positif, des vitamines et oligoéléments antioxydants et d'éviter les effets paradoxaux des doses élevées (Favier *et al.*, 1996). En effet, une relation est démontrée,

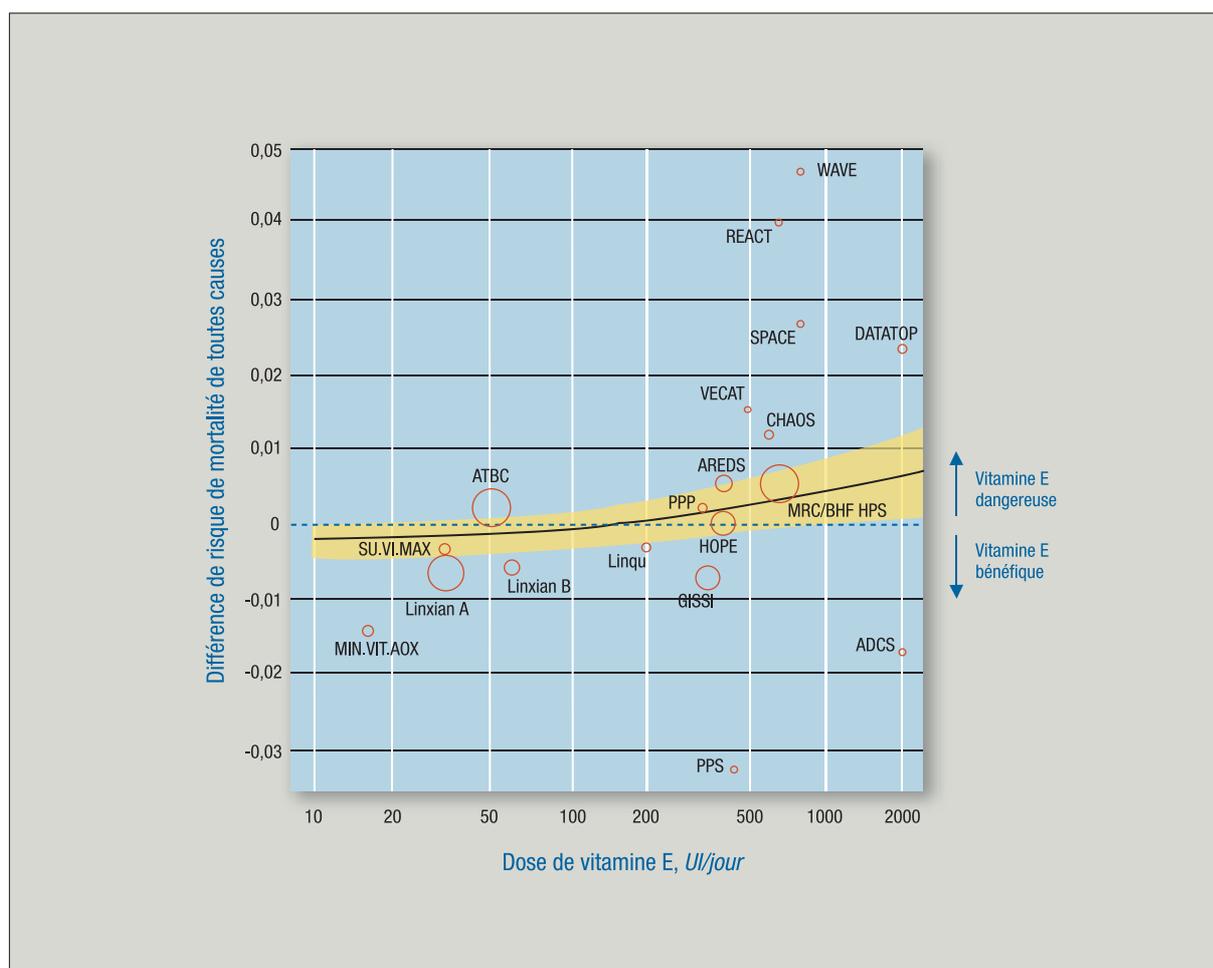


Figure 3 : Bénéfice de l'apport en vitamine E selon la dose utilisée dans différentes études de supplémentation randomisées (Miller, 2005).

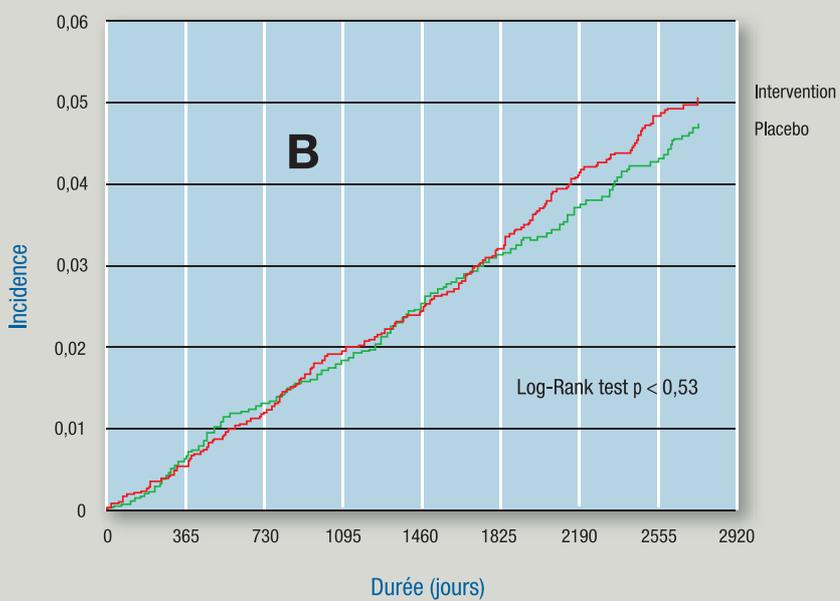
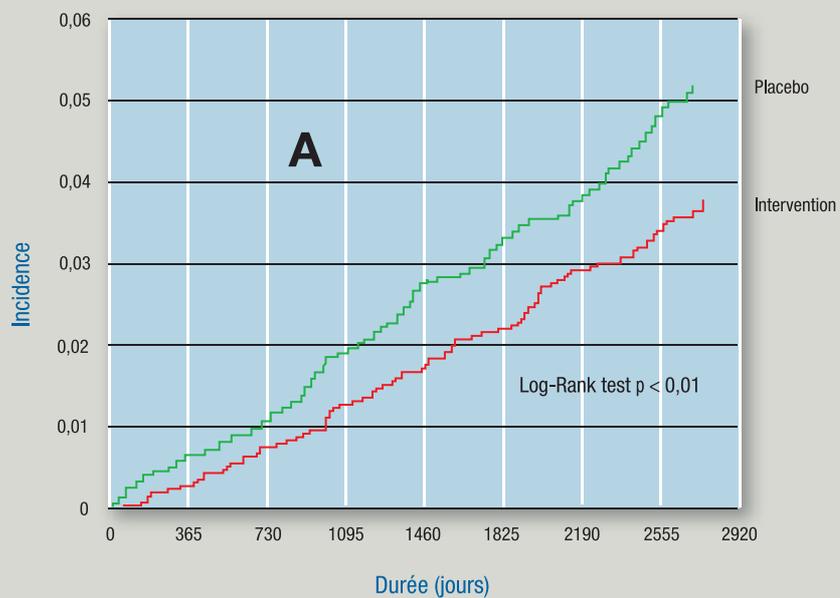


Figure 4 : Effet de la supplémentation en antioxydants et du placebo dans la cohorte SUVIMAX :
A : chez les hommes (diminution de 35 % de l'incidence des cancers)
B : chez les femmes (aucun effet global).

uniquement chez les hommes de la cohorte, entre un taux bas de β -carotène dans le sang et un risque accru de cancer. Ce taux bas qui est lié à un apport insuffisant de fruits et légumes n'est pas retrouvé chez les femmes de la cohorte qui ont, dans l'ensemble, une nutrition bien plus équilibrée que les hommes. Cette relation est confirmée par le fait que la supplémentation en antioxydants diminue de 31 % le risque de cancers et de 37 % la mortalité chez les hommes de la cohorte. Aucun effet n'est retrouvé chez les femmes qui possèdent en effet, dès l'entrée dans l'étude, un statut en vitamines antioxydantes nettement supérieur à celui des hommes. Transposé à la population française de même âge, le bénéfice observé permettrait d'éviter au moins 4 400 nouveaux cancers. Sur l'ensemble des 135 000 nouveaux cas de cancer observés par an dans notre pays, c'est donc au minimum 12 000 cas, au mieux 50 000 cas de cancers qui pourraient être évités. Ces chiffres sont certes des extrapolations qui demanderont à être confirmés, mais ils indiquent clairement le bénéfice important à attendre d'un enrichissement en antioxydants de notre alimentation en terme de santé publique (Hercberg *et al.*, 2004).

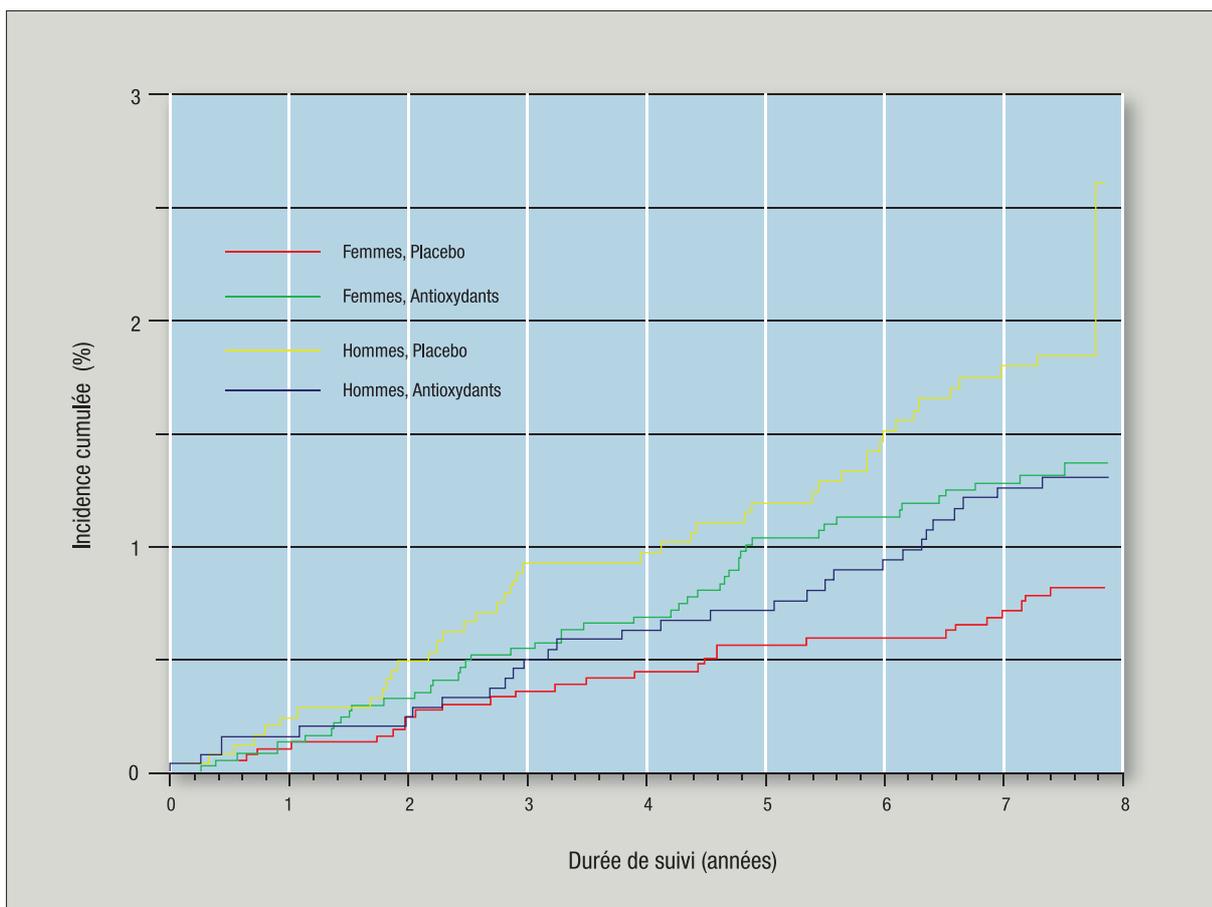


Figure 5 : Effet de la supplémentation antioxydante et du placebo sur l'ensemble des cancers cutanés dans la cohorte SUVIMAX chez les hommes (diminution de 30 % non significative) et chez les femmes (augmentation de 68 % significative).

