

**UNIVERSITÉ DE LIMOGES**

**FACULTÉ DE PHARMACIE**

---

ANNÉE : 1995

THÈSE N° 216

LA VITAMINE B<sub>6</sub>  
INTÉRÊT ET MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE DOSAGE  
DANS LE PLASMA HUMAIN PAR CHROMATOGRAPHIE  
LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE



THÈSE

POUR LE DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le : 10 mai 1995

PAR

Anne LEMMET

née le 31/10/1970 à Rabat (MAROC)

**EXAMINATEURS DE LA THÈSE**

M<sup>r</sup> le Professeur B. PENICAUT ..... - Président  
M<sup>r</sup> le Professeur G. LACHÂTRE ..... - Juge  
M<sup>me</sup> A.M. DESMAISON ..... - Juge  
M<sup>lle</sup> H. LOTFI ..... - Juge  
M<sup>r</sup> J. CHARLES ..... - Membre invité

---

# UNIVERSITÉ DE LIMOGES

## FACULTÉ DE PHARMACIE

---

**DOYEN DE LA FACULTÉ :**

Monsieur le Professeur RABY Claude

**ASSESEURS :**

Monsieur le Professeur GHESTEM Axel

Monsieur DREYFUSS Gilles - Maître de Conférences

**PROFESSEURS :**

BENEYTOUT Jean-Louis

BIOCHIMIE

BERNARD Michel

PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE

BOSGIRAUD Claudine

BACTÉRIOLOGIE-VIROLOGIE  
PARASITOLOGIE

BROSSARD Claude

PHARMACOTECHNIE

BUXERAUD Jacques

CHIMIE ORGANIQUE  
CHIMIE THÉRAPEUTIQUE

CHULIA Albert

PHARMACOGNOSIE

CHULIA Dominique

PHARMACOTECHNIE

DELAGE Christiane

CHIMIE GÉNÉRALE ET MINÉRALE

GHESTEM Axel

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE

HABRIOUX Gérard

BIOCHIMIE FONDAMENTALE

LACHÂTRE Gérard

TOXICOLOGIE

LEFORT DES YLOUSES Daniel

PHARMACIE GALÉNIQUE

MOESCH Christian

HYGIÈNE

LOUDART Nicole

PHARMACODYNAMIE

PENICAUT Bernard

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

RABY Claude

PHARMACIE CHIMIQUE ET CHIMIE ORGANIQUE

**SECRETARE GÉNÉRAL DE LA FACULTÉ - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS**

POMMARET Maryse.

## **Remerciements**

*A Monsieur le Professeur B. PENICAUT, Professeur de Chimie Analytique à la Faculté de Pharmacie de Limoges, j'exprime ma gratitude respectueuse d'avoir accepté la présidence de ce jury.*

*Qu'il me soit permis d'exprimer mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur G. LACHÂTRE, Professeur de Toxicologie à la Faculté de Pharmacie de Limoges, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire de Toxicologie de la Faculté de Pharmacie de Limoges et de son service de Pharmacologie et Toxicologie du CHRU de Limoges, et de m'avoir donné les moyens de conclure cette étude.*

*Mes remerciements chaleureux vont aussi à Madame A.M. DESMAISON, Maître de Conférence de Biochimie à la Faculté de Pharmacie de Limoges pour sa gentillesse et l'intérêt qu'elle a accordé à ce travail.*

*Je tiens à remercier aussi Mademoiselle H. LOTFI d'avoir suivi toute la progression de cette étude et de m'avoir initiée à la pratique de la CLHP, ainsi que pour sa patience et son dévouement de tous les instants.*

*Je remercie Monsieur J. CHARLES, Pharmacien Maître de Stage, de m'avoir toujours très cordialement accueillie dans son officine, et d'avoir si spontanément accepté de faire partie de ce jury de thèse.*

*Je remercie chaleureusement Monsieur J.P. VALETTE et Corinne, pour leur aide technique.*

*Je remercie Mademoiselle ALARY, Professeur de Chimie analytique à la Faculté de Pharmacie de Grenoble, de m'avoir donné le goût de l'analyse dès le début de mon cursus universitaire.*

*Je remercie profondément et très sincèrement Madame M. LE SCRIL d'avoir su mettre en page cette thèse avec beaucoup de talent ainsi que pour sa disponibilité, son dévouement et sa volonté de perfection jusqu'aux ultimes retouches.*

*Enfin, je remercie mes parents pour le soutien qu'ils m'ont apporté tout au long de mes études, ainsi que Christian et Johanna pour leur compréhension, leur soutien et leur réconfort.*

## PLAN

Sigles et abréviations

Introduction

### Chapitre I - Les vitamines : Généralités

I.1 - DÉFINITION

I.2 - CLASSIFICATION DES VITAMINES

I.3 - BESOIN VITAMINIQUE

I.4 - ESTIMATION DU STATUT VITAMINIQUE

Conclusion

### Chapitre II - La vitamine B<sub>6</sub> : Pyridoxine

II.1 - GÉNÉRALITÉS

II.1.a - Structure

II.1.b - Sources

II.1.c - Besoins

II.1.d - Propriétés physicochimiques de la vitamine B<sub>6</sub>

II.2 - MÉTABOLISME

II.2.a - Absorption intestinale

II.2.b - Répartition et taux circulants

II.2.c - Activation de la vitamine B<sub>6</sub> en phosphate de pyridoxal (PLP)

II.2.d - Catabolisme et élimination.

II.3 - RÔLE PHYSIOLOGIQUE

II.3.a - Les transaminations

II.3.b - Les décarboxylations

II.3.c - Autres réactions enzymatiques impliquant le PLP

II.4 - CONTEXTE PATHOLOGIQUE

II.4.a - Déficiences et carences

II.4.b - Les maladies métaboliques pyridoxino-dépendantes

II.5 - TOXICOLOGIE DE LA VITAMINE B<sub>6</sub>

Conclusion

### **Chapitre III - Intérêt du dosage de la vitamine B<sub>6</sub> chez l'homme**

#### **III.1 - LES DIVERS ÉTATS PHYSIOPATHOLOGIQUES CONCERNÉS**

III.1.a - Pyridoxine et grossesse

III.1.b - Pyridoxine et lactation

III.1.c - La vitamine B<sub>6</sub> en cardiologie

III.1.d - La vitamine B<sub>6</sub> en neuropsychiatrie

#### **III. 2 - PYRIDOXINE ET INTERACTIONS MÉDICAMENTEUSES**

III.2.a - La place du métabolisme des vitamines

III.2.b - Influence des médicaments sur l'état nutritionnel

III.2.c - Substances interagissant avec la vitamine B<sub>6</sub>

Conclusion

### **Chapitre IV - Les différentes méthodes d'analyse de la vitamine B<sub>6</sub>**

#### **IV.1 - LES TESTS BIOLOGIQUES**

IV.1.a - Les dosages sanguins : tests statiques

IV.1.b - Les dosages urinaires

IV.1.c - Les dosages tissulaires

IV.1.d - Les tests dynamiques

#### **IV.2 - EXPLORATION DU STATUT VITAMINIQUE B<sub>6</sub>**

IV.2.a - Analyse titrimétrique

IV.2.b - Analyse chromatographique

IV.2.c - Spectrophotométrie

IV.2.d - Analyse microbiologique

IV.2.e - Dosages enzymatiques

#### **IV.3 - MÉTHODES D'EXPLORATION LES PLUS UTILISÉES**

IV.3.a - Test au tryptophane et épreuve de charge en méthionine

IV.3.b - Dosage du PLP plasmatique

IV.3.c - Dosages enzymatiques

IV.3.d - Dosage du PLP musculaire

IV.3.e - Dosage de l'acide 4-pyridoxique

Conclusion

### **Chapitre V - Dosage de la vitamine B<sub>6</sub> par chromatographie liquide haute performance (partie expérimentale)**

#### **V.1 - RAPPELS SUR LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE**

## V.2 - ETUDE EXPÉRIMENTALE

### V.2.a - Matériels et méthodes

### V.2.b - Résultats et discussion

1° - Mise au point

2° - Validation de la technique

3° - Détermination des taux normaux de 4 composés vitaminiques  
B<sub>6</sub> dans le plasma humain

Conclusion

Références bibliographiques

Conclusion générale

Annexes

Table des matières

## SIGLES ET ABRÉVIATIONS

µg	:	microgramme
mg	:	milligramme
NAD	:	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP	:	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
DJR	:	Dose journalière recommandée
RDA	:	Recommended dietary allowance
NRC	:	National research council
OMS	:	Organisation mondiale de la santé
FAO	:	Food and agriculture organization
ANC	:	Apport nutritionnel conseillé
CNERNA	:	Centre national de coordination des études et recherches sur la nutrition et l'alimentation.
UI	:	Unité internationale
PN	:	Pyridoxine
PL	:	Pyridoxal
PM	:	Pyridoxamine
PLP	:	Phosphate de pyridoxal
PMP	:	Phosphate de pyridoxamine
PA	:	Acide 4-pyridoxique
PNP	:	Phosphate de pyridoxine
UV	:	Ultraviolet
IR	:	Infrarouge
KBr	:	Bromure de potassium
RMN	:	Résonance magnétique nucléaire
nm	:	nanomètre
MHz	:	Mégahertz
nM	:	nanomole par litre
AA	:	Acide aminé
Cu	:	Cuivre
TA	:	Transaminase
GOT	:	Transaminase glutamino oxaloacétique
GPT	:	Transaminase glutamino pyruvique
A α C	:	Acide α-cétonique
Asp	:	Acide aspartique
Leu	:	Leucine
Tyr	:	Tyrosine
Trp	:	Tryptophane
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
5-HT	:	5-hydroxytryptamine ou sérotonine
DA	:	Dopamine
NA	:	noradrénaline
GABA	:	acide gamma aminobutyrique
INH	:	Isoniazide
DOP	:	désoxypyridoxine
Cu <sup>++</sup>	:	ion cuivreux
EDTA	:	Ethylène diamine tétraacétate

AgNO <sub>3</sub>	:	Nitrate d'argent
DMSO	:	Diméthylsulfoxyde
mV	:	millivolt
mM	:	millimole/litre
KMnO <sub>4</sub>	:	Permanganate de potassium
HCl	:	Acide chlorhydrique
μ	:	micron
nmol	:	nanomole
ng	:	nanogramme
ml	:	millilitre
l	:	litre
ASAT	=	GOT
ALAT	=	GPT
AB	:	Activité basale
AS	:	Activité après stimulation
CA	:	coefficient d'activation
α EGOT	=	CA de la GOT
α EGPT	=	CA de la GPT
CPL	:	Chromatographie en phase liquide
CLHP	:	Chromatographie liquide haute performance
t <sub>r</sub>	:	Temps de rétention
V <sub>r</sub>	:	Volume de rétention
k'	:	Facteur de capacité
CPG	:	Chromatographie en phase gazeuse
EI	:	Etalon interne
TEA	:	Triéthanolamine
μl	:	microlitre
CHU	:	Centre hospitalier universitaire

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

La vitamine B<sub>6</sub> est le terme générique donné à tous les dérivés de la 3-hydroxy 2-méthyl pyridine ayant la même activité biologique. Elle appartient au groupe des vitamines hydrosolubles, et est aussi connue sous le nom de pyridoxine.

Elle intervient, en tant que cofacteur d'enzymes, dans plus de soixante systèmes enzymatiques, ce qui peut suggérer l'étendue du contexte pathologique existant dès lors que survient un déséquilibre entre les apports, les capacités d'utilisation de cette vitamine et les besoins de l'organisme.

Devant les pathologies liées à la vitamine B<sub>6</sub>, et notamment très récemment à sa toxicité, il semble important de disposer de méthodes d'exploration des statuts vitaminiques B<sub>6</sub>, et plus précisément de méthodes de dosages spécifiques et sensibles dans les fluides biologiques humains.

Avant de réaliser l'étude expérimentale sur la mise au point d'une technique de dosage de la vitamine B<sub>6</sub> dans le plasma humain (chapitre V), nous avons entrepris d'abord une étude bibliographique sur les vitamines connues (chapitre I), puis plus précisément sur la vitamine B<sub>6</sub> (chapitre II), sur l'intérêt de son dosage (chapitre III), et les différentes techniques d'identification et de quantification proposées (chapitre IV).

## **CHAPITRE I**

# **LES VITAMINES : GÉNÉRALITÉS**

## I.1 - DÉFINITION

Les vitamines sont des nutriments, c'est-à-dire des substances qui n'ont pas besoin de subir de transformation digestive pour être assimilées ; de nature organique et le plus souvent d'apport exogène, elles sont indispensables en très faibles quantités pour assurer les réactions biochimiques au niveau des cellules vivantes : quelques  $\mu\text{g}$  à 100 mg/ jour suffisent, c'est-à-dire 1000 fois moins que les autres éléments nutritifs : protéines, lipides, glucides, acides aminés ou sels minéraux [1].

Certaines fonctionnent comme de véritables hormones ou précurseurs d'hormones (vitamine D), ou sont des antioxygènes cellulaires capteurs de radicaux libres (vitamines C et E); d'autres représentent le groupement prosthétique de coenzymes (vitamine du groupe B).

## I.2 - CLASSIFICATION DES VITAMINES

Il est classique de diviser les vitamines en deux grandes familles, distinctes d'après leur solubilité : les vitamines LIPOSOLUBLES et les vitamines HYDROSOLUBLES.

### Les vitamines liposolubles

La vitamine A (*Rétinol*) a un rôle dans la vision, dans la différenciation des tissus épithéliaux, dans la croissance et dans la reproduction.

La vitamine D (*Calciférol*) joue un rôle dans le métabolisme phosphocalcique, dans la croissance et la reproduction et dans l'immunomodulation.

La vitamine E (*Tocophérol*) a un effet antioxydant et anti radicaux libres, d'où son rôle dans la stabilisation des lipides membranaires.

La vitamine K<sub>1</sub> (*Phytoménadione ou phylloquinone*) joue un rôle de cofacteur de carboxylation des protéines de la coagulation.

### Les vitamines hydrosolubles

La vitamine B<sub>1</sub> (*Thiamine*) a un rôle de cofacteur dans les décarboxylations oxydatives par l'intermédiaire de son métabolite thiamine pyrophosphate (TPP) et un rôle de neurotransmetteur par l'intermédiaire du métabolite thiamine triphosphate (TTP).

La vitamine B<sub>2</sub> (*Riboflavine*) est la vitamine des processus d'utilisation énergétique et joue le rôle de cofacteur de nombreuses déshydrogénases et oxydases, dont les Acyl Coenzyme A (Acyl CoA) déshydrogénases.

La vitamine PP ou B<sub>3</sub> (*Niacine, Acide nicotinique et nicotinamide*) a un rôle de précurseur du NAD et du NADP.

La vitamine B<sub>5</sub> (*Acide pantothénique*) est un constituant du coenzyme A qui intervient dans le cycle de Krebs, la synthèse des acides gras, du cholestérol et la cétogénèse.

La vitamine B<sub>6</sub> (*Pyridoxine*) est cofacteur de décarboxylations et transaminations des acides aminés.

La vitamine B<sub>8</sub> ou vitamine H (*Biotine*) intervient dans la carboxylation de l'acide pyruvique (néoglucogénèse), de l'acétyl CoA (lipogénèse), du propionyl CoA, et du méthylcrotonyl CoA (catabolisme des acides aminés ramifiés).

La vitamine B<sub>9</sub> (*Acide folique, Folacine*) joue un rôle dans le transfert des groupes monocarbonés, dans l'hématopoïèse et dans le développement et le fonctionnement cérébral.

La vitamine B<sub>12</sub> (*Cobalamine*) a un rôle de méthylation de l'homocystéine en méthionine et d'isomérisation du méthyl-malonyl CoA en succinyl CoA, un rôle dans l'hématopoïèse et un rôle dans le métabolisme de la myéline (système nerveux central et périphérique).

L'acide lipoïque ou acide thioctique intervient dans la décarboxylation des acides alpha-cétoniques (A α C) et dans la synthèse des prostaglandines.

La vitamine C (*Acide ascorbique*) joue un rôle de réducteur et réagit avec les radicaux libres, joue aussi de nombreux rôles biochimiques et intervient dans les fonctions immunologiques et antibactériennes.

### I.3 - BESOIN VITAMINIQUE

Le besoin vitaminique désigne "la quantité de chacune des vitamines nécessaires au maintien de la santé" [1].

Ce besoin est tel que la fraction absorbée compense exactement les pertes quotidiennes.

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

La "couverture des besoins" est en principe assurée par une alimentation variée, équilibrée et suffisante en quantité.

En fait, il existe diverses raisons qui conduisent à l'affaiblissement des apports en vitamines :

- l'appauvrissement des aliments de base (blé, lait, huile), à la suite des traitements industriels préalables à leur consommation [2,4].
- les pertes en vitamines pendant le stockage, la préparation, la cuisson des aliments [3,5,6].
- la limitation des apports caloriques [7].
- la non-augmentation des apports caloriques en cas d'accroissement momentané ou permanent des besoins.
- les modes alimentaires tels que restauration rapide, régimes végétariens, régimes déséquilibrés et monotones.

Le plus souvent, le pourcentage de "couverture des besoins" ne peut-être connu avec précision. Dans la pratique, il faut se contenter d'estimations basées sur un questionnaire précis des aliments ingérés pendant une semaine, et de tables de composition des aliments [8,9]. Cependant, il existe un complément souhaitable qui consiste en une évaluation du statut vitaminique par des mesures biochimiques.

Ainsi on a été amené à définir la Dose Journalière Recommandée (DJR), encore appelée Recommended Dietary Allowance (RDA).

B.WATTIER et coll. [1] ont recueilli les RDA préconisées :

- en France [12]
- aux USA, par le NRC (National Research Council) [10].
- dans le monde, par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) [11].

En fait, chaque pays préfère établir ses propres DJR en fonction des conditions spécifiques de ses populations (tableau I.1).

En France, H. DUPIN et les membres de la commission "Apports Nutritionnels Conseillés" du Centre National de Coordination des Etudes et Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation (CNERNA) ont préféré définir des Apports Nutritionnels Conseillés plutôt que Recommandés [12]. Ainsi, depuis 1992, la France dispose d'éléments nutritionnels de référence [12] en fonction de l'âge et du sexe des individus en bonne santé et ayant une activité considérée comme "habituelle". Quelques groupes dits "à risque" ont également été pris en compte : prématurés, femmes enceintes ou allaitantes, personnes âgées et malades sous-nutrition parentérale.

	FRANCE 1992 [12]		NRC 1989 * [10]		FAO/OMS1974 [11]	
	H**	F**	H	F	H	F
Vitamine A (UI)	3 330	2 670	3 330	2 670	2 500	2 500
Vitamine D (UI)	400	400	200	200	100	100
Vitamine E (mg)	12	12	10	8		
Vitamine K (µg)	45	35	80	65		
Vitamine C (mg)	80	80	60	60	30	30
Vitamine B <sub>1</sub> (mg)	1,5	1,3	1,5	1,1	1,2	0,9
Vitamine B <sub>2</sub> (mg)	1,8	1,5	1,7	1,3	1,8	1,3
<b>Vitamine B<sub>6</sub> (mg)</b>	<b>2,2</b>	<b>2,0</b>	<b>2,0</b>	<b>1,6</b>		
Vitamine B <sub>3</sub> (mg)	18	15	19	15	19,8	14,5
Vitamine B <sub>5</sub> (mg)	10	10	4-7	4-7		
Vitamine B <sub>12</sub> (µg)	3	3	2	2	2	2
Vitamine B <sub>9</sub> (µg)	300	300	200	180	200	200
Biotine (µg)	100-300	100-300	30-100	30-100		

\* pour les adultes de 25 à 50 ans

\*\* H = homme adulte, F = femme adulte

**Tableau I.1 : Adultes : Apports quotidiens conseillés ou recommandés.**

Vitamines	Anciennes unités	Nouvelles unités	Correspondances
A	UI	Equivalent rétinol (ER)	1ER=1µg de rétinol 1 ER = 6 µg de β-carotène 1 ER = 12 µg d'autres caroténoïdes provitamine A 1 UI = 0,3 ER 1µg de β-carotène = 0,167 ER
D	UI	µg de cholécalférol	1UI = 0,025 µg 1µg = 40 UI 1µg = 1 µg d'ergocalciférol
E	UI	mg d'acétate de tocophérol	1 UI = 1 mg d'acétate de dl-α-tocophérol 1 UI = 0,909 mg de dl-α-tocophérol 1 UI = 0,735 mg d'acétate de d-α-tocophérol 1UI = 0,671 mg de d-α-tocophérol 1 UI = 1,75 mg de d-β-tocophérol 1 UI = 7 mg de d-γ-tocophérol
K	µg	µg de phylloquinone (K1)	
C	mg	mg d'acide L - ascorbique	
B <sub>1</sub>	mg	mg de thiamine chlorhydrate	
B <sub>2</sub>	mg	mg de riboflavine	
B <sub>6</sub>	mg	mg de pyridoxine chlorhydrate	1mg = 0,82 mg de pyridoxine 1mg = 0,81 mg de pyridoxal 1mg = 0,82 mg de pyridoxamine
PP	mg	Equivalent niacine (EN)	1 EN = 1mg d'acide nicotinique (niacine) 1 EN = 1mg d'amide nicotinique 1 EN = 60 mg de tryptophane
Acide pantothénique	mg	mg d'acide pantothénique	1mg = 1,10 mg de pantothénate de sodium 1 mg = 1,087 mg de pantothénate de calcium 1mg = 0,94 mg de panthénol
B <sub>12</sub>	µg	µg de cyanocobalamine	
Acide folique	µg	µg d'acide folique	
Biotine	µg	µg de D-biotine	

Tableau I.2 : Unités de mesure des vitamines [18].

## I.4 - ESTIMATION DU STATUT VITAMINIQUE

Le statut vitaminique d'un sujet s'évalue par l'intermédiaire de données biochimiques :

- taux plasmatiques, sériques, érythrocytaires ou urinaires des vitamines ;
- mesures de l'activité d'enzymes érythrocytaires dépendant des vitamines ;
- taux sanguins ou urinaires des métabolites [13].

Pour un groupe de population, l'évaluation du statut biochimique est complétée par une enquête diététique.

De récentes études épidémiologiques réalisées en France sur des adultes en bonne santé ont montré que les statuts vitaminiques sont parfois marginaux ou déficients [14,15]; dans d'autres pays, et sur des populations "à risque", aussi [16].

La séquence des événements métaboliques et pathologiques conduisant à l'installation d'une carence vitaminique, se déroule en 5 temps (figure I.1) :

- atteinte des réserves vitaminiques de l'organisme (non symptomatique),
- baisse de l'activité vitaminique (manque de cofacteur indispensable),
- apparition d'une symptomatologie morphologique et fonctionnelle encore réversible,
- atteinte anatomique réversible par mégavitaminothérapie,
- atteinte clinique irréversible évoluant vers la mort.

Le statut vitaminique d'un sujet repose en partie sur des taux vitaminiques dans l'organisme. Il est donc nécessaire d'établir des unités de mesures des vitamines : ces dernières sont consignées dans le tableau I.2.

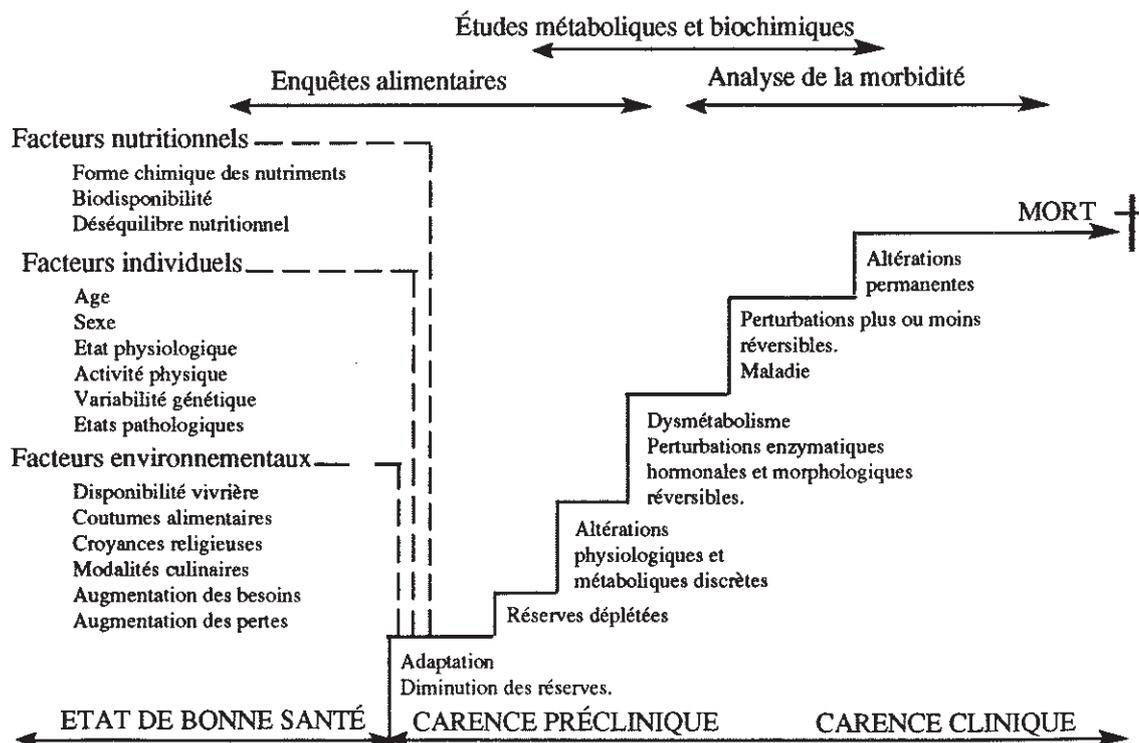


Figure I.1 : Les différentes étapes conduisant à l'installation d'une carence vitaminique d'après [17].

## CONCLUSION

Les vitamines sont des nutriments organiques et le plus souvent d'apport exogène, qui sont indispensables en très faibles quantités pour assurer le métabolisme des cellules vivantes.

L'éventualité d'un apport en quantité insuffisante au maintien de la santé induit la notion de besoin vitaminique, et par suite celle d'apports nutritionnels conseillés.

Lorsque le statut vitaminique d'un sujet est déficient, on parle de sub-carence ou de carence : il est alors possible d'effectuer une estimation de ce statut, soit en mesurant les taux des vitamines ou de leurs métabolites dans les fluides biologiques, soit de mesurer l'activité d'enzymes vitamino-dépendantes.

## Références bibliographiques du chapitre I

- [1] - A. MUNNICH, H. OGIER, J.M. SAUDUBRAY. Les vitamines : aspects métaboliques, génétiques, nutritionnels et thérapeutiques. Paris : éditions Masson, 1987, 428p.
- [2] - ANONYME. Activités vitaminiques et technologie des denrées alimentaires. Journées scientifiques du CNERNA : Paris, C.N.R.S, 1970, 551p.
- [3] - A.E. BENDER. Food processing and nutrition. New-York Academic Press, 1978, 243 p.
- [4] - A.E. BENDER. The effects of food processing on the vitamins. *In* : Vitamins in medicine, B.M. BARKER, and D.A. BENDER ed., 4<sup>ème</sup> édition, Londres : William Heinemann Medical Books LTD, 1982, 291-318.
- [5] - R.S. HARRIS, E. KARMAS. Nutritional Evaluation of Food Processing. Westport: Avi Publishing Company, 1975, 670 p.
- [6] - J. GHISOLFI. Vitamines et alimentation de l'homme normal. *Nouv. Rev. Méd. Toulouse*, 1985, 3, 70-72.
- [7] - J.P. MARESCHI, F. COUSIN, B. DE LA VILLEON, C.B. BRUBACHER. Valeur calorique de l'alimentation et couverture des apports nutritionnels conseillés en vitamines de l'homme adulte. *Ann. Nutr. Metab.*, 1984, 28, 11-23.
- [8] - S.W. SOUCI, W. FACHMANN, H. KRAUT. La composition des aliments. Tableau des valeurs nutritives 1981/1982 Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1352 p.
- [9] - A.A. PAUL, D.A.T. SOUTHGATE. Mc CANCE and WIDDOWSON'S the composition of foods. 4<sup>th</sup> ed, London : Her majesty's Stationery Office, 1978, 418 p.
- [10] - ANONYME. Recommended Dietary Allowances. 10th ed., Washington : National Academy of Sciences, 1989, 186 p.
- [11] - R. PASSMORE, B.M. NICOL, M. NARAYANA RAD, GH. BEATON, E.M. DEMAeyer. Manuel sur les besoins nutritionnels de l'homme. Etudes de nutrition de la F.A.O. n° 28, OMS, série de monographies n°61, F.A.O. et O.M.S publ. F.A.O., Rome, 1974, 64p.
- [12] - H. DUPIN. Apports nutritionnels conseillés pour la population française. CNRS-CNERNA, Technique et Documentation, Paris, 1992, 146p.
- [13] - G. BRUBACHER. Marqueurs biochimiques d'apports vitaminiques. *Rev. Epid. Santé Pub.*, 1985, 33, 324-330.
- [14] - A. LEMOINE, C. LE DEVEHAT, B. HERBERT. Statut vitaminique : étude d'un groupe d'adultes français. *Bull. Acad. Nat. Med.*, 1984, 168, 522-530.

- [15] - J.C. GUILLAND, V. BOGGIO, D. MOREAU, J. KLEPPING. Evaluation de l'apport alimentaire vitaminique en Bourgogne. *Ann. Nutr. Metab.*, 1986, 30, 21-46.
- [16] - J.C. GUILLAND, B. LEQUEU. Les vitamines : du nutriment au médicament. Paris : Editions Médicales Internationales, 1992, 57-60.
- [17] - J.C. GUILLAND, B. LEQUEU. Les vitamines : du nutriment au médicament. Paris : Editions Médicales Internationales, 1992, 38-39.
- [18] - J.C. GUILLAND, B. LEQUEU. Les vitamines : du nutriment au médicament. Paris : Editions Médicales Internationales, 1992, Annexe 1.

## **CHAPITRE II**

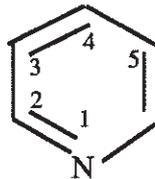
### **LA VITAMINE B<sub>6</sub> : PYRIDOXINE**

## II.1- GÉNÉRALITÉS

### II.1.a - Structure

Il existe en fait au moins 3 composés de structure chimique différente et qui présentent une activité vitaminique B<sub>6</sub> : ce sont la pyridoxine, le pyridoxal et la pyridoxamine. La structure de base commune aux trois molécules est celle de la **pyridine** (hétérocycle aromatique azoté), sur laquelle viennent se substituer aux hydrogènes différents groupes chimiques.

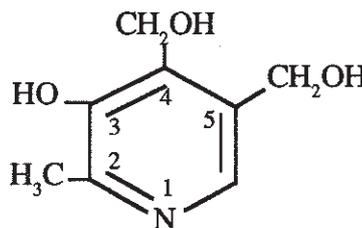
#### La pyridine



[II.1]

#### La pyridoxine

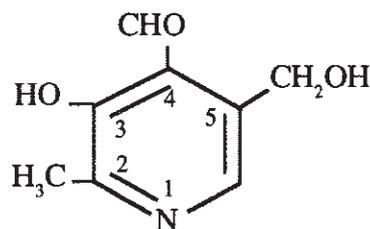
Souvent sous forme  
de chlorhydrate  
(C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>ClNO<sub>3</sub>)



[II.2]

#### Le pyridoxal

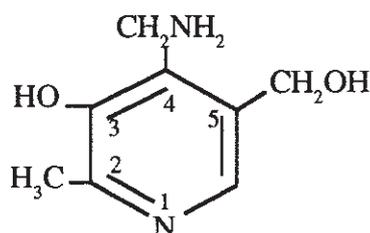
(C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>)



[II.3]

#### La pyridoxamine

Souvent sous forme  
de chlorhydrate  
(C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)



[II.4]

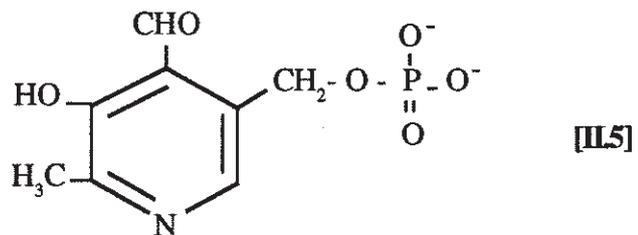
Certains groupements sont communs aux trois composés: le méthyle en C<sub>2</sub>, le OH alcoolique en C<sub>3</sub> et l'alcool primaire en C<sub>5</sub>.

Le groupement placé en C<sub>4</sub> par contre diffère pour chacune des trois molécules. Il s'agit d'un alcool primaire (CH<sub>2</sub>OH) pour la pyridoxine, d'un aldéhyde (CHO) pour le pyridoxal, et d'une amine primaire (CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) pour la pyridoxamine.

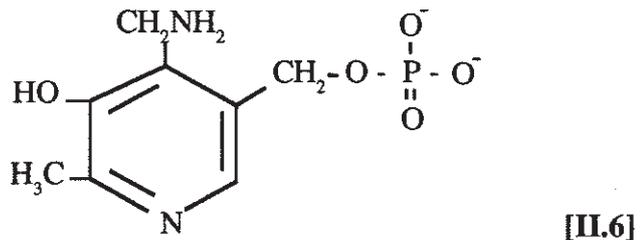
Il faut également préciser la structure de composés dérivés des 3 cités précédemment, qui existent dans l'organisme humain en tant que métabolites des vitamines alimentaires ou médicamenteuses.

Ces autres composés voisins sont :

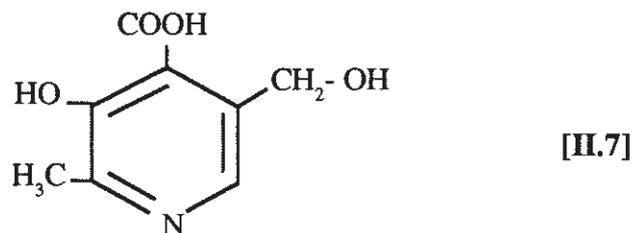
#### Le phosphate de pyridoxal (PLP)



#### Le phosphate de pyridoxamine (PMP)



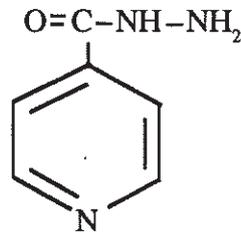
#### L'acide 4-pyridoxique (PA)



Remarque

On peut constater l'analogie structurale avec l'isoniazide (antituberculeux majeur) qui est un antagoniste de la vitamine B<sub>6</sub> (effet compétitif) :

**L'isoniazide**



[II.8]

**II.1.b - Sources**

La vitamine B<sub>6</sub> est ubiquitaire: on la trouve dans de très nombreux aliments (aussi bien animaux que végétaux). Elle possède aussi la particularité d'être synthétisée par les bactéries saprophytes du tube digestif, d'où une double provenance de la vitamine B<sub>6</sub> résorbée chez l'homme dans une proportion qu'il semble être encore difficile à chiffrer [1].

Les sources principales de vitamine B<sub>6</sub> sont données dans le tableau II.1 [1].

	mg/100g
Foie de veau, mouton, jambon, poulet.....	1 - 2
Farine de blé entière, maïs.....	0,4 - 0,7
Viandes, poissons.....	0,3 - 0,7
Fruits et légumes.....	0,1 - 0,5
Œufs.....	0,1
Lait de vache.....	0,05- 0,3
Lait de mère.....	0,01

**Tableau II.1 :** Sources naturelles de vitamine B<sub>6</sub> (classées par ordre de richesse décroissante) [1].

Pour connaître la composition en vitamines -dont la pyridoxine- des aliments, il convient de se reporter à des "Tables de composition des aliments". En attendant la publication de tables françaises actualisées (publication probable en 1995 de tables de 1991), les plus complètes concernant les vitamines sont des tables anglaises [3] ou allemandes [4].

Ainsi, dans le tableau II.2, sont données les teneurs en vitamine B<sub>6</sub> de 67 aliments courants prêts à être consommés (pour 100 g d'aliment). Pour les aliments cuits, il a été tenu compte d'un coefficient de rétention dû à la dégradation thermique de la vitamine, adapté à chaque aliment [5].

Les valeurs qui représentent une part intéressante des apports quotidiens sont en **gras**: elles représentent 10% au moins des apports conseillés pour l'homme adulte.

Vitamine B <sub>6</sub> (mg)	Vitamine B <sub>6</sub> (mg)
1 - Cerveau de boeuf .....0,13	33 - Carottes cuites .....0,09
2 - Filet de boeuf .....0,16	34 - Céleri cuit .....0,06
3 - Langue de boeuf .....0,06	35 - Champignons cuits .....0,04
4 - <b>Jambon blanc</b> ..... <b>0,36</b>	36 - Chou blanc cuit .....0,07
5 - Salami .....0,15	37 - Concombre .....0,03
6 - Saucisse de Francfort .....0,07	38 - Endives crues .....0
7 - Filet de veau .....0,15	<b>39 - Epinards</b> ..... <b>0,13</b>
<b>8 - Rognon de veau</b> ..... <b>0,4</b>	<b>40 - Haricot vert</b> ..... <b>0,17</b>
<b>9 - Dinde</b> ..... <b>0,23</b>	<b>41 - Haricot sec</b> ..... <b>0,5</b>
10 - Lapin .....0,15	42 - Laitue crue .....0,05
11 - Poulet .....0,25	<b>43 - Lentilles</b> ..... <b>0,54</b>
	44 - Navets .....0,05
12 - Crevette .....0,1	
<b>13 - Maquereau</b> ..... <b>0,57</b>	45 - Oignons cuits .....0,08
<b>14 - Thon</b> ..... <b>0,4</b>	46 - Petits pois .....0,1
	<b>47 - Poireaux cuits</b> ..... <b>0,15</b>
15 - Oeuf .....0,1	48 - Pommes de terre cuites .....0,13
	49 - Radis .....0,06
16 - Lait entier .....0,06	50 - Courgette .....0,04
17 - Lait demi-écrémé .....0,06	
18 - Lait écrémé .....0,06	51 - Tomates crues .....0
19 - Emmenthal .....0,06	52 - Abricot sec .....0
20 - Camembert .....0,25	53 - Ananas .....0,09
21 - Fromage fondu .....0,07	<b>54 - Banane</b> ..... <b>0,37</b>
22 - Fromage blanc .....0,09	55 - Mandarine .....0
23 - Yaourt .....0,05	56 - Orange .....0,05
	57 - Pamplémousse .....0,03
24 - Crème fraîche .....0,04	58 - Pêche .....0,03
25 - Beurre .....0,01	59 - Poire .....0,01
26 - Huile de tournesol .....0	60 - Pomme Golden .....0,04
27 - Margarine .....0,03	
	61 - Chocolat .....0,02
28 - Pain blanc .....0,14	62 - Confiture de fraise .....0
29 - Farine .....0,15	63 - Sucre .....0
30 - Macaroni .....0,04	
	64 - Apéritif .....0
31 - Artichaut .....0	65 - Bière .....0,05
32 - Asperges .....0,04	66 - Cidre .....0
	67 - Vin .....0

**Tableau II.2 :** Composition en vitamines de 67 aliments courants prêts à être consommés (pour 100 g d'aliments) [5].

Une autre source [6] indique des teneurs intéressantes de vitamine B<sub>6</sub> dans la levure de bière et les germes de céréales. Le tableau II.3 donné est le suivant :

		mg/ 100g
Levures	de bière sèche	4 - 8 4 - 10
Céréales	blé, riz: grain maïs, orge, avoine: grain blé, maïs: germe	0,3 - 0,6 0,7 - 4 1 - 5
Farine	de blé Taux d'extraction 80% Taux d'extraction 70%	0,4 - 0,7 0,1 - 0,3 0,08 - 0,16
Légumes	Choux, pomme de terre, pois, salade, haricots, épinards	0,1 - 0,5
Fruits	Oranges, poires, bananes	0,1 - 0,5
Foie	Mouton, veau	1 - 2,5
Muscles	Mouton, boeuf, veau Poulet, jambon	0,3 - 0,7 2,5
Jaune d'œuf	de poule	0,18
Lait	de femme, en moyenne de vache	0,01 0,05 - 0,3

**Tableau II.3 : Sources naturelles de vitamine B<sub>6</sub> [6].**

En comparant les tableaux II.1, II.2 et II.3, il semble que les teneurs maximales de vitamine B<sub>6</sub> soient trouvées :

- dans les abats (foie, rein...)
- dans les viandes rouges (porc...), la volaille (dinde, poule)
- dans les germes de céréales (blé)
- dans la levure de bière
- dans les légumineuses (lentilles, haricots secs) et certains fruits (banane).

Les nutritionnistes s'accordent à dire que le mode de conservation des aliments est parfois la cause d'une déperdition importante de la vitamine B<sub>6</sub> contenue [6]:

- les radiations du spectre visible de la lumière solaire par exemple détruisent une proportion plus ou moins importante de vitamine B<sub>6</sub>, même si celle-ci fait partie des vitamines les plus stables.
- l'eau bouillante lessive toutes les vitamines hydrosolubles contenues dans les légumes (= blanchiment). Ce mode est donc plus agressif qu'un blanchiment en phase vapeur.
- les traitements par le froid (congélation, surgélation et lyophilisation) sont de loin préférables car ils induisent une déperdition vitaminique insignifiante.

### II.1.c - Besoins

La définition de "Besoin vitaminique" donnée dans le paragraphe I.3 s'applique bien évidemment à la vitamine B<sub>6</sub>; de même qu'il existe une "Recommended Dietary Allowance" (RDA) [7] [8] ou un Apport Nutritionnel Conseillé [9] exprimé en mg de B<sub>6</sub>/jour.

Les besoins humains généralement relevés sont :

- au minimum 1,5 mg/ jour chez un sujet adulte consommant 100g de protéines par jour, et de préférence  $\left\{ \begin{array}{l} 2,0 \text{ mg/jour pour les femmes adultes} \\ 2,2 \text{ mg/jour pour les hommes adultes.} \end{array} \right.$
- 2,0 mg/jour pour un adulte exerçant une activité moyenne, calculés sur la base d'une ration de 2600 à 2900 calories comportant 60 à 65g de protéines.
- 0,3 mg/jour pour un nourrisson.
- 2,5 mg/jour pour une femme enceinte ou allaitante.
- 2 à 5 mg/jour en prévention d'accès épileptiformes.
- selon les tranches d'âge, environ 0,6 à 2,2 mg/jour.  
dont
  - 0,1 à 0,4 mg/24h chez les prématurés (apports entéraux).
  - 0,3 mg/24h par tranche de 6 kg pour un nourrisson de moins de 6 mois.

D'autres catégories, d'âge en particulier, ont été longuement étudiées par B. WATIER et coll. [10].

Il est en fait difficile d'évaluer les besoins nutritionnels en vitamine B<sub>6</sub>, parce que cette vitamine est très répandue dans les aliments, et parce qu'il existe une synthèse endogène par les bactéries saprophytes du tube digestif, dont le niveau est difficile à chiffrer.

Le plus important est de se rappeler que les besoins sont accrus chez la femme enceinte, durant la lactation et dans de nombreuses situations qui seront envisagées dans le paragraphe II.4 sur le contexte pathologique.

#### II.1.d - Propriétés physicochimiques de la vitamine B<sub>6</sub>

La Pyridoxine (C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub>N) est composée d'un noyau pyridinique substitué (voir formule II.2).

Sous sa forme commerciale habituelle (chlorhydrate de pyridoxine), la pyridoxine (C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub>N, HCl) [30] :

- a un poids moléculaire de 205,64
- a la composition élémentaire suivante :
  - C : 46,72%;
  - H : 5,88%;
  - O : 23,34%
  - N : 6,81%;
  - Cl: 17,24%;
- est une poudre blanche ou presque blanche, cristalline, sans odeur, au goût salin légèrement amer, acide.
- a les constantes de dissociation suivantes :
  - pKa = 5,0 et 9,0 à 25°C
- est parfaitement soluble dans l'eau (vitamine dite hydrosoluble)
- peu soluble dans l'alcool à 95°
- soluble dans le propylène glycol
- pratiquement insoluble dans le chloroforme et l'éthanol.
- soluble dans l'acétone
- se décompose entre 202 et 206°C avec fusion
- se sublime
- est incompatible en solution avec les alcalins et les oxydants.

Quant à la stabilité, la vitamine B<sub>6</sub> présente les caractéristiques suivantes :

- Le chlorhydrate de pyridoxine est plus stable que la pyridoxamine ou le pyridoxal.
- Les solutions aqueuses acides de vitamine B<sub>6</sub> sont stables à température ambiante et peuvent être chauffées à 120°C pendant 30 minutes sans décomposition.

- La pyridoxine est sensible à l'action de la lumière : elle est détruite par les radiations UV en solutions neutres ou alcalines, mais pas en solution acide.

- La pyridoxine est instable dans divers aliments, médicaments et produits cosmétiques, du fait de la formation de composés d'addition entre les colorants et la pyridoxine.

- Il semblerait que, vis à vis de la lumière, la pyridoxine et la pyridoxamine soient relativement stables en milieu acide, alors que le pyridoxal se décompose indépendamment du pH, du fait de la probable participation de l'oxygène aldéhydique.

La pyridoxine possède des propriétés spectrales particulières :

- spectre UV (Ultraviolet).

Le spectre UV du chlorhydrate de pyridoxine dépend du milieu dans lequel il se trouve (annexe 1) :

- dans l'éthanol neutre, il présente un maximum d'absorption à environ 291nm ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 523$ )
- dans une solution basique, il y a 2 maxima : à 245 nm ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 219$ ), et à 307 nm.
- dans un tampon phosphate à pH =7,02, 2 maxima sont également observés : à 324 et à 254 nm ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 345$  et 183 respectivement).

• spectre IR (Infrarouge)

Le spectre IR du chlorhydrate de pyridoxine dans une pastille de KBr est montré en annexe 2 . Les principales bandes d'absorption sont données dans le tableau II.4.

Fréquence (cm <sup>-1</sup> )	Correspondance
3340	OH phénolique
3250	OH alcoolique
{ 1630 1550	C=C et C=N du cycle aromatique

**Tableau II.4:** Principales bandes d'absorption dans l'infrarouge du chlorhydrate de pyridoxine.

Les autres bandes d'absorption caractéristiques du chlorhydrate de pyridoxine sont : 1275, 1220, 1100, et 1570 cm<sup>-1</sup>.

• spectre RMN du proton :

Le spectre RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) du chlorhydrate de pyridoxine dans de l'eau deutériée a été enregistré sur un spectrophotomètre RMN à 60 MHz. Le spectre obtenu est montré en annexe 3.

Les déplacements chimiques déduits de ce spectre figurent dans le tableau II.5.

Déplacements chimiques $\delta$	Protons correspondants
2,73 ppm (singulet)	CH <sub>3</sub> en C <sub>2</sub>
5,06 ppm (singulet)	CH <sub>2</sub> en C <sub>4</sub> et C <sub>5</sub>
8,13 ppm (singulet)	H aromatique en C <sub>6</sub>

**Tableau II.5 :** Déplacements chimiques de la pyridoxine en RMN du proton (60 MHz).

• spectre RMN du carbone :

Le spectre RMN du chlorhydrate de pyridoxine obtenu dans de l'eau deutériée à température ambiante, en utilisant du dioxane comme ligne de référence, est montré en annexe 3.