Toutefois, cette supplémentation doit être réservée aux sujets à statut nutritionnel déficitaire comme le montre dans l'étude SU.VI.MAX le fait que le bénéfice de la supplémentation ne soit retrouvé que chez les hommes ayant un statut déficitaire en β -carotène (caroténémie < 0,30 $\mu\text{mol/l}$) ou en vitamine C (ascorbémie < 2 $\mu\text{g/ml}$) (Galan *et al.*, 2005), et inversement le fait qu'un effet négatif soit retrouvé chez les femmes supplémentées dont le statut n'est pas déficitaire et qui développent une plus grande incidence des cancers cutanés (Hercberg *et al.*, 2006). De même, l'effet bénéfique chez des sujets non précancéreux peut être remplacé par un effet néfaste chez des sujets précancéreux. Ainsi, dans la cohorte SU.VI.MAX, la supplémentation diminue de moitié le risque de cancer de la prostate chez les hommes dont le PSA est normal mais accroît de 50 % l'incidence des cancers de la prostate chez ceux dont le PSA est supérieur à 3 $\mu\text{g/L}$ (Meyer *et al.*, 2005).

Le danger des supplémentations chez les sujets précancéreux est confirmé par les résultats de deux études réalisées en Finlande et aux USA, qui montrent que des effets paradoxaux graves peuvent être obtenus, principalement avec les fortes doses de β -carotène. Dans l'étude ATBC, la supplémentation par le β -carotène de 29 000 fumeurs âgés de 50 à 69 ans par quatre régimes, donnés de façon aléatoire, α -tocophérol, β -carotène, tocophérol et β -carotène ou placebo, loin de diminuer le nombre de cancers, a été responsable au contraire d'une augmentation de 18 % des cancers du poumon dans le groupe recevant du β -carotène, et de 8 % de la mortalité par choc hémorragique dans le groupe recevant la vitamine E (*The Alpha-tocopherol Beta carotene Cancer Prevention Group*, 1994). Aux USA, l'étude CARET (*Beta Carotene and Retinol Efficacy Trial*) qui a testé l'effet d'une association de 30 mg de β -carotène et 25 000 unités de rétinol, chez 18 400 fumeurs ou travailleurs exposés à l'amiante, aboutit aux mêmes conclusions négatives (Omenn *et al.*, 1996). L'étude a dû être arrêtée au bout de 4 ans, le risque de cancer du poumon était de 1,28 dans le groupe traité par rapport au groupe recevant le placebo. Aucun effet n'est observé sur les autres types de cancer. Le risque relatif de mort par cancer du poumon était passé à 1,46 et celui de mort par accident cardio-vasculaire à 1,26.

LES VITAMINES CHEZ LE MALADE CANCÉREUX

Les traitements anticancéreux font souvent appel aux mêmes mécanismes qu'utilisent les agents carcinogènes, création de lésions de l'ADN ou anomalies de méthylation, mais amplifiés dans le but de freiner la prolifération tumorale et d'induire l'apoptose ou la sénescence. Les vitamines peuvent donc freiner ces effets thérapeutiques même si elles renforcent l'état du malade souvent cachectique et immunodéprimé.

Les vitamines au cœur de la thérapeutique antitumorale : les antifolates

Les analogues de la vitamine B₉ ont été parmi les premiers antitumoraux utilisés en chimiothérapie. Ils agissent en inhibant la dihydrofolate réductase qui transforme le dihydrofolate en tétrahydrofolate nécessaire à la synthèse des nucléotides puriques, mais surtout à la méthylation du désoxy-uridine monophosphate en thymidine monophosphate. Tous ces nucléotides étant nécessaires à la synthèse accélérée de l'ADN dans les cellules cancéreuses. Le méthotrexate (MTX) bien qu'étant le 2^{ème} antifolate développé après l'aminoptérine continue à être préconisé largement dans les leucoses aiguës lymphocytaires, le choriocarcinome, les mycosis fungoïdes, les cancers ORL ou des poumons, et le sarcome ostéogénique. L'intérêt de ces traitements réside dans la possibilité d'une réversion rapide des effets secondaires en utilisant un traitement par le dihydrofolate. Des médicaments plus récents ont été développés sur ce principe des analogues des folates : 10-éthyl-10-deazaaminoptérine, edatrexate, trimétrexate, lométrexol.

Les antifolates sont aussi utilisés comme immunosuppresseurs, anti-inflammatoires, antimicrobiens notamment contre l'agent du paludisme. Ainsi le méthotrexate est utilisé dans le traitement du psoriasis, de la réaction du greffon contre l'hôte ou de l'arthrite rhumatoïde. D'autres antifolates comme le triméthoprime sont utilisés comme antipaludéens car ils ont une affinité 105 fois plus forte pour la dihydrofolate réductase des protozoaires que pour l'enzyme humaine.

Le polymorphisme du gène codant pour la MTHFR peut expliquer la fréquence des complications aux traitements par le méthotrexate, la variante MTHFR 677TT étant anormalement fréquente chez les malades traités pour cancer du sein développant une complication (Toffoli *et al.*, 2000). L'élévation accrue de l'homocystéinémie observée chez ces variants pourrait expliquer cette plus forte toxicité.

Les inhibiteurs de la thymidine synthase, 5-fluorouracil (FU), capecitabine, raltitrexed, nolatrexed, tegafur, sont aussi des médicaments anticancéreux en empêchant cette enzyme d'utiliser le méthylène-THF pour méthyler l'uridine monophosphate en thymidine monophosphate.

Faut-il donner des vitamines aux malades cancéreux ?

La situation nutritionnelle est encore plus complexe chez les malades que chez les sujets sains. En effet, même si le malade est souvent dénutri voire cachectique, donc déficitaire en vitamines, plusieurs questions importantes se posent et ne sont toujours pas résolues faute d'études en

nombre suffisant. L'apport vitaminique profitera-t'il plus au malade ou à la tumeur? Les antioxydants ne vont-ils pas diminuer l'effet de l'immunité antitumorale? L'apport vitaminique ne va-t-il pas diminuer l'efficacité du traitement antitumoral ?

Effet sur l'état général : amélioration de l'état général et immunitaire

Cameron et Pauling observent une augmentation significative de la survie de malades, à un stade terminal ou incurables, après un apport quotidien de 10 g de vitamine C (Cameron et Pauling, 1978). Cet effet bénéfique n'est hélas pas retrouvé par d'autres équipes réalisant des études contre placebo, ni sur des cancers avancés (Moertel *et al.*, 1985), ni sur des cancers du sein dépistés (Poulter *et al.*, 1984). L'apport de vitamine E, durant 5 semaines précédant la chirurgie modifie le profil des protéines sériques de malades atteints de cancer de la prostate, le ramenant à celui de sujets sains chez plusieurs patients (Kim *et al.*, 2005).

Les malades atteints de cancer du poumon non à petites cellules survivent mieux lorsque ils sont opérés en été et qu'ils ont des apports en vitamine D les plus élevés que lorsque ils sont opérés en hiver et qu'ils ont les apports les plus bas (Zhou *et al.*, 2005).

La prise spontanée et globale de vitamines et minéraux évaluée dans l'étude de la Mayo Clinic, sur 1129 malades, s'avère bénéfique sur le bien être et la survie de patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules (Jatoi *et al.*, 2005) - la médiane de survie étant de 4,3 années chez ceux prenant un supplément contre 2,0 années chez ceux n'en prenant aucun. Après correction en fonction du stade tumoral, le bénéfice reste de 35 % de survie supplémentaire. Ceci est d'autant plus important qu'aux Etats-Unis, 70 % des malades s'auto-supplémentent en vitamines.

Effet sur les traitements anticancéreux

Il est en apparence paradoxal de constater que la plupart des traitements destinés à lutter contre le cancer utilisent une génération massive de radicaux libres : radiothérapie, photochimiothérapie, ou certaines chimiothérapies. Si pour certains agents antitumoraux, comme la bléomycine, la formation de ces radicaux libres est le mécanisme principal d'action, pour d'autres, comme l'adriamycine ou doxorubicine, la mitomycine C, l'étoposide ou VP-16, le cis-platine, le celiptium, il s'agit peut être d'un simple effet secondaire. Ainsi, nous avons montré que le traitement par l'adriamycine induit une augmentation de l'élimination urinaire de 5-hydroxyméthyluracyle et de 8-oxodG ainsi qu'une élévation des TBARs associées à une baisse du tocophérol (Faure *et al.*, 1998) et que l'épirubicine augmente les lésions de l'ADN (Mousseau *et al.*, 2005). Dans le cas de l'adriamycine, cette production serait responsable de certains effets indésirables comme la toxicité pulmonaire, cardiaque ou rénale.

Une question importante se pose donc lors des traitements anticancéreux. Doit-on renforcer les défenses antioxydantes du malade, pour diminuer la toxicité du traitement et augmenter les défenses naturelles antioxydantes, ou au contraire, les diminuer pour faciliter la mort par apoptose des cellules tumorales ?

Expérimentalement, la superoxyde dismutase protège de la fibrose pulmonaire induite chez le rat par administration intra-trachéale de bléomycine (Parizada *et al.*, 1991) ; le PBN diminue la cardiotoxicité de la doxorubicine (Cova *et al.*, 1992), un antioxydant d'origine végétale ; l'acide

salvianolique diminue significativement la peroxydation des membranes mitochondriales induites par l'adriamycine sans modifier son activité antitumorale (Lin *et al.*, 1992). La vitamine E (Meyers *et al.*, 1978), le sélénium (Coudray *et al.*, 1992), ainsi que d'autres molécules antioxydantes, réduisent la cardiotoxicité de l'adriamycine chez le rat. La supplémentation par le β -carotène et la canthaxanthine diminue le nombre des dommages chromosomiques induits *in vitro* sur les lymphocytes par la bléomycine (Bianchi *et al.*, 1993).

Certains auteurs ont observé que les antioxydants pouvaient prévenir les effets secondaires des antimétabolites, mais aussi potentialiser l'action du traitement. La vitamine C, seule ou associée au tocophérol et au β -carotène, potentialise l'effet antiprolifératif du cis-platine, du tamoxifène du dacarbazine ou de l'interféron alpha 2b, sur des cellules de mélanome humain SK30 (Prasad *et al.*, 1994). Toutefois, les doses considérables utilisées dans ces études pourraient plutôt mettre en jeu le caractère pro-oxydant de cette vitamine à haute dose.

Il convient toutefois d'être prudent et d'attendre les résultats d'essais randomisés de plus grande puissance, car il existe des liens potentiels entre les mécanismes de résistance aux anticancéreux, qui font souvent appel au glutathion réduit pour fonctionner, et les défenses antioxydantes. Ainsi, la surexpression par transfert du gène de la résistance multidrogue (MDR) confère aux cellules 3T3 une susceptibilité accrue aux rayonnements et à la peroxydation lipidique (Panzzani *et al.*, 1996). La supplémentation par de fortes doses de vitamine E et de β -carotène pendant et 3 ans après radiothérapie de patients atteints de cancer de la tête et du cou, diminue certes fortement les complications mais favorise hélas les récives. L'incidence des cancers secondaires est très forte durant les trois ans de supplémentation (OD = 2,88) mais devient plus faible après arrêt de la supplémentation (Bairati *et al.*, 2005). L'apport d'acide folinique lors des traitements par l'association 5FU et levamisole diminue et augmente la survie globale et l'absence de récives de patients atteints de cancer du colon (Link *et al.*, 2005).

CONCLUSION

Les vitamines B₆, B₉, D et antioxydantes (C, E, caroténoïdes) constituent des nutriments importants pour nous protéger de l'apparition des cancers surtout chez les sujets dotés génétiquement d'un polymorphisme défavorable pour le métabolisme de ces vitamines, la détoxification des carcinogènes ou la réparation de l'ADN. Toutefois, des apports trop élevés peuvent accélérer l'évolution des tumeurs et sont à proscrire chez les sujets à apport nutritionnel suffisant ou à fort risque de lésions précancéreuses comme les fumeurs. Les apports supplémentaires peuvent donc être bénéfiques, surtout chez les sujets masculins, mais doivent de préférence être réalisés par des apports de fruits et légumes qui ne peuvent pas apporter des doses dangereuses.

Références bibliographiques

- Allgood VE, Cidlowski JA** (1992). Vitamin B₆ modulates transcriptional activation by multiple members of the steroid hormone receptor superfamily. *J Biol Chem*, **267** : 3819-3824.
- Anderson R, Theron AJ** (1990). Physiological potential of ascorbate, beta-carotene and alpha-tocopherol individually and in combination in the prevention of tissue damage. Carcinogenesis and immune dysfunction mediated by phagocyte-derived reactive oxidants. *Word Rev Nutr Diet*, **62** : 27-58.
- Bairati I, Meyer F, Gelinac M et al.** (2005). A randomized trial of antioxidant vitamins to prevent second primary cancers in head and neck cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, **6** : 481-488.
- Beckman KB, Ames BN** (1997). Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem*, **272** : 19633-19636.
- Bianchi L, Tateo F, Pizzala R et al.** (1993). Carotenoids reduce the chromosomal damage induced by bleomycin in human cultured lymphocytes. *Anticancer Res*, **13** : 1007-10.
- Block G, Hartman AM.** Dietary assesment methods. In : Moon TE, Nicosi MS (1989). *Nutrition and cancer prevention: investigating the role of micronutrients*. Marcel Dekker Inc, New York, 150-180.
- Blot WJ, Li JY, Taylor PR et al.** (1993). Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J Natl Cancer Inst*, **85** : 1483-1492.
- Blount BC, Ames BN** (1995). DNA damage in folate deficiency. *Baillieres Clin Haematol*, **8** : 461-478.
- Bogden JD, Oleske JM, LaVenham A et al.** (1990). Effects of one year supplementation with zinc and other micronutrients on cellular immunity in the elderly. *J Am Coll Nutr*, **9** : 214-225.
- Bollag W** (1983). Vitamin A and retinoids: from nutrients to pharmacotherapy in dermatology and oncology. *Lancet*, **8329** : 860-863.
- Boyd NF, Mc Guire V** (1990). Evidence of lipid peroxidation in premenopausal women with mammographic dysplasia. *Cancer Lett*, **50** : 31-37.
- Boyd NF, Mc Guire V** (1991). The possible role of lipid peroxidation in breast cancer risk. *Free Rad Biol Med*, **10** : 185-190.
- Bussey HJ, DeCosse JJ, Deschner EE et al.** (1982). A randomized trial of ascorbic acid in polyposis coli. *Cancer*, **50** : 1434-1439.
- Butterworth CE** (1992). Effect of folate on cervical cancer. Synergism among risk factors. *Ann N Y Acad Sci*, **669** : 293-299.
- Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat JL** (1997). Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **131** : 1-87.
- Cahill RJ, O'Sullivan KR, Mathias PM et al.** (1993). Effects of vitamin antioxidant supplementation on cell kinetics of patients with adenomatous polyps. *Gut*, **34** : 963-967.
- Cameron E, Pauling L** (1978). Experimental studies designed to evaluate the management of patients with incurable cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, **75** : 6252.
- Charry-Reddy S, Prasad V, Ahuja Y** (1994). Expression of common fragile sites in untreated non-hodgkin's lymphoma with aphidicolin and folate deficiency. *Cancer Lett*, **86** : 111-117.

- Chen WY, Bertone-Johnson ER, Hunter DJ et al.** (2005). Associations between polymorphisms in the vitamin D receptor and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **14** : 2335–2339.
- Cho KH, Son YS, Lee DY et al.** (1996). Calcipotriol (MC 903), a synthetic derivative of vitamin D3 stimulates differentiation of squamous carcinoma cell line in the rat culture. *Anticancer Res*, **16** : 337-347.
- Coudray C, Mouhiedine S, Richard MJ et al.** (1992). Effect of adriamycin on chronic cardiotoxicity in selenium deficient rats. *Basic Res Cardiol*, **87** : 173-183.
- Cova D, De Angelis L, Monti E, Piccinini F** (1992). Subcellular distribution of two spin trapping agents in rat heart: possible explanation for their different protective effects against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Free Rad Res Comm*, **15** : 353-360.
- D'yaz-Llera S, González-Hernández Y, Prieto-González EA, Azoy A** (2002). Genotoxic effect of ozone in human peripheral blood leukocytes. *Mutat Res*, **517** : 13–20.
- Dallergri F, Patrone F, Frumento G et al.** (1985). Down-regulation of K-cell activity by neutrophils. *Blood*, **65** : 571-577.
- Dion PW, Bright-See EB, Smith CC, Bruce WR** (1982). The effect of dietary ascorbic acid and alpha-tocopherol on fecal mutagenicity. *Mutat Res*, **102** : 27-37.
- Duthie SJ, Ma A, Ross MA, Collins AR** (1996). Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res*, **56** : 1291-1295.
- Dyke GW, Craven JL, Garner RC** (1994). Effect of vitamin C supplementation on gastric mucosal DNA damage. *Carcinogenesis*, **15** : 291-295.
- El-Hag A, Lipsky PE, Benett M, Clark RA** (1989). Immunomodulation by neutrophil myeloperoxidase and hydrogen peroxide: differential susceptibility of human lymphocyte functions. *J Immun*, **136** : 3420-3426.
- Faure H, Mousseau M, Cadet J et al.** (1998). Urine 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine vs. 5-(hydroxymethyl) uracil as DNA oxidation marker in adriamycin-treated patients. *Free Radical Research*, **28** : 377-382.
- Friedberg EC** (1995). Out of the shadows and into the light: the emergence of DNA repair. *Trends Biochem Sci*, **20** : 381.
- Galan P, Briçon S, Favier A et al.** (2005). Antioxidant status and risk of cancer in the SU.VI.MAX study : is the effect of supplementation dependent on baseline levels. *Br J Nutr*, **94** : 125-132.
- Galeotti TL, Masotti L, Borello S, Casali E** (1991). Oxy-radical metabolism and control of tumour growth. *Xenobiotica*, **21** : 1041-1051.
- Gardiner N, Duncan J** (1989). Inhibition of murine melanoma growth by sodium ascorbate. *J Nutr*, **119** : 586-590.
- Garewal HS, Meyskens FL Jr, Killen D et al.** (1990). Response of oral leukoplakia to beta-carotene. *J Clin Oncol*, **8** : 1715-1720.
- Gould M, Haag J Kennan W et al.** (1991). A comparison of tocopherol and tocotrienol for the chemoprevention of chemically induced rat mammary tumors. *Am J Clin Nutr*, **53** : 1068S-1070S.
- Grever M, Thompson V, Balcerzak S, Sagone A** (1980). The effect of oxidant stress on human lymphocyte cytotoxicity. *Blood*, **56** : 284-288.
- Gutteridge JML** (1984). Catalytic iron complexes in biological material: a potential for oxygen radical damage. *Life Chem Rep Supp*, **2** : 15-18.

- Hanawalt PC** (1994). Transcription-coupled repair and human disease. *Science*, **266** : 1957-1958.
- Hanusch M, Stahl W, Schulz W, Sies H** (1995). Induction of gap junctional communication by 4-oxoretinoic acid generated from its precursor canthaxanthin. *Arch Biochem Biophys*, **317** : 423-428.
- Heinonen O, Albanes D, Virtamo J et al.** (1998). Prostate cancer and supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene: incidence and mortality in a controlled trial. *J Natl Cancer Inst*, **90** : 440-446.
- Hercberg S, Galan P, Preziosi P et al.** (2004). The SU.VI.MAX Study: a randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Arch Intern Med*, **164** : 2335-2342.
- Hercberg S, Preziosi P, Galan P et al.** (2006). Effects of antioxidant supplementation on skin cancers according to gender: beneficial or harmful results of the SU.VI.MAX study, a randomised, placebo-controlled trial (communication personnelle).
- Hernandez J, Syed S, Weiss G et al.** (2005). The modulation of prostate cancer risk with alpha-tocopherol: a pilot randomized, controlled clinical trial. *J Urol*, **174** : 519-522.
- Ingram D** (1994). Diet and subsequent survival in women with breast cancer. *Br J Cancer*, **69** : 592-595.
- James S, Basnakian A, Miller B** (1994). In vitro folate deficiency induces deoxynucleotide pool imbalance, apoptosis, and mutagenesis in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res*, **54** : 5075-5080.
- Jatoi A, Williams B, Nichols F et al.** (2005). Is voluntary vitamin and mineral supplementation associated with better outcome in non-small cell lung cancer patients? Results from the Mayo Clinic lung cancer cohort. *Lung Cancer*, **49** : 77-84.
- Jeng KC, Yang CY, Siu WY et al.** (1996). Supplementation with vitamins C and E enhances cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in healthy adults. *Am J Clin Nutr*, **64** : 960-965.
- Jennings E** (1995). Folic acid as a cancer preventing agent. *Med Hypotheses*, **45** : 297-303.
- Keshavarian A, Zaped D, List T, Mobarhan S** (1992). High levels of reactive oxygen metabolites in colon cancer tissue: analysis by chemiluminescence probe. *Nutr Cancer*, **17** : 243-249.
- Kim J, Sun P, Lam YW et al.** (2005). Changes in serum proteomic patterns by presurgical alpha-tocopherol and l-selenomethionine supplementation in prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **14** : 1697-1702.
- Kim YI** (2004). Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **13** : 511-519.
- Le Marchand L, Donlon T, Lum-Jones A et al.** (2002). Association of the hOGG1 Ser326Cys polymorphism with lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **11** : 409-412.
- Le Marchand L, Haiman CA, Wilkens LR et al.** (2004). MTHFR polymorphisms, diet, HRT, and breast cancer risk: the Multiethnic Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **13** : 2071-2077.
- Lee CM, Boileau AC, Boileau TW et al.** (1999). Review of animal models in carotenoids research. *J Nutr*, **129** : 2271-2277.
- Lee IM, Cook NR, Gaziano JM et al.** (2005). Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial. *JAMA*, **294** : 56-65.
- Lin T, Liu G, Xu G** (1992). Protection by salvianolic acid A against adriamycin toxicity on rat heart mitochondria. *Free Rad Biol Med*, **12** : 347-351.