Le spectre a été enregistré à 20MHz.

Les déplacements chimiques  $\delta$  sont donnés dans le tableau II.6.

Déplacements chimiques $\delta$ en ppm	Carbone correspondant
153,52 (singulets)	C <sub>3</sub>
143,42 (s)	C <sub>2</sub>
141,32 (s)	C <sub>4</sub>
137,62 (s)	C <sub>5</sub>
130,57 (doublet)	C <sub>6</sub>
58,92 (triplet) 57,88	C <sub>7</sub> et C <sub>8</sub>
15,23 (quartet)	C <sub>9</sub>

**Tableau II.6 :** *Déplacements chimiques de la pyridoxine en RMN du carbone (20 MHz).*

## II. 2 - METABOLISME

### II.2.a- Absorption intestinale

La pyridoxine est absorbée par simple diffusion dans le jéjunum. Il résulte en effet de différentes études, effectuées *in vivo* chez l'homme et l'animal, et *in vitro* en utilisant la technique du sac éversé [11], que l'absorption intestinale de la pyridoxine est relativement lente, fonction de la concentration dans la lumière intestinale, en général non saturable et non dépendante du sodium. Ceci conforterait l'idée de l'existence d'un système de transport passif de la pyridoxine.

Puis, dans l'entérocyte, la pyridoxine est phosphorylée selon un mécanisme cette fois-ci saturable et fonction de sa concentration. Cette phosphorylation, par rétrocontrôle, induit une réduction de l'absorption intestinale de pyridoxine, mais le rôle exact des mécanismes de phosphorylation dans le transport intra-entérocytaire reste obscur.

La pyridoxamine et le phosphate de pyridoxal ont également fait l'objet de plusieurs études. On sait que le phosphate de pyridoxal est absorbé intact (sans hydrolyse) [11] par l'iléon proximal selon un mécanisme de transport :

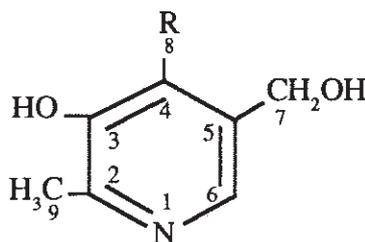
- plus rapide que celui de la pyridoxine
- efficace (40% d'absorption en 10 minutes)
- indépendant de sa concentration intracellulaire.

Il semble cependant aujourd'hui que, par des travaux plus approfondis ou des observations cliniques privilégiées, on soit amené à découvrir, à côté de ce transport non spécifique, un authentique mécanisme de transport spécifique, capable d'accumuler la vitamine à une concentration supérieure à celle du milieu, comme des travaux déjà anciens l'avaient suggéré [12].

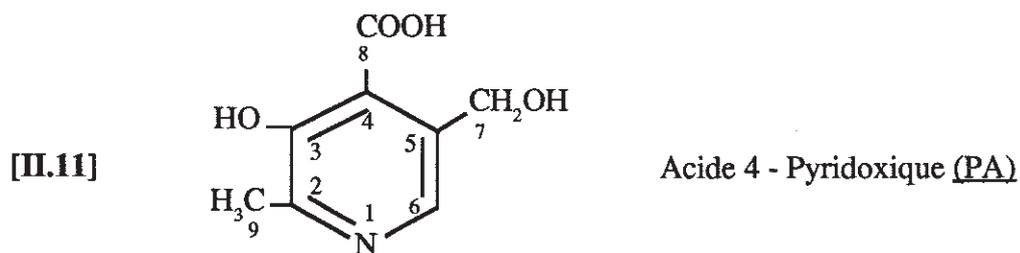
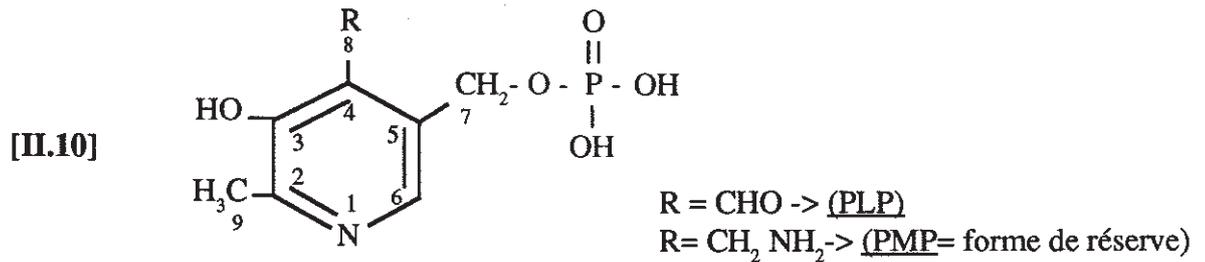
### II.2.b - Répartition et taux circulants

Rappelons tout d'abord la structure des différents composés que recouvre le terme de vitamine B<sub>6</sub>.

[II.9]



R = CH<sub>2</sub>OH -> Pyridoxine (PN)  
R = CHO -> Pyridoxal (PL)  
R = CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> -> Pyridoxamine (PM)



Une fois absorbés, ces différents composés seront rapidement convertis en coenzyme actif par le foie (voir paragraphe II.2.c).

Le foie, où pénètrent la PN et ses dérivés par simple diffusion passive, est donc l'organe le plus riche en vitamine B<sub>6</sub> (PL et dérivés: 6-8 µg/g, PM et dérivés: 2,5 µg/g [13]).

La concentration plasmatique des différents constituants de la vitamine B<sub>6</sub> serait de 114±9nM [11]. Le phosphate de pyridoxal (54%) en serait le constituant principal (pyridoxine: 27%, pyridoxal : 11%, pyridoxamine : 5%). Le phosphate de pyridoxal circule sous forme liée aux protéines plasmatiques (80% à l'albumine), ce qui le met à l'abri de la dégradation instantanée par les phosphatases alcalines. Il forme avec l'albumine une base de Schiff (2 molécules de coenzyme par molécule d'albumine). C'est sous cette forme que le coenzyme quitterait l'hépatocyte qui l'a synthétisé. Le foie serait le seul organe capable d'exporter de la vitamine B<sub>6</sub> sous forme de phosphate de pyridoxal dans la circulation et le taux circulant de ce dernier serait donc un bon reflet de sa synthèse hépatique.

Après une charge chronique en pyridoxine (100 mg par jour pendant 1 à 3 semaines), la concentration des différents composés de la vitamine B<sub>6</sub> atteint 655 ± 122 nM. Ce sont les concentrations de phosphate de pyridoxal (x 6) et de pyridoxal (x 12) qui augmentent le plus, celle de la pyridoxine changeant peu.

En fait, la vitamine B<sub>6</sub> circulant dans le sang total se répartit en deux compartiments différents: le compartiment plasmatique qu'on vient de voir, et un compartiment globulaire, deux fois plus riche que le précédent [14].

L'entrée de la vitamine B<sub>6</sub> dans les érythrocytes se fait par diffusion passive, sans système de transport spécifique. Mais il se produit, malgré l'absence de système de transport spécialisé, une accumulation intra-érythrocytaire importante de vitamine B<sub>6</sub>, impliquant des phénomènes de phosphorylation. C'est que la vitamine se lie rapidement à une protéine intra-globulaire (probablement l'hémoglobine) avec laquelle elle forme une base de Schiff.

Il existe donc dans le sang circulant deux pools de vitamine B<sub>6</sub> : un pool plasmatique, lié à l'albumine, et un pool globulaire, probablement lié à l'hémoglobine.

Les mécanismes de captation de la vitamine par les tissus périphériques sont mal connus, mais il semble que les formes déphosphorylées de la vitamine soient mieux transportées à travers les membranes. Le pyridoxal, véhiculé dans le plasma sous forme phosphorylée liée à l'albumine, pourrait être libéré sous l'action d'une phosphatase, transporté à travers les membranes puis rephosphorylé dans la cellule. Le turn-over de la vitamine B<sub>6</sub> est relativement lent : 2 à 4% de renouvellement quotidien des stocks.

### II.2.c - Activation de la vitamine B<sub>6</sub> en phosphate de pyridoxal (PLP)

Pour être active, la vitamine B<sub>6</sub> doit être transformée en PLP. Cette phosphorylation est le fait d'une enzyme unique, présente dans toutes les cellules de l'organisme : la pyridoxal kinase. La conversion de la pyridoxine en coenzyme peut se faire de deux manières (figure II.6) :

- a) Conversion de la pyridoxine en pyridoxal par la *pyridoxine-oxydase*, suivie d'une phosphorylation par la *pyridoxal kinase*.
- b) Transformation de la pyridoxine en phosphate de pyridoxine par la *pyridoxal kinase*, suivie d'une déhydratation par une oxydase, différente de la précédente, la *PNP-oxydase*.

La conversion de la pyridoxamine en coenzyme requiert une kinase spécifique, puis une oxydase semblable à celle du phosphate de pyridoxine. (figure II.1).

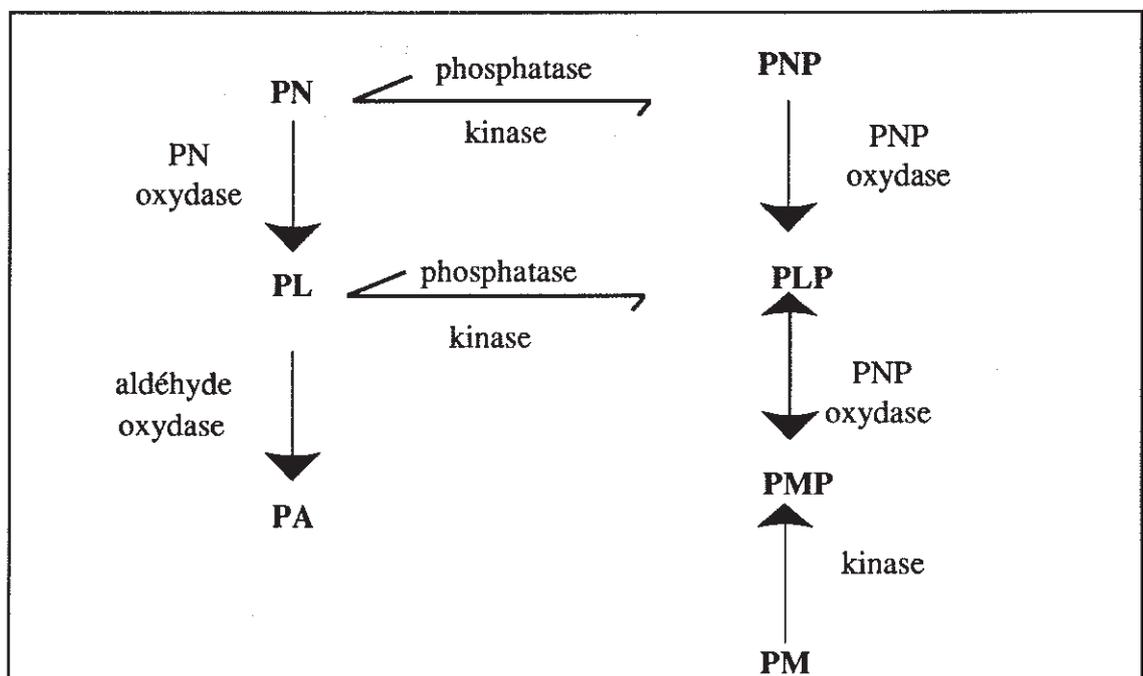


Figure II.1 : Activation et catabolisme de la vitamine B<sub>6</sub>.

## II.2.d - Catabolisme et élimination

Près de 50% de la vitamine B<sub>6</sub> ingérée chaque jour (2 mg/jour) sont éliminés dans les urines sous forme de PA (0,5 à 1,3 mg/jour) [11].

L'enzyme responsable du catabolisme du PL en PA est l'*aldéhyde-oxygène oxydo-réductase* (figure II.1). Les quantités éliminées chaque jour dans les urines sous forme de vitamine B<sub>6</sub> sont très faibles (0,1mg/jour ou 0,1 mg/g de créatinine). Le reste est éliminé sous des formes chimiques plus ou moins bien identifiées.

Quant aux faibles quantités de PLP éliminées, elles ne proviennent probablement pas du plasma, car le coenzyme n'est pas ultrafiltrable. Ceci donne toute sa valeur à la brève demi-vie du coenzyme plasmatique, qui n'est donc l'objet que d'un transport cellulaire ou d'un catabolisme.

## II.3 - RÔLE PHYSIOLOGIQUE

Toutes les enzymes utilisant la vitamine B<sub>6</sub> sont impliquées dans de très nombreuses réactions métaboliques. On a dénombré jusqu'à 60 systèmes enzymatiques dans lesquels elle joue un rôle de coenzyme.

Elle est cependant surtout essentielle au métabolisme des acides aminés (AA) et des protéines, à tel point qu'une carence en vitamine B<sub>6</sub> peut être à l'origine d'une rétention azotée sans qu'il existe de dysfonctionnement rénal (défaut de catabolisation des acides aminés par défaut de transamination et de décarboxylation).

Tous ces systèmes enzymatiques pyridoxino-dépendants, fonctionnent de la même manière : l'acide aminé forme une base de Schiff (ou aldimine) avec le phosphate de pyridoxal au niveau de site catalytique de l'enzyme. La base de Schiff résulte de la condensation de la fonction amine de l'AA avec la fonction aldéhyde du PLP qui constitue le véritable pivot de toutes ces réactions (figure II.2). Une des liaisons de la base de Schiff est alors rompue. Selon la nature de la liaison rompue, il en résulte, chez l'homme, soit une décarboxylation (rupture de la liaison ①, et réaction ①) soit une désamination, première étape de la transamination (rupture de la liaison ②, et réaction ②).

C'est la nature de l'apoenzyme qui détermine la voie ① ou ② empruntée.

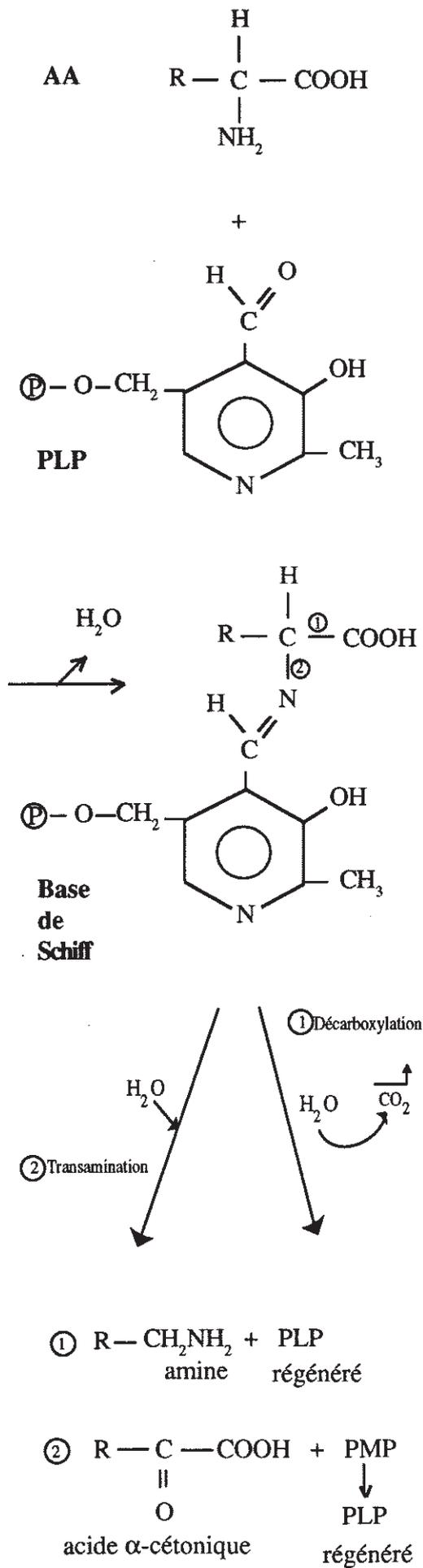


Figure II.2 : Mécanisme d'action du PLP.

### II.3.a - Les transaminations

Presque tous les acides aminés, à l'exception de la lysine, peuvent subir une transamination réversible par l'action d'une *transaminase* spécifique utilisant le PLP comme cofacteur.

Dans tous les cas, l'accepteur de la fonction amine est un acide  $\alpha$ -cétonique qui est transformé en acide  $\alpha$ -aminé (figure II.3). Le coenzyme est l'accepteur transitoire de la fonction amine : il donne par hydrolyse (liaison ① et réaction ② figure II.2) un premier acide  $\alpha$ -cétonique et la PMP qui reste attachée à l'apoenzyme. Un second acide  $\alpha$ -cétonique intervient alors, et forme avec la PMP une nouvelle base de Schiff, laquelle donne par hydrolyse le PLP régénéré, et un nouvel acide aminé (figure II.3).

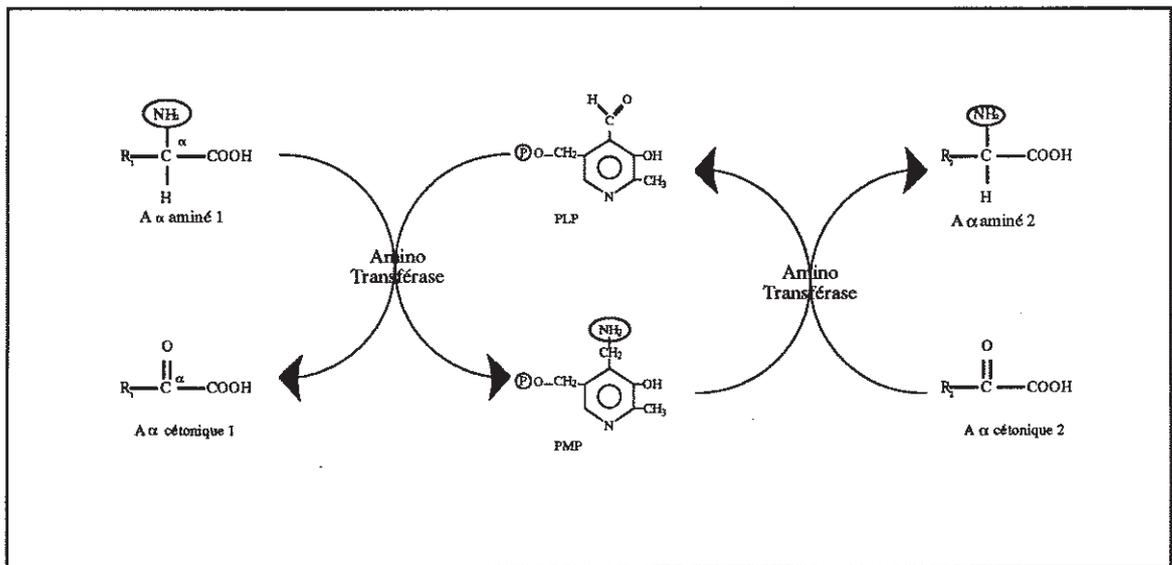


Figure II.3 : Mécanisme des réactions de transamination utilisant le PLP.

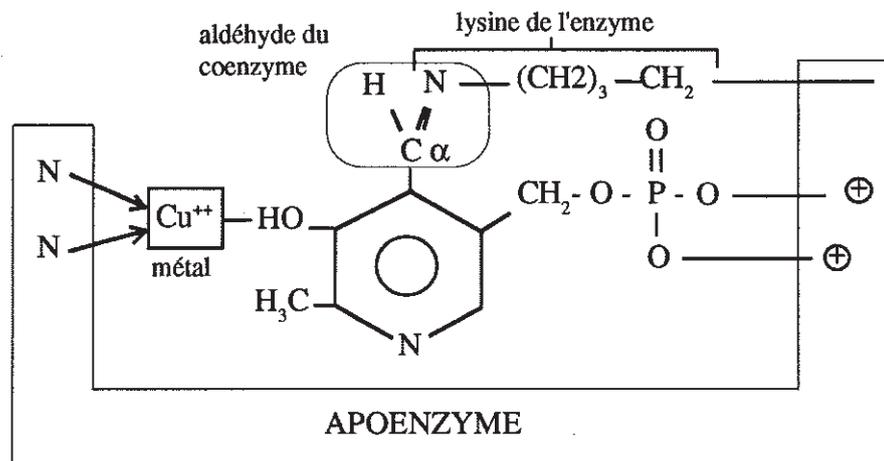
Considérations spatiales de cette transamination :

1° - En l'absence de substrat acide aminé :

Dans ces conditions, eul existe le complexe "apoenzyme- coenzyme", c'est à dire le complexe formé par la protéine enzymatique et son cofacteur, le PLP.

Le PLP se fixe solidement sur l'enzyme par un atome métallique (Cu ++ ) et réagit par sa fonction aldéhyde.

L'apoenzyme réagit par un de ses résidus lysine (figure II.4).



**Figure II. 4:** Structure du complexe "apoenzyme-coenzyme" en l'absence de substrat acide aminé.

2° - En présence de substrat acide aminé :

L'acide aminé se fixe sur le coenzyme, remplaçant ainsi le groupe lysyl de l'apoenzyme. Puis la répartition des électrons autour du carbone en  $\alpha$  se modifie : l'azote pyridinique attire les électrons, conditionnant la réaction de transamination. Les mécanismes et étapes intermédiaires sont donnés figure II.5.

Le résultat final aboutit à la formation d'un nouvel acide aminé et d'un nouvel acide  $\alpha$ -cétonique (figure II.5).

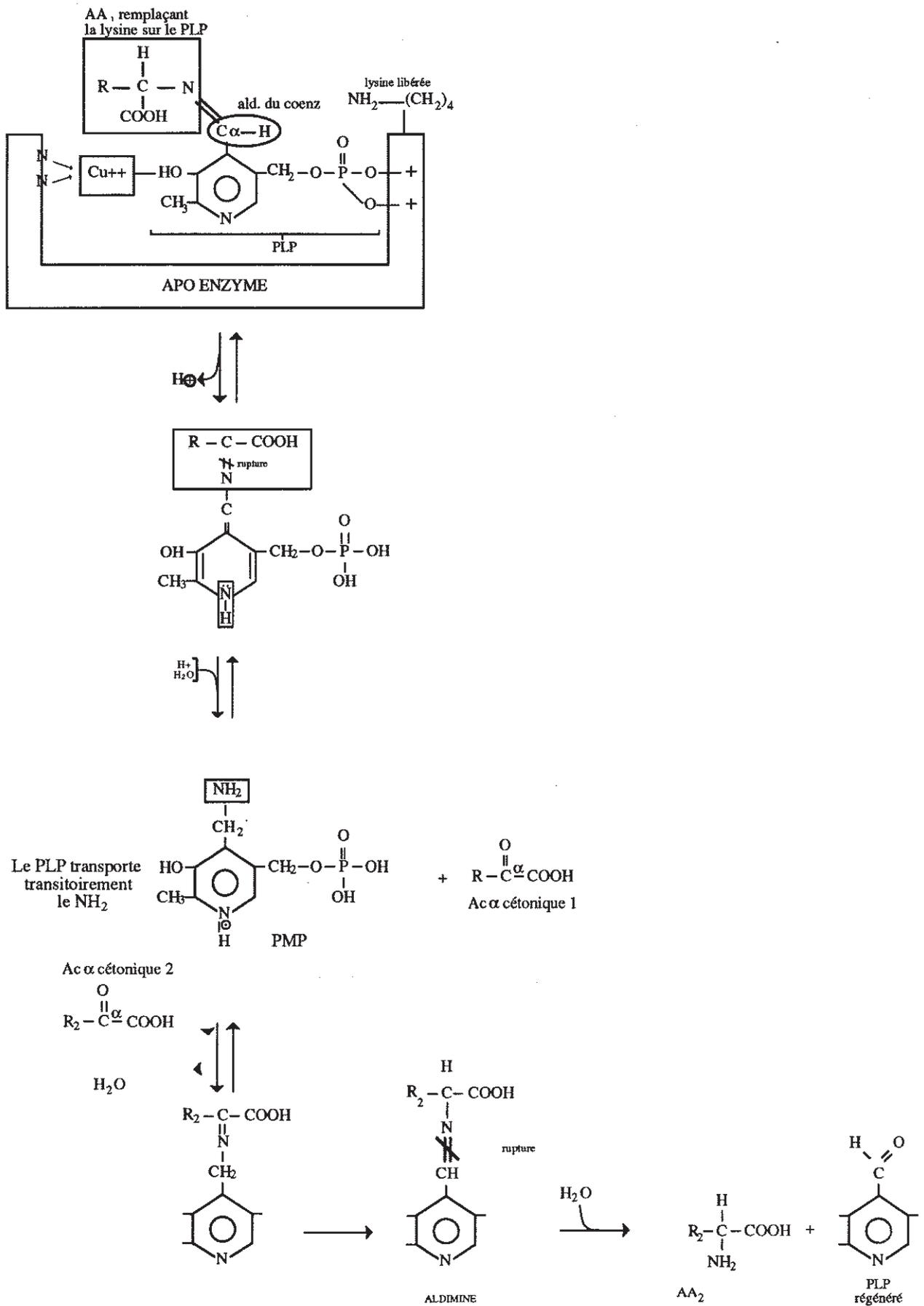
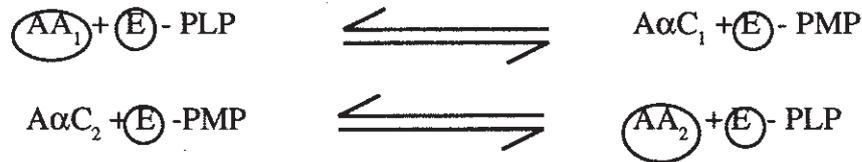


Figure II. 5 : Réactions enzymatiques en présence de substrat AA.

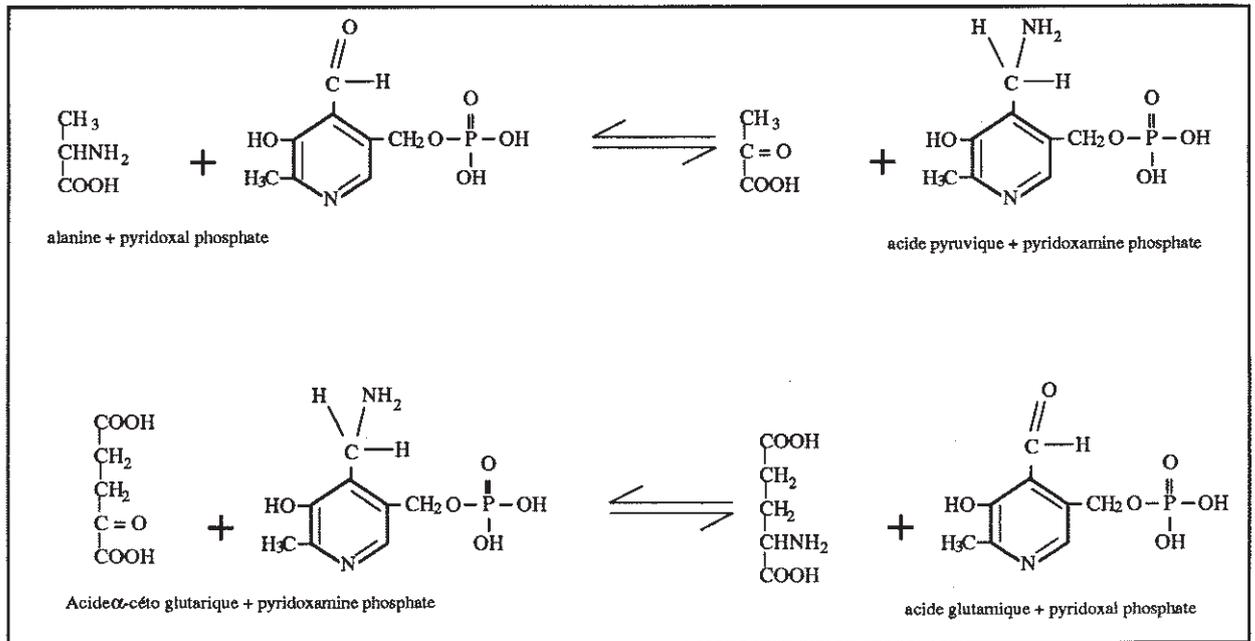
On pourrait résumer ce schéma par (E) désignant le complexe enzymatique) :



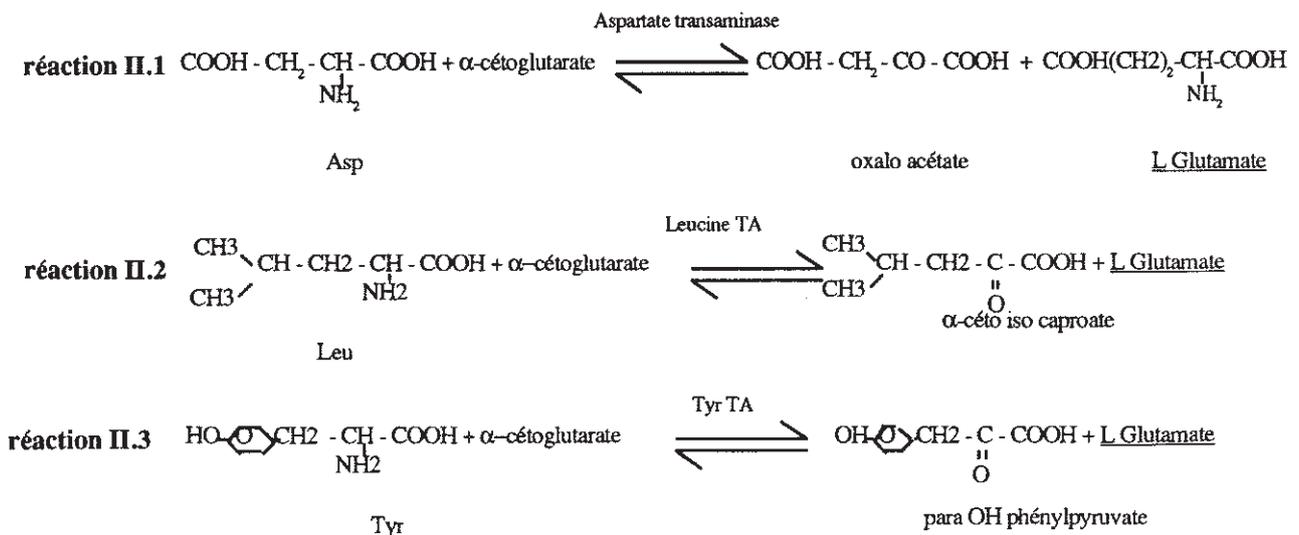
3° - Applications :

Il existe différentes transaminases (TA) dans l'organisme, chacune étant spécifique d'un acide aminé de départ, qui peut être l'alanine (figure II.6), l'aspartate (réaction II.1), la leucine (réaction II.2), la Tyrosine (réaction II.3) etc...

L'AαC1 est ici toujours le même : l'ac.α céto glutarique, mais il peut aussi s'agir de l'acide oxaloacétique (pour la GOT par exemple) ou de l'acide pyruvique (pour la GPT)



**Figure II.6 :** Un exemple de transamination faisant intervenir le pyridoxal 5 phosphate comme coenzyme.



On peut affirmer que ces réactions de transamination sont au coeur du métabolisme des acides aminés car elles sont un préalable indispensable à leur catabolisme. Elles sont par ailleurs également impliquées dans la synthèse des acides aminés dits non essentiels, à partir des acides  $\alpha$ -cétoniques correspondants.

### II.3.b - Les décarboxylations

Les décarboxylases utilisant la vitamine B<sub>6</sub> catalysent la formation d'amines à partir d'acides aminés. Les plus importantes d'entre elles sont :

- *l'histidine décarboxylase* qui produit l'**histamine** à partir d'histidine. L'histamine est une importante amine vasopressive relarguée par les mastocytes en réponse à un conflit antigène-anticorps à leur surface (asthme, eczéma, allergies diverses). Elle est aussi le second messenger de la gastrine dans l'estomac où elle permet la poursuite de la sécrétion d'acidité gastrique après l'arrêt de la sécrétion de gastrine.

- *l'ornithine décarboxylase* qui produit la **putrescine**, précurseur de deux polyamines cationiques essentielles pour les régulations cellulaires et les interactions entre acides nucléiques : la spermine et la spermidine.

- *la décarboxylase des acides aminés aromatiques* qui décarboxyle la dopa (dihydroxyphénylalanine) en **dopamine**, le 5-OH-tryptophane en 5-OH-tryptamine (**sérotonine**) et la tyrosine en **tyramine**. La sérotonine et la dopamine sont deux neurotransmetteurs importants, précurseur pour le second de l'**adrénaline** et de la **noradrénaline**.

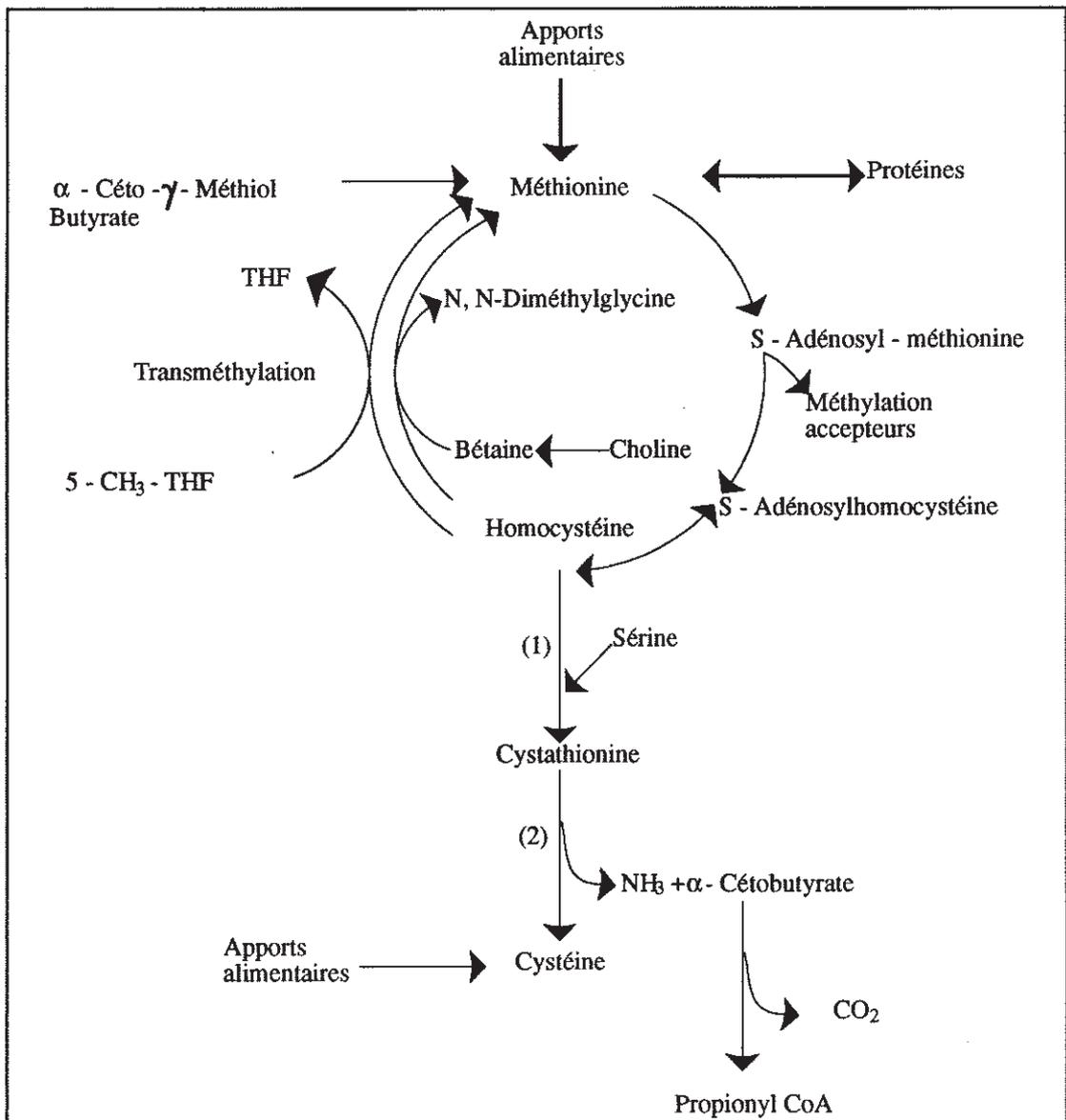
- *la décarboxylase de l'acide glutamique* qui conduit de l'acide glutamique à l'acide  $\gamma$ -amino-butyrique (GABA), autre neuromédiateur important. Cette enzyme est l'une des plus sensibles à la vitamino-déficiences : la chute d'activité de l'enzyme, du GABA cérébral et l'apparition de convulsions sont d'ailleurs étroitement liées dans le temps chez les sujets déficients.

Nous retrouverons cette intervention de la vitamine B<sub>6</sub> lors d'une interaction de cette vitamine avec un médicament antiparkinsonien, la L. Dopa, détaillée plus amplement au chapitre III.

### II.3.c - Autres réactions enzymatiques impliquant le PLP

#### 1° - Cystathionine synthétase et cystathionase

Ce sont 2 enzymes impliquées dans le métabolisme de la méthionine en cystéine. Le métabolisme de la méthionine aboutit à la formation d'homocystéine et d'un groupe méthyle, transféré sur un accepteur. L'homocystéine peut alors être reméthylée en méthionine ou transformée en cystéine (figure II.7). La synthèse de cystéine implique la formation intermédiaire de cystathionine par condensation d'une homocystéine et d'une sérine, réaction catalysée par la *cystathionine synthétase*, enzyme pyridoxino-dépendante (figure II.7), réaction 1). La cystathionine est alors hydrolysée en cystéine par la *cystathionase*, elle aussi B<sub>6</sub> dépendante (figure II.7, réaction 2). Dans cette réaction se trouve généré un analogue instable de la sérine, l'homosérine, immédiatement désaminé en ac  $\alpha$ -céto-butyrrique.



**Figure II.7 :** Intervention de la vitamine B<sub>6</sub> dans la dégradation de la méthionine et de ses dérivés soufrés.

(1) *Cystathionine synthétase.*

(2) *Cystathionase. Accepteurs : créatinine, phosphatidylcholine, carnitine, catécholamines, ARN, ADN, etc.*

C'est ce mécanisme qui explique l'intérêt d'un traitement par vitamine B<sub>6</sub> lors de toute cystathionurie ou homocystinurie.

## 2° - Cinuréninase et autres enzymes du métabolisme du Tryptophane

Rappelons tout d'abord les différentes voies du métabolisme du tryptophane, avant de ne s'intéresser qu'à son catabolisme oxydatif mettant en jeu la *cinuréninase*.

On peut considérer trois voies principales d'utilisation du tryptophane alimentaire :

la voie de la sérotonine = la 1<sup>ère</sup> voie

la voie de la vitamine PP = la 2<sup>ème</sup> voie

et la voie des protéines (figure II.8).

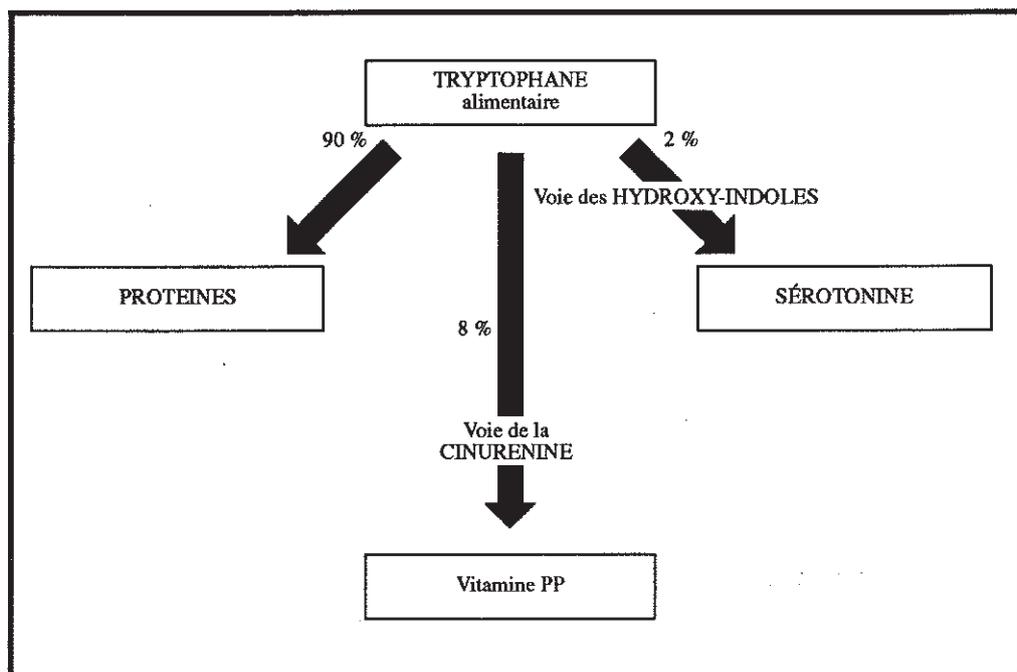
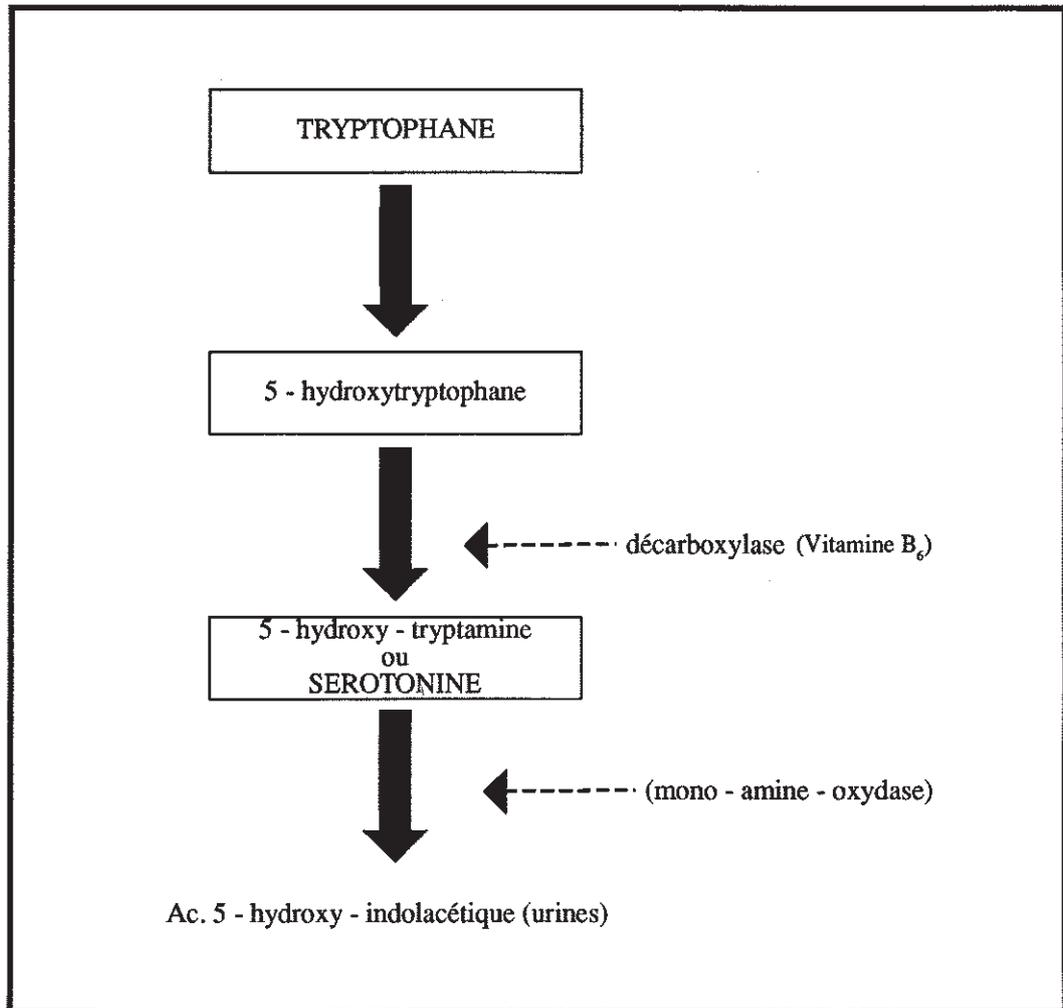


Figure II.8 : Les différentes voies du métabolisme du tryptophane.

La 1<sup>ère</sup> voie de dégradation du tryptophane passe par le 5-hydroxytryptophane et aboutit, après action d'une décarboxylase B<sub>6</sub>-dépendante, à la 5-hydroxytryptamine, ou sérotonine (figure II.9).





**Figure II.9 :** Voie des hydroxy-indoles conduisant à la sérotonine.

La 2<sup>ème</sup> voie, dite voie de la cinurénine, consiste en un métabolisme oxydatif du Tryptophane par la *tryptophane pyrrolase* (figure II.10, réaction ①) et conduit à la cinurénine puis à la 3-OH-cinurénine. Ces composés sont respectivement transformés en acide anthranilique et 3-OH-anthranilique, par la *cinuréninase* (figure II.10, réactions ②), PLP dépendante. En cas de déficit en vitamine B<sub>6</sub>, cette transformation ne se fait pas et d'autres métabolites se forment par transamination : les acides cinurénique et xanthurénique, qui sont éliminés dans les urines (figure II.10, réactions ③).

Cette voie métabolique secondaire (réaction ③) est à la base du test de charge en tryptophane.