- Link KH, Kormmann M, Staib L et al.** (2005). Increase of survival benefit in advanced resectable colon cancer by extent of adjuvant treatment: results of a randomized trial comparing modulation of 5-FU + levamisole with folinic acid or with interferon-alpha. *Ann Surg*, **242** : 178-187.
- Lippman SM, Kessler JF, Meyskens FL** (1987). Retinoids as preventive and therapeutic anticancer agents. *Cancer Treat Rep*, **71** : 391-405.
- Litwack G, Robertson NM, Celiker N.** Vitamin B₆ and other inhibitors of glucocorticoid receptor function and cell death of B₁₆ melanoma cells. In : Jacobs M (1991). *Vitamins and minerals in the prevention and treatment of cancer*. CRC Press, Boca Raton : 19-30.
- Lonn E, Bosch J, Yusuf S et al.** (2005). HOPE and HOPE-TWO Trial Investigators. Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *JAMA*, **293** : 1338-1347.
- Lotan R** (1980). Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochem Biophys Acta*, **605** : 33-91.
- Malins DC, Haimanot R** (1991). Major alterations in the nucleotide structure of DNA in cancer of the female breast. *Cancer Res*, **51** : 5430-5432.
- Mayne ST, Janerich DT, Greenwald P et al.** (1994). Dietary beta carotene and lung cancer risk in US nonsmokers. *J Natl Cancer Inst*, **86** : 33-38.
- Meydani SN, Barklund P, Liu S et al.** (1990). Vitamin E supplementation enhances cell-mediated immunity in healthy elderly subjects. *Am J Clin Nutr*, **52** : 557-563.
- Meyer F, Galan P, Douville P et al.** (2005) Antioxidant vitamin and mineral supplementation and prostate cancer prevention in the SU.VI.MAX trial. *J Cancer*, **116** : 182-186.
- Meyers C, Mc Guire W, Young R** (1978). Adriamycin: amelioration of toxicity by α -tocopherol. *Cancer Treat Rep*, **60** : 961-962.
- Miller ER 3rd, Pastor-Barrusio R, Dalal D et al.** (2005). Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med*, **142** : 37-46.
- Mirvish SS** (1986). Effects of vitamins C and E on N-nitroso compound formation carcinogenesis and cancer. *Cancer*, **58** : 1842-1850.
- Modrich P** (1994). Mismatch, repair, genetic stability, and cancer. *Science*, **266** : 1959-1960.
- Moertel CG, Fleming TR, Creagan ET et al.** (1985). High-dose vitamin C versus placebo in the treatment of patients with advanced cancer who have had no prior chemotherapy. A randomized double-blind comparison. *N Engl J Med*, **312** : 137-141.
- Mousseau M, Faure H, Hininger I et al.** (2005). Leukocyte 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and comet assay in epirubicin-treated patients. *Free Radical Res*, **39** : 837-843.
- Murata M, Otsuka M, Hayakawa Y et al.** (1992). Expressivity of a common fragile site, fra (3) (p14.2) in patients with cancer and other diseases. *Jpn J Hum Genet*, **37** : 205-213.
- Murphy P, Myers D, Webster N, Jones J** (1992). Direct detection of free radical generation in an in vivo model of acute lung injury. *Free Rad Res Comm*, **15** : 167-176.
- Ni J, Wen X, Yao J et al.** (2005). Tocopherol-associated protein suppresses prostate cancer cell growth by inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway. *Cancer Res*, **65** : 9807-9816.

- Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD et al.** (1996). Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. *J Natl Cancer Inst*, **88** : 1550-1559.
- Orr RB, Kamen BA** (1995). Identification of a point mutation in the folate receptor gene that confers a dominant negative phenotype. *Cancer Res*, **55** : 847-852.
- Panzzani R, Fantappie O, Fabrizio P et al.** (1996). Conferring multidrug resistance by MDR1 transfection increases susceptibility to irradiation and lipid peroxidation in 3T3 cell line. *Free Radic Biol Med*, **20** : 601-606.
- Parizada B, Werber M, Nimrod A** (1991). Protective effects of human recombinant MnSOD in adjuvant arthritis and bleomycin-induced lung fibrosis. *Free Rad Res Comm*, **15** : 297-301.
- Pathak MA, Stratton K** (1969). Effect of UV and visible radiations on the production of free radicals in skin. *Arch Biochem Biophys*, **123** : 458-476.
- Pelucchi C, Galeone C, Talamini R et al.** (2005). Dietary folate and risk of prostate cancer in Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **14** : 944-948.
- Poulter JM, White WF, Dickerson JW** (1984). Ascorbic acid supplementation and five year survival rates in women with early breast cancer. *Acta Vitaminol Enzymol*, **6** : 175-182.
- Prasad K, Edwards-Prasad J** (1992). Vitamin E and cancer prevention: recent advances and future potentials. *J Am Col Nutr*, **11** : 487-500.
- Prasad K, Hernandez C, Edwards-Prasad J et al.** (1994). Modification of the effect of tamoxifen, cis-platin, DTIC, and interferon alpha 2b on human melanoma cells in culture by a mixture of vitamins. *Nutr Cancer*, **22** : 233-245.
- Pryor W, Prier D, Church D** (1983). Electron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar. *Environ Health Perspect*, **47** : 345-355.
- Riondel J, Glise D, Fernandez-Carlos T, Favier A** (1998). In vitro comparative study of cytotoxicity mediated by natural killer cells towards malignant cells preincubated with antioxidants. *Anticancer Research*, **18** : 1757-1764.
- Rodriguez C, Jacobs EJ, Mondul AM et al.** (2004). Vitamin E supplements and risk of prostate cancer in US men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **13** : 378-382.
- Ross JF, Chaudhuri PK, Ratman M** (1994). Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines. *Cancer*, **73** : 2432-2443.
- Rousseau E, Davison A, Dunn B** (1992). Protection by carotene end related compounds against oxygen-mediated cytotoxicity and genotoxicity: implications for carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Free Rad Biol Med*, **13** : 407-433.
- Sancar A** (1995). Excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem*, **270** : 15915-15918.
- Schecman G, Byrd J, Hoffman R** (1991). Ascorbic acid requirements for smokers: analysis of a population survey. *Am J Clin Nutr*, **53** : 1466-1470.
- Shi Q, Zhang Z, Li G et al.** (2005). Differences in risk of lung cancer associated with methylene-tetrahydrofolate reductase polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **14** : 1477-1484.
- Shklar G, Schwartz J, Trickler D, Niukan K** (1987). Regression by vitamin E of experimental oral cancer. *J Natl Cancer Instit*, **78** : 987-992.

- Singer A, Tay SK, Griffin JF et al.** (1987). Diagnosis of cervical dysplasia by the estimation octadeca-9,11-dienoic acid. *Lancet*, **8532** : 537-539
- Stevens RG, Jones DY, Micozzi MS, Taylor PR** (1988). Body iron stores and the risk of cancer. *N Engl J Med*, **319** : 1047-1052.
- Sugiyama M, Lin X, Costa M** (1991). Protective effect of vitamin E against chromosomal aberrations and mutation induced by sodium chromate in Chinese hamster V-79 cells. *Mutat Res*, **260** : 19-23.
- Terry MB, Gammon MD, Zhang FF et al.** (2004). Polymorphism in the DNA repair gene XPD, polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, cigarette smoking, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **13** : 2053-2058.
- Thurnham D** (1990). Antioxidant vitamins and cancer prevention. *Micronutr Anal*, **7** : 279-299.
- Toffoli G, Vernosi A, Boiocchi M** (2000). MTHFR gene polymorphism and severe toxicity during adjuvant treatment of early breast cancer with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil (CMF). *Ann Oncol*, **11** : 373-374.
- Toyokuni S** (1996). Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation. *Free Rad Biol Med*, **20** : 553-566.
- Ulrich CM, Curtin K, Potter JD et al.** (2005). Polymorphisms in the reduced folate carrier, thymidylate synthase, or methionine synthase and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **14** : 2509-2516.
- Van Gils C, Bostick RM, Stern MC, Taylor JA** (2002). Differences in base excision repair capacity may modulate the effect of dietary antioxidant intake on prostate cancer risk: an example of polymorphism in the XRCC1 gene cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **11** : 1279-1284.
- Van Poppel G, Kok FJ, Duijzings P, de Vogel N** (1992). No influence of beta-carotene on smoking-induced DNA damage as reflected by sister chromatid exchanges. *Int J Cancer*, **51** : 355-358.
- Van Poppel G, Kok FJ, Hermus RJ** (1992). Beta-carotene supplementation in smokers reduces the frequency of micronuclei in sputum. *Br J Cancer*, **66** : 1164-1168.
- Watson RR** (1991). Beta-carotene's effects on serum lipoproteins and immunologic indices in humans. *Am J Clin Nutr*, **54** : 609-610.
- Wei Q, Shen H, Wang LE et al.** (2003). Association between low dietary folate intake and suboptimal cellular DNA repair capacity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **12** : 963-969.
- Wu K, Willett WC, Chan JM et al.** (2002). A prospective study on supplemental vitamin E intake and risk of colon cancer in women and men cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **11** : 1298-1304.
- Yu J, Papavasiliou V, Rhim J et al.** (1995). Vitamin D analogs: new therapeutic agents for the treatment of squamous cancer and its associated hypercalcemia. *Anticancer Drugs*, **6** : 101-108.
- Zhang M, Hankinson SE, Hunter DJ et al.** (2005). Folate intake and risk of breast cancer characterized by hormone receptor status. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **14** : 2004-2008.
- Zhou W, Suk R, Liu G et al.** (2005). Vitamin D is associated with improved survival in early-stage non-small cell lung cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **14** : 2303-2309.
- Zu K, Ip C** (2003). Synergy between selenium and vitamin E in apoptosis induction is associated with activation of distinctive initiator caspases in human prostate cancer cells. *Cancer Research*, **63** : 6988-6995.

Carence en vitamine C et scorbut

Gisèle Le Moel, Olivier Fain

Il est difficile à croire qu'il existe dans les pays industrialisés des cas de scorbut par carence en vitamine C. Pourtant, cette carence est fréquente dans les populations défavorisées et s'intègre dans le cadre de carences multiples en vitamines et, le plus souvent, d'une dénutrition globale. Le scorbut survient après 3 mois de carence totale en acide ascorbique (Ely, 2003).

Jusqu'au XVIII^{ème} siècle le scorbut décimait les équipages lors des navigations au long cours. Dès 1753, James Lind mettait en évidence le rôle curatif de la consommation de citron. En 1932, N Haworth établissait la structure de la vitamine C et lui donnait le nom d'acide ascorbique.

Alors que le nombre de personnes en voie de précarité augmente, des observations de scorbut sont de plus en plus fréquemment rapportées et l'étude SU.VI.MAX (SUpplémentation en Vitamines et Minéraux AntioXydants) confirme un état de déplétion en vitamine C dans la population générale et en particulier dans la population masculine. (Faure *et al.*, 2006 ; Hercberg *et al.*, 2004).

RAPPELS PHYSIOLOGIQUES (cf. 1^{ère} partie)

La vitamine C est une vitamine hydrosoluble, altérable par la chaleur, les ultraviolets et facilement oxydable. Le pool total de l'organisme est de 1500 à 2500 mg, le turnover quotidien de 45 à 60 mg par jour et la demi-vie de 10 à 20 jours.

La vitamine C est absorbée au niveau de l'iléon par un mécanisme de transport actif, saturable sodium-dépendant. À forte dose, l'absorption se fait par diffusion passive ; la capacité maximum d'absorption est de 3 g mais peut être augmentée par absorption de doses fractionnées. La vitamine C passe rapidement dans le sang et diffuse dans les tissus. Dans le plasma, la vitamine C est sous forme d'ascorbate pour 90 à 95 % et de déhydroascorbate pour 5 à 10 %. L'entrée de l'ascorbate dans les cellules dépend d'un mécanisme de transport actif, sodium-dépendant, mettant en jeu des transporteurs (*Sodium Vitamin C Transporter*) SVCT1 et SVCT2 saturables tandis que celle du déhydroascorbate est de type facilité et implique les transporteurs membranaires des hexoses : GLUT 1, 2 et 4 (Hediger, 2002 ; Tsukaguchi *et al.*, 1999). Dans le rein, la vitamine C est réabsorbée à 90 % au niveau tubulaire après filtration glomérulaire.

La concentration en vitamine C est basse dans le plasma (5 à 15 mg/l) et dans les globules rouges mais est très élevée dans les plaquettes et les leucocytes. Les concentrations leucocytaires reflètent la concentration tissulaire. L'hypophyse, les surrénales et l'œil sont des organes riches en acide ascorbique alors que le muscle et le foie ont les concentrations les plus basses. À partir d'une concentration plasmatique de 15 mg/l, la vitamine C est éliminée par les urines pour 45 % sous forme d'acide oxalique, 25 % sous forme d'acide ascorbique et déhydroascorbique et pour 20 % sous forme d'acide dicétogulonique.

Il n'existe ni synthèse d'acide ascorbique ni stockage d'où la nécessité d'un apport quotidien d'origine alimentaire qui provient principalement des fruits et légumes frais. Le lait, la viande le poisson en contiennent très peu. Le besoin minimal pour prévenir le scorbut est de 10 mg/j et suffit à maintenir le pool total de 350 mg (Levine, 1986).

La fonction biochimique la plus importante de la vitamine C est son rôle dans la biosynthèse du collagène (Geesin et Berg, 2001). L'acide ascorbique protège les hydroxylases impliquées dans la biosynthèse du pro-collagène et agit comme cofacteur dans la réparation des tissus lésés. La carence en vitamine C induit une altération de la structure du collagène et le scorbut est caractérisé par des anomalies du tissu conjonctif et de la cicatrisation (Philipps et Yeowell, 1997). Ceci explique les manifestations cliniques du scorbut avec altération de la formation de dentine et déchaussement des dents, atteinte de la paroi vasculaire et purpura avec syndrome hémorragique, œdèmes, altération cutanée par atteinte de la kératine, remaniement osseux du fait de l'incapacité des ostéoblastes à former la bordure ostéoïde chez l'enfant.

L'acide ascorbique intervient dans la synthèse de la carnitine à partir de la lysine et de la méthionine par deux hydroxylases contenant l'ion ferreux. La carence en acide ascorbique pourrait diminuer la synthèse de la carnitine et de ce fait inhiber le transfert des acides gras à longue chaîne dans la mitochondrie, entraînant fatigue musculaire et lassitude observées dans le scorbut.

L'acide ascorbique participe aux réactions d'hydroxylation de la phénylalanine et de la tyrosine, les précurseurs de la dopamine et de la noradrénaline, ce qui peut rendre compte des troubles du comportement et de l'humeur observés au cours du scorbut.

L'acide ascorbique est un important réducteur physiologique. C'est l'un des quatre antioxydants apportés par l'alimentation avec les caroténoïdes, la vitamine E et le sélénium qui participent à la dégradation des radicaux oxygénés, assurant une protection de la cellule contre les agents toxiques.

PRÉVALENCE DE L'HYPOVITAMINOSE C

Au Royaume-Uni, des études réalisées dans les années 1970 montrent que 50 % des personnes âgées vivant à domicile avaient une ascorbémie inférieure à 2mg/l. Dans l'étude du Val de Marne portant sur 1108 sujets non hospitalisés, Hercberg *et al.* (1994) mettaient en évidence une ascorbémie inférieure à 2 mg/l chez 5 % des femmes et 12 % des hommes adultes et après 65 ans chez 15 % des femmes et 20 % des hommes.

Dans notre étude prospective de 184 patients hospitalisés dans un service de médecine interne du département de la Seine St-Denis, une hypovitaminose C était détectée dans 47,3 % des cas avec une ascorbémie <5 mg/l et une carence dans 16,9 % des cas avec une ascorbémie <2mg/l (Fain *et al.*, 2003). Dans les années 1985-1990, plus de 100 000 cas de scorbut ont été répertoriés parmi des réfugiés Ethiopiens.

Les taux d'ascorbémie varient en fonction de la saison et les valeurs sont plus basses en hiver, en rapport avec la difficulté de s'approvisionner en fruits et légumes frais.

QUELLES CIRCONSTANCES FAVORISENT LA CARENCE EN VITAMINE C DANS LES PAYS INDUSTRIALISÉS?

Tableau 1 : Populations à risque et facteurs favorisant la carence en vitamine C

Diminution des apports <ul style="list-style-type: none">• Hommes seuls• Sujets âgés• Sans domicile fixe• Consommation excessive alcool et tabac• Troubles psychiatriques : psychose, anorexie mentale,...• Maladies cachectisantes : cancer, SIDA,...• "Fast fooder" et autres régimes déséquilibrés• Alimentation parentérale exclusive non supplémentée	Diminution de l'absorption <ul style="list-style-type: none">• Maladie de Crohn• Maladie de Whipple• Maladie cœliaque Augmentation des besoins <ul style="list-style-type: none">• Surcharges en fer• Croissance, grossesse, allaitement Fausse carences <ul style="list-style-type: none">• Redistribution de la vitamine C plasmatique vers les leucocytes• Syndromes inflammatoires
Augmentation du métabolisme <ul style="list-style-type: none">• Fumeurs• Diabétiques• Hémodialyse et dialyse péritonéale	

Diminution des apports dans les populations à risque

Cette diminution est liée au mode de vie, mais surtout aux conditions socio-économiques défavorables. Les déficiences, voire les carences, se rencontrent dans la population âgée, isolée ou en institution, dans la population alcoolique chronique et dans la population tabagique.

Dans notre étude menée dans le département de la Seine St Denis (93) plusieurs facteurs de risque ont été identifiés : sexe masculin, état de retraité ou chômeur, consommation alcool-tabagique excessive (Fain *et al.*, 2003).

Le tabac diminue l'absorption et augmente le catabolisme de la vitamine C avec un turnover journalier supérieur de 40 % chez les gros fumeurs (> 20 cigarettes/jour) par rapport aux non-fumeurs (Kallner *et al.*, 1981). Chez les fumeurs, les besoins sont augmentés car la vitamine C intervient comme réducteur de l'oxyde de carbone.

Certaines pathologies

Certaines pathologies favorisent la carence par diminution des apports tels les troubles psychiatriques (psychose, anorexie mentale) ou par augmentation des besoins (affections cachectisantes, cancer, sida).

Certains traitements

Nutrition parentérale jadis non supplémentée, hémodialyse, dialyse péritonéale.

Diminution de l'absorption

Malabsorptions digestives chroniques, pathologies intestinales : maladie de Crohn, maladie de Whipple, maladie cœliaque.

Augmentation des besoins

Les besoins sont augmentés au cours de la croissance, de la grossesse et de l'allaitement. Chez les diabétiques insulino-dépendants, la concentration d'acide ascorbique leucocytaire est diminuée malgré des apports quotidiens conformes aux valeurs recommandées (Johnston et Thompson, 1998).

DIAGNOSTIC D'UNE HYPOVITAMINOSE C ET D'UNE CARENCE : SCORBUT CHEZ L'ADULTE, MALADIE DE BARLOW CHEZ L'ENFANT

Tableau 2 : Manifestations cliniques et biologiques du scorbut

Signes généraux <ul style="list-style-type: none">• Asthénie, anorexie	Manifestations cutanées <ul style="list-style-type: none">• Hyperkératose folliculaire• Ichtyose pigmentée• Oedèmes des membres inférieurs• Atteinte des phanères : "cheveux en tire-bouchon", alopecie.
Manifestations ostéoarticulaires <ul style="list-style-type: none">• Arthralgies• Myalgies• Hémarthrose	Autres <ul style="list-style-type: none">• Syndrome sec• Hypertrophie parotidienne• Troubles psychiatriques : dépression• Déficit de l'immunité cellulaire et troubles de la phagocytose• Convulsions• Atteintes cardiaques : <i>Modifications du segment ST et des ondes T</i> <i>Mort subite</i>
Chez l'enfant : <ul style="list-style-type: none">• Douleurs osseuses (hémorragies sous-périostées)• Radiographies manchon péri-ostéodiaphysaire, élargissement de l'extrémité antérieure des côtes.	Signes biologiques <ul style="list-style-type: none">• Anémie• Leucopénie• Hypocholestérolémie• Hypoalbuminémie
Syndrome hémorragique <ul style="list-style-type: none">• Purpura• Ecchymoses• Hématomes• Hémarthrose• Hémorragies des gaines des nerfs• Hémorragies cérébrales, gynécologiques	
Manifestations stomatologiques <ul style="list-style-type: none">• Gingivite hypertrophique et hémorragique (absente en cas d'édentation)• Parodontolyse• Chutes des dents	

Selon le modèle expérimental de scorbut, le délai d'apparition des signes cliniques suit le schéma suivant :

Régime restrictif à J0, ascorbémie nulle à J 41, déplétion cellulaire (globules blancs) à J 121, premiers signes cutanés à J 132. Les anomalies dentaires ainsi que le retard n'apparaissent qu'au bout de six mois. Le tableau clinique se constitue en 1 à 4 mois de carence absolue en acide ascorbique quand le pool total de l'organisme est inférieur à 300 mg et que l'ascorbémie est inférieur à 2 ou 2,5 mg/l. En cas de supplémentation, ces signes disparaissent en une semaine environ mais les lésions cutanées hyperkératosiques ne régressent qu'après un traitement de 2 semaines (Grandon *et al.*, 1940).