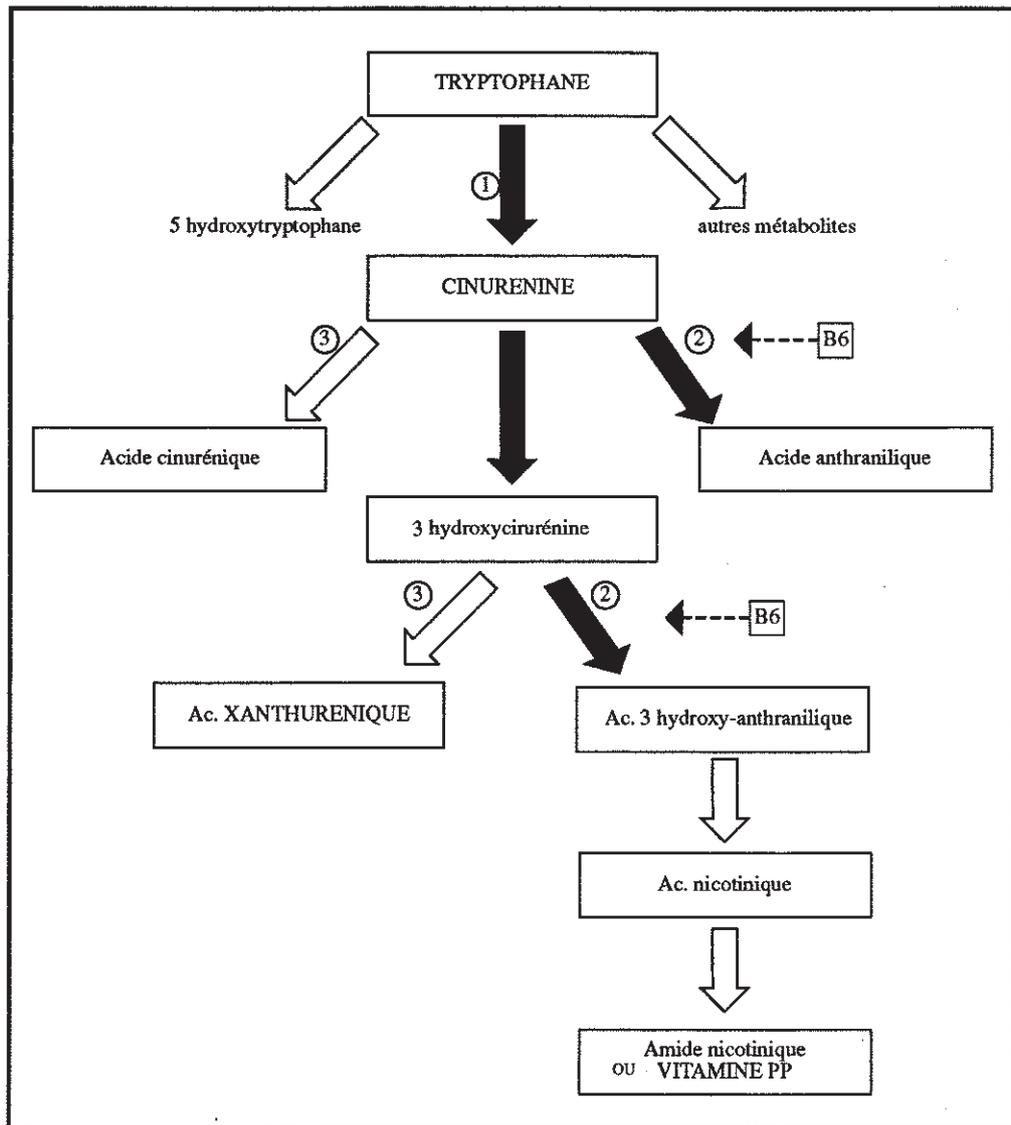


Figure II.10 : Voie de la cinurénine, conduisant à la vitamine PP.

### 3° - Autres enzymes B<sub>6</sub> dépendantes

Parmi les autres réactions enzymatiques utilisant la vitamine B<sub>6</sub>, il faut citer :

- la *sérine désaminase*, qui conduit de la sérine à l'acide pyruvique (foie, désamination oxydative, PLP) et la *thréonine désaminase*, qui conduit de la thréonine à l'acide  $\alpha$ -cétobutyrique

- La *sérine hydroxyméthyl transférase*, qui permet la synthèse d'une sérine par condensation de 2 glycines et requiert en outre le NAD, l'acide lipoïque et l'acide tétrahydrofolique comme cofacteurs.

- la  *$\delta$ -amino lévulinate synthétase* qui catalyse la première étape de la synthèse de l'hème et des porphyrines par condensation de la glycine et du succinyl-coenzyme A. C'est la faible activité de cette enzyme dans les carences en vitamine B<sub>6</sub> qui est responsable de l'anémie microcytaire hypochrome chez les sujets déficients.

NB : Les racémases des acides aminés pyridoxino-dépendantes, n'existent pas chez les mammifères.

## II.4 - CONTEXTE PATHOLOGIQUE

### II.4.a - Déficiences et carences

#### 1°- Les nouvelles déficiences en vitamine B<sub>6</sub>

Les carences d'apport sont rares chez l'homme et l'animal car cette vitamine est abondante dans le monde vivant et parce que la flore intestinale contribue aussi à satisfaire les besoins de l'organisme. La vitamine B<sub>6</sub> est si largement représentée qu'il est même difficile d'obtenir un modèle animal réellement déficient en cette seule vitamine.

Le plus sûr moyen d'y parvenir consiste à soumettre des rattes à un régime dépourvu de pyridoxine avant la fécondation et de poursuivre le même régime en milieu axénique chez les petits. Il est très difficile chez l'homme d'induire une avitaminose franche chez des sujets volontaires s'ils ne reçoivent pas un antagoniste comme la désoxy-pyridoxine (analogue structural de la pyridoxine) agissant par inhibition compétitive au niveau des réactions enzymatiques pyridoxinodépendantes. Les déficits en vitamine B<sub>6</sub> chez l'homme d'aujourd'hui ne sont donc pas d'origine nutritionnelle, sauf peut-être chez les sujets âgés [15]. Ils résultent de l'interaction de multiples facteurs dont aucun n'est absolument suffisant, mais dont la conjonction conduit à un état de vitamino-déficience: facteurs nutritionnels, pharmacologiques, génétiques et facteurs de milieu. Pour illustrer le rôle décisif de ces interactions, il suffit de citer à titre d'exemples quelques situations caricaturales qui sont loin d'être exceptionnelles:

- alcoolisme chronique chez un psychotique hospitalisé dans de mauvaises conditions.
- traitement par l'isoniazide chez un éthylique chronique "acétyleur lent".
- hémodialyse chronique chez un insuffisant rénal soumis à un régime hypocalorique et hypoprotidique
- grossesse après interruption récente d'une contraception prolongée par les oestroprogestatifs, grossesse chez une femme traitée par l'isoniazide .

La fréquence de ces associations illustre assez la réalité des risque de déficience en vitamine B<sub>6</sub>. Cette vitamino-déficience n'est jamais complète, de sorte que son expression reste longtemps purement biologique. Lorsqu'elle se démasque cliniquement, elle donne lieu d'abord à des symptômes non spécifiques. Exceptionnellement, des symptômes plus spécifiques apparaissent. La description de ces manifestations, qui est faite au paragraphe suivant, est donc d'un intérêt restreint dans la mesure où de telles situations de vitamino déficience profonde ne sont jamais rencontrées. Il importe bien davantage de savoir prévenir le déficit en vitamine B<sub>6</sub> chaque fois que les conditions de son installation sont réunies.

## 2°- Les signes cliniques et biologiques d'une carence en vitamine B<sub>6</sub>

Les signes cliniques principaux de la carence en vitamine B<sub>6</sub> sont : des lésions cutanées érythémateuses, séborrhéiques, naso-labiales ; une glossite (rougeur, œdème), des troubles neurologiques (convulsions), une anémie microcytaire hypochrome. Dans les carences expérimentales, on observe également des anomalies immunitaires cellulaires et humorales dues à une perturbation des proliférations cellulaires et des synthèses protéiques, la carence en vitamine B<sub>6</sub> affectant la synthèse des bases puriques et donc celle des acides nucléiques.

Si la carence pure en vitamine B<sub>6</sub> ne s'observe que très rarement, de nombreux auteurs ont mis en évidence une altération de l'état nutritionnel vitaminique B<sub>6</sub> chez un grand nombre d'individus (Annexe 4).

La découverte de méthodes nouvelles d'exploration de l'état vitaminique B<sub>6</sub>, notamment la mesure des activités des transaminases érythrocytaires et les renseignements qu'elles apportent, a clairement démontré l'existence d'états intermédiaires de carence pour cette vitamine.

De tels états, dont l'expression est le plus souvent infra-clinique, n'apparaissent pas comme étant le seul fait d'un approvisionnement insuffisant en cette vitamine et résultent de l'interaction de nombreux facteurs.

## 3°- Les causes des déficiences en vitamine B<sub>6</sub>

### a) - L'alcoolisme chronique

Le déficit en vitamine B<sub>6</sub> est très fréquent chez l'alcoolique.

Les concentrations plasmatiques et hépatiques de tous les composés de la vitamine B<sub>6</sub> sont significativement abaissées chez 50% d'entre eux [11].

La réalité de ce déficit est confirmée par la perturbation du test de charge en tryptophane dans 50% des cas. Ce déficit résulte d'une carence d'apport, d'une malabsorption, mais surtout d'une perturbation du métabolisme de la vitamine B<sub>6</sub> [16, 17].

Il a été montré en particulier :

\*) une inhibition de l'activité de la *pyridoxine-kinase* durant l'ingestion d'alcool.

\* \*) un catabolisme accéléré du phosphate de pyridoxal par les produits d'oxydation de l'éthanol (acétaldéhyde en particulier) qui déplacent le coenzyme de sa liaison à l'albumine et activent les phosphatases alcalines membranaires (dégradation du PLP en PL, puis élimination sous forme de PA).

Il en résulte une clairance rénale accrue du PA chez l'alcoolique.

Même s'il est difficile d'établir un lien certain de cause à effet entre la carence en vitamine B<sub>6</sub> et les troubles observés chez l'alcoolique chronique, l'administration quotidienne de vitamine B<sub>6</sub> a néanmoins une action bénéfique indiscutable sur certaines manifestations hématologiques et neurologiques.

b) - Les interactions médicamenteuses

*L'isoniazide (INH) :*

L'INH est un antituberculeux majeur largement utilisé depuis plus de 40 ans. Ce médicament a l'inconvénient de se combiner avec le phosphate de pyridoxal pour former une hydrazone dépourvue d'activité vitaminique.

Un traitement prolongé par l'isoniazide conduit donc à une vitamino-déficience avec en particulier une neuropathie périphérique et une pellagre curable par la vitamine B<sub>6</sub> [11].

Les progrès récents de la pharmacogénétique ont permis d'établir que ces accidents d'intoxication se rencontrent surtout chez les patients dits "acétyleurs lents" de l'isoniazide, c'est-à-dire chez ceux qui, pour des raisons d'hétérogénéité génétique, métabolisent l'isoniazide plus lentement [18].

*Les contraceptifs oraux*

Les contraceptifs oraux, comme du reste, tous les stéroïdes, augmentent la synthèse de la tryptophane pyrrolase.

Il en résulte un accroissement du flux de tryptophane vers la cinurénine, une induction de la cinuréninase et une surconsommation de vitamine B<sub>6</sub> (figure II.10), d'où un certain déséquilibre du pool vitaminique au détriment des autres réactions pyridoxino-dépendantes. La tendance dépressive et les troubles digestifs des femmes sous contraceptifs oraux ont d'ailleurs été imputés à une réduction du tryptophane disponible pour la synthèse de sérotonine dans le cerveau, ainsi qu'à une réduction d'activité de la *5-hydroxy-tryptophane décarboxylase*, qui est une enzyme pyridoxino dépendante [11]. L'administration de vitamine B<sub>6</sub> aux femmes sous contraceptifs oraux aurait à cet égard une action salutaire sur les différents troubles métaboliques [19].

### *Autres interactions médicamenteuses*

Il faut signaler enfin l'existence d'interactions pharmacologiques entre le métabolisme de la vitamine B<sub>6</sub> et celui de l'hydralazine, de la cyclosérine et de la D-pénicillanine [20]. Un déficit en vitamine B<sub>6</sub> est également évoqué chez les épileptiques traités.

Certaines seront détaillées plus amplement dans le chapitre III.

### *Les interrelations vitaminiques [21].*

La vitamine B<sub>6</sub> est indispensable pour la conversion du tryptophane en vitamine PP (figure II. 10). La vitamine PP, la vitamine B<sub>2</sub> et la biotine sont synergiques avec la vitamine B<sub>6</sub>.

Un surdosage en vitamine B<sub>1</sub> est susceptible de provoquer un déficit en vitamine B<sub>6</sub> chez l'animal ; consommées ensemble, ces deux vitamines sont synergiques [22].

Le déficit en vitamine B<sub>6</sub> provoque une diminution du coenzyme A dans le foie chez le rat [23]. D'autre part, la PN peut être administrée avantageusement chez les sujets présentant un déficit des autres éléments du complexe B [24]. Ceci peut être résumé par le tableau II.7.

vitamine B <sub>1</sub>	concentrations tissulaires diminuées par déficit en vitamine B <sub>6</sub>
vitamine B <sub>2</sub>	<ul style="list-style-type: none"><li>• indispensable à la conversion de la vitamine B<sub>6</sub> en son coenzyme actif</li><li>• synergique avec la vitamine B<sub>6</sub></li></ul>
vitamine PP	<ul style="list-style-type: none"><li>• synergique avec la vitamine B<sub>6</sub></li></ul>
vitamine B <sub>6</sub>	<ul style="list-style-type: none"><li>• indispensable à la conversion du tryptophane en vitamine PP</li><li>• si déficitaire, diminution des concentrations tissulaires de vitamine B<sub>1</sub></li></ul>
Biotine	synergique avec la vitamine B <sub>6</sub>

**Tableau II.7 : Interrelations vitaminiques concernant la vitamine B<sub>6</sub> [21].**

c) - Les déficits en vitamine B<sub>6</sub> chez les psychotiques

Deux enquêtes récentes portant sur plus de 300 psychotiques hospitalisés ont permis de mettre en évidence un authentique déficit en pyridoxine chez 10% d'entre eux [25]. La multiplicité des facteurs en cause est manifeste : alcoolisme, dénutrition, chimiothérapie ou autres facteurs. Là plus qu'ailleurs, la part qui revient au seul déficit en pyridoxine est difficile à faire. Ces enquêtes ont néanmoins l'intérêt d'attirer l'attention sur un aspect encore méconnu de la pathologie carencielle en psychiatrie et de permettre d'y remédier par une supplémentation vitaminique systématique.

Le mécanisme de cette déplétion en vitamine B<sub>6</sub> résulterait, selon C.C PFEIFFER et P. GONTHIER [26], d'une augmentation de l'élimination urinaire de cryptopyrrole. Or ce pyrrole réagit avidement avec tous les composés aldéhydiques, dont le pyridoxal induisant une carence grave en pyridoxine. Ils ont également remarqué que le complexe formé par le pyridoxal et le cryptopyrrole déplétait exagérément l'organisme en Zinc. Ainsi, chez certains psychotiques, certains symptômes observés seraient dûs à une déperdition simultanée et accrue de pyridoxine et de Zinc, puisque cédant à l'administration de fortes doses de pyridoxine (jusqu'à 1g/jour), mais aussi de Zinc et de Manganèse.

d) - L'hémodialyse chronique

Les patients en hémodialyse chronique sont particulièrement exposés au risque de déficience en vitamine B<sub>6</sub>, et en présentent en effet les multiples stigmates. Leurs besoins quotidiens se situent bien au-delà de 2mg/jour, apports recommandés chez l'adulte normal. Le mécanisme de cet accroissement des besoins n'est pas clair. Il met en jeu :

\*) une inhibition de la phosphorylation du pyridoxal par des toxines réduisant l'activité de la *pyridoxalkinase*.

\* \*) une activation des *phosphatases* hydrolysant le phosphate de pyridoxal. Certains insuffisants rénaux présentent d'ailleurs des anomalies de l'immunité cellulaire curables par la vitamine B<sub>6</sub>, qui rappellent les déficits immunitaires des carences expérimentales en pyridoxine [27].

e) - La grossesse et la période néonatale

La grossesse est une période particulièrement sensible au déficit en vitamine B<sub>6</sub> [28]. C'est que les besoins du fœtus en pyridoxine sont importants : pour les satisfaire, il existe un gradient de concentration de 5 fois en faveur de l'enfant. Il en résulte un épuisement des réserves maternelles, parfois rendu responsable des troubles digestifs de la grossesse.

Les besoins sont également accrus pendant la lactation. La concentration en vitamine B<sub>6</sub> du lait de femme est au moins six fois plus faible que celle du lait de vache.

Aujourd'hui, les laits maternisés actuels sont supplémentés en vitamine B<sub>6</sub> car la pyridoxine est thermolabile et donc détruite durant leur préparation. Les premiers laits maternisés qui n'étaient pas supplémentés en pyridoxine, furent à l'origine de véritables syndrômes carenciels avec convulsions, curables par la vitamine B<sub>6</sub> [11].

f) - "Le syndrome du restaurant chinois"

Le syndrome du restaurant chinois est un syndrome transitoire, consécutif à l'absorption de monoglutamate de sodium, qui entre dans la composition de certaines soupes et mets chinois. Ce syndrome bénin comporte des sensations de brûlures, raideur, maux de tête et gastralgies.

Des travaux effectués par FOLKERS et coll. ont montré que ce syndrome s'observait chez 50% des sujets présentant un déficit en pyridoxine. Il s'agirait donc d'une anomalie du catabolisme du monoglutamate de sodium chez les sujets déficients en pyridoxine [29].

#### **II.4.b - Les maladies métaboliques pyridoxino-dépendantes (tableau II. 8)**

##### **1° - L'homocystinurie**

La maladie métabolique pyridoxino-dépendante la plus fréquente est l'**homocystinurie** par déficit en *cystathionine synthétase*. Cette enzyme catalyse la formation intermédiaire de cystathionine dans la réaction globale de transsulfuration de la méthionine en cystéine (figure II.7). Le déficit en cette enzyme entraîne donc une accumulation considérable de méthionine et d'homocystéine dans le plasma et les urines.

L'homocystinurie se traduit sur le plan clinique par des altérations des tissus conjonctifs et osseux, une atteinte du cristallin, des thromboses vasculaires fréquentes et un retard mental. De fortes doses de pyridoxine sont efficaces s'il persiste une activité enzymatique résiduelle. Ces patients sont habituellement porteur d'une mutation qui réduit l'affinité de l'apoenzyme pour le coenzyme (phosphate de pyridoxal). Ceci se traduit par une instabilité de l'apoenzyme et une réduction de sa demi-vie. L'administration de pyridoxine stabilise l'apoprotéine et augmente l'activité du complexe enzymatique.

## 2° - La cystathioninurie

La cystathioninurie, dont la traduction clinique la plus fréquente est une arriération mentale et une comitialité, est due à un déficit en *cystathionase*, une enzyme pyridoxino-dépendante qui catalyse l'hydrolyse de la cystathionine en cystéine (figure II.7). La plupart du temps, l'administration de vitamine B<sub>6</sub> est efficace. Comme dans le cas de l'homocystinurie, la mutation causale est responsable d'une diminution de l'affinité de l'apoenzyme pour le phosphate de pyridoxal.

## 3° - Les autres maladies métaboliques

D'autres maladies métaboliques répondent favorablement à l'administration de pyridoxine.

- **l'hyper ornithinémie** : due à un déficit héréditaire en *ornithine-cétoacide aminotransférase*, enzyme pyridoxino-dépendante.

- **l'oxalurie primaire** : probablement due au déficit d'une enzyme située sur la voie de synthèse de l'acide glycolique.

- **l'acidurie xanthurénique** : déficit en *cinuréninase*, enzyme pyridoxino-dépendante, de la voie du catabolisme du tryptophane en vitamine PP, induisant une arriération mentale des patients.

- **les convulsions pyridoxino-dépendantes** : la pyridoxino-dépendance est une cause rare de convulsions. Les convulsions pyridoxino-dépendantes débutent habituellement dans la période néonatale et répondent bien à l'administration de vitamine B<sub>6</sub>. A l'arrêt de la vitaminothérapie, les convulsions reprennent en 2 à 23 jours.

En fait, la présentation clinique des convulsions pyridoxino-dépendantes est très hétérogène: elles peuvent aussi débuter bien après la période néonatale et ne pas se reproduire pendant plusieurs mois malgré l'arrêt de la vitaminothérapie [11].

Pour la pratique, il faut retenir qu'un traitement d'épreuve par la pyridoxine doit être systématiquement tenté dans toutes les comitialités débutant avant l'âge de 18 mois, quel qu'en soit le type.

En prévention, tous les aliments lactés diététiques infantiles sont aujourd'hui plus ou moins supplémentés en vitamine B<sub>6</sub>.

Affection	Enzyme en cause
Homocystinurie	<i>Cystathionine synthétase</i>
Cystathioninurie	<i>Cystathionase</i>
Hyperornithinémie	<i>Ornithine cétoacide amino-tranférase</i>
Oxalurie primaire	Enzyme non pyridoxino dépendante (mécanisme indirect)
Acidurie xanthurénique	<i>Cinuréninase</i>
Convulsions pyridoxino-dépendantes	( <i>Glutamate décarboxylase ?</i> )

**Tableau II.8 :** *Récapitulatif des maladies métaboliques pyridoxino-sensibles.*

## II.5 - TOXICOLOGIE DE LA VITAMINE B<sub>6</sub>

La vitamine B<sub>6</sub> étant hydrosoluble, rapidement métabolisée et excrétée, elle devrait avoir une toxicité faible [36]. C'est ce que pensent encore BERTIN et TREVES [37] qui écrivent que la posologie moyenne de la vitamine B<sub>6</sub> varie de 50 à 500 mg/jour, et qu'il n'y a pas d'effets secondaires.

Cela semble également être l'avis de GUILLAND et LEQUEU [31] qui pensent que la toxicité apparaît chez l'homme comme faible pour des posologies voisines d'une centaine de mg/jour. Au delà, des neuropathies sensorielles apparaîtraient.

Cependant, des études menées chez l'homme [36] ont conclu au caractère potentiellement toxique de doses journalières supérieures à 50 mg, c'est-à-dire encore moindre que celles retenues précédemment. Les véritables neuropathies sensorielles apparaîtraient pour des posologies de 2 g de PN HCl/j pendant plusieurs mois [32, 33, 35].

D'autre part, des signes de neuropathie périphérique (ataxie cérébelleuse, faiblesse musculaire) ont été observés chez des chiens ayant reçu 200 mg de PN HCl/kg de poids/j pendant 40 à 75 jours, ce qui représente des doses massives.

A une dose de 50 mg de PN HCl/kg/j, aucun signe clinique de toxicité n'a été observé, malgré une atteinte histologique de la myéline des racines dorsales (relais de la sensibilité). Les signes cliniques d'une hypervitaminose B<sub>6</sub> régressent chez le chien en 6 mois après l'arrêt de la B<sub>6</sub> ; la vitesse de conduction nerveuse, après diminution, ne retrouve pas sa valeur initiale [33, 34].

Quoi qu'il en soit, la notion de faibles et fortes doses de B<sub>6</sub> est toute subjective, puisque pour BERTIN et TREVES [37], 667 mg/kg chez l'animal est une forte dose, et 100 à 250 mg/kg est une faible dose, alors que nous avons vu plus haut que, dès 50 mg/kg, une toxicité visible histologiquement était observée [33, 34].

Chez l'homme, une étude récente [38] semble montrer que la toxicité de la pyridoxine est désormais bien établie, et qu'un excès de vitamine B<sub>6</sub> a des effets similaires à ceux de carence. Le mécanisme de cette toxicité a été étudié sur des cultures de cellules nerveuses, et il s'avère que la pyridoxine (ainsi que d'autres vitamines) provoque une augmentation de l'influx de calcium, d'où son potentiel neurotoxique. De plus, le PLP provoque, *in vitro*, une altération des récepteurs hépatiques des glucocorticoïdes, provoquée par une altération de l'expression des gènes.

Parmi les autres effets toxiques de la pyridoxine chez l'homme, on trouve l'apparition de convulsions pour de fortes doses, des symptômes cliniques neurologiques divers dès des doses de 200 mg/jour (en deçà, les neuropathies sont asymptomatiques, malgré la plus grande sensibilité de l'homme à la PN, par rapport à l'animal (rongeurs)) ; on a observé également des lésions de la peau par photosensibilisation chez des enfants traités pour syndrome de Down (à 25 mg/kg/jour ou plus pendant plusieurs années), ainsi que des vomissements et des neuropathies périphériques.

Inversement, la vitamine B<sub>6</sub> semble améliorer la tolérance à la douleur chez les rongeurs [38], et est proposé comme adjuvant dans le traitement antalgique par anti inflammatoires non stéroïdiens des lombalgies neurologiques ou rhumatologiques, et dans le traitement chirurgical du syndrome du canal carpien [37].

Toutes ces récentes découvertes sur la toxicité de la vitamine B<sub>6</sub> mériteraient d'être approfondies, et si elles se confirment, le dosage de la vitamine B<sub>6</sub> deviendra plus essentiel encore dans la recherche d'hypervitaminoses que dans celle de carences.

## CONCLUSION

On désigne aujourd'hui sous le terme de vitamine B<sub>6</sub> au moins 6 composés hydrosolubles de structure chimique différente : la pyridoxine (PN), le pyridoxal (PL) et la pyridoxamine (PM) qui représentent la vitamine B<sub>6</sub> exogène, le phosphate de pyridoxal (PLP) et le phosphate de pyridoxamine (PMP) qui sont des métabolites dérivés des trois premiers et enfin l'acide 4-pyridoxique (4-PA) ou principal catabolite urinaire de la vitamine B<sub>6</sub>. Des interconversions entre ces différentes formes surviennent dans l'organisme sous l'action d'enzymes spécifiques conduisant rapidement à leur élimination urinaire sous forme de 4-PA.

Le besoin en vitamine B<sub>6</sub> (généralement 2,0 mg/jour chez l'homme adulte et 2,2 mg/jour chez la femme adulte) est le plus souvent satisfait du fait de l'ubiquité de cette substance dans les aliments courants (origine animale et végétale).

Ceci permet à la forme active de la vitamine B<sub>6</sub>, le phosphate de pyridoxal (PLP), d'assurer son rôle de cofacteur de réactions enzymatiques : les plus importants concernent le métabolisme des acides aminés par des réactions de transamination et de décarboxylation. De nombreux autres systèmes PLP-dépendants (une soixantaine) ont été également identifiés.

Le contexte pathologique de la vitamine B<sub>6</sub> est vaste.

Il concerne tout d'abord les déficiences et les carences : d'apport, mais surtout aujourd'hui consécutives à diverses situations physiopathologiques (grossesse, hémodialyse chronique...), à des comportements sociaux (alcoolisme...) ou à des traitements médicamenteux (isoniazide, contraceptifs oraux, L.Dopa...).

Il concerne ensuite un certain nombre d'affections métaboliques pyridoxino-dépendantes (homocystinurie, cystathioninurie...) où l'organisme ne parvient pas à utiliser la vitamine B<sub>6</sub> disponible, du fait de déficits enzymatiques précis. Ici comme dans le cas des carences, les signes cliniques ne sont pas spécifiques : lésions cutanées, convulsions, anémie microcytaire hypochrome...

Et enfin, mais qui n'a été découverte que très récemment puisque l'on croyait encore, il y a trois ans, en sa totale innocuité, une toxicité de la vitamine B<sub>6</sub> existe, se manifestant par les signes d'un surdosage chronique : neuropathies sensorielles, convulsions, lésions cutanées... Il semble aujourd'hui qu'un intérêt croissant se porte sur cette hypervitaminose, en particulier dans le cadre des multivitaminothérapies très en vogue actuellement

## Références bibliographiques du chapitre II

- [1] - A. MUNNICH. Pyridoxine (vitamine B<sub>6</sub>). *In* : Les vitamines : aspects métaboliques, génétiques, nutritionnels et thérapeutiques. Paris, Edition Masson, 1987, 211-212.
- [2] - J.C. FAVIER. Banque de données sur la composition des aliments. *Rev. Fr. Diét.*, 1984, 111, 4, 3-10.
- [3] - A.A. PAUL, D.A.T. SOUTHGATE. *Mc Cance and Widdowson's the composition of foods*, 4<sup>th</sup> ed, London : Her Majesty's Stationery Office, 1978, 418p.
- [4] - S.W SOUCI, W. FACHMANN, H. KRAUT. *La composition des aliments. Tableau des valeurs nutritives 1981-1982*, Wissenschaftliche Verlags Gesellschaft mbH, Stuttgart, 1352 p.
- [5] - J.P. MARESCHI, F. COUSIN. Composition en vitamines de soixante-sept aliments courants. *Med. Nutr.*, 1984, 1, 39-46.
- [6] - J. LÉBOULANGER. *Les vitamines : Biochimie, Mode d'Action, Intérêt Thérapeutique*. Produits ROCHE ed, 194 p.
- [7] - ANONYME. *Recommended Dietary Allowances*. 9<sup>o</sup> ed. Washington : National Academy of Sciences, 1980, 186 p.
- [8] - R. PASSMORE, et al. *Manuel sur les besoins nutritionnels de l'homme. Etudes de nutrition de la F.A.O. n°28, O.M.S. série de Monographies n°61, F.A.O. et O.M.S. publ. F.A.O., Rome, 1974, 64 p.*
- [9] - H. DUPIN. *Apports nutritionnels conseillés pour la population française*. C.N.R.S. - C.N.E.R.N.A., Technique et documentation, Paris, 1992, 146 p.
- [10] - B. WATIER, J.F. DUHAMEL, B. SALLE, J.L. BRESSON. Vitamines et nutrition, Aspects pratiques, *In* : Les vitamines : aspects métaboliques, génétiques, nutritionnels et thérapeutiques. A. MUNNICH, H. OGIER, J.M. SAUDUBRAY. Paris : éditions Masson, 1987, 355-367.
- [11] - A. MUNNICH, H. OGIER, J.M. SAUDUBRAY. *Les vitamines : aspects métaboliques, génétiques, nutritionnels et thérapeutiques*. Paris : éditions Masson, 1987, 428 p.
- [12] - H. MEHANSHO, D.D.BUSS, M.W. HAMM, L.M. HENDERSON. Transport and metabolism of PN in rat liver. *Biochem. Biophys. Acta*, 1980, 631, 112-113.
- [13] - S. JOHANSON, S. LINSTEDT, H.G. TISELIUS. Metabolic interconversion of different forms of vitamin B<sub>6</sub>. *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 6040-6046.
- [14] - H. MEHANSHO, L.M. HENDERSON. Transport and accumulation of PN and PL by erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 1980, 255, 11 901-11907.
- [15] - C.S. ROSE, et al. Age differences in vitamin B<sub>6</sub> status of 617 men. *Amer. J. Clin. Nutr.* 1976, 29, 847-853.

- [16] - J.P. BONJOUR. Vitamins and alcoholism III. Vitamin B<sub>6</sub>. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 1980, 50, 215-230.
- [17] - L. LUMENG, T.K. LI. Vitamin B<sub>6</sub> metabolism in chronic alcohol abuse. *J. Clin. Invest.*, 1974, 53, 693-704.
- [18] - B.R. STANDAL, S.M. KAO CHEN, G.Y. YANG, D.F.B. CHAP. Early changes in PN status of patients receiving isoniazid therapy. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 1974, 27, 479-484.
- [19] - L.T. MILLER, E.M. BENSON, M.A. EDWARDS, J. YOUNG. Vitamin B<sub>6</sub> metabolism in women using oral contraceptives. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 1974, 27, 797-805.
- [20] - K.H. KRAUSE, P. BERLIT, J.P. BONJOUR, H. SCHMIDT-GAYK, B. SCHELLENBERG, J. GILLEN. Vitamin status in patients on chronic anticonvulsant therapy. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 1982, 52, 375-385.
- [21] - L.J. MACHLIN. Handbook of Vitamins. Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects. Marcel Dekker, Inc., New-York et Bâle, 1984.
- [22] - M.B. RICHARDS. *Brit. Med. J.*, 1944, 55, 139.
- [23] - H.E. SAUBERLICH. VII: Biosynthesis of vitamin B<sub>6</sub>. *In: The vitamins: Chemistry, Physiology, Pathology, Assay.* SEBRELL et HARRIS, New-York : Academic Press, 2<sup>ème</sup> éd., 1968, II, 31-80.
- [24] - GOODMAN and GILMAN'S : The pharmacological Basis of Therapeutics. New-York : Macmillan Publishing Co., Inc., 6<sup>ème</sup> éd., 1980.
- [25] - M.W. CARNEY, A. RAVINDRAN, M.G. RINSLER, D.G. WILLIAMS. Thiamin, riboflavin and pyridoxin deficiency in psychiatric patients. *Brit. J. Psychiatry*, 1982, 141, 271-272.
- [26] - C.C. PFEIFFER, P. GONTHIER. Equilibre psychobiologique et oligo aliments. Paris : Editions Equilibres, 1988.
- [27] - M.J. KLEINER, S.S. TATE, J.F. SULLIVAN, J. CHAMI. Vitamin B<sub>6</sub> Deficiency in maintenance dialysis patients : metabolic effects of repletion. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 1980, 33, 1612-1619.
- [28] - S.C. VIR, A.H. LOVE, W. THOMPSON. Vitamin B<sub>6</sub> status during pregnancy. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 1980, 50, 403-411.
- [29] - K. FOLKERS et al. Biochemical evidence for a deficiency of vitamin B<sub>6</sub> in subjects reacting to sodium L. Glutamate by the Chinese restaurant syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1981, 100, 972-977.
- [30] - HASSAN Y. ABOUL-ENEIN, MOHAMMED A. LOUFTY. Pyridoxin hydrochloride, Analytical Profiles of Drug Substances, 13, American Pharmaceutical association, 1984, 447-486.

- [31] - J.C. GUILLAND, B. LEQUEU. Les vitamines : du nutriment au médicament. Paris: Editions Médicales Internationales, 1992, 337-338.
- [32] - K. DALTON, M.J. DALTON. Characteristics of pyridoxine overdose neuropathy syndrome. *Acta. Neurol. Scand.*, 1987, 76, 8-11.
- [33] - G. KRINKE, H.H. SCHAUMBURG, P.S. SPENCER, J. SUTER, O. THOMANN, R. HESS. Pyridoxine megavitaminosis produces degeneration of peripheral sensory neurons (sensory neuropathy) in the dog. *Neurotoxicology*, 1980, 2, 13-24.
- [34] - W.E. PHILIPS, J.H. MILLS, S.M. CHARBONNEAU et al. Sub-acute toxicity of pyridoxine hydrochloride in the beagle dog. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1978, 44, 323-333.
- [35] - H. SCHAUMBURG, J. KAPLAN, A. WINDEBANK et Al. Sensory neuropathy from pyridoxine abuse. A new megavitamin syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 1983, 309, 445-448.
- [36] - J.C. GUILLAND, A. LEMOINE. Vitamine B<sub>6</sub>. Editions techniques. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, 1995, 25-202-E-10, 6p.
- [37] - Ph. BERTIN, R. TREVES. Vitamines B dans les maladies rhumatologiques : revue critique. *Thérapie*, 1995, 50, 53-58.
- [38] - S.R. SNODGRASS. Vitamin neurotoxicity. *Mol. Neurobiol.*, 1992, 6, 41-73.

**CHAPITRE III**

**INTÉRÊT D'UN DOSAGE  
DE LA VITAMINE B<sub>6</sub>  
CHEZ L'HOMME**

### III.1- LES DIVERS ETATS PHYSIOPATHOLOGIQUES CONCERNÉS

#### III.1.a - Pyridoxine et grossesse

Les besoins en vitamine B<sub>6</sub> durant la grossesse méritent une attention spéciale. Comme il a été vu au chapitre II, cette vitamine joue un rôle essentiel dans le métabolisme des acides aminés aromatiques (Trp et Tyr) et dans la synthèse des neurotransmetteurs (sérotonine et dopamine); ces acides aminés en sont les précurseurs. Le placenta contient une forte concentration de pyridoxine si l'on en juge d'après la grande quantité contenue dans le cordon ombilical [1-6]; elle est au moins deux fois supérieure à celle que l'on retrouve dans le système nerveux. La vitamine B<sub>6</sub> joue également un rôle dans la synthèse de l'ADN et dans la formation des cérébrosides au cours de la myélinisation.

Lors d'études visant à régler le problème des nausées matinales au cours des trois premiers mois de la grossesse, on a observé des effets positifs en administrant un supplément de vitamine B<sub>6</sub>. Des études assez récentes ayant inclus des paramètres biochimiques ont fait ressortir la possibilité d'une carence en pyridoxine chez les femmes enceintes. Des anomalies du métabolisme du Trp surviennent lorsque la pyridoxine ne joue pas normalement son rôle [2-10].

Ces premières études qui ont permis de déceler la présence d'une carence relative en vitamine B<sub>6</sub> chez la femme enceinte consistaient à doser, après une épreuve de surcharge au tryptophane (50 mg/kg), la concentration urinaire des métabolites du Trp par la voie de la cinurénine, tel que l'acide xanthurénique (figure II.10). Il existe aujourd'hui plusieurs autres types d'études beaucoup plus précises, comme les dosages:

- 1) de l'excrétion urinaire de l'acide 4-pyridoxique, principal métabolite urinaire de la PN,
- 2) de la concentration plasmatique de la vitamine B<sub>6</sub> totale, et particulièrement du PLP qui en est la forme active,
- 3) de l'activité enzymatique des transaminases pyruvique (GPT) et oxaloacétique (GOT) qui ont pour cofacteur le PLP, indispensable à leur fonctionnement.

Les femmes enceintes ont une plus grande excrétion urinaire d'acide xanthurénique et l'activité enzymatique de la GPT diminue significativement au cours de la grossesse, particulièrement au cours du troisième trimestre [11,12]. Les changements hormonaux ou métaboliques de la grossesse peuvent en être la cause en modifiant les taux de PLP. Ainsi, la réduction de la concentration du PLP peut affecter l'activité enzymatique des transaminases de 2 façons :

- directement, en réduisant la disponibilité du groupement prosthétique (c'est-à-dire du PLP).

- indirectement, en réduisant le taux de synthèse des enzymes, le PLP étant impliqué dans la synthèse des protéines.

La concentration du PLP dans le plasma peut diminuer par suite d'une induction hormonale, d'une séquestration par le fœtus, et d'un apport alimentaire inadéquat. L'étude de VIR et collaborateurs [12], réalisée à partir d'un échantillon de 60 femmes enceintes, a indiqué que seulement 5,9% d'entre elles avaient un apport en vitamine B<sub>6</sub> satisfaisant la norme recommandée. D'après CLEARY et collaborateurs [6], les femmes peuvent présenter des anomalies métaboliques de la vitamine B<sub>6</sub> même avec des apports alimentaires jugés adéquats. Dans cette étude, les taux plasmatiques du PLP d'un groupe témoin de 58 femmes qui n'étaient pas enceintes ont été comparés à ceux de deux groupes de femmes enceintes recevant ou non un supplément de vitamine B<sub>6</sub>, soit un régime fournissant respectivement 10 mg et 2 mg de PN/jour. Aucun sujet du groupe témoin ne présenta d'anomalies biochimiques; respectivement 4 et 10 sujets chez les deux groupes de femmes enceintes ont affiché une concentration plasmatique inférieure à la concentration considérée comme normale. Inversement, la teneur en PL augmente, laissant la teneur en B<sub>6</sub> totale (PLP + PL) inchangée [42].

Il est difficile d'interpréter la signification des altérations métaboliques relatives à la PN. Les femmes enceintes sont-elles effectivement dans un état nutritionnel inadéquat en ce qui a trait à cette vitamine, ou sont-elles tout simplement dans une phase physiologique normale d'ajustement? Cette question demeure sans réponse [13]. Pourtant, elle est d'une importance cruciale si l'on veut définir les besoins en vitamine B<sub>6</sub> durant la grossesse. Du point de vue physiologique, un apport de 2,6 mg suffirait à satisfaire les besoins nutritionnels de la mère et à assurer un transfert placentaire adéquat [14]. Cette quantité pourrait également suffire à maintenir normal le métabolisme du Trp durant la grossesse. En effet, en supposant que l'excrétion urinaire de l'acide pyridoxique chez la femme enceinte est approximativement de 1,5 mg et qu'elle représente 60% de l'apport alimentaire en PN, les besoins en cette vitamine peuvent être évalués à 2,5 mg [11]. L'hypothèse selon laquelle les besoins en vitamine B<sub>6</sub> sont augmentés durant la grossesse repose sur le fait que les œstrogènes, sécrétés en plus grande quantité, accélèrent le catabolisme du Trp ; cette augmentation peut aussi s'expliquer par le fait que les besoins en protéines sont plus grands. Selon BAPURAO et collaborateurs [11], un apport additionnel de 2,5 mg de PN par jour est nécessaire si l'on veut corriger les anomalies du métabolisme du Trp chez les femmes enceintes. L'excédent recommandé, au Canada comme en France, est de 0,5 mg, soit au total **2,5 mg/jour**. Des états carenciels seraient rattachés à l'état général de l'enfant à la naissance, état objectivé par le score d'APGAR [42].

### **III.1.b - Pyridoxine et lactation**

L'allaitement ne semble pas affecter le métabolisme de la PN, cependant, la connaissance des besoins en cette vitamine est fragmentaire. Le besoin inhérent à l'activité métabolique des acides aminés en vue de la synthèse des protéines du lait maternel n'a jamais été déterminé. Au Canada, l'apport quotidien de vitamine B<sub>6</sub> recommandé pour les femmes allaitantes, en général, est de 0,015 mg par gramme de protéines. En supposant que les besoins quotidiens en protéines chez ces femmes sont augmentés de 20g environ [13], l'excédent recommandé pour la PN serait de 0,3 mg, soit 2,3 mg/jour au total. Les nutritionnistes américains recommandent à la femme allaitante un apport total de 2,5 mg/jour; en France, on retient également la valeur de 2,5 mg/jour, la supplémentation des femmes allaitantes provoquant une augmentation favorable des teneurs du lait en vitamine B<sub>6</sub> [43].

### **III.1.c - La vitamine B<sub>6</sub> en cardiologie**

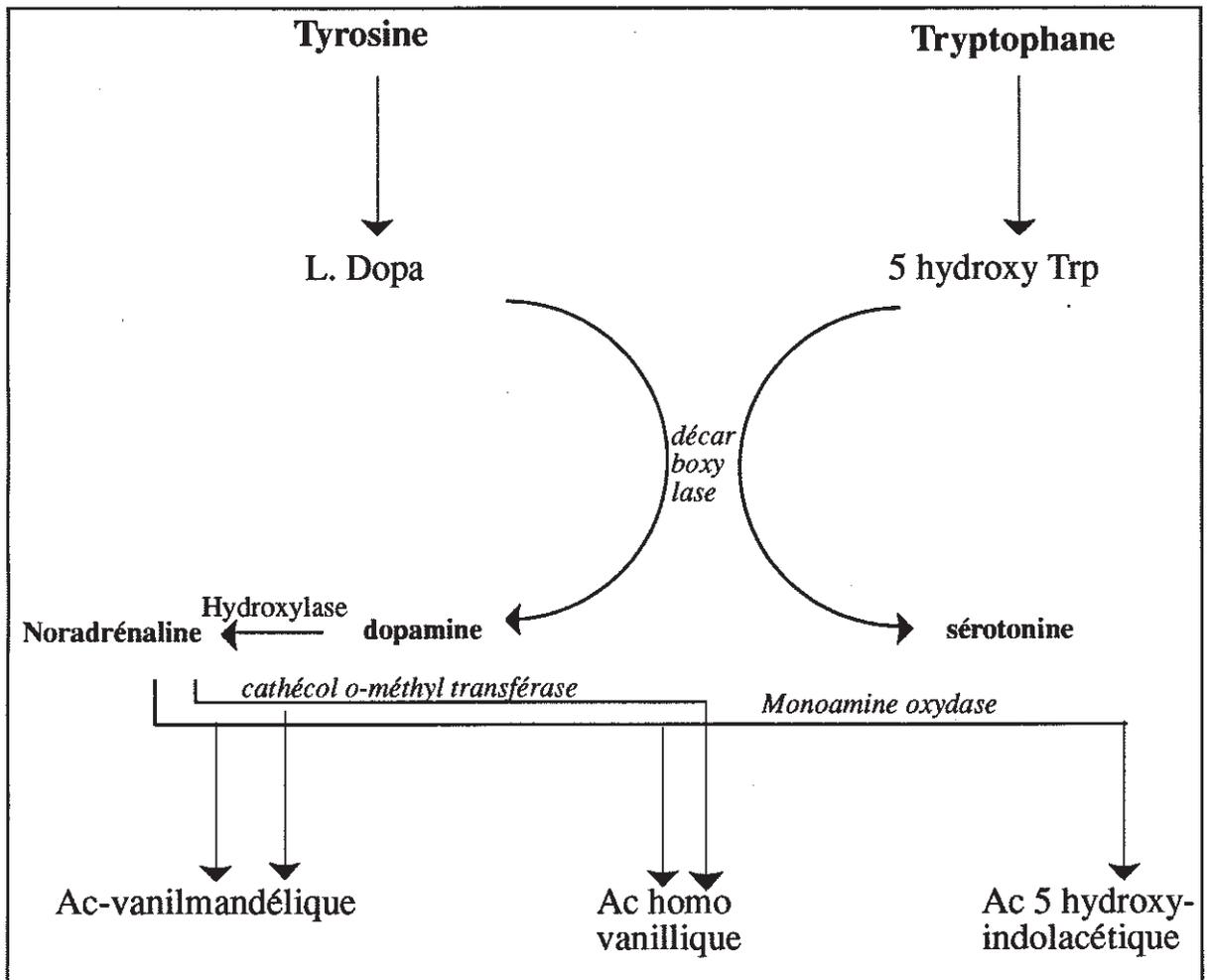
La relation entre les vitamines et les lipides sériques (donc les maladies cardiovasculaires) a été plus approfondie chez l'animal que chez l'homme. Cependant, bien que la vitamine B<sub>6</sub> ait ici un rôle bien moindre que celui de la niacine dans ce domaine, FAILEY [15], vers la fin des années 1950, avait suggéré qu'un supplément en PN pouvait réduire le taux de cholestérol sérique chez l'homme. Williams et ses collaborateurs [16] ont remarqué que des rats ayant une carence en vitamine B<sub>6</sub>, présentaient des anomalies du métabolisme du cholestérol.

### **III.1.d - La vitamine B<sub>6</sub> en neuropsychiatrie**

#### **1° - Rôle du Trp et de la Tyr**

Plusieurs acides aminés ont été identifiés dans les mécanismes de la transmission nerveuse à titre de neurotransmetteurs : il s'agit, entre autres, du Trp et de la Tyr, responsables de la synthèse de 2 groupes de neuro-transmetteurs : les indolamines et les catécholamines. Ces amines biogènes jouent un rôle important dans le cerveau, tant sur le plan de l'activité mentale que sur le plan de l'activité neurologique.

Leur métabolisme est décrit figure **III.1**



**Figure III.1** : Relation métabolique entre les catécholamines et les indolamines.

Mentionnons ici que la décarboxylation de ces deux AA aromatiques s'effectue au moyen de la vitamine B<sub>6</sub>.

Ainsi le rôle de ces trois neuromédiateurs (5-HT, DA et NA) dans les activités psycho-affectives, mentales et neurologiques est étroitement lié, tant sur le plan anatomique que sur le plan biochimique. A une augmentation de la concentration en 5-HT correspond une diminution de la DA et vice-versa. Les états psychoaffectifs sont donc étroitement liés à des anomalies du métabolisme des amines biogènes.

## 2° - Importance de la pyridoxine pour le cerveau

Il faut d'abord savoir que le PLP et la PM se trouvent en plus forte concentration dans les tissus nerveux que la PN ou le PL. Deux décarboxylases PLP dépendantes jouent un rôle important dans l'intégrité fonctionnelle des neurones :

1 - *La décarboxylase de l'acide glutamique* est responsable de la synthèse du GABA à partir de l'acide glutamique. Un déséquilibre dans le rapport acide glutamique/GABA peut expliquer les convulsions chez un enfant présentant une carence en PN [17] (paragraphe II.3.b.).