Signes cliniques chez l'adulte (figures 1 et2)

Les signes cliniques associent des signes généraux, des signes ostéoarticulaires, un syndrome hémorragique et des signes cutanéomuqueux. (Hodges *et al.*, 1971).

Signes généraux : ils apparaissent rapidement avec asthénie, anorexie, amaigrissement, faiblesse musculaire, besoin de sommeil et susceptibilité plus grande aux infections.

Signes ostéoarticulaires : arthralgies des épaules, des poignets et surtout des membres inférieurs : genoux, chevilles, des myalgies, des hémarthroses.

Syndrome hémorragique : purpura pétéchial des membres et du tronc centré sur les follicules pileux, hématomes, hémorragies des gaines des nerfs avec "paralysie douloureuse du scorbut", hémorragies intramusculaires, hémarthroses responsables d'ostéolyses, hémorragies digestives, gynécologiques ou cérébrales. Ce syndrome hémorragique est secondaire à une altération de la synthèse du collagène et des anomalies des fonctions plaquettaires. Les plaies ne cicatrisent plus à ce stade : il peut survenir une tachycardie, une dyspnée pouvant entraîner la mort par arrêt cardiaque ou infection grave.

Les manifestations stomatologiques, bien que caractéristiques, avec gingivite hypertrophique et hémorragique, n'apparaissent que si l'état dentaire est mauvais. En cas d'édentation elles ne sont pas toujours présentes. Une parodontolyse peut survenir secondairement avec mobilité dentaire et chute des dents.

Signes cutanéomuqueux : en dehors du purpura et des ecchymoses, le tableau se complète par une folliculite hyperkératosique, une ichtyose pigmentée, un œdème des membres inférieurs et une atteinte des phanères : "cheveux en tire-bouchon".

Ces manifestations sont souvent associées à des troubles psychiatriques type dépression.

Signes cliniques chez l'enfant

Le scorbut peut survenir chez l'enfant entre 6 à 18 mois en cas d'alimentation artificielle exclusive non supplémentée. Les manifestations sont essentiellement ostéoarticulaires : douleurs osseuses secondaires aux hémorragies sous péri-ostéodiaphysaire.



Figure 1 : Manifestations cutanées du scorbut :
hématomes, ecchymoses et oedèmes
des membres inférieurs



Figure 2 : Manifestations stomatologiques du
scorbut : gingivite et perte de dents

Signes biologiques

Les signes biologiques sont : une anémie hypochrome, normo- ou macrocytaire secondaire aux hémorragies et à l'hémolyse intravasculaire, une leucopénie, une carence en fer et en folates, une hypoalbuminémie par malnutrition et une hypocholestérolémie.

Le diagnostic de la carence est établi par le dosage de l'ascorbémie. Le dosage direct de l'ascorbémie reflète les prises récentes d'acide ascorbique mais le statut vitaminique est établi par le dosage leucocytaire qui reflète le stock de l'organisme. Cependant, ce dosage ne peut être couramment pratiqué car non automatisable (Djedour *et al.*, 2005).

Valeurs fréquentes

- Plasma = 5 à 14 mg/l, soit 45 à 90 $\mu\text{mol/l}$
- Leucocytes = 180-420 $\mu\text{g}/100$ millions de cellules.

Les valeurs de l'ascorbémie ne peuvent être interprétées qu'en fonction de l'existence ou non d'un syndrome inflammatoire qui favorise le transfert de la vitamine C du plasma vers les leucocytes avec baisse de l'acide ascorbique dans le plasma et augmentation dans les leucocytes.

La carence est définie pour des valeurs d'ascorbémie inférieures à 2 ou 2,5 mg/l selon les auteurs.

L'état de déplétion est défini pour les valeurs d'ascorbémie comprises entre 2 et 5 mg/l sans que des signes cliniques n'apparaissent.

En absence de diagnostic et de traitement, l'évolution est défavorable avec aggravation du syndrome hémorragique, déficit de l'immunité cellulaire, majoration du risque infectieux, troubles de la phagocytose, convulsions, parfois atteinte cardiaque voire mort subite.

DÉPLÉTIONS ASYMPTOMATIQUES EN VITAMINE C

À des valeurs prolongées d'ascorbémie comprises entre 2 et 5 mg/l, qui témoignent d'un état de déficience, sont associés certains états pathologiques liés le plus souvent à la diminution de l'effet antioxydant de la vitamine C : fatigabilité, augmentation des infections, augmentation du risque de cancer surtout chez les fumeurs (Carr et Frei, 1999), développement de la cataracte, diminution de la réponse immunitaire sachant que l'acide ascorbique participe aux fonctions immunologiques et bactéricides des leucocytes en augmentant leur mobilité et en protégeant les membranes des atteintes oxydatives.

Vitamine C et cancer

De nombreuses études épidémiologiques mettent en évidence l'effet protecteur des fruits et légumes vis-à-vis des cancers. L'acide ascorbique aurait un pouvoir important dans ce processus, en particulier dans les cancers de la cavité buccale, du pharynx, de l'œsophage, de l'estomac et du pancréas (Khaw *et al.*, 2001). Du fait de son pouvoir antioxydant, l'acide ascorbique pourrait inhiber les processus oxydatifs et les radicaux libres impliqués dans l'initiation et la promotion du processus néoplasique. De plus, l'acide ascorbique empêche la formation de nitrosamines dans l'estomac.

Vitamine C et cataracte

Le cristallin contient des concentrations élevées d'acide ascorbique. L'attaque des protéines du cristallin est considérée comme responsable en partie de la cataracte par formation de produits de Maillard. L'acide ascorbique et d'autres substances antioxydantes retarderaient ce processus. D'où le possible intérêt d'une supplémentation préventive en vitamine C à des doses de 120 à 500 mg/jour pendant plusieurs années variant de 5 à 10 ans. À la vitamine C, ont souvent été associées la vitamine E, le bêta-carotène et d'autres caroténoïdes (Chylack *et al.*, 2002), mais les résultats de toutes les études ne sont pas concordants.

Vitamine C et maladies cardiovasculaires

Plusieurs études épidémiologiques ont montré une relation inverse entre le niveau de vitamine C dans le plasma associé au bêta-carotène et le risque d'angor. Une étude récente a mis en évidence une protection accrue chez les femmes consommant des suppléments en vitamine C (Organian *et al.*, 2003) et une étude prospective sur 4 ans a mis en évidence une corrélation inverse entre les apports en vitamine C et la mortalité cardiovasculaire des sujets masculins et féminin indépendamment de l'âge, de la pression artérielle, du cholestérol plasmatique et de la consommation de tabac (Khaw *et al.*, 2001).

Vitamine C et troubles cognitifs

Les patients atteints de maladie d'Alzheimer présenteraient des taux effondrés de vitamine C et une supplémentation en vitamine C semblerait diminuer le risque de cette maladie (Morris *et al.*, 1998).

TRAITEMENT ET PRÉVENTION DU SCORBUT

Le traitement du scorbut consiste en l'administration d'un gramme de vitamine C réparti en plusieurs prises quotidiennes pendant 15 jours, *per os* le plus souvent ou par voie parentérale en cas de malabsorption. Le syndrome hémorragique disparaît en 48 h avec une amélioration des autres symptômes en une quinzaine de jours. L'administration de vitamine C à forte dose est contre-indiquée dans les cas d'hémochromatose, d'oxalose et de déficit en G6PD (risque d'hémolyse). La goutte, l'acidose rénale, la cirrhose, l'hémoglobinurie paroxystique nocturne sont aggravées par une charge en vitamine C. Une consommation accrue de grandes quantités de vitamine C au long cours peut favoriser l'apparition de calculs rénaux et de diarrhée.

La prévention du scorbut se fait par une alimentation équilibrée et riche en fruits et légumes. Il est recommandé par le comité pour la santé de consommer au moins 5 fruits et légumes par jour.

En France, les apports recommandés en vitamine C pour les adultes des deux sexes sont de 110mg/jour. Ces recommandations tiennent compte de la prévention du scorbut (10mg/j), mais surtout des concentrations nécessaires à la diminution du risque de maladies cardiovasculaires, de cancer et de cataracte.

Dans certaines circonstances telle la réanimation post-chirurgicale, pour éviter le risque de scorbut par carence profonde, des apports de 2 000 mg/jour sont recommandés pour des patients maintenus en nutrition entérale ou parentérale (Perret *et al.*, 2004).

CONCLUSION

Le déficit en vitamine C est fréquent, souvent méconnu mais délétère à long terme. Cependant, les demandes de dosage sont plus fréquemment prescrites car l'analyse en chromatographie haute performance en a facilité l'accès. Les rhumatologues, les gériatres, les pédiatres et les services de médecine interne sont les principaux prescripteurs.

Le scorbut bien que de faible incidence est une pathologie d'actualité dans des populations à risque. Oui le scorbut existe toujours au XXI^{ème} siècle.