2 - *La décarboxylase des AA aromatiques*, localisée dans les terminaisons nerveuses, participe à la synthèse de la sérotonine et de la dopamine, 2 neuromédiateurs impliqués dans plusieurs états physiologiques et comportementaux pouvant affecter le fonctionnement de l'organisme, et dans plusieurs pathologies neurologiques et psychiatriques. Ainsi il a été montré [18] que l'administration de Pyridoxine par voie injectable améliorait nettement l'état de certains patients souffrant de maladie de Parkinson : réduction de la faiblesse, de la rigidité musculaire et des difficultés à marcher. D'autres patients n'ont pas bénéficié de ces améliorations [19].

D'autre part, la non supplémentation en PN des préparations de lait pour nourrissons provoque des signes de convulsion et d'hyper irritabilité, ainsi que des anomalies de l'électroencéphalogramme et une augmentation modérée des protéines dans le liquide céphalorachidien [20].

Enfin l'explication de ces mécanismes neuronaux a permis, au cours des dernières décennies, de mieux comprendre les symptômes neurologiques associés à la prise de médicaments chez l'homme : antiparkinsonniens, antituberculeux, antihypertenseurs. La supplémentation en vitamine B<sub>6</sub> réduit souvent leurs effets secondaires, d'où la recommandation de prescrire un supplément de vitamine B<sub>6</sub> à une dose de 150 à 300 mg [21].

Ainsi, le rôle complexe de la PN dans le système nerveux central est mal défini encore aujourd'hui et de nombreuses recherches se poursuivent afin d'élucider toutes ses facettes dans le fonctionnement des neurones.

#### Conclusion sur l'intérêt du dosage de la vitamine B<sub>6</sub> dans certains états physiopathologiques

En étudiant certains états physiologiques (grossesse, allaitement) ou pathologiques (hyperlipidémie, troubles neurologiques), on a observé un certain nombre de symptômes qui pouvaient être en lien avec des anomalies de l'apport en B<sub>6</sub> ou de son métabolisme. Et c'est en dosant cette B<sub>6</sub> dans divers milieux biologiques, que les scientifiques ont pu mettre au jour les liens réels qui pouvaient exister entre les symptômes décrits et cette vitamine.

Grâce à l'évolution et l'amélioration des techniques d'analyses, ce sont de plus en plus de relations qui sont mises en évidence entre le métabolisme de la PN et certains mécanismes physiopathologiques.

L'intérêt aujourd'hui serait d'approfondir les rôles de la vitamine B<sub>6</sub>, et de rendre encore plus exacts les apports recommandés. Pour cela il faudrait, entre autre, affiner et améliorer la technicité des méthodes d'analyse et de dosage aujourd'hui disponibles.

### III.2 - PYRIDOXINE ET INTERACTIONS MEDICAMENTEUSES

En dépit de la panoplie d'aliments dont ils disposent, les habitants des pays industrialisés ne sont pas tous exempts de carences nutritionnelles ; les mauvaises habitudes alimentaires, les abus de l'industrie alimentaire ou plus récemment les médicaments, sont des facteurs importants dans l'apparition de maladies iatrogéniques. Nous savons maintenant que plusieurs médicaments peuvent contribuer à créer ou à aggraver une carence nutritionnelle par des mécanismes réciproques d'influence.

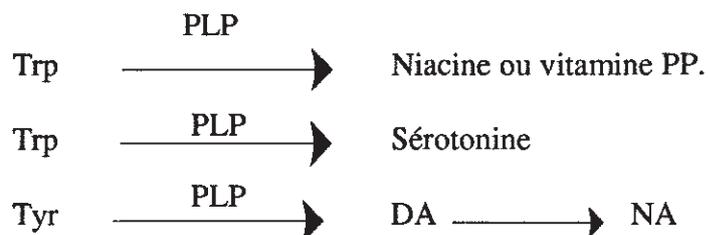
#### III.2.a - La place du métabolisme des vitamines

La vitamine B<sub>6</sub> est l'un des nutriments les plus sensibles aux interactions médicamenteuses, aux côtés de l'acide folique (vitamine B<sub>9</sub>) et de la vitamine B<sub>12</sub>.

Carence	Symptômes
Vitamine B <sub>6</sub>	Problèmes dermatologiques Anémie hypochrome Convulsions Dépression et/ou névropathies Pellagre.

**Tableau III.1 :** Principaux symptômes d'une carence en vitamine B<sub>6</sub>.

Une déficience de la forme active de la vitamine B<sub>6</sub> (PLP) peut affecter le métabolisme de acides aminés aromatiques et, par ricochet, celui des neurotransmetteurs :



Carence	Médicaments et/ou Classe de médicaments
Vitamine B <sub>6</sub>	Contraceptifs oraux Hydralazine Isoniazide (antituberculeux) L. Dopa Pénicillamine.

**Tableau III.2 :** Principaux médicaments pouvant être responsables d'une carence vitaminique B<sub>6</sub>.

### III.2. b - Influence des médicaments sur l'état nutritionnel

Les médicaments, en raison de leurs effets secondaires, influencent l'état nutritionnel, surtout s'ils sont utilisés régulièrement.

Bon nombre de médicaments de structure chimique et d'action pharmacologique différentes peuvent interférer avec le métabolisme de la PN (tableau III. 2). On peut les classer selon leur type d'antagonisme avec cette vitamine (figure III.2):

- 1 - Les substances chimiques **analogues à la vitamine B<sub>6</sub>**: par exemple la désoxypyridoxine (DOP). Ce sont aussi des substrats pour l'enzyme (*kinase*) responsable de la formation du PLP actif.
- 2 - Les substances chimiques **qui inhibent l'action de la kinase**, empêchant ainsi la formation du coenzyme.
- 3 - Les substances chimiques **analogues au PLP** qui entrent directement en **compétition** avec ce cofacteur dans plusieurs réactions métaboliques.
- 4 - Les substances chimiques qui **forment un complexe avec le PLP** et le rendent **inactif**, comme les hydrazides et la pénicillamine.

La L. Dopa (agent antiparkinsonien) entre aussi dans cette catégorie [22].

- 5 - Les **contraceptifs oraux** qui semblent appartenir à une section encore distincte.

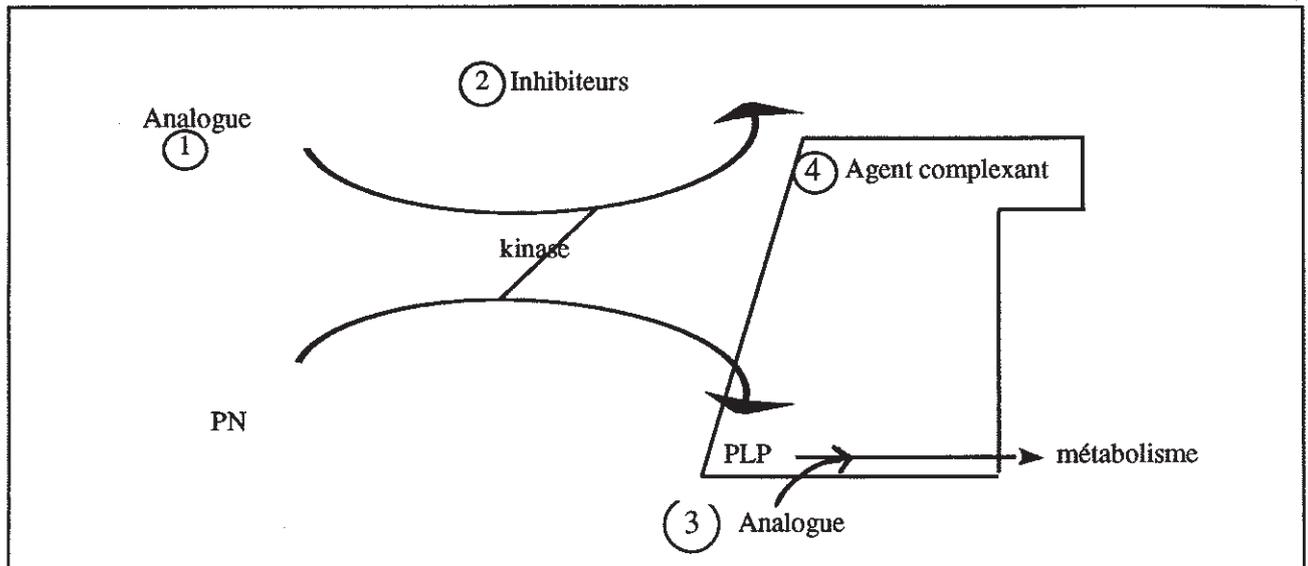


Figure III.2 : Les différents types d'antagonisme avec la vitamine B<sub>6</sub>.

### III.2. c- Substances interagissant avec la vitamine B<sub>6</sub>

#### 1° - La désoxypyridoxine (DOP) :

Elle s'est souvent montrée responsable d'une réduction du taux de vitamine B<sub>6</sub> active, ainsi que d'une altération de l'épiderme et de névropathies : paresthésies et sensation de brûlures aux pieds.

#### 2° - L'isoniazide (INH) :

Des névropathies similaires à celles observées lors de l'administration de DOP apparaissent lors des traitements par l'INH. Un supplément de 50 mg/jour en vitamine B<sub>6</sub> favorise la rémission des symptômes, alors que l'apport vitaminique alimentaire ne suffit pas à y parvenir.

#### 3° - La pénicillamine :

En 1969, Joffre [23] a remarqué que l'administration de doses thérapeutiques de D. pénicillamine à des humains perturbait les fonctions métaboliques de la vitamine B<sub>6</sub>, à en juger d'après l'augmentation de l'excrétion urinaire de l'acide xanthurénique et de la cinurénine après une épreuve de surcharge en Trp.

L'administration d'un supplément de vitamine B<sub>6</sub> (50 mg/jour) peut empêcher l'apparition des symptômes de carences chez les patients traités à la pénicillamine[24].

#### 4° - La L. Dopa :

La L. Dopa, utilisée pour traiter la maladie de Parkinson, peut traverser la barrière hématoencéphalique du cerveau où elle est décarboxylée en dopamine, précurseur déficient des catécholamines. Cette décarboxylation de la L. Dopa est activée par le PLP.

L'administration quotidienne de 50 mg de PN peut neutraliser les effets thérapeutiques de la L-Dopa en accélérant sa décarboxylation périphérique, de sorte que la quantité se rendant au cerveau est diminuée, tandis que les effets indésirables de la Dopamine périphérique augmentent.

C'est pourquoi on suggérait autrefois de restreindre l'apport alimentaire en pyridoxine chez les patients parkinsoniens traités par L-Dopa ; cette mesure diététique n'est plus justifiée depuis que l'on utilise des inhibiteurs de la décarboxylase périphérique (bensérazide, carbidopa) en association à la L-Dopa. Par ailleurs, le régime pauvre en PN n'est pas conseillé en raison des risques de carence rattachés à la L-Dopa. En effet, ce médicament peut interférer à son tour sur le métabolisme de la vitamine B<sub>6</sub>, non seulement en se combinant au PLP (d'où son appartenance au type 4 d'antagonisme), mais aussi en inhibant l'enzyme responsable de la conversion du PL en PLP (appartenance au type 1 également) [25].

#### 5° - Les contraceptifs oraux :

Les stéroïdes anovulants sont employés comme contraceptifs depuis le début des années soixante.

Outre leur effet neuro-endocrinien désirable et incontestable, les contraceptifs oraux ont une influence négative sur un bon nombre de métabolismes, notamment lipidique et glucidique. Ils peuvent également altérer les concentrations sériques des vitamines et minéraux, et modifier l'activité de certaines enzymes.

En ce qui concerne la pyridoxine, l'hypothèse selon laquelle les stéroïdes anovulants influencent les besoins en vitamine B<sub>6</sub> provient du fait qu'ils augmentent l'excrétion urinaire des métabolites du Trp, cette anomalie étant corrigée par l'administration d'un supplément de PN [26]. Le mécanisme précis par lequel les oestrogènes de synthèse altèrent ce métabolisme n'est pas connu avec certitude, bien que l'implication de la vitamine B<sub>6</sub> soit certaine [27].

Le choix de la méthode d'analyse biochimique pour évaluer l'état nutritionnel est déterminant. La mesure de l'acide xanthurénique dans l'urine ne permet pas de conclure que les contraceptifs oraux causent une carence en PN; les techniques utilisées en enzymologie, plus précises et plus spécifiques, ne parviennent pas toujours à prouver l'existence d'une relation entre les contraceptifs oraux et cette vitamine. Ces méthodes consistent principalement en l'analyse sanguine des aminotransférases (aspartate et alanine aminotransférases). L'acide 4-pyridoxique et le phosphate de pyridoxal sont considérés comme de bons indicateurs du métabolisme de la pyridoxine : le dosage sanguin de ces 2 vitamines au moins sera donc le seul recommandé.

Plusieurs chercheurs ont observé un taux plasmatique réduit du PLP chez les femmes qui utilisent des contraceptifs oraux [28-31]; cette observation n'a pu être vérifiée dans d'autres études, bien que l'état nutritionnel des sujets ait été évalué par diverses méthodes appropriées [32-35]. Ainsi, l'étude de BROWN et collaborateurs [32] consistait à doser l'acide 4-pyridoxique dans l'urine, le PLP plasmatique, et les niveaux érythrocytaires des transaminases.

L'impact des contraceptifs oraux sur le métabolisme de la vitamine B<sub>6</sub> est complexe (figure II.10). D'une part, en stimulant la *tryptophane pyrolase*, les hormones de synthèse (composante oestrogénique) augmentent le catabolisme du tryptophane par le biais de la cinurénine, et, en conséquence, accroissent la consommation du coenzyme actif PLP [36]. Si la quantité de vitamine B<sub>6</sub> est suffisante, une partie des dérivés du tryptophane, dont la cinurénine, est transformée en acide xanthurénique. Normalement, la cinurénine est transformée en acide anthranilique, un des précurseurs dans la synthèse de la niacine; l'enzyme qui catalyse cette réaction, la cinuréninase, requiert le PLP comme cofacteur. D'autre part, il y a compétition entre les oestrogènes et le PLP sur le site actif de l'enzyme. De plus, la sécrétion des glucocorticoïdes dans le cortex surrénalien est stimulée [27]. Une concentration élevée de cortisol dans le plasma implique une synthèse accrue d'apoenzymes (nature protéique) qui ne pourront être liées à leur groupement prosthétique (le PLP), à moins d'un apport alimentaire plus élevé en pyridoxine.

En 1969, PRICE et TOSELAND [37] ont suggéré d'administrer de façon systématique un supplément de vitamine B<sub>6</sub> aux utilisatrices de contraceptifs oraux. L'administration d'une dose quotidienne de 20 mg suffit à corriger les anomalies susmentionnées du métabolisme du tryptophane [26].

WISTON [38] fut le premier à proposer une telle mesure pour traiter les symptômes dépressifs associés à la prise de contraceptifs oraux.

ADAMS et collaborateurs [39] ont étudié un groupe de 22 femmes présentant ce syndrome. Seulement la moitié de l'échantillon présentait une carence relative en vitamine B<sub>6</sub> d'après la mesure des métabolites urinaires du tryptophane et de la pyridoxine, et d'après l'activité enzymatique des aminotransférases dans les érythrocytes. L'administration thérapeutiques d'un supplément de vitamine B<sub>6</sub> à raison de 40 mg/jour pendant 1 mois a eu des effets bénéfiques sur le caractère des sujets, à en juger selon les résultats d'un test psychométrique.

Ceci fut confirmé ultérieurement par ADAMS et collaborateurs [40] à partir d'un nombre plus grand de sujets.

Bien que les travaux de recherche ne peuvent aujourd'hui constituer une preuve suffisante qu'un lien existe entre la vitamine B<sub>6</sub> et les troubles psychoaffectifs, dans certains pays, la pilule anticonceptionnelle est enrichie en PN.

Il a été démontré que des doses pharmacologiques de vitamines hydrosolubles pouvaient réduire la 1/2 vie de certains médicaments : l'effet thérapeutique escompté peut alors être réduit. Inversement, des effets bénéfiques peuvent être rattachés aux doses pharmacologiques de vitamines, en l'occurrence pour la vitamine B<sub>6</sub> en compagnie d'un agent antituberculeux ou d'un contraceptif oral. Les symptômes neurologiques associés à l'INH (sommolence, convulsion, dépression...) disparaissent avec un supplément en pyridoxine, lequel permet aussi de normaliser l'excrétion urinaire des métabolites du tryptophane chez les femmes qui prennent des contraceptifs oraux et même d'améliorer leur comportement psychoaffectif dans certains cas.

## CONCLUSION

L'intérêt d'une exploration du statut vitaminique B<sub>6</sub> passe par la recherche et la connaissance des rôles de cette vitamine dans certaines situations physiopathologiques. Un dosage de la vitamine B<sub>6</sub> s'avère nécessaire dès lors que des signes cliniques de carence apparaissent, ou qu'une ou plusieurs conditions sont réunies pour faire apparaître une carence.

Dans le cas de la grossesse, il est intéressant d'utiliser une méthode séparative, telle qu'une méthode chromatographique, permettant le dosage séparé du PLP et du PL dans le plasma, puisque les taux de ces 2 vitamines semblent varier dans des sens contraires [42].

D'autre part, un tel dosage permettrait, par des études plus approfondies, d'élucider la cause de l'inadéquation de l'état nutritionnel des femmes en début de grossesse [12], de déterminer avec une plus grande précision les apports recommandés dans ce cas, et de supplémenter éventuellement.

Il serait également intéressant d'établir la relation existant entre le besoin en vitamine B<sub>6</sub> et la synthèse des protéines du lait maternel chez une femme allaitante, cette étude reposant forcément sur des dosages vitaminiques et protéiques.

L'étude des anomalies du métabolisme du cholestérol chez des sujets carencés en vitamine B<sub>6</sub> pourrait compléter les recherches déjà effectuées chez l'animal et permettrait de reconnaître le bien-fondé du rôle bénéfique de la PN sur le taux de cholestérol chez l'homme [15, 16].

Quant à l'impact des médicaments sur les besoins nutritionnels, il est à peu près ignoré, même si leur usage est très répandu, comme c'est le cas pour les contraceptifs oraux. Le dosage de la vitamine B<sub>6</sub> dans les fluides biologiques apparaît comme indispensable à l'exploration de l'incidence des traitements médicamenteux et, par la suite, à la prévention d'interactions éventuelles, comme cela fut le cas pour les sujets parkinsoniens traités par L.Dopa, et à qui on conseillait de restreindre les apports alimentaires en pyridoxine.

Enfin, comme nous l'avons vu au chapitre II, l'hypervitaminose B<sub>6</sub> semble aussi ennuyeuse voire dangereuse pour l'homme que sa carence, ce qui justifierait le dosage systématique de la vitamine B<sub>6</sub> chez toute personne supplémentée artificiellement, et en particulier en milieu hospitalier.

### Références bibliographiques du chapitre III

- [1] - M. WACHSTEIN., J.D. KELLNER , J.M. ORTIZ . Pyridoxal phosphate in plasma and leucocytes of normal and pregnant subjects following B<sub>6</sub> load tests, *Proceedings of the society for Experimental Biology and Medicine*, 1960, 103, 350.
  
- [2] - D.B. COURSIN , V.C.BROWN. Changes in vitamin B<sub>6</sub> during pregnancy, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1961, 82, 1307.
  
- [3] - S.F. CONTRACTOR , B. SHANE. Blood and urine levels of vitamine B<sub>6</sub> in the mother and foetus before and after loading of the mother with B<sub>6</sub>, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1970, 107, 635.
  
- [4] - M. BRIN . Abnormal tryptophan metabolism in pregnancy and with contraceptive pill. II. Relative levels of vitamin B<sub>6</sub> vitamers in cord and in mother's blood. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1971, 24, 704.
  
- [5] - A. HAMFELT, T. TUVEMO. Pyridoxal phosphate and folic acid concentration in blood erythrocyte aspartate aminotransferase activity during pregnancy, *Clin. Chim. Acta*, 1972, 41, 287.
  
- [6] - R.E. CLEARY, L. LUMENG, T.K. LI. Maternal and foetal plasma levels of pyridoxal phosphate at term : adequacy of vitamin B<sub>6</sub> supplementation during pregnancy, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1975, 121, 25.
  
- [7] - R.R. BROWN, J. THORNTON, J.M. PRICE. The effect of vitamin supplementation on the urinary excretion of tryptophan metabolites by pregnant women, *Journal of Clinic Investigation*, 1961, 40, 617.
  
- [8] - M.K. HOR WITT, C.C. KARVEY, C.H. DAHM Jr. Relationship between levels of blood lipids, vitamins C, A and E, serum copper compounds, and urinary excretions of tryptophan metabolites in women taking oral contraceptive therapy, *American Journal of Clinical Nutrition*, 1975, 28, 739.
  
- [9] - B. SHANE, S.F. CONTRACTOR. Assessment of vitamin B<sub>6</sub> status. Studies on pregnant women and oral contraceptive users, *American Journal of Clinical Nutrition*, 1975, 28, 739.
  
- [10] - L. LUMENG, R.E. CLEARY, R. WASNER et collaborateurs. Adequacy of vitamin B<sub>6</sub> supplementation during pregnancy: a prospective study, *American Journal of Clinical Nutrition*, 1976, 29, 1376.
  
- [11] - S. BAPURAO, L. RAMAN, P.G. TULPULE. Biochemical assessment of vitamine B<sub>6</sub> nutritionnal status in pregnant women with orolingual manifestations, *American Journal of Clinical Nutrition*, 1982, 36, 581.
  
- [12] - S.C. VIR, A.H.G. LOVE, W. THOMPSON. Vitamin B<sub>6</sub> status during pregnancy, *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 1980, 50, 403.

- [13] - P. Ph. D. MASSÉ. La Nutrition : l'alliée de la médecine moderne, Montréal : Gaëtan Morin Editeur, 1987.
- [14] - R.M. PITKIN. Assessment of nutritional status of mother, fœtus and new born, *American Journal of Clinical Nutrition*, 1981, 34, 658.
- [15] - R.B. FAILEY. Effect in man of large doses of B<sub>6</sub> on serum cholesterol, *Circulation Research*, 1958, 6, 203.
- [16] - M.A. WILLIAMS, D.J. MC INTOSH, I. HINCENBERGS. Changes in fatty acids composition in liver lipids fractions of B<sub>6</sub> - deficient rats fed cholesterol, *Journal of Nutrition*, 1966, 88, 193.
- [17] - I.R.T. LOTT, T. COULOMBE, R.V. DIPAULO et collaborateurs. Vitamin B<sub>6</sub> dependant seizures; pathology and chemistry findings in brain, *Neurology*, 1978, 28, 47.
- [18] - T.D. SPIES, W.B. BEAN, W.H. ASHE. A note on the use of vitamin B<sub>6</sub> in human nutrition, *Journal of the American Medical Association*, 1939, 112, 2414.
- [19] - W.H. BARKER, H.J. STEIN, M.H. MILLER et collaborateurs. Failure of pyridoxine to modify the Parkinsonian syndrome, *Bulletin of St-John's Hopkins Hospital*, 1941, 69, 266.
- [20] - C.J. MOLONY, H.A. PARMELEE. Convulsions in young infants as a result of B<sub>6</sub> deficiency. *Journal of the American Medical Association*, 1954, 154, 405.
- [21] - P.M. DREYFUS, Neurological diseases, Nutritional Support of Medical Practice. H.A. Schneider, C.E. Anderson et D.B. Coursin ed., Harper & Row, Hagerstown, 1977.
- [22] - D.F. EVERED. L-Dopa as a vitamin B<sub>6</sub> antagonist, *Lancet*, 1971, 1, 914.
- [23] - I.A. JOFFRE. Antivitamin B<sub>6</sub> effect of D-penicillamine: vitamine B<sub>6</sub> in metabolism of the nervous system., *Annals of New-York Academy of Sciences*, 1969, 166, 57.
- [24] - I. STERNLIEB, I.H. SCHEINBERG. Penicillamin therapy for hepatolenticular degeneration, *Journal of the American Medical Association*, 1964, 189, 748.
- [25] - R.L. GOLDEN, F.S. MORTATI, G.A. SCHROETER. Levodopa, PN and the burning feet syndrome, *Journal of the American Medical Association*, 1970, 216, 628.
- [26] - The vitamin B<sub>6</sub> requirement in oral contraceptive users, *Nutrition Reviews*, 1979, 37, 344.
- [27] - D.P. ROSE. The interactions between vitamin B<sub>6</sub> and hormones, *Vitamins and hormones*, P.L. Munson, E. Diczfalusy, J. Glover et collaborateurs (édit.), Academic Press, New York, 1978.
- [28] - A.R. DOBERENZ, J.P. VAN MILLER, J.R. GREEN et collaborateurs. Vitamin B<sub>6</sub> depletion in women using oral contraceptives as determined by erythrocyte glutamic-pyruvic transaminase activities, *Proceedings of the society of Experimental Biology and Medicine*, 1971, 137, 1100.

- [29] - D.P. ROSE, P.W. ADAMS. Oral contraceptives and tryptophane metabolism: effects of oestrogen in low dose combined with a progestagen and a low dose progestagen (megestrol acetate) given alone, *Journal of Clinical Pathology*, 1972, 25, 252.
- [30] - R.M. SALKELD, K. KNORR, W.F. KORMER. The effect of oral contraceptives on vitamin B<sub>6</sub> status, *Clinica Chimica Acta*, 1973, 49, 195.
- [31] - L. LUMENG, R.E. CLEARY, T.K. LI. Effect of oral contraceptives on the plasma concentration of pyridoxal phosphate, *American Journal of Clinical Nutrition*, 1974, 27, 326.
- [32] - R.R. BROWN, D.P. ROSE, J.E. LEKLEM et collaborateurs. Urinary 4-pyridoxic acid, plasma PLP, and erythrocyte amino transferase levels in oral contraceptive users receiving controlled intakes of vitamin B<sub>6</sub>, *American Journal of Clinical Nutrition*, 1975, 28, 10.
- [33] - E.M. WIEN. Vitamin B<sub>6</sub> status of Nigerian women using various methods of contraception, *American Journal of Clinical Nutrition*, 1978, 31, 1392.
- [34] - L.T. MILLER, M.J. DOW, S.C. KOKKELER. Methionine metabolism and vitamin B<sub>6</sub> status in women using oral contraceptives, *American Journal of Clinical Nutrition*, 1978, 31, 619.
- [35] - S.C. VIR, A.H.G. LOVE. Effect of oral contraceptives on vitamin B<sub>6</sub> nutriture of young women, *International Journal of vitamin and Nutrition Research*, 1979, 50, 29.
- [36] - M. BRIN. Abnormal tryptophan metabolism in pregnancy and with the oral contraceptive pill. I. Specific effects of an oral estrogenic contraceptive steroid on the tryptophan oxygenase and two aminotransferase activities in livers of ovariectomized-adrenalectomized rats, *American Journal of Clinical Nutrition*, 1971, 24, 699.
- [37] - S.A. PRICE, P.A. TOSELAND. Oral contraceptives and depression, *Lancet*, 1969, 2, 158.
- [38] - F. WISTON. Oral contraceptives and depression, *Lancel*, 1969, 2, 377.
- [39] - P.W. ADAMS, D.P. ROSE, J. FOLKARD et collaborateurs. Effect of pyridoxin hydrochloride (vitamin B<sub>6</sub>) upon depression associated with oral contraception, *Lancet*, 1973, 1, 897.
- [40] - P.W. ADAMS, V. WYNN, M. SEED et collaborateurs. Vitamin B<sub>6</sub> depression and oral contraception, *Lancet*, 1974, 2, 516.
- [41] - D.A. ROE. Drug-induced Nutritional Deficiency, *Avi Publishing*, Westport, 1978.
- [42] - J.C. GUILLAND, B. LEQUEU. Les vitamines : du nutriment au médicament. Paris, Éditions médicales Internationales, 1992, 357 p.
- [43] - B.L. NICHOLS et collaborateurs. Nutrition in pregnancy and lactation. *Nutr. Abstr. Rev.*, 1983, 53, 259 - 273.

## **CHAPITRE IV**

### **LES DIFFÉRENTES MÉTHODES D'ANALYSE DE LA VITAMINE B<sub>6</sub>**

Une synthèse des principales méthodes de dosage de la vitamine B<sub>6</sub> a déjà été faite par H.Y.ABOUL-ENEIN et M.A. LOUTFY.[1], mais doit aujourd'hui être complétée, en particulier par les techniques les plus récentes de chromatographie.

## **IV.1. - LES TESTS BIOLOGIQUES**

Pourquoi chercher à évaluer les statuts en vitamine B<sub>6</sub>?

Il faut d'abord savoir que dans la genèse de toute pathologie, les désordres biochimiques précèdent l'expression clinique (figure I.1). L'exploration biologique de l'état nutritionnel vitaminique permettra donc de révéler une précaréance avant que ne survienne la carence clinique.

De plus, l'absence de spécificité de certaines symptomatologies rend indispensable l'utilisation d'une approche biologique de l'état nutritionnel vitaminique.

Les tests biologiques, pour être appliqués à une grande échelle dans le cadre des enquêtes épidémiologiques [3], doivent être:

- réalisables sur un matériel biologique facilement disponible,
- simples,
- sensibles et spécifiques.

En fait, à l'heure actuelle, aucun test ne répond entièrement à un tel «cahier des charges». Il serait souhaitable, dans un premier temps, que les méthodologies mises en oeuvre soient standardisées et puissent faire l'objet d'un contrôle de qualité interlaboratoire permettant ainsi de fixer des valeurs «normales» et de rendre aussi moins aléatoires les comparaisons inter-études.

Parmi les différents tests utilisés, on distingue : les tests statiques (les dosages sanguins), les dosages urinaires, les dosages tissulaires, et les tests dynamiques.

### **IV.1.a - Les dosages sanguins : tests statiques**

Les tests statiques qui mettent en oeuvre des dosages sanguins ne représentent le plus souvent qu'un instantané peu représentatif de l'état nutritionnel vitaminique d'un individu. La validité des dosages sanguins comme marqueurs des états carenciels avancés est certaine, alors qu'en général, leur pouvoir diagnostique dans les états précarenciels est faible. L'interprétation des valeurs des paramètres sanguins doit toujours être faite en tenant compte de la «physiologie» de la vitamine étudiée.

#### IV.1.b - Les dosages urinaires

La mesure de l'excrétion urinaire des vitamines et/ou de leurs métabolites peut être intéressante dans l'étude de la balance «entrée/sortie» et constitue, pour un nombre restreint de vitamines, dont la B<sub>6</sub>, un indicateur fiable.

Les dosages urinaires prennent toute leur signification lors des épreuves de surcharge: on peut en effet penser que, chez un individu présentant un état nutritionnel vitaminique «correct», dont les sites de stockage sont saturés, tout apport vitaminique à un taux supérieur à ses besoins sera suivi par une nette augmentation du débit urinaire de la vitamine. A l'opposé, chez un individu déficient, un réapprovisionnement résultera plutôt en une réplétion des réserves de l'organisme sans augmentation du débit urinaire de cette vitamine.

#### IV.1.c - Les dosages tissulaires

L'évaluation directe des réserves peut être considérée comme la méthode de référence. Mais une telle démarche est difficilement envisageable sur une large échelle pour des raisons éthiques et pratiques. Elle est, par contre, très utilisée en épidémiologie post-mortem. Le foie, site privilégié du métabolisme vitaminique (stockage, activation), est accessible par ponction biopsie. Le muscle, deuxième site «aisément explorable» par ponction biopsie, est un compartiment intéressant à explorer dans le cas de la vitamine B<sub>6</sub>. La chromatographie liquide haute performance (CLHP) apparaît actuellement comme l'outil de choix dans ce domaine.

#### IV.1.d - Les tests dynamiques

Les tests dynamiques, qui s'appliquent essentiellement aux vitamines à rôle essentiellement coenzymatique, consistent en la mesure d'une activité enzymatique pour laquelle la vitamine joue le rôle de cofacteur indispensable. Bien que non standardisés, ces tests, du fait de leur bonne praticabilité, sont très utilisés dans l'évaluation de l'état vitaminique de la vitamine B<sub>6</sub>.

Parmi les tests dynamiques, on place également les tests fonctionnels. Ces tests fonctionnels explorent soit une voie métabolique dans laquelle la vitamine est impliquée, soit une phase du métabolisme de la vitamine (principalement la phase d'absorption). Les deux principaux tests fonctionnels existant sont **le test de surcharge en tryptophane** (paragraphe IV.3.a) qui a été, historiquement, le plus utilisé ; et **l'épreuve de charge en méthionine**, qui explore, elle, le métabolisme de la méthionine en cystéine (figure II.7). A priori, toute déficience en pyridoxine se traduit par une homocystinurie lors d'un apport massif en méthionine, ainsi que par une baisse du taux de cystéine.

## IV.2 - EXPLORATION DU STATUT VITAMINIQUE B<sub>6</sub>

Ainsi, deux approches différentes sont généralement envisagées pour évaluer l'état nutritionnel vitaminique B<sub>6</sub> : soit la mise en oeuvre de méthodes directes (dosage de la vitamine B<sub>6</sub> et de ses différentes formes vitaminiques dans le sang et l'urine), soit la mise en oeuvre de méthodes indirectes (épreuve de charge en tryptophane, épreuve de charge en méthionine, et tests enzymatiques).

En résumé :

Vitamine B <sub>6</sub>	Test au tryptophane	*
	Acide 4-pyridoxique urinaire	*(*)
	Pyridoxal phosphate plasmatique	***
	EGOT	** (*)
	Pyridoxal phosphate musculaire	*** (*)

\*(faute de mieux), \*\* (bon), \*\*\* (très bon actuellement), \*\*\*\* (excellent).

**Tableau IV.1 : Méthodes biologiques d'étude du statut vitaminique B<sub>6</sub> en clinique humaine [2].**

Voici la classification que l'on pourrait utiliser pour les différentes techniques analytiques de dosage de la vitamine B<sub>6</sub>, reprise et complétée sur la base des recherches bibliographiques et historiques de H.Y. Aboul-Enein et M.A. Loufty [1] ; certaines ne sont plus du tout utilisées ; d'autres sont en pleine expansion.

### IV.2.a - Analyse titrimétrique

#### 1° - Non-aqueuse

Le chlorhydrate de pyridoxine a été dosé par titrimétrie en phase non-aqueuse, en utilisant de l'acide perchlorique 0,1N, en présence d'acétate mercurique, et de violet cristal comme indicateur. Les publications citées relatives à cette méthode sont antérieures à 1976. [4, 5, 6, 7].

#### 2° - Complexométrique

La vitamine B<sub>6</sub> peut être dosée par complexométrie titrimétrique d'ions Cu<sup>++</sup> libérés en passant la solution à travers une colonne de résine échangeuse de cations. Une solution d'EDTA te disodique (Ethylène Diamine Tétra-acétate disodique) 0,005 ou 0,0025M joue le rôle de solution titrante, en présence d'un indicateur, le murexide [8].

#### 3° - Ampérométrique

Une méthode ampérométrique a été rapportée [9] en vue de déterminer les taux d'hydrochlorures de plusieurs bases organiques, dont la PN.

Le titrage, par des solutions d'AgNO<sub>3</sub> dans le DMSO (diméthyl sulfoxyde), de tels hydrochlorures en solution dans le DMSO, donne une première zone de virage correspondant à la formation d'AgCl<sub>2</sub>, et une 2<sup>ème</sup> zone à la précipitation de AgCl. L'utilisation de la première zone de virage et de 2 électrodes de platine, avec une différence de potentiel de 100mV, permet un titrage jusqu'à des concentrations de 0,2mM de chlorhydrate de pyridoxine.

Système de solvants	Mode de révélation	Rf	Références
1. Acide citrique : eau : n - butanol (4,8 mg : 130 ml: 870 ml).	Lumière UV (fluorescence bleue), spray d'iodoplatinate (blanc), spray de bromocrésol vert (réaction forte).	0,18	[18]
2. Tampon acétate (pH = 4,58 )	Lumière UV (fluorescence bleue).	0,90	[18]
3. Tampon phosphate (pH = 7,4)	Lumière UV (fluorescence bleue).	0,86	[18]
4. Chromatographie bidimensionnelle composée de :			
a) Collidine: lutine (1:1) saturé avec de l'eau :	-	0,88	[19]
b) Butanol: acide acétique : eau (40:10:50)	-	0,63	[19]
5. Alcool amylique : acétone : eau (2:1:2).	-	-	[20]
Alcool isoamylique : pyridine : eau (2:1:2).	-	-	[20]
6. Chromatographie bidimensionnelle composée de :			
a) Propanol: Acide formique à 10% (80:20).	Lumière UV	-	[21]
b) Butanol saturé par l'ammoniaque à 1%.	-	-	[21]

**Tableau IV.2 :** *Chromatographie sur papier de la pyridoxine.*

#### 4° - Polarographique

Il a été décrit [10] une détermination polarographique directe du pyridoxal en présence de phosphate de pyridoxal. La détermination simultanée des deux composés est possible, à condition que les concentrations soient comparables. Cette technique est aussi applicable à la pyridoxine et à certains analogues, dans des solutions tampon. NAKAYA a aussi été cité pour avoir décrit [11] des études polarographiques sur le chlorhydrate de pyridoxine et sur quelques dérivés de la pyridine à des pH variés.

### IV.2.b - Analyse chromatographique

#### 1° - Chromatographie sur papier (CP)

Plusieurs systèmes de solvants [12-16] ont été utilisés pour séparer, identifier, et quantifier la pyridoxine dans les fluides pharmaceutiques et biologiques. Ils sont présentés dans le tableau IV.2.

La séparation des vitamines hydrosolubles, dont la vitamine B<sub>6</sub>, sur papier échangeur d'ions a été décrite par KLOTZ et HUETTENRAUCH [17], en utilisant de l'Amberlite SB-2, de l'Amberlite WB-2, et de l'Amberlite WA-2.

#### 2° - Chromatographie sur couche mince (CCM)

CLARKE [18] a décrit un système de solvants composé de solution ammoniacale concentrée et de méthanol (proportions respectives 1,5 et 100), avec révélation par pulvérisation de KMnO<sub>4</sub>.

LYLE et TEHRANI [22] ont séparé plusieurs vitamines, dont la B<sub>6</sub>, par CCM, en utilisant un système acide acétique anhydre-acétone-méthanol-benzène, dans les proportions 1-1-4-14.

Une méthode rapide de CCM, dans le cadre d'une identification en routine de la vitamine B<sub>6</sub> (et d'autres substances) a été aussi décrite pour des liquides biologiques [23].

#### 3° - Electrophorèse

Une méthode électrophorétique, destinée à la fois à la séparation et à l'estimation des taux de vitamine B<sub>6</sub> et de ses dérivés contenus dans différents tissus, a été décrite en 1970 [24]. La méthode est basée sur une électrophorèse à haut voltage de petits échantillons d'extraits tissulaires, appliqués sur une base de cellulose. Cette méthode n'est sensible que jusqu'à 1µg de vitamine B<sub>6</sub>.

#### 4° - Chromatographie sur colonne (CC)

Plusieurs méthodes ont été rapportées pour séparer des vitamines hydrosolubles, et en particulier la vitamine B<sub>6</sub>. On trouve en particulier 2 systèmes :

a) Amberlite WA-2, résine carboxylique, avec un tampon acétate (pH=4,62) comme éluant [17]

b) SD cationite, avec une solution d'ammoniaque concentré comme éluant [25].

Un autre système utilisant une colonne Amberlite IRA-400 et de l'acide acétique comme éluant a également été décrit par NERLO et PAWLAK en 1969 [25].

#### 5° - Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Plusieurs procédés de CPG ont été rapportés concernant la détermination de la vitamine B<sub>6</sub> dans des formulations pharmaceutiques et des liquides biologiques. Le tableau IV.3 résume certaines de ces méthodes.

Colonne	Conditions	Commentaire	Réf.
1. 3% SE-30	programmation de température de 100-270°	Dérivation utilisant du NO-bis (triméthylsilyl) acétamide.	[26]
2. 15% DOW-Corning high vacuum silicone grease on Gas-Chrom Q (60-80mesh)	Température colonne = 175° avec détection de la conductivité thermique et Hélium comme gaz porteur.	Dérivation utilisant du NO-bis (triméthylsilyl) acétamide.	[27]
3. 3% SE-52 on silanized Gas Chrom P (60-80 mesh)	Température colonne : 165° et azote comme gaz porteur.	Dérivation utilisant du NO-bis (triméthylsilyl) acétamide.	[28]
4. 3% OV-101 on Gas Chrom Q (100-200 mesh)	Température colonne : 160°	Dérivation par le diazométhane et l'acide butane boronique en pyridoxine O-méthyl éther cyclique butaneboronate.	[29]

**Tableau IV.3 : Chromatographie gazeuse du chlorhydrate de pyridoxine [1].**

## 6° - Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

De très nombreux procédés de CLHP ont été publiés concernant la séparation et le dosage des vitamines B<sub>6</sub> dans les fluides biologiques (tableau IV.4).

SCHRIJVER et coll. [72] ont décrit en 1981, une méthode de dosage du PLP dans le sang total, basée sur une séparation par CLHP, suivie d'une dérivation du PLP en sa semicarbazone et d'une modification de pH, permettant une détection fluorométrique optimale. Cette méthode est semi-automatisée, ce qui représente un progrès par rapport aux techniques précédemment proposées [75], cependant elle ne permet pas la détection du PL, ni des autres vitamines (PMP, PNP, PM et PN) qui ne sont pas fluorescents dans les conditions fixées. De plus, sa sensibilité n'est que de 30 nmol de PLP par litre de sang.

En 1983, COBURN et MAHUREN [76] proposent une méthode basée sur un échange de cations, permettant le dosage de 7 vitamines B<sub>6</sub> différents (PLP, PNP, PA, PMP, PL, PN et PM) dans le plasma et l'urine. Ils utilisent une déprotéinisation à l'acide trichloroacétique, un gradient d'élution, une dérivation post-colonne par ions bisulfites et solution tampon et une détection fluorimétrique. La sensibilité est considérablement améliorée par la détection de quantités de l'ordre de 15 nmol/l, et on arrive à séparer et doser une multitude de vitamines. Le principal inconvénient de cette technique est la présence d'impuretés interférentes, surtout dans l'urine, d'où l'utilisation d'un gradient de solvants relativement complexe. De plus, l'analyse semble encore trop longue : 50 minutes sont nécessaires pour éluer la totalité des solutés, sans compter les ajouts de vitamines effectués fréquemment pour confirmer l'identité des pics.

Plusieurs équipes ont travaillé ensuite à partir de la méthode de COBURN et MAHUREN, notamment LUI, LUMENG et LI, en 1995 [77] qui ont essentiellement cherché à comparer cette technique avec deux autres méthodes (chromatographie à faible pression et test enzymatique). Ils ont conclu à la supériorité de la technique CLHP, tant sur le plan de la rapidité et de la sensibilité que sur le plan de l'automatisation, même si celle-ci ne permet pas une purification totale.

D'autres auteurs, DRISKELL et CHRISLEY en 1988 [78] ont pressenti également le potentiel que pouvait développer la CLHP pour le dosage des vitamines B<sub>6</sub>. Ils ont d'ailleurs poursuivi leurs investigations en 1991 [79] [80] en utilisant une technique de CLHP à polarité de phases inversée basée sur la formation de paires d'ions avec gradient d'élution, et double détection UV et fluorimétrie.

Devant la complexité des méthodes de CLHP proposées jusque là, EDWARDS, LIU et ROSE [73, 93] ont publié une technique inspirée de celle de Coburn et Mahuren [76] :

déprotéinisation à l'acide perchlorique, utilisation d'un système d'élution isocratique, CLHP à polarité de phases inversée, dérivation post-colonne par des ions bisulfite et détection fluorimétrique. Le montage est considérablement simplifié par le régime isocratique, et la durée d'analyse notablement réduite à 25 min pour une séparation des sept formes connues de vitamine B<sub>6</sub>.

Cette technique apparaît comme très intéressante à approfondir notamment en intégrant un étalon interne.

D'autres techniques ont été développées par d'autres auteurs.

C'est le cas de HIROSE, KUBO et TSUGE [81, 86] qui ont rencontré des difficultés à détecter la PM, la PN et la PNP, et à doser les quantités faibles de PL obtenues. Leur méthode reste néanmoins très fiable pour le dosage du PLP plasmatique.

C'est le cas également de SAMPSON et O'CONNOR [82] en 1989, dont la technique de chromatographie à polarité de phases inversée semble également précise et juste, intéressante pour des dosages tissulaires et dans les globules rouges, mais ne permet de doser, dans le plasma, que le PLP et le PL. Elle utilise un gradient binaire d'élution, et une double dérivation post-colonne par bisulfite de sodium et solution tampon.

C'est le cas enfin de SHARMA et DAKSHINAMURTI [85] en 1992 avec un gradient binaire, une dérivation post-colonne et une détection fluorimétrique.

Auteurs	Références	Mode d'éluition	Phase mobile	colonne	Nature des cposés dosés	Etaion interne
SCHRIJVER et coll	[72]	isocratique	- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,05 mmol/l - pH ajusté à 2,9 avec $\text{H}_3\text{PO}_4$	Hypersil - ODS 5 $\mu\text{m}$ (250x4,6mm)	PL et PLP (sang total)	non
COBURN et MAHUREN	[76]	gradient ternaire	3 solvants de base : - HCl 0,02N - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,1M + $\text{H}_3\text{PO}_4$ 0,1N (pH 3,3) - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,5M + NaOH 0,5N (pH 5,9)	Vydac 401 TP-B 10 $\mu\text{m}$ (300x4,6mm)	PLP, PNP, PA, PMP, PL PN, PM (plasma)	oui : acide 2-amino 5-Chloro benzolique
TOUKAIRIN et al.	[86] [81]	isocratique	- acétonitrile 1% - perchlorate de $\text{Na}^+$ 0,1M - tampon phosphate de $\text{K}^+$ 0,1M (pH 3,5)	TSK - gel ODS-120A (250x4,6mm)	PMP, PM, PNP, PLP, PL, PN, PA (plasma, aliments)	oui : PN- $\beta$ -glucoside
DRISKELL et CHRISLEY	[78] [79] [80]	gradient binaire	2 solvants de base : - méthanol : eau (85:15) - acides heptane et octane sulfoniques 0,005M	Bondapac C18 10 $\mu\text{m}$ (300x3,9mm)	PLP, PNP, PA, PMP, PL PN, PM (plasma) PA (urinaire)	oui : déoxypyridoxine
EDWARDS, LIU et ROSE	[73]	isocratique	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 75 mmol/l + $\text{NaClO}_4$ 75 mmol/l + acétonitrile 8,5 ml/l + triéthanolamine 0,5 ml/l + $\text{HClO}_4$ conc. qsp pH 3,38	TSK ODS-120T 5 $\mu\text{m}$ (250x4,6mm)	PMP, PM, PNP, PLP PL, PN, PA (plasma)	non
SAMPSON et O'CONNOR	[82]	gradient binaire	2 solvants de base : - acide phosphorique 0,033M + acide octane sulfonique 0,008M (pH 2,2) + acide phosphorique 0,033M + 2 propanol 10% (V/V) (pH 2,2)	Ultramex C <sub>18</sub> 3 $\mu\text{m}$ (150x4,6mm)	PLP, PMP, PL, PN, PM PA (plasma, tissus et urine)	oui : déoxypyridoxine
SHARMA et DAKSHINAMURTI	[85]	gradient binaire	2 solvants de base : - $\text{H}_3\text{PO}_4$ 0,033M + acide octane sulfonique 0,01M + KOH 6M qsp pH : 2,2 - $\text{H}_3\text{PO}_4$ 0,33M dans du 2-propanol 10% + KOH 6M qsp pH 2,2	Ultramex C <sub>18</sub> 3 $\mu\text{m}$ (150x4,6mm)	PLP, PA, PMP, PL, PN, PM (plasma, tissus)	oui : déoxypyridoxine

Tableau IV. 4 : Etude comparative de 6 procédés de séparation et de dosage de la vitamine B<sub>6</sub> dans les fluides biologiques

Réf.	Dérivation post-colonne	Détection	Limite de détection	Limite de quantification	Taux de recouvrement	Divers
[72]	semicarbazide 12% + modification de pH (NaOH 8%)	Fluorimétrique (367nm Exc, 478nm Em)	5 nmol/ ou 1,5 pmol/300 µl injectés	30 nmol/ ou 9 pmol/injection	87,9%	- Semi automatisée - durée 18 min
[76]	ions bisulfites + modif. de pH (pH 7,5)	Fluorimétrique	—	—	87% à 106% selon les vitamines	- interférences - durée 50 min
[86] [81]	traitement par KCN à pH 7,5	Fluorimétrique (305 Exc,390 Em)	0,25 pmol/200 µl injectés	—	—	méthode > 24 h
[78] [79] [80]	Non	UV (254 nm) + fluorimétrique (300 nm Exc, 375 nm Em)	—	—	plasma : 88 % à 97% urine : 105% à 108%	- durée : 20 min
[79]	ions bisulfites	fluorimétrique (325 nm Exc 400 nm Em)	—	—	85 % à 98%	- durée : 25 min
[82]	ions bisulfites + modif de pH (pH 7,5)	Fluorimétrique (328 nm Exc 393 nm Em)	0,5 à 2,0 pmol/200 µl injectés	1,7 à 6,7 pmol/injection	89% à 104%	- durée 30 min
[85]	oui : ions bisulfites + modif de pH (pH 7,4)	Fluorimétrique (328 nm Exc 393 nm)	0,3 à 1,5 pmol/25 µl injectés	2,5 à 10 pmol/injection	90% à 104%	- durée 35 min

Tableau IV. 4 : Etude comparative de 6 procédés de séparation et de dosage de la vitamine B<sub>6</sub> dans les fluides biologiques (suite).

## IV.2.c - Spectrophotométrie

### 1° Colorimétrie

Plusieurs méthodes colorimétriques ont été mises au point pour l'identification de la pyridoxine. La méthode de la Pharmacopée américaine utilisée pour la détection et le dosage du chlorhydrate de pyridoxine, est basée sur la réaction entre la pyridoxine et le 2,6-dichloroquinone chloroimide, donnant une couleur bleue, selon la méthode décrite par KUHN et LOW [30]. L'absorbance de la couleur bleue est mesurée à 650 nm et comparée à celles de solutions standards. Cette réaction a pu, dans certaines conditions, être utilisée pour le dosage de cette substance.

Il y a une quinzaine d'années, MOUSSA [31] a décrit une modification de ce procédé permettant d'améliorer la stabilité de la coloration, la rapidité et la sensibilité de l'essai. Cependant, la limite de détection de cette méthode n'est que de 10 µg de vitamine B<sub>6</sub>, ce qui est bien insuffisant pour pouvoir l'appliquer à des dosages sanguins, à fortiori s'ils proviennent de sujets carencés.

Parmi les autres méthodes colorimétriques proposées pour le dosage de la vitamine B<sub>6</sub>, on peut aussi citer :

- a) MURAI [32], qui a déterminé des taux de B<sub>6</sub> par sa réaction avec de la diméthyl-p-phénylène diamine, HCl et de l'hypochlorite de sodium, dans une solution tampon à pH 8. Le composé coloré obtenu est extrait par l'alcool isobutylique, et l'absorbance de la solution est mesurée à 625 nm.
- b) D'autre part, la pyridoxine et ses dérivés donnent un composé stable, soluble dans l'alcool, de couleur rouge-violette, avec un sulfathiazole diazoté stabilisé par du chlorure de Zinc, à pH 6,5 - 7,0 [33].

Ces méthodes colorimétriques ne sont plus utilisées aujourd'hui à cause de leur manque de sensibilité.

### 2° - Spectrophotométrie en Ultraviolet (U.V)

BOSCH [34] a publié une méthode de dosage spectrophotométrique de la vitamine B<sub>6</sub>, et d'autres vitamines, présentes dans des préparations pharmaceutiques, en présence de N-bromosuccinimide, dans du méthanol à 370-380 nm. La méthode permet un dosage

jusqu'à 1000 ou même 100  $\mu\text{g}$  de vitamine  $B_6$ , ce qui n'est pas cependant exploitable pour les taux, bien plus bas, de vitamine  $B_6$  dans le sang. Un autre problème peut aussi être rencontré ici : les vitamines  $B_1$ ,  $B_{12}$ , A et la ménadione bisulfite interfèrent dans cette méthode.

Une enquête sur les spectres UV de nombreuses vitamines et de certains dérivés synthétiques a été rapportée [35]. Les spectres de ces vitamines après dérivation sont particulièrement intéressants dans l'optique d'une détermination quantitative. En effet, la détermination quantitative par spectrophotométrie dérivative est supérieure à la mesure spectrophotométrique directe (sans dérivation) dans de nombreuses situations problématiques.

D'autres analyses ont été rapportées, à des longueurs d'ondes variables : 290 nm [36], 324 nm [37].

### 3° - Spectrophotométrie en Infrarouge (I.R.)

Le chlorhydrate de pyridoxine a été dosé par spectrophotométrie IR, en utilisant la région 6-11  $\mu\text{m}$  avec l'eau comme solvant [38].

### 4° - Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Une méthode spectrométrique RMN a été décrite [39] permettant des dosages simultanés de vitamine  $B_1$  et  $B_6$ . C'est grâce à la relation existant entre, d'une part, les aires des pics de vitamine  $B_1$  ( $\delta = 2,55$  ppm) et de  $B_1 + B_6$  ( $\delta = 2,65$  ppm) et, d'autre part, celle de l'acide maléique ( $\delta = 6,6$  ppm) que l'on peut réellement quantifier les composés du mélange.

Plus tard, une autre méthode RMN destinée à l'analyse simultanée des vitamines  $B_1$  et  $B_6$ , et utilisant une équation plus simple de calcul, a été développée [40]. Les pourcentages moyens de récupération des vitamines  $B_6$  et  $B_1$  sous leurs formes utilisées pour le dosage, sont de  $97,42 \pm 2,99$  et  $97,57 \pm 1,52\%$  respectivement. Cette méthode évite la superposition des pics comme dans la méthode initiale.

### 5° - Absorption-luminescence

La technique spectroscopique d'absorption-luminescence a, dans le même temps, été appliquée à l'analyse de la vitamine  $B_6$  et de ses composés apparentés [41].

BAZHULINA et MOROZOV ont en effet étudié les constantes d'équilibre entre divers ions et les formes tautomériques de la vitamine B<sub>6</sub>, ainsi que les effets de la température, des substitutions, des milieux, sur les propriétés d'absorption de ces formes. Les résultats expérimentaux de la spectroscopie sont en bon accord avec les calculs quantiques.

#### 6° - Spectrofluorimétrie

ALEKSEICHIK, et al. [42] ont publié une analyse qualitative de préparations de vitamine B<sub>6</sub> et d'autres substances. Les spectres sont déterminés dans l'éthanol, l'acide chlorhydrique et l'hydroxyde de sodium, en utilisant des concentrations de vitamine B<sub>6</sub> allant de 0,01 à 0,001 mg/ml (au minimum, 1000µg/l, c'est donc trop peu sensible pour doser la vitamine B<sub>6</sub> dans le sang).

FUJITA, et al. [43] ont rapporté un dosage fluorométrique de la vitamine B<sub>6</sub>. D'autres auteurs ont également fait des études plus élargies dans ce même but [44].

FUJINO [45] a mis au point et amélioré une méthode de dosage de la vitamine B<sub>6</sub>, utilisant la fluorescence de l'acide 4-pyridoxique, obtenu par oxydation de la vitamine B<sub>6</sub> par le permanganate. Cette méthode est appliquée à la détermination de la vitamine B<sub>6</sub> dans les liquides biologiques [46, 47].

#### IV.2.d - Analyse microbiologique

Plusieurs méthodes microbiologiques destinées à l'analyse de la vitamine B<sub>6</sub> dans des échantillons biologiques ou dans d'autres produits ont été rapportées [49, 50].

Le principe consiste à observer la croissance d'une souche de levures pyridoxino-dépendantes en présence de l'échantillon de vitamine B<sub>6</sub> à doser. Le taux de vitamine B<sub>6</sub> est déduit de la mesure néphélométrique de la culture après traitement approprié.

Nous ne donnerons ici que l'essentiel de ces dosages, étant donné l'intérêt désormais limité d'une telle technique en routine (protocole lourd, méthode trop longue, résultats aléatoires et mauvaise sensibilité).

La méthode microbiologique permet de quantifier la vitamine B<sub>6</sub> de manière directe mais statique (taux de vitamine B<sub>6</sub> à un instant donné) : elle consiste à mesurer la croissance d'une souche incapable de synthétiser la vitamine B<sub>6</sub> (auxotrophe) en présence de l'échantillon à doser. La croissance, dans des conditions bien standardisées, devient proportionnelle à la quantité de facteur limitant apportée, permettant un dosage par comparaison à des "cultures étalons" effectuées dans les mêmes conditions.

La souche la plus utilisée est la levure *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 4228, encore appelée *Saccharomyces uvarum*, qui permet de doser simultanément la pyridoxine, le pyridoxal et la pyridoxamine [74]. Les formes phosphorylées ne pouvant être quantifiées par cette méthode microbiologique, une hydrolyse préalable des formes phosphorylées est indispensable.

Certaines souches permettent de doser le pyridoxal seul (*Lactobacillus casei*) [48], ou bien le pyridoxal et la pyridoxamine simultanément (*Streptococcus faecalis*).

Le phosphate de pyridoxal et le pyridoxal représentant 90% de la vitamine B<sub>6</sub> totale contenue dans le plasma, le dosage de cette dernière est donc une mesure indirecte de la somme phosphate de pyridoxal et pyridoxal.

Les valeurs de vitamine B<sub>6</sub> mesurées chez 10 sujets à l'aide de *Saccharomyces uvarum*, varient de 26 à 66 nmol/l de plasma [49].

Les valeurs considérées comme normales avec *Saccharomyces uvarum* sont comprises entre 6 et 18 ng/ml.

Un tableau donnant les correspondances entre les 2 unités les plus couramment utilisées pour désigner les taux de vitamine B<sub>6</sub> (nmol/l et ng/ml) est donné en annexe 8.

#### Inconvénients de la méthode:

- Méthode délicate; problème de précision (quantité de B<sub>6</sub> de l'ordre du ng/ml)
- Souche-test fragile: soin constant pendant la culture
- Durée d'analyse longue (48 heures)
- Mauvaise reproductibilité
- Manque de sensibilité

Cette technique semble de moins en moins employée aujourd'hui du fait de son intérêt désormais limité, comparé à celui des nouvelles méthodes chromatographiques.

#### **IV.2.e - Dosages enzymatiques**

Les tests enzymatiques pour la mise en évidence du statut vitaminique B<sub>6</sub> font intervenir les transaminases glutamino oxalo acétique (GOT ou ASAT) et glutamino pyruvique (GPT ou ALAT). Par incubation in vitro en présence de vitamine B<sub>6</sub> en excès, on obtient un pourcentage d'activation par rapport à l'activité basale d'autant plus important que l'hypovitaminose est avancée [51-58].

Une variante est désignée sous le nom de méthode radio-enzymatique [59, 71], qui utilise des isotopes radioactifs détectés spécifiquement.

Une multitude de méthodes a été développée pour doser la vitamine B<sub>6</sub> dans les liquides biologiques. Ainsi, on peut effectuer une estimation indirecte donnant une indication sur le statut vitaminique, sans pour autant déterminer exactement la concentration en B<sub>6</sub> : on utilise pour cela la mesure de l'activation d'une enzyme, le plus souvent l'aspartate aminotransférase (ASAT), après addition de PLP.

De nombreuses autres méthodes permettent de doser quantitativement la vitamine B<sub>6</sub> : parmi elles on retrouve des méthodes microbiologiques, radioenzymatiques, enzymatiques-non-isotopiques et chromatographiques. Seules ces dernières connaissent aujourd'hui des applications cliniques étendues, du fait essentiellement des durées d'analyses beaucoup plus courtes. Ce sont elles qui ont inspiré la démarche de la mise au point de notre méthode de dosage décrite plus loin (chapitre V).

### IV.3 - MÉTHODES D'EXPLORATION LES PLUS UTILISÉES

Voici maintenant le détail des méthodes aujourd'hui les plus approfondies et les mieux connues dans l'exploration fonctionnelle du statut vitaminique B<sub>6</sub>. Comme nous l'avons déjà dit plus haut, les méthodes d'exploration comportent d'une part des dosages plasmatiques et urinaires de la vitamine, du coenzyme actif et de ses catabolites, mais aussi d'autre part des études fonctionnelles renseignant sur le pool de **cofacteur effectivement actif**. Il semblerait qu'il y ait en fait une assez bonne corrélation entre les taux plasmatiques de la vitamine, de coenzyme actif et les épreuves dynamiques développées plus bas.

#### IV.3.a - Test au Tryptophane et épreuve de charge en méthionine

Historiquement le **test de surcharge au Trp** a été l'indicateur de l'état vitaminique B<sub>6</sub> le plus utilisé. Comme il a été vu dans le chapitre II.1, le foie est le site principal du métabolisme du Trp. Étant donné que la plus grande partie du PLP est synthétisée au niveau du foie, la teneur de cet organe en PLP et ses répercussions sur les étapes de transformation du tryptophane, suggèrent la possibilité d'utiliser l'exploration du métabolisme du Trp dans l'évaluation biochimique de l'état nutritionnel vitaminique B<sub>6</sub>. Lors d'une carence en cette vitamine, le métabolisme de cet acide aminé s'oriente préférentiellement vers la formation d'acide xanthurénique (figure IV.10). Cet acide aminé étant éliminé par le rein, sa quantification dans les urines, après une charge orale unique de Trp (2 à 5g chez l'adulte et 0,1g/kg chez l'enfant), renseigne sur l'état vitaminique B<sub>6</sub>.

L'interprétation de ce test est rendue complexe, dans la mesure où plusieurs facteurs, outre la vitamine B<sub>6</sub>, peuvent altérer le métabolisme hépatique du Trp [52].

Le développement récent de méthodes de dosage des métabolites urinaires de cet acide aminé par Chromatographie Liquide Haute Performance a amélioré la validité de ce test [60].

Une méthode similaire, l'**épreuve de charge en méthionine**, a aussi été utilisée comme un moyen indirect d'évaluation du statut B<sub>6</sub> [61] (figure II.7). Cependant, du fait du nombre limité d'études disponibles [2], il est difficile d'établir une valeur-seuil pour la cystathioninurie permettant d'affirmer l'existence d'un état déficient en vitamine B<sub>6</sub>.

#### IV.3.b - Dosage du PLP plasmatique

Depuis plus de quinze ans, le dosage du PLP plasmatique a été la méthode directe la plus utilisée pour évaluer le statut vitaminique B<sub>6</sub> [53, 62], bien que ce paramètre ait été récemment considéré comme peu discriminatif [63]. Le dosage du PLP plasmatique a supplanté le test de surcharge au Trp comme méthode de choix. La validation du PLP plasmatique comme indicateur du statut vitaminique B<sub>6</sub> a été basée sur des résultats expérimentaux obtenus chez le rat, qui mirent en évidence une bonne corrélation entre PLP plasmatique et PLP musculaire [64]. Le PLP plasmatique est influencé par l'apport alimentaire en vitamine B<sub>6</sub> ; cependant, l'effet des variations de l'apport en vitamine B<sub>6</sub> sur le PLP du plasma n'est pas immédiat [65, 66]. Dans plusieurs études métaboliques, un plateau n'est observé que 7 à 10 jours après l'administration de doses de vitamine B<sub>6</sub> variant de 0,5 à 10 mg.

Outre les apports en vitamine B<sub>6</sub>, de nombreux facteurs peuvent modifier le taux circulant de PLP. Il s'agit principalement de l'apport en protéines : quand l'apport en protéines augmente, le taux de PLP diminue [67]. Un apport de glucose a le même effet qu'un apport en protéines [68]. A l'inverse, un exercice physique, même bref, fait augmenter le PLP dans le plasma [69]. D'autres facteurs ont été reconnus comme influençant le taux de PLP du plasma, mais leur rôle respectif n'est pas encore clairement évalué [70]. Par ailleurs, de nombreux facteurs physiologiques (le jeûne, la grossesse) ou pathologiques diminuent le taux de PLP sans qu'apparaissent pour autant de signes cliniques de carence en vitamine B<sub>6</sub>. Des taux plasmatiques bas de PLP ont été notés chez les asthmatiques et les patients drépanocytaires. Si dans certains états physiologiques ou pathologiques, le PLP plasmatique ne constitue pas un bon reflet du statut vitaminique B<sub>6</sub>, la question de son utilité chez l'homme sain reste posée.

Quant aux techniques de dosage utilisées, ce sont soit des méthodes radioenzymatiques [59, 71], soit une Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la détection électrochimique [55] ou à la détection fluorimétrique [72].

Les valeurs considérées dans la littérature comme normales pour le PLP plasmatique vont de 28 à 130 nmol/l.

Il est important de noter également l'intérêt de séparer et de doser simultanément les autres vitamines B<sub>6</sub>. De nombreux travaux ont été effectués ces dernières années dans ce but, en utilisant la Chromatographie Liquide Haute Performance notamment. Une analyse détaillée de ces différents travaux a été présentée au paragraphe IV.2.b.

Une interprétation des taux de PL obtenus dans le plasma, figure dans l'ouvrage de référence de GUILLAND et LEQUEU [2]. Le PL est la principale forme de vitamine B<sub>6</sub> plasmatique qui franchit la membrane plasmique en période post-prandiale comme nous l'avons déjà vu au paragraphe II.2. Le PL est, de ce fait, également considéré comme un bon reflet du statut B<sub>6</sub> [70].

Le dosage du PL dans le plasma apporte une information complémentaire de celle fournie par le dosage du PLP dans le plasma. Il a été démontré que certains états physiologiques (la grossesse) ou pathologiques (traumatisme, infarctus du myocarde, prise de médicaments) peuvent conduire à une perturbation de l'équilibre entre les vitamines B<sub>6</sub> du plasma. Chez la femme enceinte, le taux du PLP plasmatique diminue alors que celui du PL augmente (au total, le taux de vitamine B<sub>6</sub> reste inchangé).

Le dosage simultané des différentes formes vitaminiques B<sub>6</sub> par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la détection fluorimétrique permet donc de mieux apprécier l'état nutritionnel vitaminique B<sub>6</sub>.

### IV.3. c - Dosages enzymatiques

#### Principe

La méthode consiste à mesurer l'activité d'une enzyme pyridoxinodépendante présente dans le sang d'un malade, d'une part avant addition *in vitro* de phosphate de pyridoxal (activité basale : AB) et d'autre part après addition *in vitro* de phosphate de pyridoxal en excès (activité après stimulation : AS).

On a coutume ensuite de chiffrer l'activité de l'enzyme par le rapport :

$$\text{coefficient d'activation (CA)} = \frac{\text{Activité après stimulation (AS)}}{\text{Activité basale (AB)}}$$

Ainsi, plus l'écart (AS - AB) est grand, plus CA est grand, et plus la carence en B<sub>6</sub> semble importante.

Ces tests enzymatiques font intervenir les transaminases glutamino oxaloacétique (GOT ou ASAT) et glutaminopyruvique (GPT ou ALAT) qui sont des enzymes érythrocytaires. Les activités transaminasiques sont mesurées dans les hémolysats de globules rouges. Jusqu'à présent, aucune étude métabolique n'a envisagé les effets d'apports variables en vitamine B<sub>6</sub> sur les activités basales, les activités saturées des deux transaminases et sur les coefficients d'activation. Une étude réalisée chez des femmes recevant des apports très bas (0,19 mg/jour) de PN pendant quatre semaines a mis en évidence une diminution significative des activités basales chez celles-ci [65]. Le coefficient d'activation de la GOT ne fut modifié qu'au bout de la quatrième semaine de déplétion et ne retourna pas à son niveau pré-experimental, même après ingestion pendant quatre semaines de 0,85 mg ou de 1,84 mg de vitamine B<sub>6</sub>/jour [65]. L'activité GPT a été plus affectée par la carence que l'activité GOT. Cependant, la teneur des globules rouges en GPT est environ vingt fois plus petite que celle en GOT.

Le coefficient d'activation de la GOT doit être inférieure à 2,0 chez le sujet non déficient, et supérieur à 2,0 chez les sujets déficients [52]. La valeur seuil du CA de la GPT est, elle, de 1,25 [53]. Il faut faire attention car l'interprétation des activités en GOT et GPT basales peut être difficile en cas d'atteinte hépatique [51].

#### **IV.3.d - Dosage du PLP musculaire**

Il faut rappeler tout d'abord qu'une grande partie du PLP de l'organisme est stockée au niveau du muscle. Dans le muscle squelettique, le PLP est localisé au niveau de la glycogène phosphorylase, enzyme catalysant la glycogénolyse. S'il était possible de pratiquer en routine, des dosages du PLP musculaire, cela serait probablement le meilleur reflet du statut vitaminiq ue B<sub>6</sub>, car représentant le "stock" en vitamine B<sub>6</sub> de l'organisme. Cependant la nécessité de pratiquer une biopsie musculaire limite considérablement les applications de ce dosage, pour des raisons à la fois éthiques et pratiques. Seules les analyses *post mortem* restent concernées par ce dosage.

#### **IV.3.e - Dosage de l'Acide 4-Pyridoxique**

L'acide 4-Pyridoxique (4-PA) produit au niveau du foie, est le principal métabolite de la vitamine B<sub>6</sub> excrété dans l'urine (figure II.1). Le 4-PA est produit par oxydation du pyridoxal, lui-même provenant du PLP (La PN et la PM doivent donc être préalablement converties en PLP en vue de leur élimination). Ainsi, le taux de conversion du PLP en

PL est le facteur limitant de la production de 4-PA. 40 à 60% de la vitamine B<sub>6</sub> ingérée (pour des apports compris entre 1 et 5 mg) sont transformés en 4-PA [65, 66, 70]. L'apport en protéines influence l'excrétion urinaire du 4-PA [67]. En effet, pour un apport protéique égal à 0,5 mg de protéines/kg de poids corporel, et un apport de vitamine B<sub>6</sub> égal à 1,6mg, 46% de la vitamine B<sub>6</sub> ingérée sont retrouvés dans l'urine sous la forme de 4-PA. Alors que pour un apport protéique plus important, égal à 2,0 mg/kg, seulement 29% de la vitamine B<sub>6</sub> ingérée sont excrétés sous la forme de 4-PA ; ceci devant être rapproché du fait que pour utiliser les protéines ingérées, l'organisme a besoin d'une participation plus grande de la vitamine B<sub>6</sub> apportée. Inversement, un apport plus important de PL en supplémentation, sans augmentation des quantités de protéines ingérées, conduit à une excrétion plus massive de 4-PA dans l'urine [66, 70]. C'est ce que l'on observe le plus souvent chez les sujets supplémentés. Ainsi, le débit urinaire de 4-PA varie en fonction de la consommation de vitamine B<sub>6</sub>.

De nombreuses publications rapportent des techniques de dosages de ce 4-PA urinaire permettant diverses études en fonction des populations ou des pathologies envisagées. [76, 79, 80].

On notera l'importance de la détermination des apports en cette vitamine dans l'interprétation des résultats obtenus.

La valeur seuil généralement retenue pour le 4-PA est égale à 3,0 µmol/24 heures [2].

## CONCLUSION

Devant la nécessité d'une évaluation des statuts en vitamine B<sub>6</sub> dans certaines populations "à risque", sont apparues de très nombreuses méthodes d'exploration, directes ou indirectes, de ces statuts, et inégales sur le plan de la qualité et de la précision.

Les plus anciennes, mais aussi les moins sensibles, sont des dosages titrimétriques divers, des chromatographies sur papier et sur couche mince, ou des colorimétries.

Beaucoup plus spécifiques sont les méthodes microbiologiques de dosage de la vitamine B<sub>6</sub> sur cultures de levures, ou les méthodes enzymatiques mais qui, elles, ne permettent qu'une évaluation des statuts et non pas un véritable dosage. C'est le cas également des tests dynamiques pourtant encore utilisés aujourd'hui (Test de surcharge au tryptophane et épreuve de charge en méthionine) et dont l'interprétation reste assez délicate.

Enfin les méthodes de choix aujourd'hui reposent sur des techniques chromatographiques: chromatographie sur colonne (CC) et surtout chromatographie liquide haute performance (CLHP), qui permettent déjà des dosages satisfaisant du PLP et du PA (au moins) ou des 6 formes principales de vitamine B<sub>6</sub> (au mieux), tant dans le sang total et le plasma, que dans les globules rouges ou l'urine.

## Références bibliographiques du chapitre IV

- [1] - HASSAN Y. ABOUL-ENEIN, MOHAMMED A. LOUFTY. Pyridoxinhydrochloride, Analytical Profiles of Drug Substances, 13, American Pharmaceutical association, 1984, 447-486.
- [2] - J.C. GUILLAND, B. LEQUEU. Les vitamines : du nutriment au médicament. Paris, Editions Médicales Internationales, 1992, 357 p.
- [3] - J.C. GUILLAND, B. LEQUEU. Les vitamines : du nutriment au médicament. Paris, Editions Médicales Internationales, 1992, 58.
- [4] - "The United States Pharmacopœia", XIX, Mack Publishing Co., Easton Pa., 1975, 429.
- [5] - "European Pharmacopœia", Vol. 1, Maisonneuve S.A. Sainte Ruffine, France, 1969, 353.
- [6] - J.C. GRASSELLI, W.M. RITCHEY. Atlas of Spectral Data and Physical Constants for Organic compounds, 2<sup>nd</sup> Ed., Vol. 4, CRC Press Inc., Cleveland, Ohio, 1975, 764.
- [7] - P. EKEBLAD, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1952, 4, 636.
- [8] - C.Y. TU, F.H. TSANG, Yao Hsueh, Hsueh Pao, 1963, 10, 10.
- [9] - G. LEMAHIEU, C. LEMAHIEU, B. RESIBOIS, J. BERTRAND. *Ann. Pharm. Fr.*, 1974, 32, 513.
- [10] - O. MANOUSEK, P. ZUMAN, *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.*, 1962, 27, 486.
- [11] - J. NAKAYA, *Nippon Kagaku Zasshi*, 1960, 81, 1731.
- [12] - C. BERGAMINI, *Sperimentale, Sez. Chim. Biol.*, 1953, 4, 38.
- [13] - W.A. WINSTEN, E. EIGEN, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1948, 67, 513.
- [14] - K. FINK, *Anal chem.*, 1963, 35, 389.
- [15] - F. CAPIOPPO, *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 1951, 27, 1754.
- [16] - M.N. HASHMI, N.A. CHUGHTAI, M.A. SHAHID, *Mikrochim. Acta*, 1969, 2, 244.
- [17] - R. HUETTENRAUCH, L. KLOTZ, *Experientia*, 1963, 19, 95.
- [18] - E.G.C. CLARKE, Isolation and identification of drugs, vol. 1, London: Pharmaceutical Press, 1978, p 528.
- [19] - C. TURANO, P. FASELLA, P. VECCHINI, A. GIARTOSIO, *J. Chromatogr.*, 1964, 14, 201.
- [20] - J.Q. SNYDER, S.H. WENDER, *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1953, 46, 465.
- [21] - G.C. DERITIS, G. CATTANEO, U. FANTOLI, *Ann. Ist. "Carlo Forlanini"*, 1963, 23, 168.

- [22] - S.J. LYLE, M.S. TEHRANI, *J. Chromatogr.*, 1982, 236, 31.
- [23] - W.J. SERFONTEIN, D. BOTHA, L. S. DE VILLIERS, *J. chromatogr.*, 1975, 115, 507.
- [24] - C.E. COLOMBINI, E.E. Mc COY, *Anal. Biochem.*, 1970, 34, 451.
- [25] - H. NERLO, S. PAWLAK, W. CZARNECKI, *Acta. Pol. Pharm.*, 1969, 26, 173.
- [26] - H. JANECKE, H. VOEGE, *Naturwissenschaften*, 1968, 55, 447.
- [27] - L.T. SENNELLO, C.J. ARGOUEDELIS, *Analyt. chem.*, 1969, 41, 171.
- [28] - Y. OHNISHI, Z. HORII, M. MAKITA, *Yakugaku Zasshi*, 1967, 87, 747.
- [29] - M.S. CHAUHAN, K. DAKSHINAMURTI, *J. chromatogr.*, 1982, 237, 159.
- [30] - R. KUHN, I. LOW, *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, 1939, 72, 1453.
- [31] - A.A. MOUSSA, *Mikrochim. Acta*, 1982, 1, 169.
- [32] - K. MURAI, *Yakuzaigaku*, 1961, 21, 124.
- [33] - A.M. ALIEV, *Aptech. Delo*, 1964, 13, 31.
- [34] - S.F. BOSCH, *Ars. Pharm.*, 1970, 11, 267.
- [35] - A. SCHMITT, *Angew. UV-Spektrosk.*, 1977, 3, 15.
- [36] - P. FASELL, C. BAGLIONI, *Acta Vitaminol.*, 1956, 10, 27.
- [37] - M.T. BARROSA, *Rev. Port. Farm.*, 1969, 19, 206.
- [38] - F.S. PARKER, *Appl. Spectroscopy*, 1961, 15, 96.
- [39] - S.S.M. HASSAN, *Methods Enzymol.*, 1980, 67, 552.
- [40] - H.Y. ABOUL-ENEIN, M.A. LOUFTY, H.M. EL-FATATRY, *Chem. Biomed. and Environ. Instrumentation*, 1981, 11, 69.
- [41] - N.P. BAZHULINA, Y.V. MOROZOV, *Lyminestsentr. Analiz Med. Biol. Issled.*, Riga 77, 1980.
- [42] - R.N. ALEKSEICHIK, V.P. KOROLYUK, E. TUKALO, E.D. SAFONOVA, *Mater. Sezda Farm. B., SSR*, 3<sup>me</sup> éd., 1977, 115.
- [43] - A. FUJITA, K. MATSUURA, K. FUJINO, *Vitamins*, 1953, 6, 389.
- [44] - IBID, *Vitaminology*, 1955, 1, 267.
- [45] - K. FUJINO, *Vitamins*, 1953, 6, 876.
- [46] - E.V. BOGDANOVA. *Trudy. Vsesoyuz. Nauch. Issledova tel. Vitamin. Inst.*, 1959, 6, 220.

- [47] - M.S. CHAUHAN, K. DAKSHINAMURTI, *Clin. Chim. Acta*, 1981, 109, 159.
- [48] - B.B. ANDERSON, M.B. PEART, C.E. FULFORD-JONES. The measurement of serum pyridoxal by a microbiological assay using *Lactobacillus casei*, *J. clin. Path.*, 1970, 23, 232-242.
- [49] - L.T. MILLER, M. EDWARDS, Microbiological assay of vitamin B<sub>6</sub> in blood and urine. *In: methods in vitamin B<sub>6</sub> nutrition*, J.E. LEKLEM, R.D. REYNOLDS, New-York: Plenum Press, 1981, 44-45.
- [50] - H. SAUBERLICH, *Ann. Rev. Nutr.*, 1984, 4, 377-407.
- [51] - P. BOUILLOT. Contribution à l'étude de l'influence des transaminases circulantes sur deux tests biologiques d'évaluation du statut vitamérique B<sub>6</sub>. Thèse de médecine, Dijon, 1988.
- [52] - M.S. BAMJI. Laboratory tests for the assessment of vitamin nutritional status. *In: Vitamins in human biology and medicine*. M. BRIGGS M., ed. CRC Press, Inc., Boca Raton, 1981, 1-27.
- [53] - H.E. SAUBERLICH, R.P. DOWDY, J.H. SKALA. Laboratory tests for the assessment of nutritional status, CRC Press, Inc., Boca Raton, 1974.
- [54] - B. CHABNER, D. LIVINGSTON. A simple enzymatic assay for PLP. *Anal Biochem.*, 1970, 34, 413- 423.
- [55] - B. LEQUEU, J.C. GUILLAND, J. KLEPPING. Measurement of plasma pyridoxal 5'-phosphate by combination of an enzymatic assay with HPLC/ Electro chemistry; *Anal Biochem.*, 1985, 149, 296-300.
- [56] - R. BAYOUMI, R. ROSALKI, *Clin. Chem.*, 1976, 22, 327 - 335.
- [57] - J. MOUNT, E. HEDVAN, C. HERD, R. JUPP, E. KEARNEY, A. MARSH, *Ann. Clin. Biochem.*, 1987, 24, 41 - 46.
- [58] - P. EDWARDS, P. LIU, G. ROSE, *Ann. Clin. Biochem.*, 1989, 26, 158 - 163.
- [59] - V. CAMP, J. CHIPPONI, B. FARAJ., *Clin. Chem.*, 1983, 29, 642 - 644.
- [60] - J.B. UBBINK, A.M. SCHNELL, C.H. RAPPLEY. Quantification of urinary xanthurenic acid excretion by anion-exchange solid phase extraction and HPLC, *J. Chromatogr.*, 1988, 425, 182 - 186.
- [61] - H. LINKSWILER. Methionine metabolite excretion as affected by a vitamin B<sub>6</sub> deficiency. *In : Methods in vitamin B<sub>6</sub> nutrition*. J.E. LEKLEM, R.D. REYNOLDS, New-York: Plenum Press, 1981, 373 - 381.
- [62] - J.E. LEKLEM, R.D. REYNOLDS, Recommendations for status assessment of vitamin B<sub>6</sub>. *In: Methods in vitamin B<sub>6</sub> nutrition*. J.E. LEKLEM, R.D. REYNOLDS, New-York: Plenum Press, 1981, 389 - 392.

- [63] - J.E. LEKLEM, R.D. REYNOLDS. Challenges and directions in the search for clinical applications of vitamin B<sub>6</sub>, *In: Clinical and Physiological applications of vitamin B<sub>6</sub>*, J.E. LEKLEM, R.D. REYNOLDS, New-York: A.R. Liss, 1988, 437-454.
- [64] - L.LUMENG, M.P. RYAN, T.K. LI. Validation of the diagnostic value of plasma PLP measurements in vitamin B<sub>6</sub> nutrition of the rat. *J. Nutr.*, 1979, 108, 545 - 553.
- [65] - R.R. BROWN, D.P. ROSE, J.E. LEKLEM et al. Urinary 4-PA, plasma PLP and erythrocyte amino-transferase levels in oral contraceptive users receiving controlled intakes of vitamin B<sub>6</sub>. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1975, 28, 10-19.
- [66] - J.E. LEKLEM. Vitamin B<sub>6</sub> metabolism and functions in humans, *In : Clinical and Physiological Applications of vitamin B<sub>6</sub>*, New-York: A.R. Liss, 1988, 3 - 28.
- [67] - L.T.MILLER, J.E. LEKLEM, T.D. SCHULTZ. The effect of dietary protein on the metabolism of vitamin B<sub>6</sub> in humans. *J. Nutr.*, 1985, 115, 1663-1672.
- [68] - J.E. LEKLEM, C.B. HOLLENBECK. Acute ingestion of glucose decreases plasma PLP and total vitamin B<sub>6</sub> concentration. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1990, 51, 832-836.
- [69] - J.E. LEKLEM, T.D. SCHULTZ. Increased plasma PLP and vitamin B<sub>6</sub> in male adolescents after a 4500 meter run. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1983, 38, 541-548.
- [70] - J.E. LEKLEM. Vitamin B<sub>6</sub>, *In: Handbook of vitamins*. 2nd ed. L. MACHLIN , ed. Marcel Dekker, New-York, 1990.
- [71] - B. CHABNER, D. LIVINGSTON. A simple enzymatic assay for PLP. *Anal Biochem.*, 1970, 34, 413 - 423.
- [72] - J. SCHRIJVER, A.J. SPEEK, H.P. SCHREURS. Semi- automated fluorometric determination of PLP in whole blood by HPLC. *Internat. J. Vit. Nutr. Res*, 1981, 51, 216 - 222.
- [73] - P. EDWARDS, K.S. LIU, G.A. ROSE. A simple liquid chromatographic method for measuring vitamin B<sub>6</sub> compounds in plasma. *Clin. Chem.*, 1989, 35, 241 - 245.
- [74] - A. MUNNICH, H. OGIER, J.M. SAUDUBRAY. Les vitamines : aspects métaboliques, génétiques, nutritionnels et thérapeutiques. Paris : éditions Masson, 1987, 428 p.
- [75] - H.E. SAUBERLICH, J.E. CANHAM. *In : R.S. GOODHARD and M.E. SHILS (eds.). Modern Nutrition in Health and Disease*. Lea and Febiger, Philadelphia USA : 1973.
- [76] - S.P. COBURN, J.D. MAHUREN. A versatile cation-exchange procedure for measuring the seven major forms of vitamin B<sub>6</sub> in biological samples. *Anal. biochem.*, 1983, 129, 310-317.
- [77] - A. LUI, L. LUMENG, T.K. LI. The measurement of plasma vitamin B<sub>6</sub> compounds: comparison of a cation-exchange HPLC method with the open-column chromatographic method and the L. Tyrosine apodecarboxylase assay; *Am. J. Clin. Nutr.*, 1985, 41, 1236-1243.
- [78] - B.M. CHRISLEY, F.W. THYE, H.M. Mc Nair, J.A. DRISKELL. *J. Chromatogr.*, 1988, 428, 35.

- [79] - J.A.DRISKELL, B.M. CHRISLEY. Plasma B<sub>6</sub> vitamer and plasma and urinary 4-pyridoxic acid concentrations in young women as determined using HPLC. *Biomed. Chromatogr.*, 1991, 5, 198-201.
- [80] - B.M. CHRISLEY, H.M. MCNAIR, J.A. DRISKELL. Separation and quantification of the B<sub>6</sub> vitamers in plasma and 4-pyridoxic acid in urine of adolescent girls by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 1991, 563, 369-378.
- [81] - N. HIROSE, N. KUBO, H. TSUGE. Highly sensitive determination of PLP in human plasma with HPLC method. *J. Nutr. Sci. vitaminol.*, 1990, 36, 521-529.
- [82] - D.A. SAMPSON, D.K. O'CONNOR. Analysis of B<sub>6</sub> vitamers and pyridoxic acid in plasma, tissues and urine using HPLC. *Nutr. Res.*, 1989, 2, 259-272.
- [83] - P. EDWARDS, G.A. ROSE. Metabolism of pyridoxin in mild metabolic hyperoxaluria and primary hyperoxaluria (type 1). *Urol. Int.*, 1991, 47, 113-117.
- [84] - M.A. ALLMAN et al. Elevated plasma vitamers of vitamin B<sub>6</sub> in patients with chronic renal failure on regular haemodialysis. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 1992, 46, 679-683.
- [85] - S.K.SHARMA, K. DAKSHINAMURTI. Determination of vitamin B<sub>6</sub> vitamers and pyridoxic acid in biological samples. *J. Chromatogr.*, 1992, 578, 45-51.
- [86] - T. TOUKAIRIN-ODA et al. Determination of vitamin B<sub>6</sub> derivatives in foods and biological materials by reversed-phase HPLC. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 1989, 35, 171-180.

**CHAPITRE V**

**DOSAGE DE LA VITAMINE B<sub>6</sub>  
PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE  
HAUTE PERFORMANCE (partie expérimentale)**

## V.1 - RAPPELS SUR LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (CLHP)

### V.1.a - Historique de la chromatographie en phase liquide

Les débuts de la chromatographie remontent au début du XX<sup>ème</sup> siècle, avec les travaux d'un botaniste russe, M.S. COET, qui sépare et isole ainsi des pigments végétaux. Ainsi apparaît le terme de *chromatographie*, littéralement "enregistrement graphique des couleurs" [1].

Mais ce n'est véritablement que durant les cinquante dernières années que la chromatographie s'est vraiment développée avec l'apparition de méthodes nouvelles qui ont considérablement élargi son champ d'application. Dans les années 40, apparaissent la chromatographie de partage et la chromatographie sur papier, vers 1950, les chromatographies en phase gazeuse et sur couche mince, dans les années 60 la chromatographie d'exclusion ; enfin, depuis 1969, la chromatographie en phase liquide (CPL) "moderne" [2].

On peut en réalité situer à 1958 le début de la chromatographie en phase liquide avec l'introduction par SPACKMAN, STEIN, et MOORE, de l'analyse automatique des acides aminés [2]. Les travaux théoriques de GIDDINGS [3, 4] et la publication, en 1965, de son ouvrage "Dynamics of Chromatography" [5], montrèrent dans quelle voie progresser, tandis que C.D. SCOTT démontrait que l'on pouvait obtenir des résolutions spectaculaires en séparant plusieurs centaines de composés différents dans des liquides physiologiques tels que l'urine et le sérum, par chromatographie d'échange d'ions sous haute pression, avec des durées d'analyse comprises, toutefois, entre 10 et 70 heures. Cette lenteur des séparations en CPL classique était liée aux faibles vitesses d'élution nécessaires en raison de l'efficacité médiocre des colonnes utilisées (0,001 à 0,01 cm. s<sup>-1</sup>). Actuellement, on opère avec des vitesses linéaires de la phase mobile de l'ordre de 0,1 à 1 cm. s<sup>-1</sup>, vitesses comparables à celles de la chromatographie en phase gazeuse dont elle est complémentaire, ce qui rend désormais la CPL tout à fait acceptable. La figure V.1 présente une classification de toutes les méthodes chromatographiques existantes.

On parle ainsi aujourd'hui de chromatographie "à grande vitesse", "sous haute pression", "de haute performance" ("High Performance Liquid Chromatography", HPLC). Elle est devenue une technique d'utilisation courante, qui rend possible de nombreuses découvertes concernant la biochimie et la chimie des substances organiques naturelles complexes.

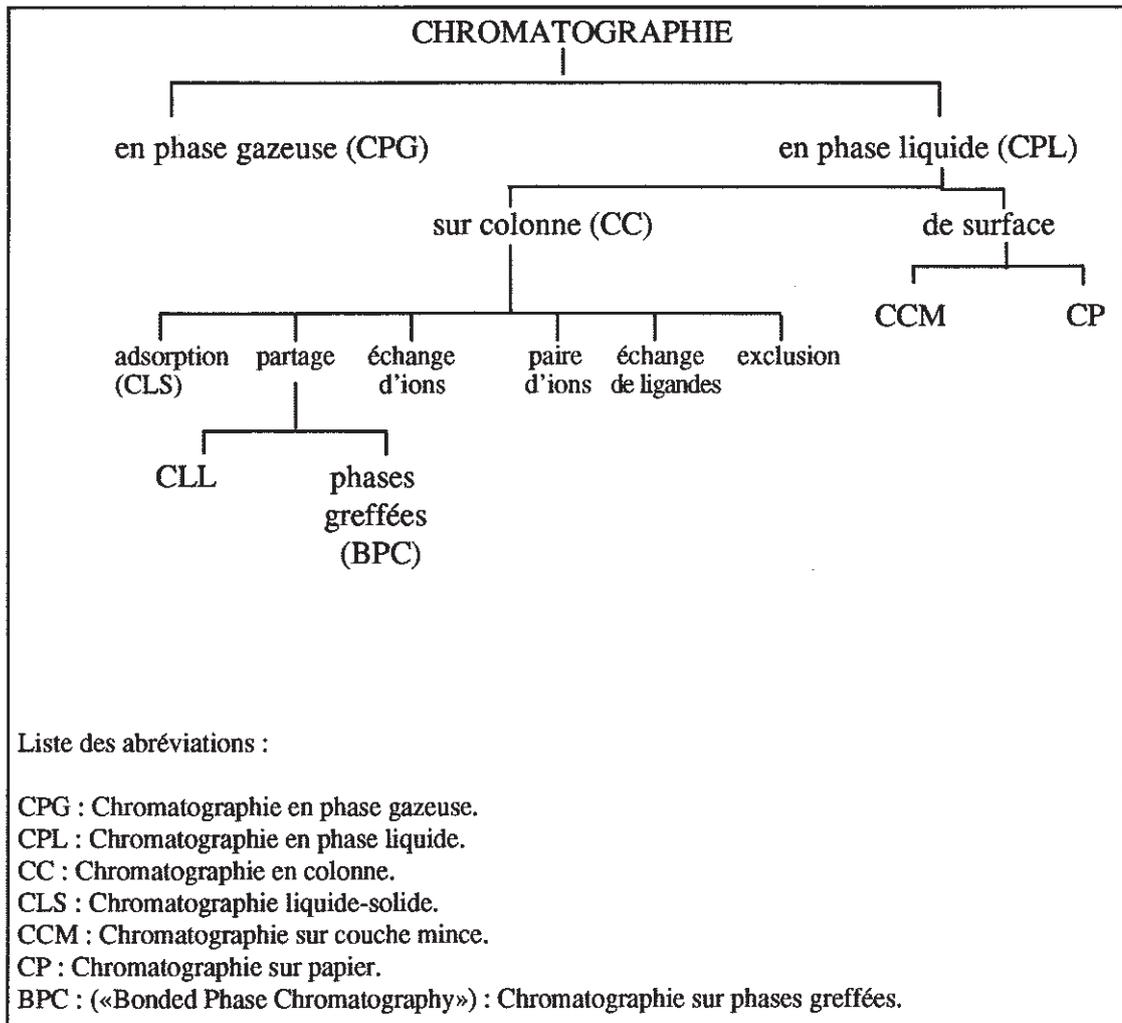


Figure V.1 : Classification des méthodes chromatographiques d'après [2].

### V.1.b - Le système chromatographique

#### 1° - Principe de la CPL

La théorie de la chromatographie liquide est complexe car elle demande la maîtrise de la thermodynamique des solutions, des équilibres et réactions en solution, mais aussi des connaissances sur l'écoulement des fluides et la structure des matériaux poreux.

La chromatographie est avant tout une méthode physique de séparation dans laquelle les composants à séparer sont répartis entre deux phases : l'une d'elles est constituée par un lit de matériau stationnaire, au travers duquel percole la deuxième phase, dite mobile, entraînant les solutés à séparer.

Le processus chromatographique résulte d'adsorptions et de désorptions répétées des solutés lors de leur traversée dans la phase stationnaire (entraînés par la phase mobile). La séparation obtenue est due aux différences entre les coefficients de partage des composants de l'échantillon vis à vis de la phase stationnaire et de la phase mobile.

Ainsi, en fonction de leurs affinités pour ces deux phases, les composants de l'échantillon sont plus ou moins retenus, donc séparés.