Références bibliographiques

- Carr AC, Frei B** (1999). Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in human. *Am J Clin Nutr*, **69** : 1086-1107.
- Chylack Jr LT, Brown NP, Bron A et al.** (2002). The Roche European American Cataract Trial (REACT): a randomized clinical trial to investigate the efficacy of an oral antioxidant micronutrient mixture to slow progression of age-related cataract. *Ophthalmic Epidemiol*, **19** : 49-80.
- Djedour A, Merah K, Dupre T et al.** (2005). Détermination de la stabilité de la vitamine C leucocytaire *in vitro*. *Act Pharm Biol Clin*, **13** : 263-267.
- Ely JJ** (2003). Inadequate levels of essential nutrients in developed nation as a risk factor for disease: a review. *Rev Environ Health*, **18** : 111-129.
- Fain O, Paries J, Jacquart B, Le Moel G et al.** (2003). Hypovitaminosis C in hospitalized patients. *Eur J Intern Med*, **14** : 419-425.
- Fain O, Le Roux G, Lenoble L, Guillevin L** (1990). Le scorbut : manifestations cutanées et systémiques ; évolution des perturbations de l'hémostase. *Sem Hôp Paris*, **11** : 559-562.
- Faure H, Preziosi, Roussel A-M et al.** (2006). Factors influencing blood concentration of retinol, α -tocopherol, vitamin C and β -carotene in the French participants of the SU.VI.MAX trial. *Eur J Clin Nutr*, **60** : 1-12.
- Geesin JC, Berg RA** (2001). Ascorbic acid regulation of extracellular matrix expression. *In* : Rucker RB, Suttie JW, McCormick DB, Machlin LJ (2001). *Handbook of vitamins 3rd edition*, Marcel Dekker, New York : 555-568.
- Grandon JH, Lund CC, Dill DB** (1940). Experimental human scurvy. *N Engl J Med*, **23** : 3533-3569.
- Hediger MA** (2002). New view at vitamin C. *Nature Medicine*, **8** : 445-446.
- Hercberg S, Galan P, Preziosi P et al.** (2004). The SU.VI.MAX study: a randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Arch Intern Med*, **164** : 2335-2342.
- Hodges RE, Hood J, Canham JE et al.** (1971). Clinical manifestations of ascorbic acid deficiency in man. *Am J Clin Nutr*, **4** : 432-443.
- Johnston CS, Thompson LL** (1998). Vitamin C status of an outpatient population. *J Am Coll Nutr*, **17** : 366-370.
- Kallner A, Hartmann D, Hornig DH** (1981). On the requirements of ascorbic acid in man: steady-state turnover and body pool in smokers. *Am J Clin Nutr*, **34** : 1347-1355.
- Khaw FT, Bingham S, Welch A et al.** (2001). Relation between plasma ascorbic acid and mortality in men and women in EPIC-Norfolk prospective study ; a prospective population study. European prospective investigation into cancer and nutrition. *Lancet*, **357** : 657-663.
- Levine M** (1986). New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *N Engl J Med*, **14** : 892-902.
- Morris MC, Beckett LA, Scherr PA et al.** (1998). Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of incident Alzheimer disease. *Alzheimer Disease Assoc Disord*, **12** : 121-126.
- Organian SK, Stampfer MJ, Rimm E et al** (2003). Vitamin C and risk of coronary heart disease in women. *J Am Coll Cardiol*, **16** : 246-252.
- Perret JL, Lagauche D, Favier JC et al.** (2004). Scorbut en soin intensifs malgré un apport vitaminique. *Presse Méd*, **14** : 170-171.
- Philipps CL, Yeowell HN.** Vitamin C, Collagen Biosynthesis and Aging. *In* : Packer L, Fuchs J (1997). *Vitamins in Health and Disease*. Marcel Dekker, Inc. New York, 205-230.
- Tsukaguchi H, Tokui T, Mackenzie B et al.** (1999). A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature*, **399** : 70-75.

Anorexie mentale et troubles du comportement alimentaire : des déficits bien au-delà du tissu adipeux

Daniel Rigaud

DÉFINITIONS

L'anorexie mentale (AM) est un besoin farouche de maigrir, alors même que le poids ne le justifie plus (Rigaud, 2003). Le diagnostic en est facile : perte de poids corporel de plus de 15 %, peur de grossir, refus de peser même un poids minimum pour l'âge, aménorrhée.

Dans le détail, le diagnostic associe les signes suivants (Rigaud, 2003) :

1. Amaigrissement de plus de 15 % du poids antérieur (ou normal pour l'âge).
2. Peur de grossir quel que soit le poids actuel. **C'est un signe majeur** : si ce signe est absent, ce n'est pas une anorexie mentale.
3. Peur de trop manger, même après avoir diminué ses repas par deux. **C'est un signe majeur**.
4. Trouble de l'image corporelle (et peur de "mal grossir"). Ce signe est très fréquent.
5. Troubles du comportement alimentaire : refus des repas, évictions de nombreux aliments (matières grasses), peur du regard de l'autre, tri... Ce signe est très souvent présent.
6. Aménorrhée. Ce signe est quasi constant (95 % des cas).
7. Absence de maladie psychiatrique ou somatique autre.

D'autres signes sont évocateurs :

Hyperactivité physique ; vomissements ou crises de **boulimie** (un tiers des cas) ; bradycardie ; lanugo (pilosité archaïque sous forme d'un mince duvet sur les joues, les bras, le haut du dos). **Vomissements** ou boulimie conditionnent le pronostic (cf. infra).

Le diagnostic est purement clinique : un **poids bas** et la **peur de rejoindre un poids même minimal** (chez l'adulte : IMC de 18,5 kg/m²) normal chez une **femme jeune** suffisent quasiment au diagnostic (Rigaud, 2003).

Il y a deux formes différentes d'anorexie mentale :

- la forme restrictive pure : si la restriction alimentaire et l'hyperactivité physique sont les seuls mécanismes de la perte de poids pendant au moins deux ans, il n'y aura dans le futur quasi jamais ni crise de boulimie ni vomissements ;
- la forme boulimique : il y a ou il y a eu, dans les 2 premières années, des vomissements et/ou des crises de boulimie. Les malades ne pourront plus s'en passer.

La boulimie est l'ingestion en un temps court d'une grande quantité d'aliments, sans faim ni plaisir ni rassasiement, avec la sensation intense de perdre tout contrôle et le besoin de se "purger", "de brûler des calories" ensuite : vomissements le plus souvent, hyperactivité physique, ou jeûne (Rigaud, 2003). Les crises peuvent être organisées, prévues, ou impulsives, soudaines. La boulimie est la succession, plusieurs fois par semaine, de crises de boulimie chez un malade, une femme le plus souvent, qui refuse de prendre même trois kilogrammes. Puisque les crises sont impossibles à éviter, il faut vomir. À l'origine de la boulimie, on note une anorexie mentale dans deux tiers des cas (la boulimie "compliquée et suit", dans les deux ans, l'anorexie dans un tiers des cas) et un état dépressif dans un tiers des cas. La peur de grossir, le dégoût de soi et la mésestime de soi sont omniprésents. On peut enfin considérer que la boulimie est une conduite addictive.

Les compulsions alimentaires correspondent à l'ingestion, en un temps assez court, de grosses quantités d'aliments sans pour autant que la perte de contrôle soit aussi forte que dans la boulimie. Les aliments sont ici choisis, il y a un certain plaisir à les consommer, ce qui fait que le dégoût de soi est bien moins fort. Comme il n'y a pas vraiment de besoin d'être mince ou de maigrir, il n'y a pas de vomissements, ni d'hyperactivité physique. Les malades peuvent donc grossir et devenir obèses (Rigaud, 2003). La compulsion est une forme mineure de conduite addictive.

ÉPIDÉMIOLOGIE ET FRÉQUENCE

Les troubles du comportement alimentaire (TCA) se déclenchent le plus souvent à l'adolescence (Rigaud, 2003), entre 14 et 17 ans pour l'anorexie, et plus tardivement, entre 16 et 20 ans, pour la boulimie. Mais de plus en plus, les TCA frappent des adultes jeunes. Ils touchent :

- **Les femmes** beaucoup plus que les hommes : 90 % de femmes pour 10 % d'hommes.
- **Les jeunes** : Plutôt les femmes jeunes, 90 % des malades ont entre 14 et 35 ans.
- **Peu ou pas de passé psychiatrique** en règle.

On admet (il n'y a pas de "registre national") que 1 à 2 % des femmes de 15 à 35 ans ont une anorexie mentale, 5 à 8 % une boulimie et 5 à 13 % des compulsions alimentaires sévères. Les TCA sont donc fréquents.

LA DÉNUTRITION ET LES CARENCES VITAMINIQUES

L'anorexie mentale (AM)

La dénutrition est quasi constante : elle touche 90 % des malades. La peur de grossir les pousse à maigrir toujours plus. Cet amaigrissement conduit à la dénutrition, dès lors que la perte de poids s'accompagne d'une perturbation des fonctions physiologiques (Moyano *et al.*, 1999 ; Oliveri *et al.*, 1999).

Les mécanismes de la dénutrition

La dénutrition, dans l'AM, a plusieurs mécanismes différents (Rigaud, 2003) :

- **La restriction alimentaire** : elle est féroce. Elle porte initialement sur les matières grasses ajoutées (huiles, beurre, crème fraîche, margarines, saindoux) vite supprimées, ainsi que sur les aliments gras (charcuteries, fromages, viandes et poissons grasses, fritures). Dans un 2^{ème} temps, l'exclusion touche féculents, légumes secs et viandes. Il en résulte d'innombrables carences alimentaires en macronutriments (acides aminés essentiels, acides gras essentiels) et en micronutriments : vitamines liposolubles avant tout (A, D, E et K), vitamines du groupe B, fer, calcium, folates, zinc. Mais aussi potassium et chlore en cas de vomissements.
- **L'hyperactivité physique** : loin de leur permettre de défendre leur état nutritionnel, cette activité physique obsessionnelle accentue le déficit en augmentant le turn-over de divers nutriments (protéines, acides gras, phosphore, magnésium, etc.). Cette hyperactivité physique et mentale induit aussi troubles du sommeil et mesures "d'ascétisme" : se tenir sur une jambe, lire ou regarder la télévision debout, marcher jusqu'à épuisement...
- Les vomissements amplifient certaines carences : le rejet de la sécrétion gastrique acide conduit à une perte de protons (HCl, donc H⁺ et Cl⁻), de calcium, de phosphore, de sodium et... d'eau.

Les conséquences des carences en vitamines

Ces conséquences ne peuvent être scientifiquement évaluées, dans la mesure où elles s'associent à d'innombrables autres carences (acides gras essentiels, acides aminés, minéraux et oligo-éléments). Elles induisent desquamation cutanée jusqu'à une pseudo-ichtyose (peau fripée, puis peau de serpent), mélanodermie atypique, perlèche, stomatite, gingivite, altération des cheveux et ongles, pâleur de la peau et faciès émacié, agueusie parfois (perte du goût), asthénie et anémie, diminution de la vision nocturne.

Le risque

Dans les dénutritions extrêmes (IMC < 11 kg/m²), la carence en vitamines et minéraux est telle que la reprise de l'alimentation sans frein peut aboutir au décès brutal, par épuisement en quelques heures des "réserves" en micronutriments nécessaires au métabolisme intermédiaire ("syndrome de renutrition"). Il faut donc assurer durant les premières 48 h un apport important de vitamines, minéraux (phosphore, magnésium, calcium) et oligo-éléments et un apport très faible en nutriments énergétiques. L'augmentation de l'apport de ces derniers sera douce et progressive.

Les vitamines dans le détail

Dans une étude récente, Zenger *et al.* (2004) ont dosé l'homocystéine, le glutathion et les vitamines B₆, B₉, et B₁₂ dans le plasma chez 11 malades : chez une patiente très dénutrie, les déficits étaient associés à une élévation marquée des transaminases. Chez les autres, la concentration plasmatique de cystéine libre, de glutathion, d'homocystéine et de vitamines B₆, B₉ et B₁₂ était basse dans 40 % des cas. Les concentrations d'homocystéine, de glycine et de glutamine étaient moins basses chez les malades n'ayant pas de déficit en vitamines B₆, B₉ et B₁₂.