## 2° - L'appareillage en CLHP

La figure V.2. présente le schéma des différents organes d'un chromatographe en phase liquide .

Le système chromatographique le plus simple est constitué d'un réservoir de solvant, relié à un système de pompage, un injecteur, une colonne chromatographique, un détecteur et un enregistreur.

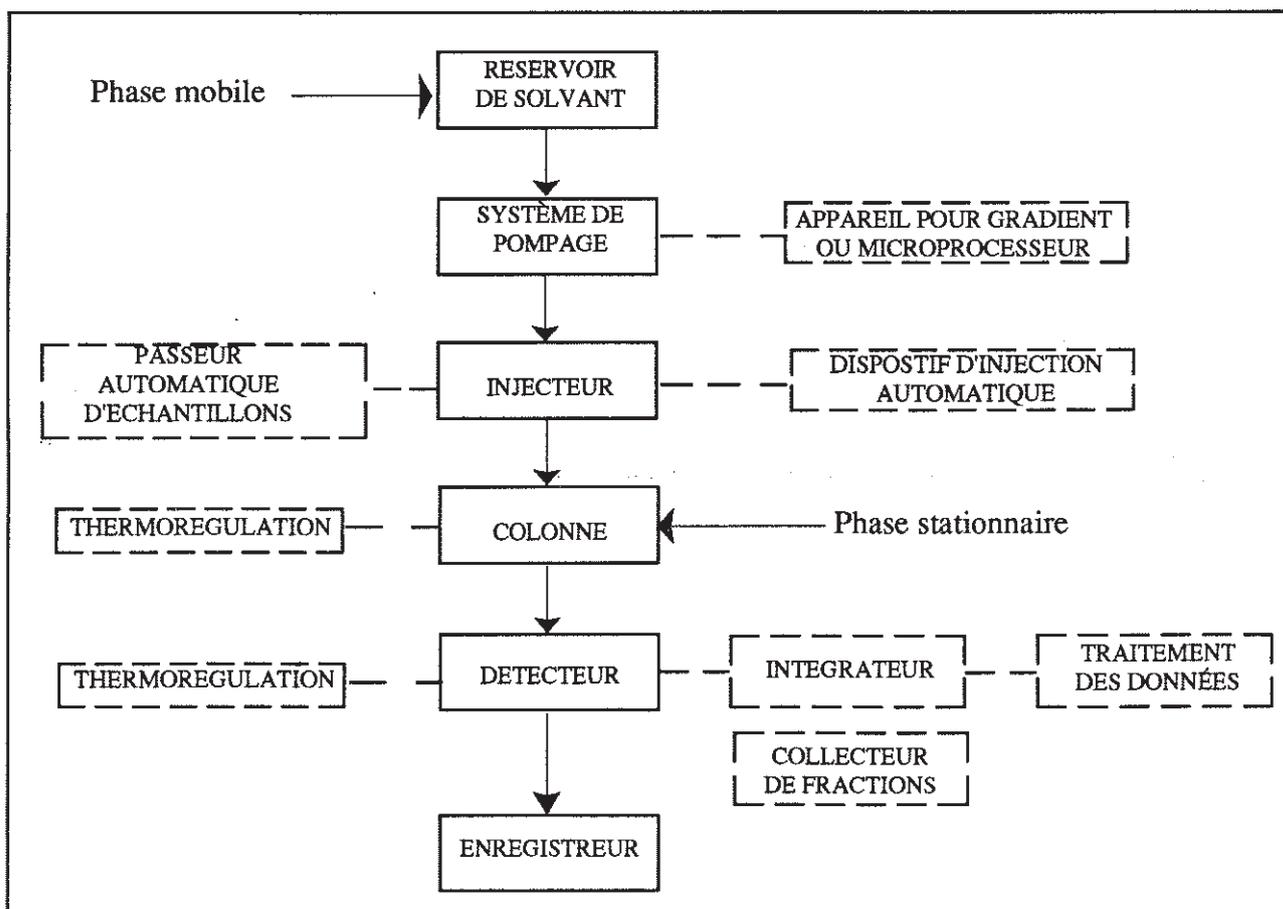


Figure V.2 : Schéma de principe d'un chromatographe en phase liquide.

———— éléments indispensables

- - - - éléments facultatifs

## Remarques

### \* Le réservoir de solvant

Un volume d'au moins un litre est satisfaisant dans la plupart des cas. Il est en général préférable d'utiliser un vase clos pour éviter toute évaporation risquant d'entraîner des modifications de la phase mobile.

Enfin, il est primordial de désoxygéner préalablement le solvant par barbotage d'un gaz inerte tel l'hélium, afin d'éliminer les risques de dégradation des échantillons ou encore la formation de bulles gazeuses dans la cellule du détecteur, celles-ci entraînant un "bruit" inacceptable.

### \* \* Les systèmes de pompage

Ils doivent être suffisamment performants pour avoir des pressions de refoulement supérieures à 100 bars, voire 300 ou 600 bars. Les qualités recherchées sont :

- précision du débit commandé
- constance et reproductibilité
- absence de pulsations
- grandeur de la gamme de débits.

## V.1.c - Grandeurs fondamentales en CLHP

### 1° - Coefficient de partage (ou coefficient de distribution)

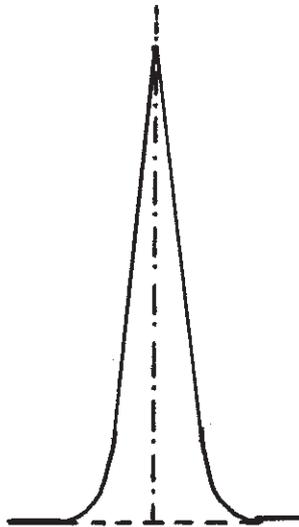
Pour un système chromatographique donné, on caractérise la distribution de chaque soluté entre les deux phases (stationnaire et mobile) par le coefficient de partage  $K$ , défini par la relation :

$$K = \frac{C_s}{C_M} \quad [V.1]$$

où  $C_s$  et  $C_M$  désignent respectivement les concentrations du soluté à l'équilibre dans les phases stationnaire et mobile.

## 2° - Grandeurs de rétention

Si la quantité d'échantillon injectée est suffisamment petite, on obtient pour chaque composé élué un pic symétrique et gaussien :



Pour traduire quantitativement ce phénomène de rétention, on utilise en général trois grandeurs : Temps de rétention, Volume de rétention et Facteur de capacité.

Ces trois valeurs sont caractéristiques du comportement du soluté et traduisent sa vitesse de migration à travers la colonne :

### (a) - Temps de rétention

On appelle **temps de rétention**  $t_R$  le temps d'élution au maximum du pic, mesuré à partir de l'injection.

### (b) - Volume de rétention

On définit le **volume de rétention**  $V_R$  par :

$$V_R = t_R \cdot D \quad [V.2]$$

où  $D$  est le débit de la phase mobile.

Ce volume de rétention  $V_R$  représente, à l'étalement du pic près, le volume de phase mobile nécessaire pour éluer chaque soluté.

Le temps de rétention ou le volume de rétention sont des grandeurs caractéristiques d'un composé, pour une colonne donnée et dans des conditions expérimentales fixées : elles peuvent servir à l'analyse qualitative d'un mélange.

Les espèces non retenues par la phase stationnaire apparaissent dans l'effluent après le temps  $t_0$  correspondant à l'écoulement du volume mort de phase mobile ( $V_0$ ) contenu dans la colonne :

On a :

$$V_0 = t_0 \times D \quad [V.3]$$

où  $t_0$  est le "temps de rétention nulle".

Le volume de rétention  $V_R$  est relié directement au coefficient de partage  $K$  par la relation :

$$V_R = V_0 + K \cdot V_S \quad [V.4]$$

$V_S$  étant le volume de la phase stationnaire.

**remarque** : cette relation ne peut s'appliquer que dans le cas d'une élution linéaire.

### (c) - Facteur de capacité

C'est la grandeur la plus utilisée en CPL.

Pour s'affranchir des paramètres géométriques de la colonne (présence d'un volume mort correspondant au  $V_R$  des solutés non retenus), on utilise, pour caractériser la rétention d'un composé, le facteur de capacité  $k'$ , défini comme le rapport de la quantité de soluté dans la phase stationnaire, à la quantité de soluté dans la phase mobile. On a :

$$k' = \frac{C_S \cdot V_S}{C_M \cdot V_M} = K \cdot \frac{V_S}{V_M} \quad [V.5]$$

où

$C_S$  = concentration du soluté dans la phase stationnaire

$C_M$  = concentration du soluté dans la phase mobile

$V_S$  = volume de phase stationnaire

$V_M$  = volume de phase mobile.

Pour une phase stationnaire donnée, le rapport  $V_S/V_M$  est constant et  $k'$  ne dépend alors plus que de  $K$ .

Le facteur de capacité  $k'$  peut être déterminé expérimentalement au moyen des relations suivantes :

$$k' = \frac{V_R - V_0}{V_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad [\text{V.6}]$$

avec  $t_R$  : temps de rétention du soluté dans la colonne  
 $t_0$  : temps de transit du soluté dans la phase mobile.

De faibles valeurs de  $k'$  indiquent des composés peu retenus, élués peu de temps après le volume de phase mobile contenu dans la colonne, lequel correspond à  $k' = 0$ . Des valeurs élevées de  $k'$  indiquent des composés fortement retenus, élués après un temps d'analyse assez long.

On conçoit, dès lors, que les conditions opératoires d'une analyse résulteront d'un compromis entre une rétention suffisamment élevée pour permettre la séparation, mais pas trop importante pour éviter que le temps d'analyse ne devienne prohibitif.

En pratique, on recherche des valeurs de  $k'$  comprises entre 1 et 10, d'autant plus que la largeur des pics augmente avec  $k'$ , et qu'au delà de 10, la résolution deviendrait difficile.

#### V.1.d - Détection en chromatographie en phase liquide

Le détecteur est l'un des organes essentiels d'un chromatographe en phase liquide puisqu'il permet de suivre en continu la séparation et de mesurer la concentration des solutés.

Il n'existe pas, en CLHP, de détecteur universel d'emploi commode et de grande sensibilité comme en CPG ; mais des détecteurs spécifiques de grande sensibilité d'un emploi aisé et d'un prix abordable ont été mis au point.

On peut classer les nombreux systèmes de détection selon le degré d'information qu'ils peuvent fournir. On distingue alors trois catégories (tableau V.1) :

- les systèmes de détection visualisant simplement le chromatogramme
- les détecteurs semi-informatifs permettant le contrôle de la pureté d'un pic d'éluion (par exemple, rapport des absorbances à deux longueurs d'ondes différentes).
- les détecteurs "intelligents" apportant des éléments d'identification du soluté.

Détecteurs Simples	Détecteurs semi-informatifs	Détecteurs "intelligents"
Ultra violet *	Spectrophotomètre UV * programmable (temps et longueur d'onde)	Spectomètre de masse *
Fluorimètre *	Spectrophotomètre à deux longueurs d'ondes *	Spectrophotomètre à barrette de diodes **
Réfractomètre *	Spectrofluorimètre programmable (temps et longueurs d'onde) *	Spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier **
Electrochimique *	Electrochimique programmable et à plusieurs électrodes indicatrices *	Spectomètre de résonance magnétique nucléaire **
Conductométrie *		
Radioactivité *		
Diffusion de la lumière *		
Polarimètre *		
Réactions de dérivation post et pré colonne *		
Ionisation et émission de flamme **		
Absorption atomique **		

**Tableau V.1 - Classement des détecteurs utilisés en HPLC en fonction du degré de l'information fournie [2,6]**

\* détecteurs commercialisés

\*\* détecteurs à l'étude

Principales caractéristiques d'un détecteur :

Les principales caractéristiques attendues d'un détecteur en chromatographie en phase liquide sont:

- la *sensibilité* (rapport de la réponse du détecteur à la quantité de soluté de l'échantillon), elle varie généralement avec la nature du soluté.
- la *déteçtabilité* (quantité minimale déteçtable), elle est souvent exprimée en multiple du bruit de fond
- la *linéarité*, qui exprime le domaine de concentration dans lequel la réponse du détecteur varie linéairement avec la concentration
- le *bruit de fond*
- le *temps de réponse*.

Quoi qu'il en soit, pour permettre une analyse quantitative précise, un système de déteçtion doit donner une réponse stable, rapide et reproductible donnant une image fidèle du pic chromatographique, et n'altérant pas la qualité de la séparation fournie par la colonne chromatographique.

Actuellement, le spectrophotomètre UV est le plus couramment utilisé (figure V.3), étant donné sa facilité d'emploi, sa relative indifférence aux variations de débit et de température, ainsi que sa transparence vis à vis d'un grand nombre de solvants.

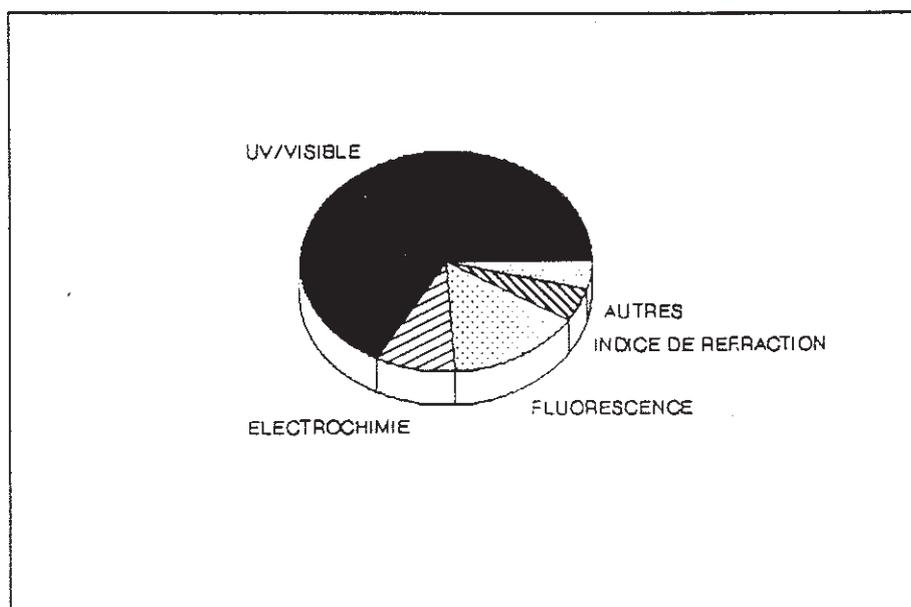


Figure V.3 : Profil d'utilisation des différents types de détecteurs en CLHP [6].

### V.1.e - Les phases stationnaires en CLHP \*

Il existe aujourd'hui sur le marché un grand nombre de phases stationnaires de toute fonctionnalité. Ce sont principalement des *gels de silice* qui sont utilisés.

Le terme «silice» est utilisé pour désigner le dioxyde de silicium.

Un schéma simplifié de la surface d'un gel de silice est donné figure V.4.

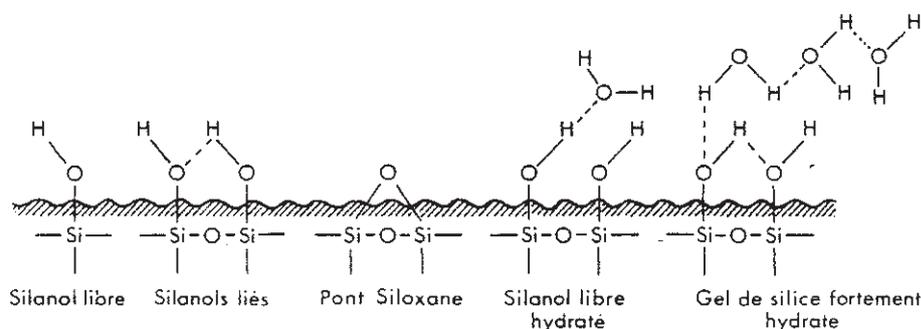


Figure V.4 Schéma simplifié d'un gel de silice [2].

(Les traits pleins représentent les liaisons covalentes, les lignes en tirets, les liaisons hydrogène).

\*Les colonnes de chromatographie utilisées comme contenant des phases stationnaires sont en général en acier inoxydable, elles mesurent de 5 à 25 cm de longueur et elles font 2 à 5 mm de diamètre intérieur.

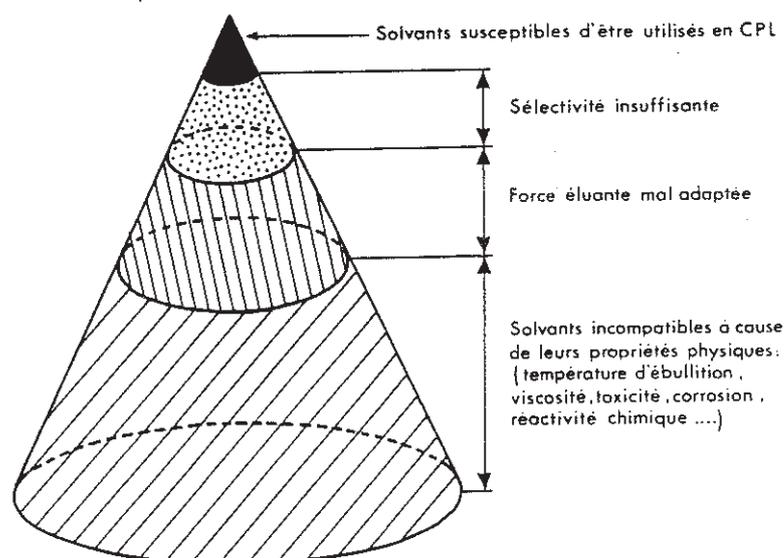
### Les silices greffées

Afin d'améliorer ou de modifier les propriétés déjà remarquables des gels de silice, il est possible de synthétiser **des phases stationnaires greffées** en faisant réagir avec les groupements silanols de la silice, des silanes le plus souvent : l'hydrogène du silanol est alors remplacé par un groupement portant une chaîne hydrocarbonée plus ou moins longue, ce qui permet d'obtenir une grande gamme de phases stationnaires. Il faut remarquer ici le fait que le greffage n'atteint que 25 à 50% des groupements hydroxyles de la silice de départ, et qu'une silice greffée renferme donc encore de nombreux groupements silanols résiduels dont on peut réduire le nombre par "End Capping" (annexe 5).

Ces silices greffées ont une importance considérable en chromatographie, puisqu'on considère que 80% des séparations chromatographiques en phase liquide sont effectués sur des supports greffés.

#### **V.1.f - Les phases mobiles en CLHP**

En théorie, de très nombreux solvants (généralement en mélanges) pourraient être utilisés, mais de nombreuses limitations existent (figure V.6).



**Figure V.6 :** *Sélection des solvants en CPL d'après [2].*

Il existe, concernant ces solvants, un certain nombre de contraintes pratiques :

- Les solvants utilisés ne doivent pas interférer avec le système de détection.
- Si la phase mobile est constituée par plusieurs solvants, ceux-ci doivent être totalement miscibles et les solutés à séparer doivent y être solubles.
- Dans la mesure du possible, on évite les solvants trop volatils à la température ambiante, pour éviter les phénomènes de dégazage et maintenir une composition stable de la phase éluante.
- La pureté des solvants est primordiale en CLHP : certaines impuretés présentes dans la phase mobile peuvent altérer la détection ; l'oxygène dissout doit être éliminé par dégazage à l'hélium ; d'éventuelles traces d'HCl ou d'HBr dans les solvants halogénés peuvent provoquer une corrosion importante de l'acier inoxydable du système chromatographique ; enfin, l'eau utilisée en chromatographie de partage à polarité de phases inversée doit être de la plus grande pureté possible, en particulier lors de la mise en oeuvre d'un gradient d'éluant.

En pratique, les solvants les plus fréquemment utilisés en CLHP sont, soit des mélanges acétonitrile-eau, soit des mélanges méthanol-eau.

### V.1.g - La chromatographie à polarité de phases inversée

Dans le cas d'une **chromatographie à polarité de phases inversée**, le lit de matériau stationnaire est de nature apolaire et la phase mobile est constituée par un liquide polaire (eau, méthanol). Un composé y est retenu d'autant plus longtemps que sa polarité est faible (figure V.5).

Cette classification, familière aux chromatographistes, surprend parfois les nouveaux venus dans le domaine, d'autant que l'on parle souvent de chromatographie en phase inversée ou même simplement, "inverse". La polarité des phases n'est inversée que pour des raisons historiques dans la mesure où, initialement, on avait opéré avec des phases stationnaires polaires et des phases mobiles peu polaires. Il est préférable de dire: chromatographie sur phase stationnaire polaire ou sur phase stationnaire apolaire.

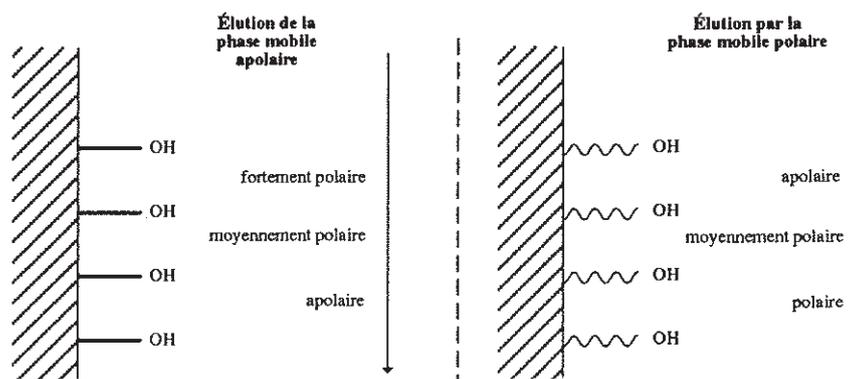


Figure V-5 : Ordre d'éluant des composés d'un échantillon en fonction de la polarité.

## V.2 - ETUDE EXPÉRIMENTALE

### V.2.a - Matériels et méthodes

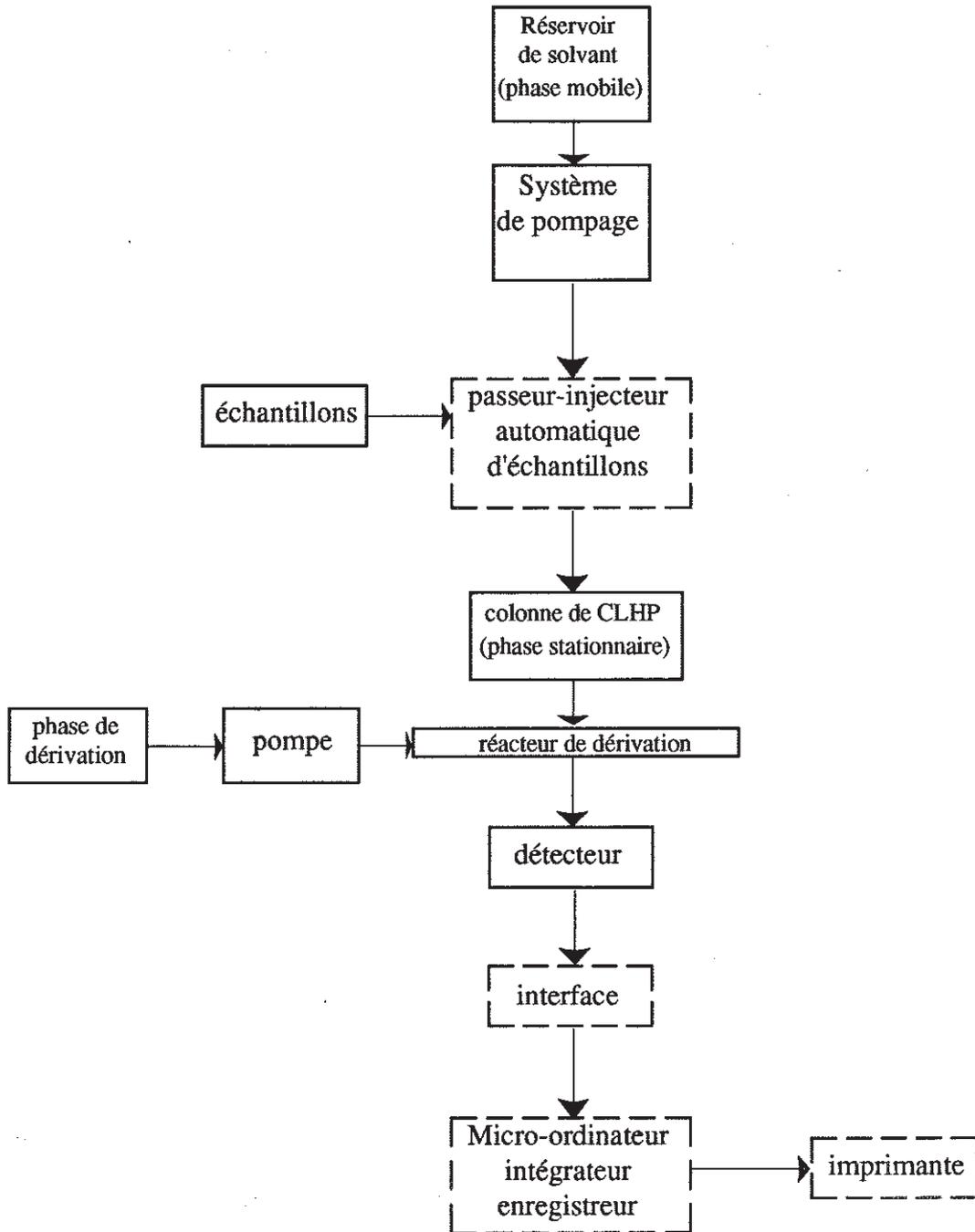
Cette étude expérimentale consiste à mettre au point une technique de dosage de quatre voire six composés vitaminiques B<sub>6</sub> par CLHP, à la valider, et à déterminer les valeurs normales des taux plasmatiques humains de ces 4 vitamines : PLP, PL, PN et PA.

#### 1° - Produits chimiques et réactifs

- phosphate de pyridoxal (PLP)
  - pyridoxal (PL)
  - pyridoxine (PN)
  - acide 4 - pyridoxique (PA)
  - pyridoxamine (PM)
  - phosphate de pyridoxamine (PMP)
  - 4 - déoxypyridoxine (Etalon interne : EI)
- } Sigma Chemical Co, S<sup>t</sup> Louis, Mo, USA.
- dihydrogénophosphate de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) : RP Normapur 99,0% (Prolabo Ref 280 152 94)
  - pentane sulfonate de sodium (Contre-ion : Cl) : Eastman Kodak Company. Rochester.
  - triéthanolamine (TEA) : RP Normapur 98% (Prolabo Ref 287 462 90)
  - acide orthophosphorique ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) concentré : RP Normapur 85% (Prolabo Ref 206 242 95)
  - hydrogénophosphate disodique ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) : RP Normapur 99,5% (Prolabo Ref 280 292 92)
  - hydroxyde de sodium 5 N ( $\text{NaOH}$  5N) : RP Normapur 30% (Prolabo Ref 202 262 93)
  - Métabisulfite de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) : RP Normapur 98,0% (Prolabo Ref 279 202 95)
  - acide chlorhydrique (HCL) 0,01N
  - acide perchlorique ( $\text{HClO}_4$ ) concentré : RP Normapur 65,0% (Prolabo Ref 205 852 90)
  - acétonitrile ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) : Carlo Erba 99,8%.
  - Eau distillée.

#### 2° - Montage expérimental

Le schéma du montage utilisé lors de nos expérimentations est donné figure V.7.



**Figure V.7 :** Schéma du montage expérimental.  
Les éléments figurant en tireté correspondent à ceux utilisés lors de la validation de la technique de dosage, et non lors de sa mise au point.

**Remarque :**

Dans le premier temps de notre étude (mise au point), les injections se sont faites manuellement à l'aide d'une simple boucle d'injection, et le tracé des chromatogrammes avec un intégrateur-enregistreur non informatisé.

### 3° - Appareillage

#### (a) - Le système de pompage

Deux pompes différentes ont été utilisées lors de la mise au point de la technique de dosage des vitamines B<sub>6</sub> d'une part, et lors de la validation et de l'utilisation en routine de cette technique d'autre part.

Lors de la mise au point, c'est une pompe CHROMATOFIELD modèle 501, suivie d'un amortisseur de pulsations, qui a été utilisée.

Lors de la validation de la méthode, cette pompe a été remplacée par un système de pompage PERKIN ELMER série 10.

Le débit a toujours été fixé à 1,2 ml/min.

#### (b) - Les phases mobiles

De nombreuses phases mobiles ont été testées, différant par le pH (2,5 à 4,25) et par la concentration en contre-ion (0,050 à 0,400mg/l). Les autres constituants étant maintenus à concentration fixe : dihydrogénophosphate de sodium (5 g/l) et triéthanolamine (2,6 ml/l) dans de l'eau distillée.

La composition retenue est la suivante :

Dihydrogénophosphate de sodium (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ).....	5 g
Pentane sulfonate.....	270 mg
Triéthanolamine.....	2,6 ml
Eau distillée.....	qsp* 1 000 ml
Acide orthophosphorique concentré.....	qsp* pH = 3,40

Cette phase mobile peut se conserver une semaine en flacon bouché.

Il faut la dégazer à l'Hélium pendant 1 minute, avant l'emploi.

#### (c) - Le système d'injection

Lors de la mise au point de la technique, une vanne Rhéodyne modèle 7125, munie d'une boucle d'injection de 100 µl, a été utilisée.

Par contre, pour la validation et l'utilisation du système en routine, elle a été remplacée par un module d'injection automatique d'échantillons WATERS 712 WISP. L'avantage de disposer d'un tel système plutôt que d'une simple vanne d'injection, est d'éviter des manipulations répétitives nécessitant la présence permanente d'un opérateur. Le volume des échantillons injectés est de 100 µl.

\* qsp : quantité suffisante pour.

(d) - Les colonnes de CLHP

Plusieurs phases stationnaires ont dans un premier temps été testées :

- a - Hypersil C<sub>18</sub>, 100 x 4,6 mm, 3 µm, TOUZART ET MATIGNON
- b - Nucléosil C<sub>18</sub>, 150 x 4,6 mm, 5 µm (remplie au laboratoire de Toxicologie du CHU de Limoges)
- c - Nucléosil C<sub>18</sub>, 150 x 4,6 mm, 5 µm (remplie au laboratoire de Toxicologie du CHU de Limoges)
- d - Ultrabase SFCC C<sub>18</sub>, 250 x 4,6 mm.
- e - Hypersil C<sub>18</sub>BDS, 250 x 4,6 mm, 5 µm, SHANDON
- f - Hypersil BDS phenyl, 250 x 4,6 mm, 5 µm, SHANDON
- g - Nucléosil C<sub>18</sub>, 250 x 4,6 mm, 5 µm, TOUZART ET MATIGNON.

Les deux colonnes Nucléosil C<sub>18</sub> remplies au laboratoire proviennent de deux lots de phase stationnaire différents.

C'est la Nucléosil C<sub>18</sub>, 250 x 4,6 mm, 5 µm, TOUZART ET MATIGNON qui a été retenue pour la validation et les dosages en routine.

(e) - Le dispositif post-colonne de dérivation

Pour détecter PL et PLP, il est nécessaire de les transformer chimiquement en dérivés fluorescents.

C'est pour cela qu'on utilise la phase de dérivation suivante :

Hydrogénophosphate disodique (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	4,4g
Métabisulfite de sodium.....	0,3g
Eau distillée.....	qsp 100 ml
NaOH concentrée.....	qsp pH=11,08

La phase de dérivation étant basique, cette réaction ne peut se faire qu'en post-colonne (la silice est altérée en milieu alcalin).

Cette solution se conserve 4 jours en flacon bouché.

Il faut effectuer, avant utilisation de cette phase, un dégazage d'une minute à l'hélium.

La pompe utilisée est une pompe ELDEX, modèle A-30-5-2., suivie d'un amortisseur de pulsations Touzart et Matignon.. Le débit de la phase de dérivation permettant d'obtenir un pH de 7 à la sortie du détecteur, est voisin de 0,3 ml/min.

Les deux solutions, éluant d'une part et phase de dérivation d'autre part, arrivent par un T de dérivation, puis sont progressivement mélangées dans un réacteur dit de dérivation, constitué d'un capillaire de 2 m de longueur et 1,56 mm de diamètre enroulé en bobine.

(f) - Le détecteur

Le rôle d'un détecteur est de traduire la présence en quantité plus ou moins importante d'une substance en sortie de colonne de CLHP, par un signal de plus ou moins grande intensité. Le phénomène ici mis en jeu pour la détection des composés vitaminiques B<sub>6</sub> est l'aptitude de ces molécules à être fluorescentes, c'est-à-dire à émettre un rayonnement fluorescent lorsqu'elles sont excitées par un rayonnement ultraviolet diffusé par une lampe au xénon.

Le détecteur utilisé est un détecteur spectrofluorimétrique RF - 551 SHIMADZU, doté d'une grande sensibilité.

Les conditions de mesure fixées dans le cadre de notre analyse sont :

- une longueur d'onde d'excitation à 325 nm.
- et une longueur d'onde d'émission à 400 nm.

(g) - Le système d'intégration et d'exploitation des données

Lors de la mise au point de la technique de dosage, un intégrateur-enregistreur de chromatogrammes SHIMADZU CR-3A a été utilisé.

Lors de la validation de la méthode, c'est à un microordinateur de traitement de données TANDON (logiciel STANG) qu'est transmise la mesure effectuée par le spectrofluorimètre et ce par le biais d'une interface NELSON série 900.

Ce système informatique équipé du logiciel STANG permet d'enregistrer et d'interpréter les chromatogrammes obtenus : il fait apparaître systématiquement, pour chaque analyse, les temps de rétention, les hauteurs de pic, les aires des pics, les rapports aire/hauteur, ainsi que, lorsqu'ils ont été mémorisés, les noms des substances dosées, et, lorsqu'une méthode de calcul a été programmée, la concentration en ng/ml.

L'imprimante utilisée est une imprimante EPSON-LX-800.

4° - Collecte et préparation des échantillons de sang

Le sang veineux est collecté dans un tube en verre contenant un anticoagulant (héparinate de sodium) et protégé de la lumière.

La séparation des globules rouges et du plasma se fait par centrifugation à 2 000 tours/min pendant 10 minutes.

Le plasma surnageant, (1ml), subit ensuite une déprotéinisation par addition de 25 µl d'acide perchlorique concentré et de 25 µl d'acide chlorhydrique 0,01N; 25 µl d'étalon interne (solution de 4-déoxypyridoxine à 5 mg/l) sont également ajoutés.

Une bonne mise en contact est réalisée par agitation au VORTEX (1 minute), puis une deuxième centrifugation est effectuée à 3 000 tours/min, pendant 10 minutes. Si un trouble persiste dans le surnageant, une filtration fine peut être réalisée (filtre centrifuge) afin d'obtenir un échantillon prêt à être injecté dans la colonne de CLHP.

Remarque : un plasma peut être congelé à  $-18^{\circ}\text{C}$  en vue de différer une analyse.

#### 5° - Mode de calibration

L'identification des pics obtenus sur un chromatogramme issu d'un échantillon de plasma se fait par comparaison des temps de rétention avec ceux d'étalons connus de vitamine B<sub>6</sub> (PLP, PL, PN, PA, PM et PMP).

La quantification de chaque vitamère se fait selon le mode de l'étalonnage interne : les aires de chaque pic sont comparées à celle d'une substance de référence (étalon interne) introduite en concentration connue et constante dans le mélange. Ce mode de calibration implique l'injection préalable d'une solution de référence contenant des concentrations connues de chaque vitamère et de l'étalon interne. La comparaison s'effectue sur les rapports des aires des pics des solutés et du pic de l'étalon interne, sur le chromatogramme de référence d'une part, et sur celui du dosage d'autre part.

#### 6° - Echantillonnage du groupe témoin

La détermination des taux normaux de vitamine B<sub>6</sub> dans le plasma humain est effectuée à partir des valeurs obtenues pour 28 sujets formant le groupe témoin (17 hommes de 26 à 54 ans, 11 femmes de 13 à 48 ans). Ces sujets sont, pour partie, des personnes venant au Centre de Prélèvement du CHU de Limoges pour une prise de sang, et, pour partie, des membres du personnel du service de Pharmacologie-Toxicologie du CHU de Limoges. Ces sujets sont considérés comme sains.

#### 7° - Taux de recouvrement

Pour déterminer le taux de recouvrement (quantité récupérée après traitement de l'échantillon, en pourcentage) des différents vitamères B<sub>6</sub> du plasma, a été supplémentée en quantités connues de PLP, PL, PN et PA, la moitié d'un échantillon de plasma avant précipitation des protéines, puis les taux des vitamères dans ce plasma supplémenté et ceux dans le plasma non supplémenté ont été comparés.

Les taux de recouvrement ont été déterminés pour des concentrations en PLP, PL, PN et PA de 5, 10, 50 et 100 µg/l selon la formule :

$$\text{taux de recouvrement} = \frac{(\text{hx/hEI dans le plasma supplémenté}) - (\text{hx/hEI dans le plasma non supplémenté})}{\text{hx/hEI dans une solution étalon correspondante}}$$

avec hx = hauteur du pic x, x pouvant être PLP, PL, PN ou PA  
et hEI = hauteur du pic de l'étalon interne.

Le taux de recouvrement déterminé est la moyenne des 5 taux calculés à partir de 5 extractions.

## V.2.b - Résultats et discussion

### 1° - Mise au point d'une technique de dosage de différents vitamines B<sub>6</sub> dans le plasma humain par chromatographie liquide haute performance

Une analyse chromatographique est basée sur la distribution des solutés à séparer, entre une phase mobile et une phase stationnaire. Réaliser une séparation de solutés en vue d'un dosage consiste donc à rechercher un système chromatographique adéquat (phase stationnaire - phase mobile).

L'étude bibliographique présentée au paragraphe IV.2.b montre que la plupart des méthodes récemment proposées s'effectuent avec gradient d'élution (la composition de la phase mobile varie avec le temps); cette technique nécessitant un appareillage adéquat et onéreux, nous avons opté pour un mode d'élution isocratique (la composition de la phase mobile est constante).

Le travail effectué est une modification de la technique proposée par EDWARDS, LIU et ROSE [8].

#### (a) - Etude comparative de 7 phases stationnaires

Les colonnes chromatographiques étudiées ici (d'après [9]) n'ont pas les mêmes caractéristiques, et sont d'origine différente. Etudier ces phases stationnaires est un préalable nécessaire à toute tentative d'amélioration d'une séparation.

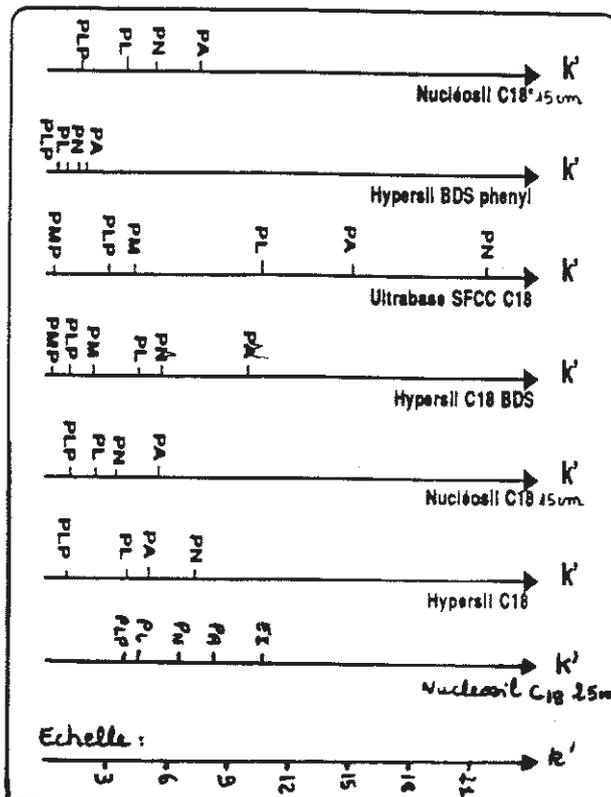


Figure V. 8 : Profil chromatographique d'un échantillon de vitamine B<sub>6</sub> en fonction de la nature de la phase stationnaire utilisée, phase mobile : NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 5 g/l, TEA = 2,6 ml/l, [CI] = 0,350 g/l et pH=3,4.

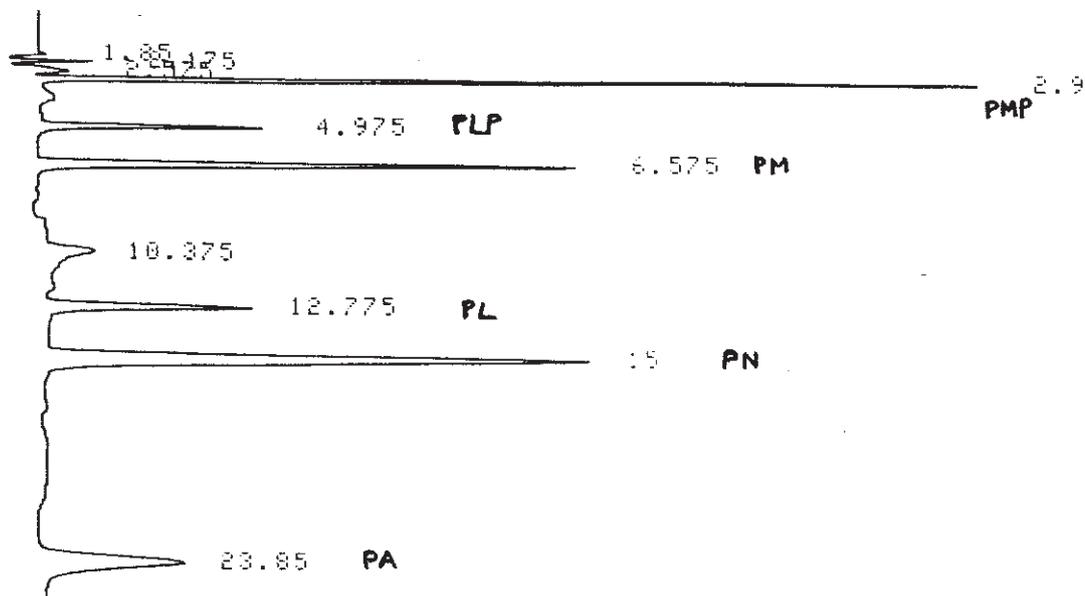
Notons tout d'abord que :

- La phase Ultrabase est de type polymère
- La phase Hypersil BDS présenterait un taux de carbone élevé car elle a subi une réaction de "End capping" (voir Annexe 5)
- Les colonnes Nucléosil C<sub>18</sub> et Nucléosil C<sub>18</sub>\* ont des capacités rétentes différentes, même si les 2 phases stationnaires sont sensées être identiques : ceci est dû au fait que les silices greffées utilisées proviennent de lots différents.

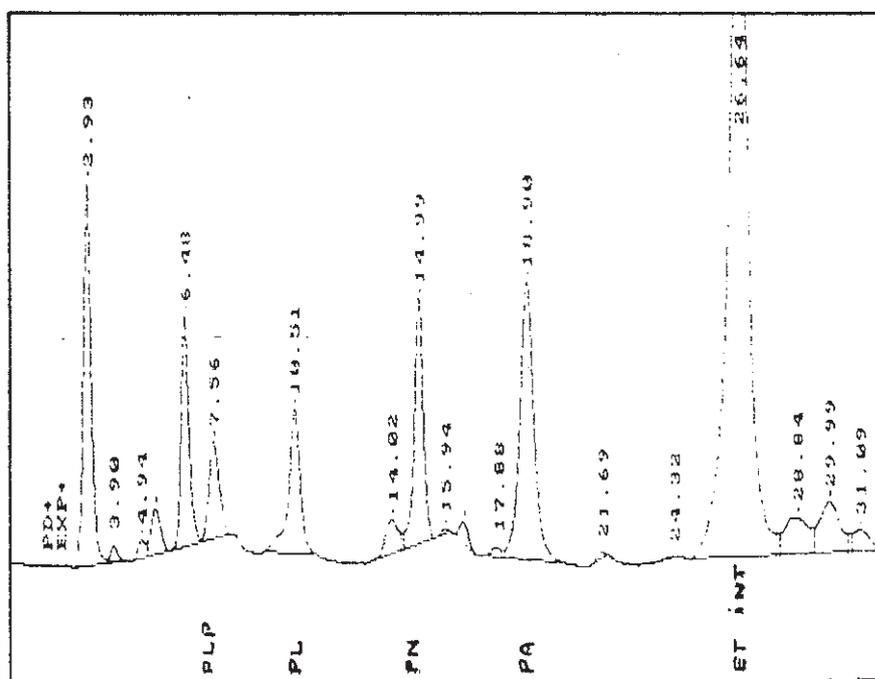
Cette étude nous permet de constater que ces phases possèdent des propriétés rétentes différentes (figure V.8) :

- la phase Hypersil BDS phenyl permet une durée d'analyse très courte (5 min) à l'inverse de l'Ultrabase SFCC C<sub>18</sub> (50 min).
- l'Hypersil C<sub>18</sub> BDS et l'Ultrabase ont des capacités rétentes élevées et permettent de séparer PMP et PM.
- l'Hypersil C<sub>18</sub>, les Nucléosil C<sub>18</sub> et C<sub>18</sub>\* 15 cm sont des colonnes qui permettent une séparation satisfaisante de PLP, PL, PN et PA, mais par contre ne permettent pas de séparer PMP et PM.
- la Nucléosil C<sub>18</sub> 25 cm permet une bonne séparation des 4 composés (et de l'étalon interne) en un temps relativement court (30 min).

Le support Nucléosil C<sub>18</sub> 25 cm semble intéressant pour une séparation de PLP, PL, PN et PA en 21 minutes, et l'Hypersil C<sub>18</sub> BDS pour les 6 composés PMP, PM, PLP, PL, PN et PA en 23 minutes (figures V.9 et V.10).



**Figure V.9 :** Chromatogramme obtenu pour la séparation de 6 composés vitaminiques B<sub>6</sub> par une colonne Hypersil C<sub>18</sub> BDS, 250x4,6 mm, 5µm, SHANDON.



**Figure V.10 :** Chromatogramme obtenu pour la séparation de 4 composés vitaminiques B<sub>6</sub> et d'un étalon interne (DOP) par une colonne Nucléosil C<sub>18</sub>, 250x4,6 mm, 5µm, TOUZART et MATIGNON.

(b) - Etude de la phase mobile

Trois études ont été menées : effet de la triéthanolamine sur la qualité de la séparation, influence de la concentration en pentane sulfonate (contre-ion) et influence du pH. Les deux colonnes utilisées ont été la Nucléosil C<sub>18</sub> 15 cm et l'Hypersil C<sub>18</sub> BDS.

1° - **Influence de la triéthanolamine sur la qualité de l'analyse**

On confère traditionnellement à la TEA un rôle dans l'affinage des pics, ce qui a été confirmé par l'étude rapportée dans le tableau V.2. Il présente les résultats obtenus pour des séparations effectuées avec ou sans TEA dans la phase mobile, sur un échantillon-étalon de PLP, PL, PN et PA en mélange dans de l'eau distillée.

Vitamine	sans TEA	avec TEA (2,6 ml/l)
PLP	k' = 0,89 h = 5 mm	k' = 0,87 h = 21 mm
PL	k' = 1,88 h = 9	k' = 1,49 h = 33
PN	k' = 3,43 h = 30	k' = 2,87 h = 36
PA	k' = 3,74 h = 21	k' = 3,39 h = 35

**Tableau V.2 : Facteurs de capacité k', et hauteurs de pic h obtenus pour 4 vitamines B<sub>6</sub>, avec ou sans adjonction de TEA dans la phase mobile (support: Hypersil C<sub>18</sub> BDS, [CI] = 0,100 g/l; pH = 3,05).**

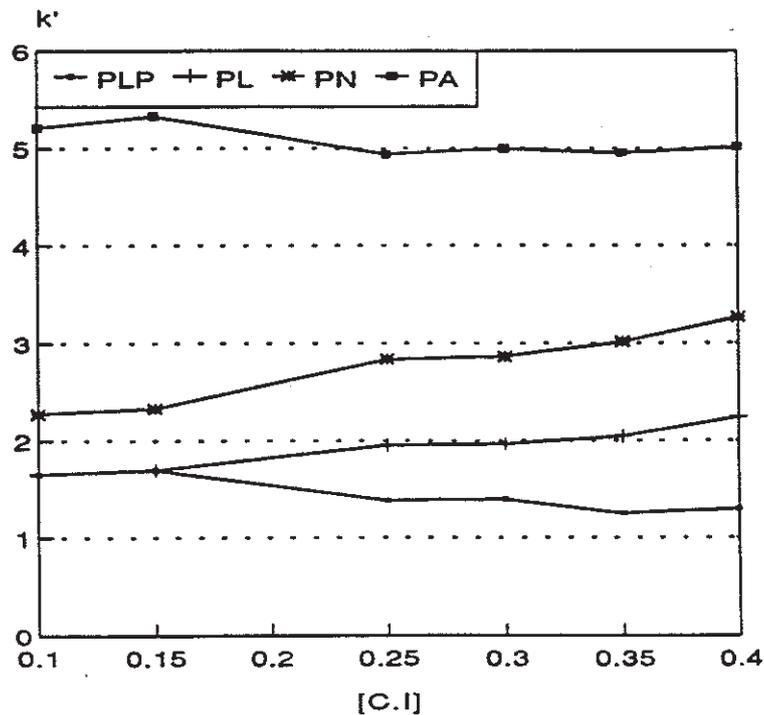
Ce tableau illustre bien le rôle de la TEA dans l'affinage des pics: les pics de PLP et PL sont notamment beaucoup plus hauts, et par conséquent plus fins; on dit que la TEA **augmente l'efficacité de la colonne** vis-à-vis de PLP et PL plus spécialement. En effet, la traîne en queue des pics observée sans ajout de TEA est due à l'effet des silanols résiduels. Cette influence est atténuée par l'ajout de TEA qui interagira préférentiellement avec ces silanols.

## 2° - Influence de la concentration en contre-ion sur la séparation

Le but de l'addition d'un CI dans la phase mobile est d'augmenter la rétention des substances ionisables par la formation d'une paire d'ions. Le mécanisme de rétention dans la chromatographie par appariement d'ions est donné en annexe 6.

Ici, le contre-ion choisi est le pentane sulfonate de sodium.

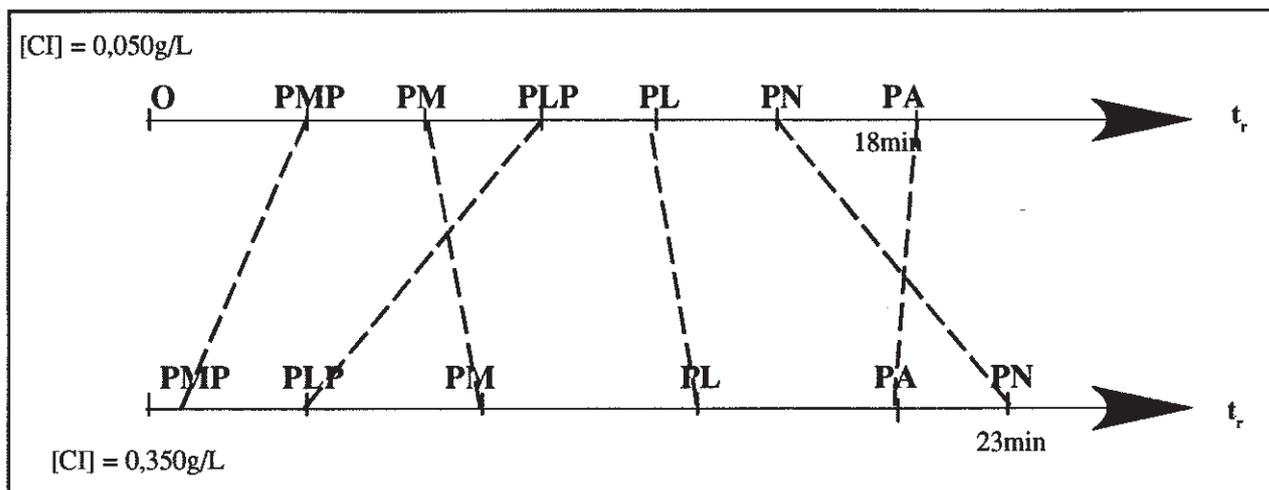
La figure V.11 présente les résultats obtenus sur la colonne Nucléosil C<sub>18</sub> 15 cm, le pH étant fixé à 3,5.



**Figure V.11.** Influence de la concentration en contre-ion sur la séparation de 4 vitamines B<sub>6</sub> (support : Nucléosil C<sub>18</sub> 15 cm. ; pH = 3,5) d'après [2].

Ainsi, l'ajout de concentrations croissantes de contre-ion dans la phase mobile engendre, pour certains composés (PL et PN), une augmentation du facteur de capacité k' ; pour d'autres (PA et PLP), une tendance inverse.

Une autre étude a été effectuée sur le support Hypersil C<sub>18</sub> BDS dans le but d'étudier l'influence du contre-ion sur 2 vitamines supplémentaires, PMP et PLP, rajoutés au mélange-étalon et leur comportement pour 2 concentrations de CI est rapporté figure V.12.



**Figure V.12.** : Influence de 2 concentrations différentes en contre-ion sur l'ordre de sortie des 6 vitamines B<sub>6</sub> (support : Hypersil C18 BDS ; pH : 3,4)

Ainsi, plus on augmente la concentration de CI, plus les composés phosphorylés (PMP et PLP) voient leur temps de rétention diminuer, plus les composés non phosphorylés (PL, PN, PM) sont retardés et le PA peu influencé. D'autres teneurs en contre-ion ont été étudiées et ont montré l'existence d'une zone de concentrations en CI (vers 0,110g/l) où PLP et PM ont des facteurs de capacité trop voisins pour être séparés.

### 3° - Influence du pH de la phase mobile sur la séparation

Le pH est ajusté par l'ajout d'acide orthophosphorique concentré en fin de préparation de la phase mobile.

La figure V.13 présente les résultats obtenus pour la colonne Nucléosil C<sub>18</sub> 15 cm, la concentration en pentane sulfonate dans la phase mobile étant fixée à 0,350g/l.

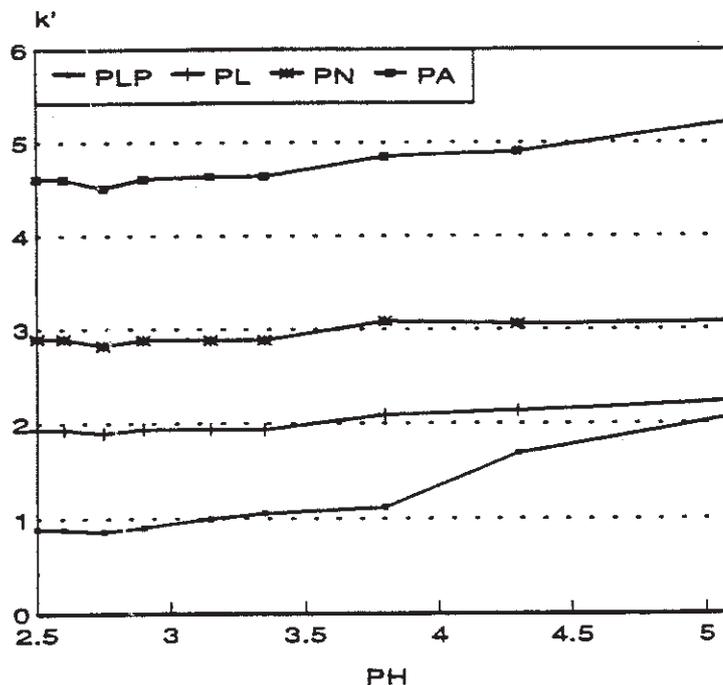


Figure V.13 : Influence du pH sur la séparation de 4 vitamines B<sub>6</sub> (support Nucléosil C<sub>18</sub> 15 cm ; Concentration de Cl = 0,350g/l) d'après [2].

Ainsi entre pH = 2,5 et pH = 3,5, le facteur de capacité  $k'$  des différents solutés étudiés ne varie pas significativement. Au-delà de cet intervalle et jusqu'à pH=5, l'influence du pH est variable selon les composés :

- PN et PL ne semblent pas être influencés.
- PA voit sa rétention augmenter sensiblement avec le pH.
- PLP est retenu de façon plus importante quand le pH augmente. La variation est particulièrement nette entre pH = 4,2 et pH = 3,8.

Une étude similaire a été réalisée avec le support Hypersil C<sub>18</sub> BDS afin d'étudier l'effet du pH sur la rétention du PMP et PM. Il semblerait d'après cette étude que PMP et PM ne soient pas influencés par ces variations de pH.

Remarque :

L'effet du pH est retrouvé lors de la préparation des échantillons. En effet, il a été constaté que l'ajout d'acide perchlorique, par similitude avec la préparation d'un échantillon de plasma où l'acide perchlorique joue le rôle d'agent précipitant des protéines plasmatiques, influence la rétention des vitamines (le tableau V.3 montre les facteurs de capacité obtenus pour les vitamines étalon préparés avec ou sans HClO<sub>4</sub>).

C'est pour cette raison que dans tous les étalons est ajouté de l'acide perchlorique.

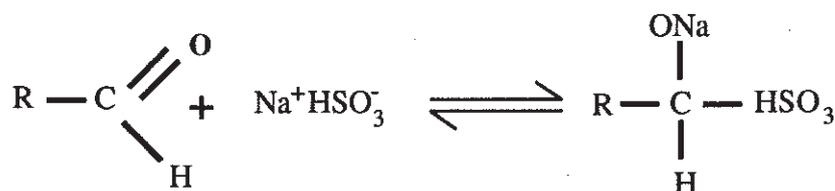
VITAMÈRE	sans HClO <sub>4</sub>	avec HClO <sub>4</sub>
PLP	k' = 1,46	0,86
PL	1,9	1,44
PN	3,52	2,74
PA	4,24	3,16

**Tableau V.3 :** Influence de la présence ou non d'acide perchlorique (HClO<sub>4</sub>) dans un échantillon-étalon ( [Cl] = 0,100g/l; pH= 3,05; support Hypersil C<sub>18</sub> BDS).

On observe ainsi que l'acidification de l'échantillon-étalon (outre son rôle de précipitation des protéines plasmatiques) a une influence sur la séparation des vitamines.

(c) - Dérivation post-colonne et détection

Le PLP et le PL sont rendus fluorescents par l'action d'ions bisulfites sur leur fonction aldéhyde selon la réaction suivante :



Le produit formé est fluorescent, mais instable aussi bien en milieu acide qu'en milieu basique. C'est pourquoi la phase de dérivation a un pH basique afin de neutraliser le pH acide de la phase mobile et d'obtenir un pH neutre dans le réacteur.

(d) - Remarque

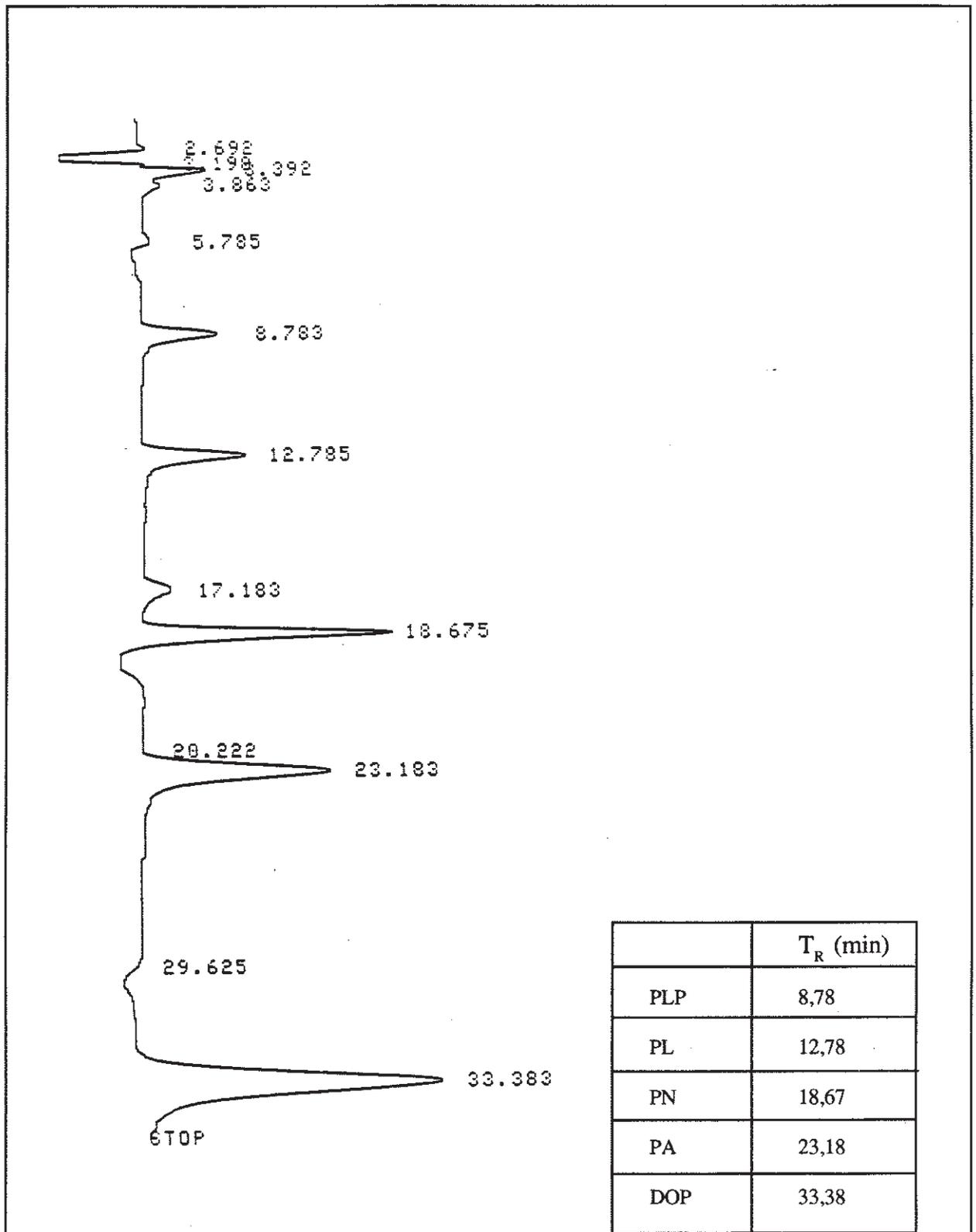
Lors de cette étude, il a été constaté que la durée de vie des colonnes est courte. Cela peut être dû, d'une part au fait que la phase mobile est très riche en eau, et d'autre part au fait que la phase de dérivation est basique.

Malgré les performances de la colonne Hypersil C<sub>18</sub> BDS, le support Nucléosil C<sub>18</sub> a été retenu pour la réalisation des analyses de routine et ce pour des raisons économiques. Ce support permet de réaliser la séparation des 4 vitamines (PLP, PL, PN et PA). Il ne permet pas de séparer PMP et PM, mais ces derniers n'ont pas un grand intérêt clinique..

Ainsi toute la validation a été réalisée avec une colonne Nucléosil C<sub>18</sub>, 25 cm, en utilisant une phase mobile contenant : NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5g/l, TEA 2,6 ml/l, pentane sulfonate 0,270 g/l, à un pH de 3,4.

2° - Validation de la technique de dosage

Nous avons obtenu une bonne résolution pour les 4 vitamines avec le procédé de CLHP décrit précédemment. Un profil complet peut être effectué toutes les 34 minutes. Un chromatogramme représentatif obtenu par cette technique avec une solution étalon contenant 4 composés vitaminiques B<sub>6</sub> (PLP, PL, PN et PA) est montré figure V.14. L'ordre d'élution est le suivant : PLP, PL, PN, PA et DOP (étalon interne).



**Figure V.14. :** Chromatogramme représentatif d'une solution-étalon de 4 composés vitaminiques B<sub>6</sub> et de 4-Déoxypyridoxine.

Lors de la validation d'une technique de dosage, plusieurs aspects doivent être étudiés : la linéarité, la reproductibilité, la répétabilité, la sensibilité et la limite de détection ainsi que le taux de recouvrement (ou pourcentage de récupération).

(a) - Etude de la linéarité

Nous avons supplémenté des échantillons provenant d'un mélange de plasmas, avec des quantités connues croissantes des 4 composés vitaminiques B<sub>6</sub> étalons: PLP, PL, PN, et PA, ainsi que de l'étalon interne: DOP (5 µg/l, 10 µg/l, 50 µg/l et 100 µg/l, pour chacun des 5 composés). Nous avons ensuite réalisé 5 courbes (droites de calibration) montrant les rapports des hauteurs des pics des solutés sur la hauteur du pic de l'étalon interne, en fonction des concentrations des solutés, chaque courbe correspondant à un soluté donné (annexe 7). L'étude a été réalisée 5 fois.

Les coefficients de régression linéaire obtenus pour les 5 composés sont tous supérieurs à 0,995 (Tableau V.4).

	PLP	PL	PN	PA
coefficient de régression linéaire	0,9970	0,9998	0,9996	0,9997
	0,9992	1,0000	0,9993	0,9996
	0,9951	0,9991	1,0000	0,9996
	0,9990	0,9966	0,9996	0,9983
	0,9997	0,9991	0,9995	0,9999
moyenne	0,9980	0,9989	0,9996	0,9994

**Tableau V.4 :** *Essai de linéarité pour 4 composés vitaminiques B<sub>6</sub> dans du plasma supplémenté et pour des concentrations allant de 5 µg/l à 100 µg/l : coefficients de régression pour 5 courbes de 5 niveaux de concentration différents.*

(b) - Etude de la reproductibilité

Les solutions étalons utilisées contiennent les 4 composés vitaminiques B<sub>6</sub> en concentrations identiques à celles utilisées pour l'étude de la linéarité, à savoir 5, 10, 50 et 100 µg/l pour chaque vitamère.

Le tableau V.5 montre que la technique de CLHP proposée est reproductible puisque les coefficients de variation obtenus sont tous inférieurs à 10% entre 5 et 100 µg/l.

	concentration de la solution injectée (µg/l)	concentration déterminée par le dosage (µg/l) moyenne ± écart type, n = 5	concentration coefficient de variation (%)
<b>PLP</b>	5	5,21 ± 0,52	9,97
	10	10,36 ± 0,57	5,50
	50	58,78 ± 3,74	6,36
	100	95,94 ± 1,84	1,91
<b>PL</b>	5	4,95 ± 0,28	5,58
	10	9,72 ± 0,79	8,18
	50	54,71 ± 6,20	11,33
	100	97,70 ± 3,00	3,07
<b>PN</b>	5	4,92 ± 0,13	2,67
	10	9,35 ± 0,70	7,52
	50	52,83 ± 1,29	2,44
	100	98,66 ± 0,59	0,60
<b>PA</b>	5	4,78 ± 0,19	3,95
	10	9,64 ± 0,75	7,80
	80	51,74 ± 2,42	4,68
	100	99,18 ± 1,16	1,17

**Tableau V.5 :** *Essai de reproductibilité pour 4 composés vitaminiques B<sub>6</sub> dans du plasma supplémenté et pour des concentrations allant de 5µg/l à 100 µg/l : coefficients de variation sur 5 jours.*

(c) - Etude de la répétabilité, ou précision

Seuls les résultats obtenus pour une solution de 10 µg/l de PLP, PL, PN et PA injectée 5 fois sont rapportés tableau V.6 : pour chaque composé et pour tous les niveaux de concentration étudiés, le coefficient de variation est inférieur ou égal à 5%.

	concentration obtenue (µg/l) (moyenne ± écart type)	coefficient de variation (%)
PLP	12,09 ± 0,34	2,86
PL	11,11 ± 0,17	1,52
PN	14,29 ± 0,31	2,16
PA	10,97 ± 0,55	5,02

**Tableau V.6 :** *Etude de la précision sur 5 injections successives d'une solution de plasma supplémenté en PLP, PL, PN et PA à hauteur de 10 µg/l.*

(d) - Taux de recouvrement

Les taux de recouvrement obtenus pour des plasmas supplémentés en PLP, PL, PN et PA à 4 concentrations différentes, sont donnés tableau V.7. Ils sont compris entre 92 et 109%.

concentration des vitamines ajoutés	PLP	PL	PN	PA
5 µg/l	92,3%	94,2%	99,0%	98,9%
10 µg/l	99,6%	93,7%	93,5%	97,3%
50 µg/l	109%	99,6%	102,3%	97,3%
100 µg/l	98%	99,1%	99,0%	99,7%

**Tableau V.7 :** *Taux de recouvrement (%) de PLP, PL, PN et PA ajoutés à des échantillons de plasma en concentrations variables.*

(e) - Limite de détection

La limite de détection de chaque vitamère est définie comme la concentration pour laquelle le signal du pic est égal à deux fois celui du bruit de fond. Dans cette étude, la limite de détection est voisine de 1 µg/l pour PLP, PL et PA, et de 0,5 µg/l pour PN.

(f) - Limite de quantification

La limite de quantification est la concentration la plus faible pour laquelle le coefficient de variation est inférieur à 10%. Elle est de 5 µg/l pour chaque composé vitaminique B<sub>6</sub>.

3° - Détermination des valeurs normales des taux de PLP, PL, PN et PA dans le plasma humain

Les résultats obtenus pour nos témoins apparemment sains sont consignés dans le tableau V.8.

vitamères	fourchette des valeurs (µg/l)	moyenne ± écart type (n = 28) (µg/l)
PLP	6 à 27	11 ± 4
PL	0 à 8,5	3 ± 1,4
PN	0 à 13	2,7 ± 2,5
PA	0 à 8,5	3,8 ± 1,8

**Tableau V.8 :** Taux (µg/l) de vitamères B<sub>6</sub> chez 28 sujets apparemment sains.

## CONCLUSION

La technique proposée a l'avantage de s'effectuer en mode isocratique et d'utiliser un étalon interne permettant de pallier aux erreurs induites par la préparation de l'échantillon et par le volume injecté.

Certes cette méthode ne permet de séparer que 4 vitamines, mais il a été montré, lors de cette étude, que la séparation des six formes principales de vitamine B<sub>6</sub> est possible en choisissant un support chromatographique adéquat (Hypersil C<sub>18</sub> BDS).

La validation de cette technique de dosage a donné une excellente linéarité pour la zone de concentrations allant de 5 à 100 µg de vitamine/l, une bonne reproductibilité et une bonne répétabilité dès des concentrations de 5 µg/l, des taux de recouvrement compris entre 92 et 109%, une détectabilité à 1 µg/l pour PLP, PL et PA, et à 0,5 µg/l pour PN. La quantification est possible à partir de 5 µg/l pour chacun des quatre composés.

Cette technique a permis la détermination des valeurs normales de ces 4 vitamines B<sub>6</sub> dans le plasma humain : 6 à 27 µg/l pour PLP, moins de 8,5 µg/l pour PL, moins de 13 µg/l pour PN et moins de 8,5 µg/l pour PA, et est actuellement utilisée en routine.

## Références bibliographiques du chapitre V

- [1] - R. YOST, L. ETTRE, R. CONLON. Practical Liquid Chromatography, an introduction, 1980.
- [2] - R. ROSSET, M. CAUDE, A. JARDY. Chromatographies en phases liquide et supercritiques, 3<sup>ème</sup> éd., Paris : Masson, 1991.
- [3] - J.C GIDDINGS. *Anal. Chem.*, 1961, 5, 61.
- [4] - J.C GIDDINGS. *Anal. Chem.*, 1963, 35, 1338.
- [5] - J.C GIDDINGS. Dynamics of chromatography, New-York : Ed. Dekker, 1965.
- [6] - R. BOUSSENADJI. Détection UV et électrochimique en microchromatographie en phase liquide. Applications : antioxydants et pesticides. Thèse de Doctorat en Chimie Analytique, Lyon I, 1992.
- [7] - J.N. BROWN, M. HEWINS, J.H.M. VANDERLINDEN, R.J. LYNCH. *J. Chromatogr*, 1981, 204, 115.
- [8] - P. EDWARDS, K.S. LIU, G.A. ROSE. A simple liquid chromatographic method for measuring vitamin B<sub>6</sub> compounds in plasma. *Clin. Chem.*, 1989, 35, 241-245.
- [9] - K. SAUNIER. Mise au point d'une technique de dosage de la vitamine B<sub>6</sub> et de ses métabolites par Chromatographie Liquide Haute Performance. Mémoire de D.U.T., Limoges, 1993, 36p.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Les vitamines, nutriments organiques le plus souvent d'apport exogène, sont indispensables en très faible quantité pour assurer le métabolisme des cellules vivantes. On les classe en deux catégories : les vitamines liposolubles et les vitamines hydrosolubles.

Parmi ces dernières, on trouve la vitamine B<sub>6</sub>, connue également sous le nom de pyridoxine. La vitamine B<sub>6</sub> existe sous six formes différentes, au moins : le phosphate de pyridoxal (PLP), le pyridoxal (PL), la pyridoxamine (PM), la pyridoxamine phosphate (PMP), la pyridoxine (PN) et l'acide pyridoxique (PA). Des interconversions entre ces différentes formes surviennent dans l'organisme au cours de leur métabolisme, et sous l'action de kinases et d'oxydases.

La forme active de la vitamine B<sub>6</sub> est le phosphate de pyridoxal (PLP) qui intervient, en tant que cofacteur indispensable, auprès de systèmes enzymatiques tels que les transaminases et les décarboxylases des acides aminés.

De nombreux états physiopathologiques impliquent la vitamine B<sub>6</sub>, directement ou indirectement. Les déficiences et les carences sont le plus souvent soit physiologiques (grossesse, allaitement...), soit consécutives à des comportements sociaux (alcoolisme), ou à des traitements médicamenteux (déficiences iatrogènes). Les maladies métaboliques pyridoxino-dépendantes sont dûes à des mutations congénitales de gènes responsables de la synthèse d'enzymes pyridoxino-dépendantes. Enfin, des surdosages en vitamine B<sub>6</sub> sont possibles, contrairement à ce que l'on pensait encore il y a peu, du fait du caractère potentiellement toxique de la vitamine B<sub>6</sub>, d'où l'intérêt de disposer de méthodes d'exploration des statuts vitaminiques B<sub>6</sub>.

La technique de dosage qui a été proposée dans la partie expérimentale est fondée sur une séparation par CLHP de 4, voire de 6 composés vitaminiques B<sub>6</sub> plasmatiques humains, et sur leur détection par spectrofluorimétrie.

Le support, choisi pour ses capacités rétentives, est un Nucléosil C<sub>18</sub> qui permet la séparation de 4 vitamines (PLP, PL, PN et PA) ; toutefois, la séparation de 6 vitamines est possible en utilisant un support Hypersil C<sub>18</sub> BDS.

L'élution s'effectue en mode isocratique et la quantification est réalisée à l'aide d'un étalon interne (4-Déoxypyridoxine).

La validation de cette technique a montré son excellente linéarité pour la zone de concentrations allant de 5 à 100 µg/l, sa bonne reproductibilité et sa bonne répétabilité à partir de concentrations de 5 µg/l. Les taux de recouvrement obtenus sont compris entre 92 et 109%. La détectabilité est de 1 µg/l pour PLP, PL et PA, et de 0,5 µg/l pour PN, et la limite de quantification de 5 µg/l pour chacun des 4 composés.

Cette technique a permis la détermination des valeurs normales de ces 4 vitamines B<sub>6</sub> dans le plasma humain : 6 à 27 µg/l pour PLP, moins de 8,5 µg/l pour PL, moins de 13 µg/l pour PN et moins de 8,5 µg/l pour PA.

Annexe 1

SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'ULTRAVIOLET (UV) DE LA PYRIDOXINE [\* ]

Le spectre UV du chlorhydrate de pyridoxine dans l'éthanol neutre est montré figure A.1 Il présente un maximum d'absorption à environ 291 nm ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 523$ ). Dans une solution d'éthanol basique, le spectre UV du chlorhydrate de pyridoxine est différent (figure A.2) : il présente 2 maxima d'absorption, à 245 et 307 nm. Enfin, dans un tampon phosphate à pH = 7, deux maxima d'absorption sont observés à 324 et 254 nm ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 345$  et  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 183$ , respectivement).

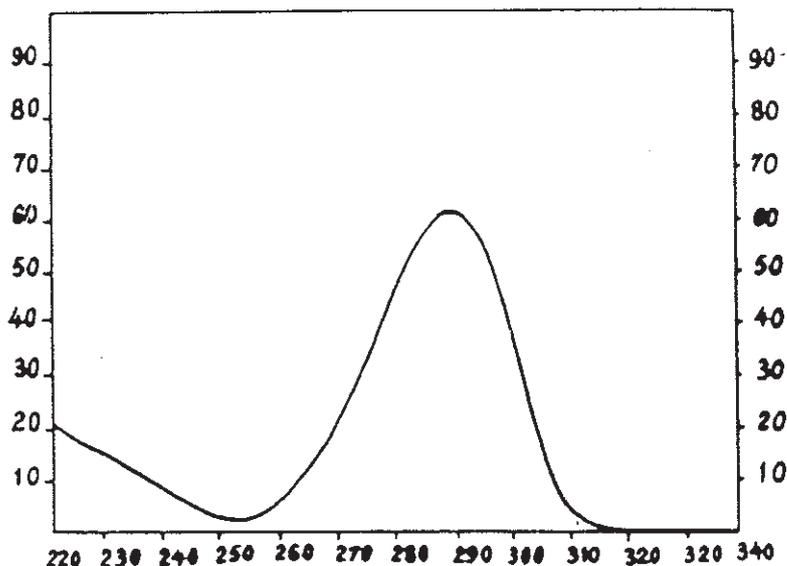


Figure A.1 : Spectre UV du chlorhydrate de pyridoxine dans l'éthanol neutre.

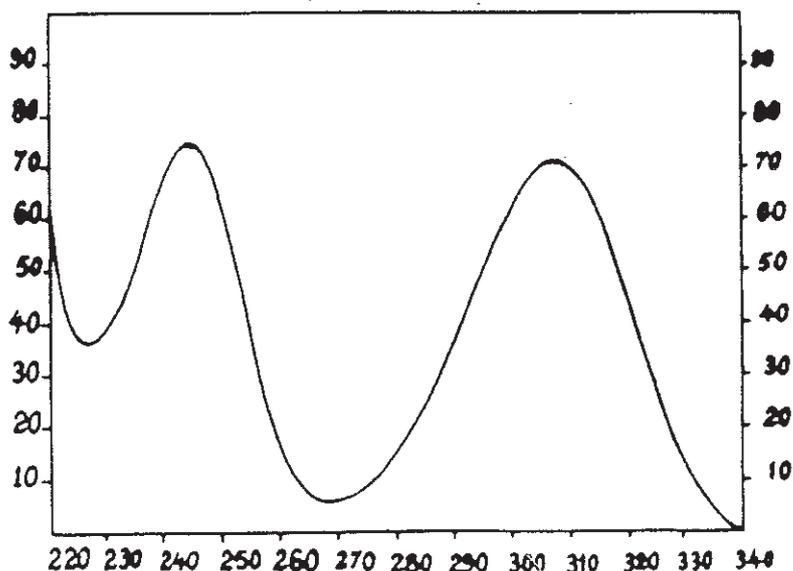


Figure A.2: Spectre UV du chlorhydrate de pyridoxine dans l'éthanol basique.

[\* ] HASSAN Y. ABoul-ENEIN, MOHAMMED A. LOUFTY. Pyridoxin hydrochloride, Analytical Profiles of Drug Substances, 13, American Pharmaceutical association, 1984, 447-486.

Annexe 2

SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'INFRAROUGE (IR) DE LA PYRIDOXINE [\* ]

Le spectre IR du chlorhydrate de pyridoxine dans une pastille de bromure de potassium (KBr) est montré sur la figure A.3 ci-dessous.

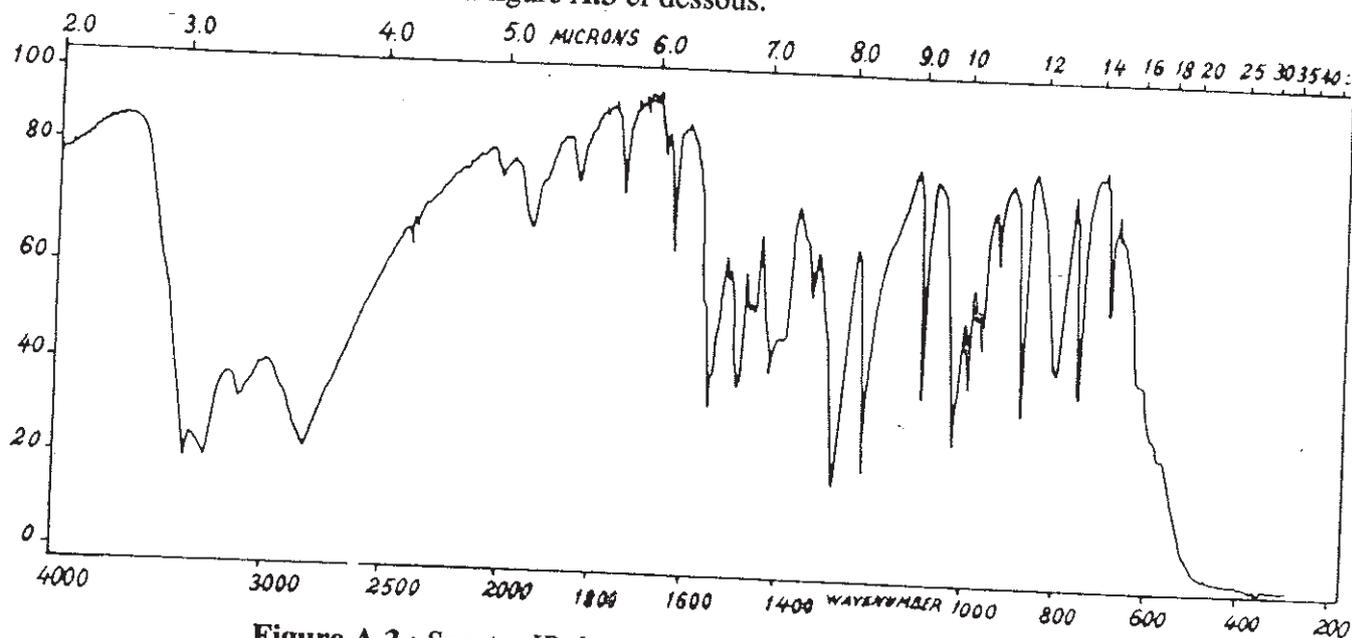


Figure A.3 : Spectre IR du chlorhydrate de pyridoxine (pastille de KBr).

Les principales bandes d'absorption sont à  $3340\text{ cm}^{-1}$ ,  $3250\text{ cm}^{-1}$ ,  $1630\text{ cm}^{-1}$  et  $1550\text{ cm}^{-1}$ , ainsi qu'à  $1275\text{ cm}^{-1}$ ,  $1220\text{ cm}^{-1}$ ,  $1100\text{ cm}^{-1}$ , et  $1570\text{ cm}^{-1}$ .

[\* ] HASSAN Y. ABOUL-ENEIN, MOHAMMED A. LOUFTY. Pyridoxin hydrochloride, Analytical Profiles of Drug Substances, 13, American Pharmaceutical association, 1984, 447-486.

Annexe 3

SPECTRE EN RÉSONNANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE (RMN) DE LA PYRIDOXINE [\* ]

Le spectre obtenu en RMN du proton à 60MHz pour le chlorhydrate de pyridoxine dans de l'eau deutériée ( $D_2O$ ), est donné figure A.4.

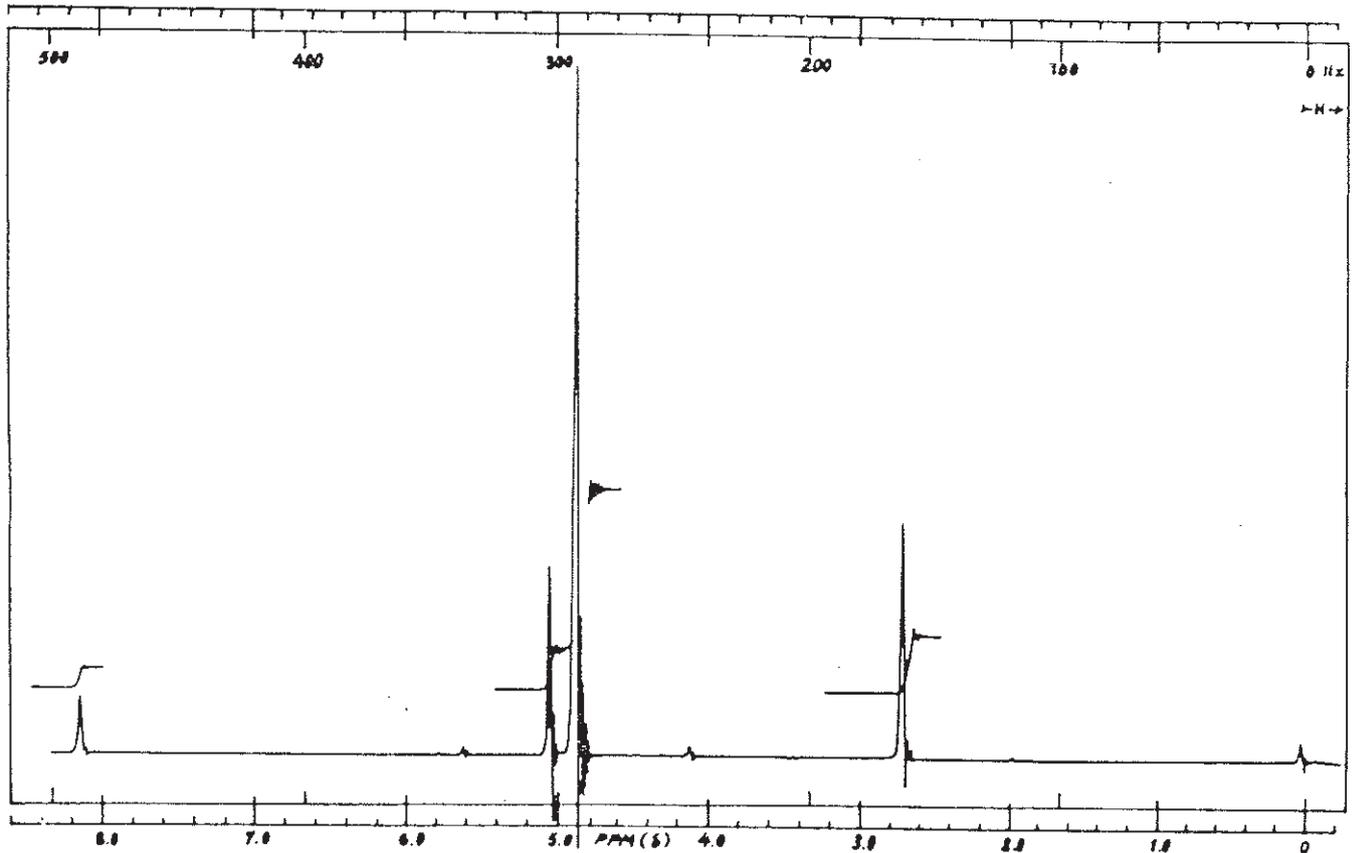
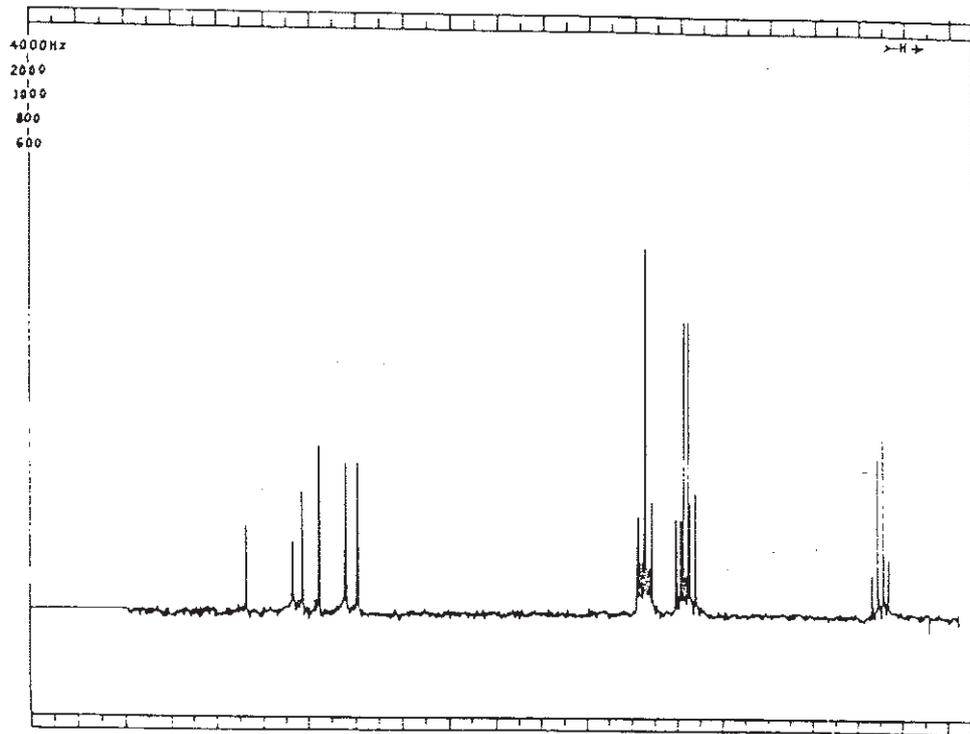


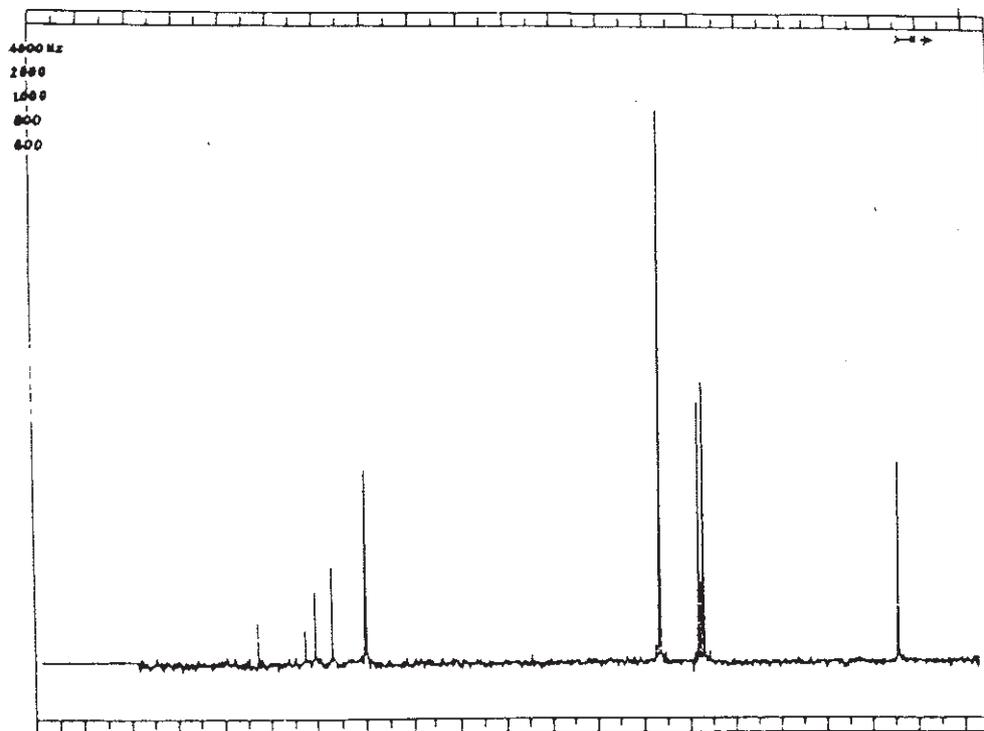
Figure A.4 : Spectre RMN du proton du chlorhydrate de pyridoxine dans de l'eau deutériée ( $D_2O$ ) à 60MHz.

Le spectre obtenu en RMN du carbone à 20MHz pour le chlorhydrate de pyridoxine dans de l'eau deutériée ( $D_2O$ ), en utilisant le dioxane comme ligne de référence, est montré figure A.5 ("Off resonance") et figure A.6 (proton découplé).

Le dioxane apparaît à 67,39 ppm.



**Figure A.5 :** Spectre RMN du carbone "off resonance" du chlorhydrate de pyridoxine dans de l'eau deutériée ( $D_2O$ ) à 20MHz [\* ].



**Figure A.6 :** Spectre RMN du carbone "proton découplé" du chlorhydrate de pyridoxine dans de l'eau deutériée ( $D_2O$ ) à 20MHz [\* ].

[\* ] HASSAN Y. ABOUL-ENEIN, MOHAMMED A. LOUFTY. Pyridoxin hydrochloride, Analytical Profiles of Drug Substances, 13, American Pharmaceutical association, 1984, 447-486.