Des cas isolés de pellagre "complète" ont été décrits dans l'AM. La pellagre est liée à un déficit couplé en tryptophane et niacine. On y décrit diarrhée, dermatite, troubles digestifs, troubles de l'idéation, démence et décès. Certains de ces signes sont assez fréquents en cas d'AM. Dans une revue de la littérature, Prousky (2003) conclut que la desquamation, la glossite et la stomatite, ainsi que les troubles de l'idéation seraient liés à un déficit en niacine. Un dosage urinaire de 24 h des métabolites de la niacine et de l'acide 5-hydroxy-indole-acétique fait le diagnostic, avec la rapide disparition des signes sous niacine.

Mais la complication la plus sévère à long terme, si les malades survivent, est l'**ostéoporose**. Cet excès de déminéralisation osseuse lié à un excès de catabolisme osseux est sous la dépendance de plusieurs facteurs : l'IMC bas (< 18,5 kg/m²), l'aménorrhée et sa durée, le déficit en vitamines D et K et en calcium (Iketani *et al.*, 2003 ; Rigaud, 2003 ; Rock et Vasantharajan, 1995). Comme toujours, calcium et vitamine D plasmatiques sont le plus souvent dans les limites de la normale. La 1-25(OH)₂ D₃ peut être trouvée basse (Olmos *et al.*, 1991). La restauration d'un IMC normal (>18,5 kg/m²) et le retour des règles sont les seuls garants d'une restitution intégrale de la masse osseuse. En l'attendant, le traitement "classique" doit comporter calcium (500 mg/j), vitamine D₂ (800 UI soit 20 µg/j) et traitement œstro-progestatif de type "ménopause" (patch d'œstrogène naturel et progestatif). Ce traitement pourrait éviter la poursuite de la dégradation osseuse, en cas de chronicité de la maladie et d'IMC très bas. Selon Iketani *et al.* (2003), un traitement combiné vitamine D + K₂ pourrait faire mieux (perte osseuse : 2,8 % dans le groupe D + K₂ et 6,9 % dans le groupe contrôle non tiré au sort).

Un déficit en vitamines A et E est fréquent quand recherché dans l'AM (Moyano *et al.*, 1999 ; Rock et Vasantharajan, 1995 ; Vaisman *et al.*, 1992). Le tocophérol et la superoxyde dismutase plasmatiques sont bas dans un quart à un tiers des cas, sans retentissement évident (au contraire) sur les fonctions d'immunité.

Un déficit en vitamine B₆ et riboflavine (Rock et Vasantharajan, 1995) n'est pas rare. Ont été décrits enfin des cas isolés d'ostéomalacie (Oliveri *et al.*, 1999) par effondrement de la vitamine D et de la calcémie chez de jeunes patientes (< 14 ans), et quelques cas de scorbut par déficit en vitamine C (Christopher *et al.*, 2002).

Mais le déficit en vitamines est probablement, comme c'est le cas pour les autres nutriments, masqué dans l'AM : longtemps, les concentrations plasmatiques sont dans les limites de la normale (Rigaud *et al.*, 1987), alors que les signes cliniques de déficit sont présents et que la prise en charge nutritionnelle, par exemple par nutrition entérale, les corrige. Ainsi, dans 21 cas d'AM, nous avons mis en évidence une concentration plasmatique élevée d'homocystéine, normalisée 17 fois par une

supplémentation en vitamines B₉ et B₁₂ (résultats non publiés). Cette “normalité anormale” s’explique en partie par l’hémoconcentration qu’induisent la dénutrition, la restriction alimentaire et les vomissements, quand il y en a (Rigaud, 2003).

La boulimie

La malnutrition est moins visible, car le poids est normal. Les restrictions alimentaires et les vomissements expliquent pourtant pourquoi beaucoup de ces malades sont malnutries : altération de la peau et des phanères, troubles de l’humeur et du sommeil, atteintes gingivales et dentaires. Au demeurant, en cas de vomissements, l’anorexie s’accompagne de déficits vitaminiques plus fréquents et marqués que la forme restrictive pure, à IMC et durée d’évolution égaux. L’hypokaliémie est une conséquence connue des vomissements, mais bien des médecins et biologistes oublient l’hémoconcentration, l’hypochlorémie, la perte acide (réserve alcaline élevée) et l’insuffisance rénale fonctionnelle qui en résultent. Surtout personne ne prend en compte les carences nutritionnelles très nombreuses chez ces malades qui réduisent beaucoup leurs repas, ou bien même sautent un, deux ou trois repas chaque jour, évitent la viande, les féculents, toute matière grasse (“déjà, avec mes crises...”). Les carences alimentaires, telles que mises en évidence par le niveau d’apport comparé aux recommandations, sont fréquentes : 80 à 90 % des malades ont des apports en dessous des apports recommandés en acides gras essentiels, protéines, minéraux tels que magnésium ou calcium et surtout en vitamines : sont fréquentes les carences en vitamines B₉, B₁₂ et D. Le statut en vitamines A et E, ou en vitamines du groupe B, autres que B₉ et B₁₂, est rarement déficient.

Les compulsions alimentaires

Les carences sont bien plus rares : 5 % des malades peut-être. Ce sont ceux qui se restreignent fortement aux repas du fait de leur crise (“une crise sinon rien”) ou se soumettent sans arrêt à des régimes très hypocaloriques (< 1200 kcal/j). Mais ici aussi, les carences sont difficiles à mettre en évidence par les seuls examens biologiques standard.

CONCLUSION

Les carences en vitamines sont la règle dans l’anorexie mentale et fréquentes dans la boulimie. Elles doivent être corrigées au cours de la renutrition. On privilégiera les apports par les aliments courants, en conseillant absolument aux boulimiques de faire trois repas par jour. Si les apports alimentaires accrus laissent subsister des carences vitaminiques d’apports, ce qui est fréquent, on prescrira des suppléments vitaminiques d’appoint, par exemple dans des spécialités associant vitamines et minéraux, voire ferments lactiques.

Références bibliographiques

Christopher K, Tammaro D, Wing EJ (2002). Early scurvy complicating anorexia nervosa. *South Med J*, **95** : 1065-1066.

Iketani T, Kiriike N, Murray B et al. (2003). Effect of menatrenone (vitamin K2) treatment on bone loss in patients with anorexia nervosa. *Psychiatry Res*, **117** : 259-269.

Moyano D, Sierra C, Brandi N et al. (1999). Antioxidant status in anorexia nervosa. *Int J Eat Disord*, **25** : 99-103.

Oliveri B, Gomez Acotto C, Mautalen C (1999). Osteomalacia in patient with severe anorexia nervosa: a systematic review of the literature. *Altern Med Rev*, **8** : 180-185.

Olmos JM, Riancho JA, Amado JA et al. (1991). Vitamin D metabolism and serum binding proteins in anorexia nervosa. *Bone*, **12** : 43-46.

Prousky JE (2003). Pellagra may be a rare secondary complication of anorexia nervosa: a systematic review of the literature. *Altern Med Rev*, **8** : 180-185.

Rigaud D, Sogni P, Hammel P et al. (1989). Anorexie mentale : absence de sensibilité des marqueurs protéiques nutritionnels ; étude de 20 malades et comparaison à un groupe apparié de maladie de Crohn colique. *Ann Méd Intern*, **140** : 86-90.

Rigaud D (2003). *Anorexie, boulimie et compulsions alimentaires. Les troubles du comportement alimentaire*. Marabout (Hachette), 323 pp.

Rock CL, Vasantharajan S (1995). Vitamin status of eating disorder patients: relationship to clinical indices and effect of treatment. *Int J Eat Disord*, **18** : 257-262.

Vaisman N, Wolfhart D, Sklan D (1992). Vitamin A metabolism in plasma of normal and anorectic women. *Eur J Clin Nutr*, **46** : 873-878.

Zenger F, Russmann S, Junker E et al. (2004). Decreased glutathione in patients with anorexia nervosa. Risk factor for toxic liver injury? *Eur J Clin Nutr*, **58** : 238-243.

ISSN : 1293-2892
ISBN : 2-913633-49-8
EGOPRIM
45, rue de la Glacière 75013 Paris
Dépôt légal : Janvier 2007



CAHIER DE **Formation** Biologie médicale

Cahiers de formation déjà parus

- N° 1 : Hématologie
- N° 2 : Immunoanalyse
- N° 3 : Parasitologie
- N° 4 : Bactériologie
- N° 5 : Hormonologie - Gazométrie
- N° 6 : G.B.E.A
- N° 7 : Immuno-allergie (1)
- N° 8 : Hémoglobines glyquées - Lipides
- N° 9 : Dosage des médicaments Tome I
- N° 10 : Hématologie Cas illustrés
- N° 11 : Amibes et flagellés intestinaux
- N° 12 : Les maladies à Prions
- N° 13 : Autoimmunité et autoanticorps
- N° 14 : L'exploration de la thyroïde
- N° 15 : Dépistage de la trisomie 21
- N° 16 : Immuno-allergie (2)
- N° 17 : Virus des hépatites A (VHA) et E (VHE)
- N° 18 : Dosage des médicaments Tome II
- N° 19 : Vaginites et vaginoses
- N° 20 : Hémostase et thrombose
- N° 21 : Virus des hépatites B (VHB), Delta (VDH), C (VHC), autres
- N° 22 : Syndrome des anti-phospholipides
- N° 23 : Parasites sanguins
- N° 24 : Biochimie pédiatrique
- N° 25 : Les moisissures d'intérêt médical
- N° 26 : Immuno-hématologie et groupes sanguins
- N° 27 : Les marqueurs cardiaques
- N° 28 : Immunoglobulines monoclonales
- N° 29 : Mycobactéries - Mycobactérioses
- N° 30 : Exploration de la fonction de reproduction - versant féminin
- N° 31 : Les dermatophytes
- N° 32 : Les marqueurs tumoraux sériques des tumeurs solides
- N° 33 : Sport et Biologie
- N° 34 : Borréliose de Lyme
- N° 35 : L'Inflammation
- N° 36 : Le virus Epstein-Barr et les marqueurs de l'infection
- N° 37 : Maladies auto-immunes du foie

BIOFORMA est la structure nationale qui gère et organise la formation continue conventionnelle des directeurs et directeurs adjoints de L.a.b.m privés.

Cette formation continue est financée par les trois Caisses Nationales de l'Assurance Maladie (C.N.A.M.T.S., C.C.M.S.A. et C.A.N.A.M.) dans le cadre de la convention passée entre elles et les trois syndicats de biologistes (S.d.B., S.N.M.B. et S.L.B.C.).

A ce titre, BIOFORMA édite des cahiers de formation comme celui-ci.

Ces ouvrages sont distribués à chaque laboratoire d'analyse de biologie médicale, privé ou hospitalier, aux inspecteurs des DRASS, aux pharmaciens et médecins conseils des CRAM, aux responsables de la DGS et du Ministère de la Santé. Les précédents numéros sont disponibles à la consultation sur le site Internet www.bioforma.net.

Ces livres ne sont pas en vente dans le commerce et le tirage est de 6500 exemplaires.

ISSN : 1293-2892

ISBN : 2-913633-49-8

Dépôt légal : JANVIER 2007