## Annexe 4

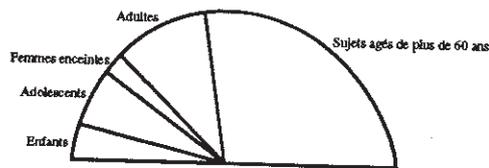
RISQUE DE DÉFICIENCE EN VITAMINE B<sub>6</sub> DANS DIVERSES POPULATIONS [\* ]

Réf.	Nombre de sujets	Age (ans)	Lieu	Mode de vie	Méthode de dosage	Déficient %
[1]	424	1-12 mois 49-60 mois	Thaïlande -	- -	alpha EGOT* -	11 31
[2]	96 garçons 90 filles	Adolescents Adolescentes	U.S.A -	- -	PLP alpha EGPT* PLP alpha EGTP	7 7 26 18
[3]	127	Adolescents Femmes enceintes	U.S.A	Faibles revenus	alpha EGTP	68
[4]	35	3-4	U.S.A	-	PLP	9
[5]	656	Adultes	France	Hôpital	alpha EGOT	25
[6]	629 hommes 748 femmes	Adultes -	Allemagne (Heidelberg)	- -	alpha EGOT -	11 18
[7]	1152	Hommes et femmes adultes	Suisse (Bâle)	- -	alpha EGOT -	15,5 25,9
[8]	155 hommes 180 femmes	Adultes -	France (Bourgogne) -	- - - -	alpha EGOT PLP alpha EGOT PLP	15,0 20,0 16,0 21,2
[9]	50 hommes 50 femmes	60-85 -	Yougoslavie -	Institution -	alpha EGOT -	59 43
[10]	99 hommes 99 femmes	64-89 -	Hollande -	Domicile -	alpha EGOT -	23 29
[11]	58	Sujets âgés	Israël	Kibboutz	alpha EGOT	32
[12]	41 78	60-95 -	U.S.A -	Institution Domicile	alpha EGPT -	27,3 17,9
[13]	45 199	66-96 Sujets âgés	Hollande Finlande	Résidence Domicile	PLP alpha EGOT PLP alpha EGOT	27 26 33 9
[14]	14 hommes 15 femmes	> 60 -	Italie du Nord	Institution -	alpha EGOT -	14 7
[15]	31 hommes 53 femmes	> 60 -	France (Dijon)	Institution -	alpha EGOT -	50 58
[16]	31 hommes 29 femmes	> 60 -	France -	Institution -	alpha EGOT PLP alpha EGOT PLP	71 71 69 86
[17]	47	65 et >	Irlande (Belfast)	Hôpital	alpha EGPT	49

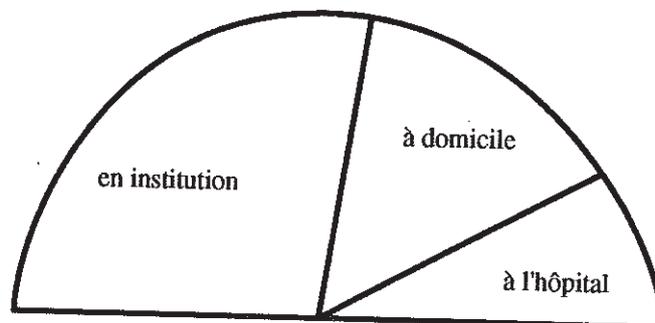
\* "alpha EGOT" et "alpha EGPT" désignent 2 techniques enzymatiques : l'une consiste en la mesure du coefficient d'activation (CA) de la Transaminase Glutamino Oxaloacétique, l'autre en celle du CA de la Transaminase Glutamino Pyruvique.

L'étude bibliographique de J.C. GUILLAND et B. LEQUEU sur les risques de déficience en vitamine B<sub>6</sub> dans diverses populations L'étude bibliographique de J.C. GUILLAND et B. LEQUEU sur les risques de déficience en vitamine B<sub>6</sub> dans diverses populations [\*] peut être interprétée de la façon suivante.

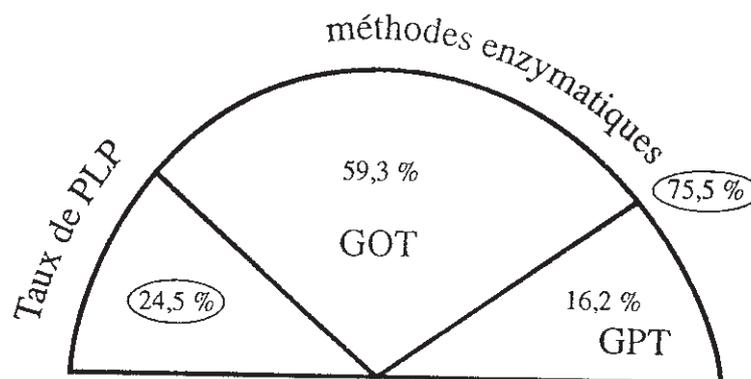
- 17 publications portant sur 27 études différentes ont été recensées.
- Le nombre de sujets de l'échantillon varie de 14 à 1 152 (en moyenne, 308 sujets).
- Les études se répartissent selon la catégorie de population étudiée :



- 47% des publications ont tenu compte du sexe dans leurs études.
- Les 27 études se répartissent sur 11 pays différents dont 23,5% concernent les U.S.A. et 23,5% la France.
- 59% des études ont mentionné le lieu de vie :

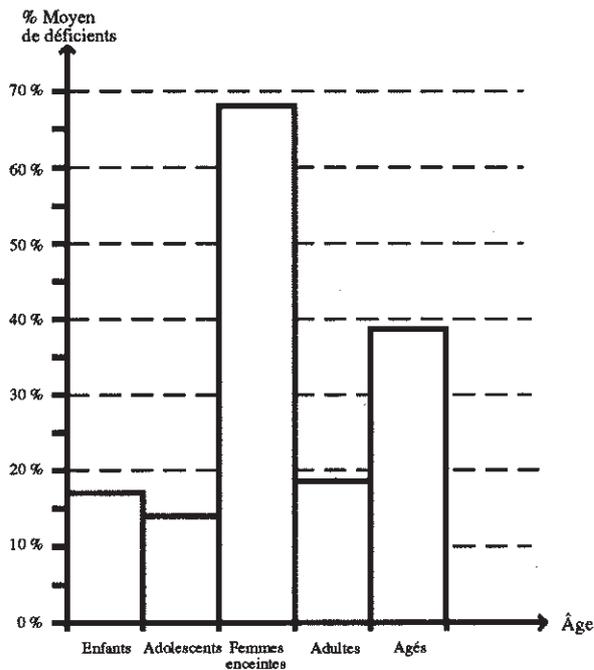


- Différentes méthodes d'évaluation du statut en B<sub>6</sub> ont été utilisées :



- Toutes les études ont trouvé des sujets déficitaires en vitamine B<sub>6</sub> au minimum 7% (adolescents aux U.S.A) et au maximum 86% (Femmes > 60 ans vivant en institution, en France). En moyenne, les publications découvrent 31% de sujets déficitaires.

- Etude selon l'âge



Les populations "à risque" sont surtout les femmes enceintes, les personnes âgées vivant en collectivité et les adolescentes.

- Globalement la méthode d'évaluation du statut par dosage du PLP a déterminé, en moyenne, 33,5% de sujets déficitaires.

Quant aux méthodes enzymatiques, elles déterminent 30,2% de déficiences, (29,8% par étude de la GOT, 31,2% par étude de la GPT)

-Au total, les publications ont obtenu, en moyenne, 31% de sujets déficitaires, toutes catégories confondues.

#### Références bibliographiques de l'annexe 4

- [1] - S. CHANGBUMRUNG *et al.* Pyridoxine status in preschool children in Northeast Thailand : a community survey. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1985, 41, 770-775.
- [2] - J.A. DRISKELL, S.W. MOAK. Plasma pyridoxal phosphate concentrations and coenzyme stimulation of erythrocyte alanine aminotransferase activities of white and black adolescent girls. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1986, 43, 599-603.
- [3] - K. SCHUSTER, L.B. BAILEY, C.S. MAHAN. Vitamin B<sub>6</sub> status of low-income adolescent and adult pregnant women and the condition of their infant at birth. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1981, 34, 1731-1735.
- [4] - M.E. FRIES, M.B. CHRISLEY, J.A. DRISKELL. Vitamin B<sub>6</sub> status of a group of preschool children. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1981, 34, 2706-2710.
- [5] - A. LEMOINE, C. LE DEVEHAT, J.L. CODACCIONI, A. MONGES, P. BERMOND, R.M. SALKELD. Vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> and C status in hospitalized patients. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1980, 33, 2595-2600.
- [6] - L. ARAB, B. SCHELLENBERG, G. SCHLIERF. Nutrition and Health. A survey of young men and women in Heidelberg. *Ann. Nutr. Metab.*, 1982, 26(suppl.1), 1-244.
- [7] - G. BRUBACHER, G. RITZEL. Zur Ernährungssituation der schweizerischen Bevölkerung ; erster schweizerischer Ernährungsbericht. Berne, Hans Huber, 1975.
- [8] - M.J. COSTA DE CARVALHO. Evaluation du statut nutritionnel en Bourgogne. Thèse de 3<sup>e</sup> cycle, Université de Bourgogne, 1987.
- [9] - K. SUBOTICANEC *et al.* Nutritional status, grip strength, and immune function in institutionalized elderly. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 1989, 59, 20-28.
- [10] - J. SCHRIJVER, B.W.C. VAN VEELLEN, W.H.P. SCHREURS. Biochemical evaluation of the vitamin and iron status of an apparently healthy Dutch freeliving elderly population. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 1985, 55, 337-350.
- [11] - E. HAVIVI, N. LEVIN, A. RESHEF. Nutritional status in elderly population in Kibbutzim. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 1985, 55, 352-355.
- [12] - L.H. CHEN, W.L. FAN-CHIANG. Biochemical evaluation of riboflavin and vitamin B<sub>6</sub> status of institutionalized and non-institutionalized elderly in central Kentucky. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 1981, 51, 232-238.
- [13] - M. TOLONEN, J. SCHRIJVER, T. WESTERMARK *et al.* Vitamin B<sub>6</sub> status of finnish elderly. Comparison with Dutch younger adults and elderly. The effect of supplementation. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 1988, 58, 73-77.
- [14] - F.FIDANZA, R. COLI, P DAMIANI *et al.* Nutritional status of a group of institutionalised elderly people in Perugia (Italy). *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 1988, 58, 85-91.

- [15] - L.S. ASCIUTTI-MOURA. Evaluation du statut nutritionnel vitaminique B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, C, A et E chez des personnes âgées en hospitalisation de longue durée. Thèse de 3<sup>e</sup> cycle, Université de Bourgogne, 1987.
  
- [16] - J.C. GUILLAND, B. BERESKI-REGUIG, B. LEQUEU, D. MOREAU, J. KLEPPING. Evaluation of pyridoxine intake and pyridoxine status among aged institutionalised people. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 1984, 54, 185-193.
  
- [17] S.C. VIR, A.H.G. LOVE. Vitamin B<sub>6</sub> status of the hospitalized aged. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1978, 31, 1383-1391.

Annexe 5

LE TRAITEMENT PAR "END-CAPPING"

Le principe du "end-capping" (ou "recouvrement final") est de soumettre une silice greffée à l'action de triméthylchlorosilane (TMCS),  $\text{ClSi}(\text{CH}_3)_3$ . Ce réactif réagit alors (figure A.8) avec les nombreux silanols résiduels (figure A.7) persistant encore après greffage de la silice.

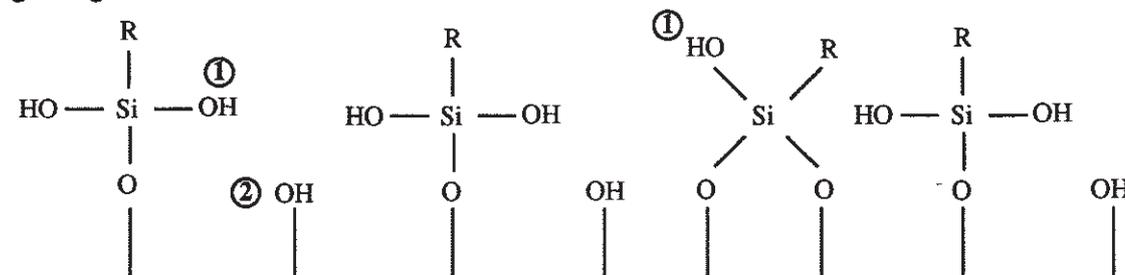


Figure A.7 : Silanols résiduels en surface d'une silice greffée par un silane trifonctionnel.

① silanols par hydrolyse

② silanols libres

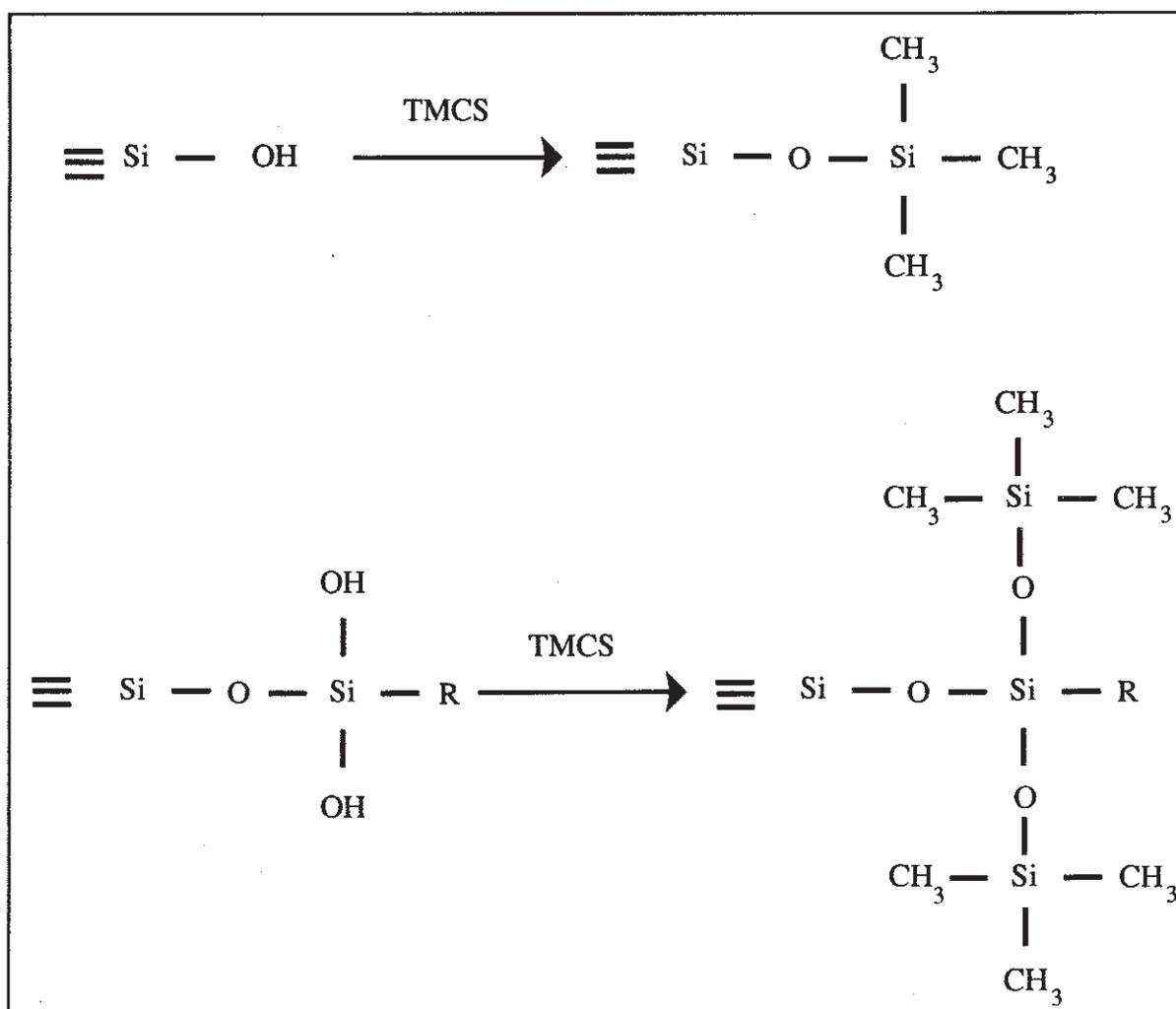


Figure A.8 : Réaction entre une silice greffée et du triméthylchlorosilane (TMCS) ou "End Capping".

Le but d'un tel traitement des silices greffées est de soustraire les molécules de soluté à l'influence des silanols résiduels, c'est-à-dire d'empêcher l'action des silanols résiduels sur les solutés, et même s'il existe encore de nombreux OH après un tel traitement, ceux-ci ne sont pas accessibles au soluté dès lors que la chaîne R est suffisamment longue.

Remarque :

La présence de silanols résiduels étant inévitable, on limite souvent leur influence par l'addition, dans la phase mobile, d'un composé adsorbé préférentiellement, ce qui supprime (ou diminue) la traîne en queue des pics chromatographiques. Un additif classique est la triéthanolamine à une concentration voisine de 1,5% en volume.

Annexe 6  
L'ACTION D'UN CONTRE-ION

Remarque:

Un milieu de faible constante diélectrique est un milieu qui conduit peu le courant électrique, c'est-à-dire pauvre en ions.

Propriété fondamentale des paires d'ions

C'est leur aptitude à passer des solutions aqueuses vers les milieux de faible constante diélectrique.

Chromatographie de paires d'ions sur phase stationnaire apolaire

1) Description du système chromatographique

- On utilise : - soit des silices greffées (alkyle, octyle, octadécyle...)  
- soit un copolymère de styrène divinylbenzène

La phase mobile est un mélange binaire eau-acétonitrile, eau-méthanol ou eau-éthanol contenant le contre-ion qui est, le plus souvent, un ion organique comportant une ou plusieurs chaînes hydrophobes, et un tampon de pH approprié.

Il y a distribution du contre-ion, des solutés ionisés et des paires d'ions entre la phase mobile polaire et la phase stationnaire apolaire.

2) Mécanismes de rétention

On a d'abord proposé deux mécanismes macroscopiques :

- a) Le CI ayant une chaîne hydrophobe est adsorbé par les chaînes alkyle de la silice: on parle d'échangeur d'ions "dynamique" (voir figure A.9).  
b) Le soluté et le CI forment une paire d'ions qui est adsorbée par la phase stationnaire apolaire.

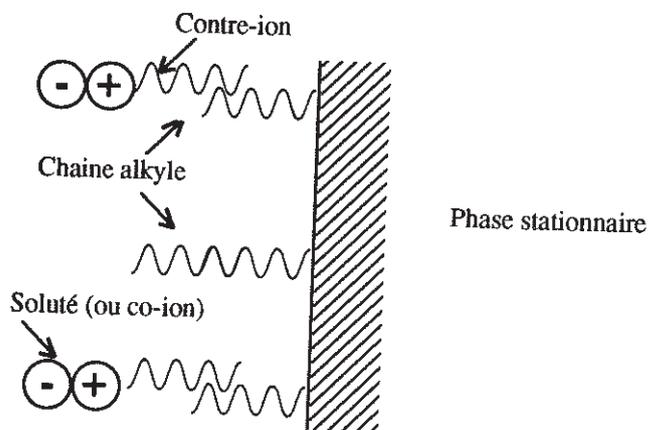


Figure A.9 : Echangeur d'ions "dynamique".

On peut raisonner simplement en disant que les CI se fixent à la surface des chaînes alkyles par effet hydrophobe, la partie ionisée, hydrophile, étant dirigée vers la phase mobile que la présence d'eau rend polaire.

Actuellement, on s'accorde pour considérer qu'il s'agit d'un mécanisme par formation d'une double couche électrique à l'interface solide hydrophobe - phase mobile.

Lorsqu'à la fois le soluté et le contre-ion sont des ions organiques volumineux, les 2 ions peuvent être adsorbés à la surface du solide hydrophobe. Toutefois, l'adsorption de l'un d'eux prédomine, soit en raison de sa nature, soit parce que sa concentration est plus grande. Cette dernière situation est celle du contre-ion en chromatographie de paire d'ions.

Plus simplement, on considère que l'adsorption de la paire d'ions soluté-contre-ion est d'autant plus importante que le contre-ion et le soluté sont plus hydrophobes et la phase mobile plus hydrophile (faible proportion de solvant organique dans le mélange binaire).

### Contres-ions

Anioniques	Cationiques
Alkyl et arylsulfonates Pentane sulfonate Hexane sulfonate Heptane sulfonate Octane sulfonate Dodécane sulfonate Campho sulfonate Naphtalène sulfonate	Ammonium quaternaires Tétraméthyl ammonium Tétra éthyl ammonium Tétra butyl ammonium Tétra heptyl ammonium Cétyl triméthyl ammonium (cétrimide) Palmityl triméthyl ammonium
Alkyl sulfates Hexyl sulfate Octyl sulfate Décyl sulfate Dodécyl sulfate	Amines protonées Octyl ammonium Trioctyl ammonium
Anions inorganiques Trifluoroacétate Trichloroacétate Phosphate Perchlorate	

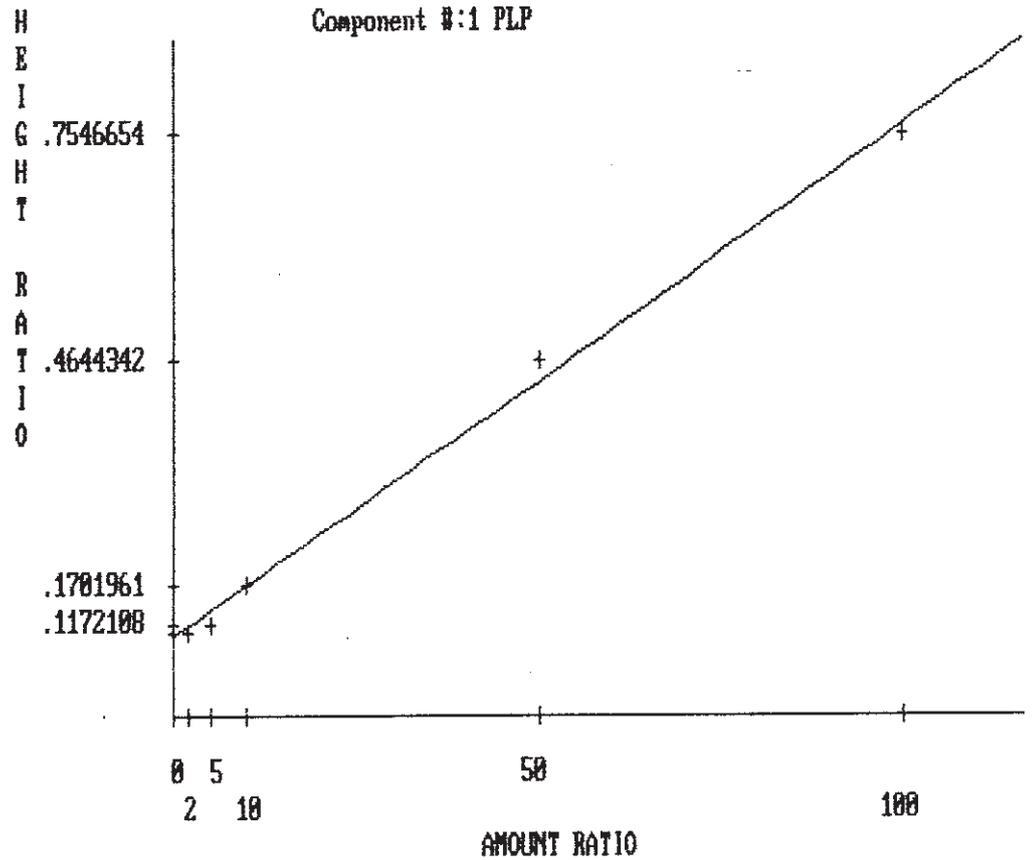
**Tableau A.1 : Principaux CI utilisés (d'après ROSSET) [\*].**

[\*] R. ROSSET, M. CAUDE, A. JARDY. et collaborateurs. Chromatographie en phase liquide et supercritique, 3<sup>ème</sup> édition, Paris : MASSON, 1992.

Annexe 7

UN EXEMPLE DE CALIBRATIONS OBTENUES POUR 4 COMPOSÉS VITAMINIQUES B<sub>6</sub>  
 ET POUR L'ÉTALON INTERNE DANS LE CADRE DE L'ÉTUDE DE LA LINÉARITÉ  
 DE NOTRE TECHNIQUE DE DOSAGE DE LA VITAMINE B<sub>6</sub>.

Printed on 03-01-1995 AT 15:55:28  
 Straight Line fit



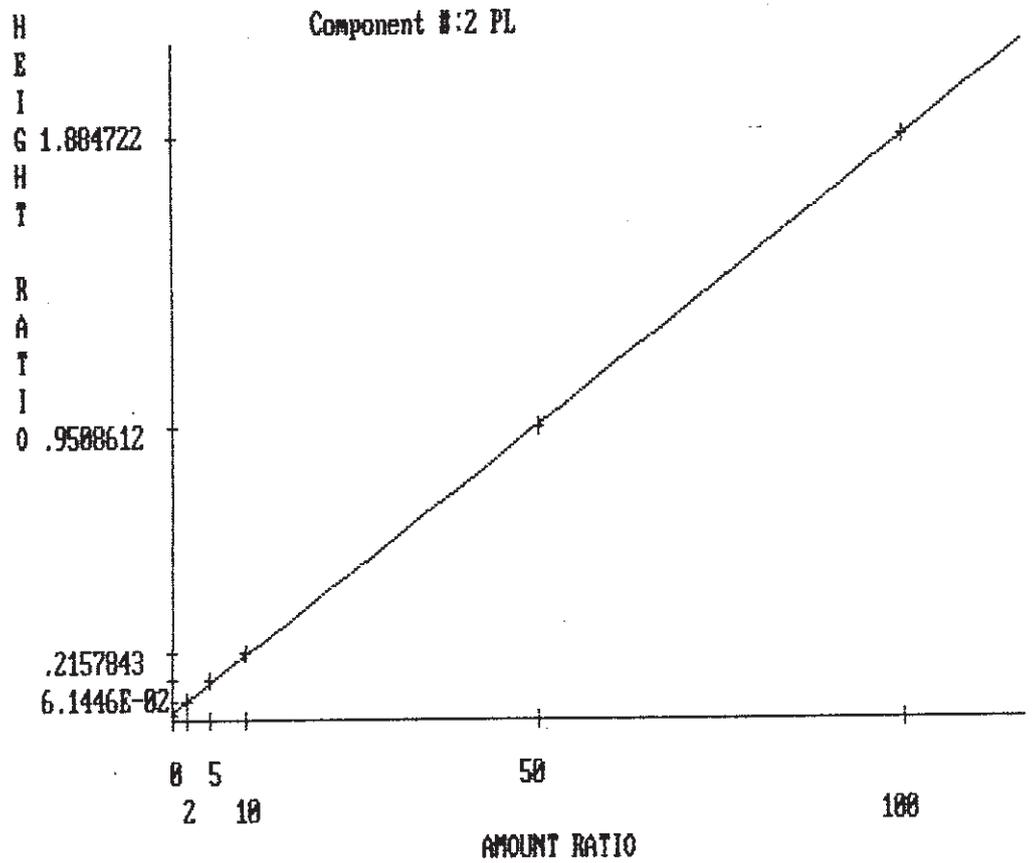
Component 1 = PLP  
 INTERNAL STANDARD CALIBRATION

LEVEL	AMOUNT	HEIGHT	AMOUNT Ratio	HEIGHT Ratio
1	0.00	1200	0.0000	0.1175
2	2.00	1087	2.0000	0.1084
3	5.00	1138	5.0000	0.1172
4	10.00	1736	10.0000	0.1702
5	50.00	4773	50.0000	0.4644
6	100.00	7827	100.0000	0.7547

Y = SLOPE \* X + INTERCEPT

Height ratio = 6.6375E-03 \* Amt ratio + 1.0400E-01  
 Amt ratio = 1.5066E+02 \* Height ratio + -1.5669E+01  
 Correlation (R squared) = 0.9953

Figure A.10



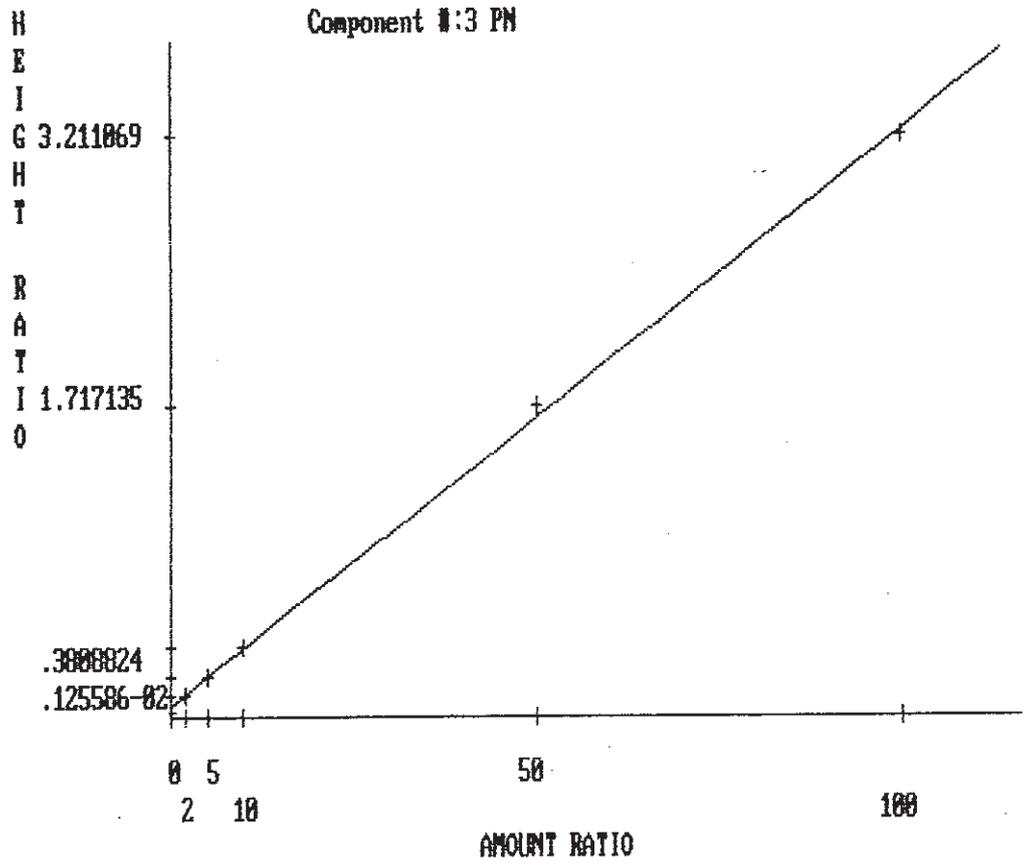
Component 2 = PL  
INTERNAL STANDARD CALIBRATION

LEVEL	AMOUNT	HEIGHT	AMOUNT Ratio	HEIGHT Ratio
1	0.00	172	0.0000	0.0168
2	2.00	616	2.0000	0.0614
3	5.00	1240	5.0000	0.1277
4	10.00	2201	10.0000	0.2158
5	50.00	9772	50.0000	0.9509
6	100.00	19546	100.0000	1.8847

Y = SLOPE \* X + INTERCEPT

Height ratio = 1.8578E-02 \* Amt ratio + 2.5798E-02  
 Amt ratio = 5.3826E+01 \* Height ratio + -1.3886E+00  
 Correlation (R squared) = 0.9999

Figure A.11



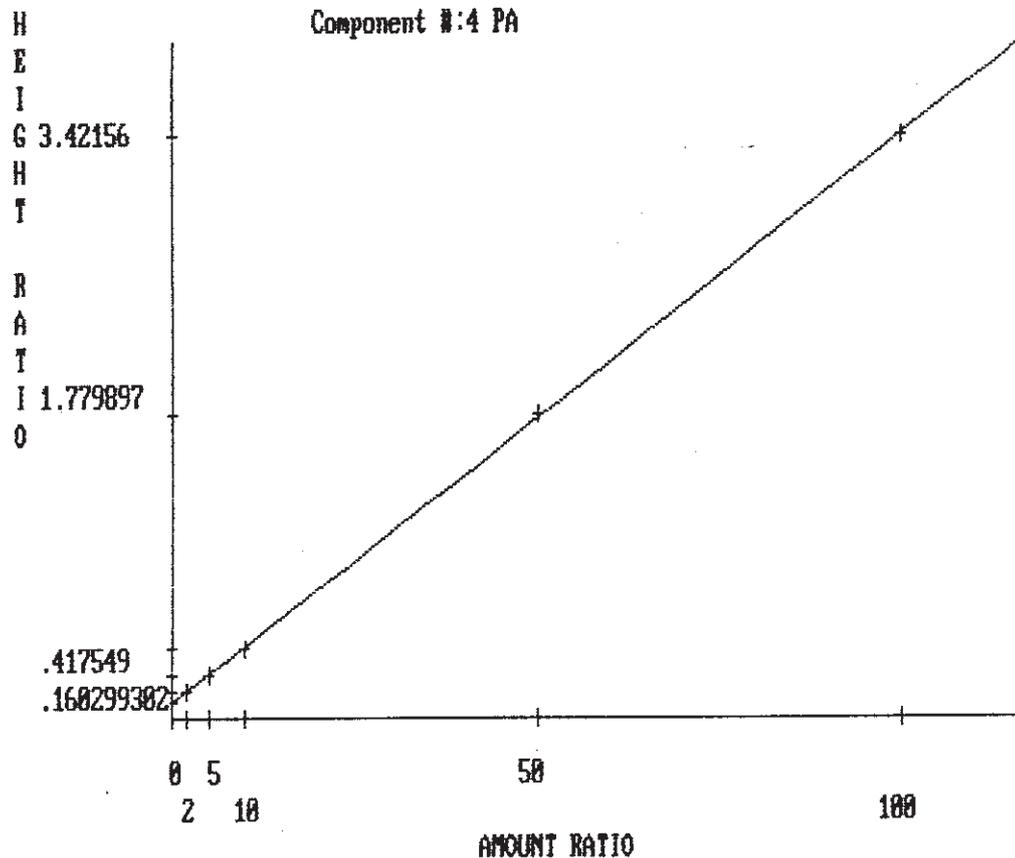
Component 3 = PN  
INTERNAL STANDARD CALIBRATION

LEVEL	AMOUNT	HEIGHT	AMOUNT Ratio	HEIGHT Ratio
1	0.00	334	0.0000	0.0327
2	2.00	1259	2.0000	0.1256
3	5.00	2133	5.0000	0.2197
4	10.00	3885	10.0000	0.3809
5	50.00	17647	50.0000	1.7171
6	100.00	33302	100.0000	3.2111

Y = SLOPE \* X + INTERCEPT

Height ratio = 3.1805E-02 \* Amt ratio + 6.2603E-02  
 Amt ratio = 3.1441E+01 \* Height ratio + -1.9683E+00  
 Correlation (R squared) = 0.9993

Figure A.12



Component 4 = PA  
INTERNAL STANDARD CALIBRATION

LEVEL	AMOUNT	HEIGHT	AMOUNT Ratio	HEIGHT Ratio
1	0.00	949	0.0000	0.0930
2	2.00	1607	2.0000	0.1603
3	5.00	2504	5.0000	0.2579
4	10.00	4259	10.0000	0.4175
5	50.00	18292	50.0000	1.7799
6	100.00	35485	100.0000	3.4216

Y = SLOPE \* X + INTERCEPT

Height ratio = 3.3369E-02 \* Amt ratio + 9.2920E-02  
 Amt ratio = 2.9968E+01 \* Height ratio + -2.7846E+00  
 Correlation (R squared) = 0.9999

Figure A.13

Annexe 8

**TABLEAU DES CONVERSIONS DE CONCENTRATIONS DE VITAMÈRES B<sub>6</sub>  
EXPRIMÉES EN NG/ML, À DES CONCENTRATIONS EXPRIMÉES EN NMOL/L.**

1 ng/ml = 1 nanogramme/millilitre = 10<sup>-9</sup>gramme/ml  
1 nmol/l = 1 nanomole/litre = 10<sup>-9</sup> mole/litre.

PLP	1 ng/ml	$\xrightarrow{\times 4,046}$	4,05 nmol/l
		$\xleftarrow{\times 0,247}$	
PL	1 ng/ml	$\xrightarrow{\times 4,91}$	4,91 nmol/l
		$\xleftarrow{\times 0,204}$	
PA	1 ng/ml	$\xrightarrow{\times 5,458}$	5,46 nmol/l
		$\xleftarrow{\times 0,183}$	
PN	1 ng/ml	$\xrightarrow{\times 4,864}$	4,86 nmol/l
		$\xleftarrow{\times 0,206}$	
PM	1 ng/ml	$\xrightarrow{\times 4,147}$	4,15 nmol/l
		$\xleftarrow{\times 0,241}$	
PMP	1 ng/ml	$\xrightarrow{\times 3,51}$	3,51 nmol/l
		$\xleftarrow{\times 0,285}$	

Tableau A.2

# TABLE DES MATIÈRES

Liste du Corps Enseignant de la Faculté de Pharmacie de Limoges .....	p 1
Remerciements .....	p 2
Plan .....	p 3
Sigles et abréviations .....	p 6
<b>Introduction générale</b> .....	<b>p 8</b>
<b>CHAPITRE I : LES VITAMINES : GÉNÉRALITÉS</b> .....	<b>p 9</b>
I.1 - DÉFINITION .....	p 10
I.2 - CLASSIFICATION DES VITAMINES .....	p 10
I.3 - BESOIN VITAMINIQUE .....	p 12
I.4 - ESTIMATION DU STATUT VITAMINIQUE .....	p 15
Conclusion .....	p 16
Références bibliographiques du chapitre I.....	p 17
<b>CHAPITRE II : LA VITAMINE B<sub>6</sub> : PYRIDOXINE</b> .....	<b>p 19</b>
II.1 - GÉNÉRALITÉS .....	p 20
II.1.a - Structure .....	p 20
II.1.b - Sources .....	p 22
II.1.c - Besoins .....	p 25
II.1.d - Propriétés physicochimiques de la vitamine B <sub>6</sub> .....	p 26
II.2 - MÉTABOLISME .....	p 30
II.2.a - Absorption intestinale .....	p 30
II.2.b - Répartition et taux circulants .....	p 30

II.2.c - Activation de la vitamine B <sub>6</sub> en phosphate de pyridoxal (PLP) .....	p 32
II.2.d - Catabolisme et élimination .....	p 33
II.3 - RÔLE PHYSIOLOGIQUE .....	p 33
II.3.a - Les transaminations .....	p 35
II.3.b - Les décarboxylations .....	p 39
II.3.c - Autres réactions enzymatiques impliquant le PLP .....	p 40
1° - <u>Cystathionine synthétase et cystathionase</u> .....	p 40
2° - <u>Cinuréninase et autres enzymes du métabolisme du     tryptophane</u> .....	p 40
3° - <u>Autres enzymes B<sub>6</sub> - dépendantes</u> .....	p 43
II.4 - CONTEXTE PATHOLOGIQUE .....	p 44
II.4.a - Déficiences et carences .....	p 44
1° - <u>Les nouvelles déficiences en vitamine B<sub>6</sub></u> .....	p 44
2° - <u>Les signes cliniques et biologiques d'une carence     en vitamine B<sub>6</sub></u> .....	p 45
3° - <u>Les causes des déficiences en vitamine B<sub>6</sub></u> .....	p 45
a) - L'alcoolisme chronique .....	p 45
b) - Les interactions médicamenteuses .....	p 46
c) - Les déficits en vitamine B <sub>6</sub> chez les psychotiques .....	p 48
d) - L'hémodialyse chronique .....	p 48
e) - La grossesse et la période néonatale .....	p 48
f) - Le "syndrome du restaurant chinois" .....	p 49
II.4.b - Les maladies métaboliques pyridoxino-dépendantes .....	p 49
1° - <u>L'homocystinurie</u> .....	p 49
2° - <u>La cystathioninurie</u> .....	p 50
3° - <u>Les autres maladies métaboliques</u> .....	p 50
II.5 - TOXICOLOGIE DE LA VITAMINE B <sub>6</sub> .....	p 51
Conclusion .....	p 53
Références bibliographiques du chapitre II .....	p 54

**CHAPITRE III : INTÉRÊT D'UN DOSAGE DE LA  
VITAMINE B<sub>6</sub> CHEZ L'HOMME ..... p 57**

<b>III.1 - LES DIVERS ETATS PHYSIOPATHOLOGIQUES CONCERNÉS ..... p 58</b>	
III.1.a - Pyridoxine et grossesse ..... p 58	
III.1.b - Pyridoxine et lactation ..... p 60	
III.1.c - La vitamine B <sub>6</sub> en cardiologie ..... p 60	
III.1.d - La vitamine B <sub>6</sub> en neuropsychiatrie ..... p 60	
1° - Rôle du Trp et de la Tyr ..... p 60	
2° - Importance de la pyridoxine pour le cerveau ..... p 61	
<b>III.2 - PYRIDOXINE ET INTERACTIONS MÉDICAMENTEUSES ..... p 63</b>	
III.2.a - La place du métabolisme des vitamines ..... p 63	
III.2.b - Influence des médicaments sur l'état nutritionnel ..... p 64	
III.2.c - Substances interagissant avec la vitamine B <sub>6</sub> ..... p 65	
1° - <u>La désoxypyridoxine (DOP)</u> ..... p 65	
2° - <u>L'isoniazide (INH)</u> ..... p 65	
3° - <u>La pénicillamine</u> ..... p 65	
4° - <u>La L. Dopa</u> ..... p 65	
5° - <u>Les contraceptifs oraux</u> ..... p 66	
<b>Conclusion ..... p 69</b>	
<b>Références bibliographiques du chapitre III ..... p 70</b>	

**CHAPITRE IV : LES DIFFÉRENTES MÉTHODES  
D'ANALYSE DE LA VITAMINE B<sub>6</sub> ..... p 73**

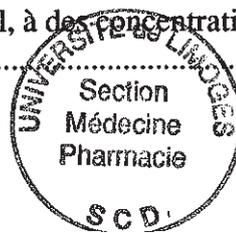
<b>IV.1 - LES TESTS BIOLOGIQUES ..... p 74</b>	
IV.1.a - Les dosages sanguins : tests statiques ..... p 74	
IV.1.b - Les dosages urinaires ..... p 75	
IV.1.c - Les dosages tissulaires ..... p 75	
IV.1.d - Les tests dynamiques ..... p 75	

IV.2 - EXPLORATION DU STATUT VITAMINIQUE B <sub>6</sub> .....	p 76
IV. 2.a - Analyse titrimétrique .....	p 76
1° - <u>Non-aqueuse</u> .....	p 76
2° - <u>Complexométrique</u> .....	p 76
3° - <u>Ampérométrique</u> .....	p 76
4° - <u>Polarographique</u> .....	p 78
IV.2.b - Analyse chromatographique .....	p 78
1° - <u>Chromatographie sur papier (CP)</u> .....	p 78
2° - <u>Chromatographie sur couche mince (CCM)</u> .....	p 78
3° - <u>Electrophorèse</u> .....	p 78
4° - <u>Chromatographie sur colonne (CC)</u> .....	p 79
5° - <u>Chromatographie en phase gazeuse (CPG)</u> .....	p 79
6° - <u>Chromatographie liquide haute performance (CLHP)</u> .....	p 80
IV. 2.c - Spectrophotométrie .....	p 84
1° - <u>Colorimétrie</u> .....	p 84
2° - <u>Spectrophotométrie en ultraviolet (UV)</u> .....	p 84
3° - <u>Spectrophotométrie en infrarouge (IR)</u> .....	p 85
4° - <u>Résonance magnétique nucléaire (RMN)</u> .....	p 85
5° - <u>Absorption - luminescence</u> .....	p 85
6° - <u>Spectrofluorimétrie</u> .....	p 86
IV. 2.d - Analyse microbiologique .....	p 86
IV. 2.e - Dosages enzymatiques.....	p 87
IV.3 - MÉTHODES D'EXPLORATION LES PLUS UTILISÉES .....	p 88
IV. 3. a - Test au tryptophane et épreuve de charge en méthionine .....	p 88
IV. 3. b - Dosage du PLP plasmatique.....	p 89
IV. 3. c - Dosages enzymatiques.....	p 90
IV. 3. d - Dosage du PLP musculaire.....	p 91
IV. 3. e - Dosage de l'acide 4-pyridoxique.....	p 91
Conclusion .....	p 93
Références bibliographiques du chapitre IV .....	p 94

**CHAPITRE V : DOSAGE DE LA VITAMINE B<sub>6</sub>  
PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE  
HAUTE PERFORMANCE (partie expérimentale) .....p 99**

V. 1 - RAPPELS SUR LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (CLHP).....	p 100
V. 1.a - Historique de la chromatographie en phase liquide .....	p 100
V. 1.b - Le système chromatographique .....	p 101
1° - <u>Principe de la CLP</u> .....	p 101
2° - <u>L'appareillage en CLHP</u> .....	p 102
V.1.c - Grandeurs fondamentales en CLHP .....	p 103
1° - <u>Coefficient de partage (ou coefficient de distribution)</u> .....	p 103
2° - <u>Grandeurs de rétention</u> .....	p 104
a) - Temps de rétention ( $t_R$ ) .....	p 104
b) - Volume de rétention ( $v_R$ ) .....	p 104
c) - Facteur de capacité ( $k'$ ) .....	p 105
V.1.d - Détection en CPL.....	p 106
V.1.e - Les phases stationnaires en CLHP .....	p 108
<u>Les silices greffées</u> .....	p 109
V.1.f - Les phases mobiles en CLHP .....	p 109
V.1.g - La chromatographie à polarité de phases inversée .....	p 110
V.2 - ETUDE EXPÉRIMENTALE .....	p 111
V.2.a - Matériels et méthodes .....	p 111
1° - <u>Produits chimiques et réactifs</u> .....	p 111
2° - <u>Montage expérimental</u> .....	p 111
3° - <u>Appareillage</u> .....	p 113
a) - le système de pompage .....	p 113
b) - les phases mobiles .....	p 113
c) - le système d'injection .....	p 113
d) - les colonnes de CLHP .....	p 114
e) - le dispositif post-colonne de dérivation .....	p 114
f) - le détecteur .....	p 115
g) - le système d'intégration et d'exploitation des données .....	p 115
4° - <u>Collecte et préparation des échantillons de sang</u> .....	p 115
5° - <u>Mode de calibration</u> .....	p 116
6° - <u>Echantillonnage du groupe témoin</u> .....	p 116
7° - <u>Taux de recouvrement</u> .....	p 116

V.2.b - Résultats et discussion .....	p 117
1° - <u>Mise au point d'une technique de dosage de différents vitamères B<sub>6</sub> dans le plasma humain par CLHP</u> .....	p 117
a) - Etude comparative de 7 phases stationnaires .....	p 117
b) - Etude de la phase mobile .....	p 120
1° - Influence de la triéthanolamine sur la qualité de l'analyse.....	p 120
2° - Influence de la concentration en contre-ion sur la séparation...	p 120
3° - Influence du pH de la phase mobile sur la séparation.....	p 122
c) - Dérivation post-colonne et détection .....	p 124
d) - Remarque .....	p 124
2° <u>Validation de la technique de dosage</u> .....	p 125
a) - Etude de la linéarité .....	p 127
b) - Etude de la reproductibilité .....	p 128
c) - Etude de la répétabilité, ou précision .....	p 129
d) - Taux de recouvrement .....	p 129
e) - Limite de détection .....	p 130
f) - Limite de quantification .....	p 130
3° - <u>Détermination des valeurs normales des taux de PLP, PL, PN et PA dans le plasma humain</u> .....	p 130
Conclusion .....	p 131
Références bibliographiques du chapitre V .....	p 132
Conclusion générale .....	p 133
Annexe 1 - "Spectre d'absorption dans l'ultraviolet (UV) de la pyridoxine" .....	p 134
Annexe 2 - "Spectre d'absorption dans l'infrarouge (IR) de la pyridoxine" .....	p 135
Annexe 3 - "Spectre en résonance magnétique nucléaire (RMN)de la pyridoxine" .....	p 136
Annexe 4 - "Risque de déficience en vitamine B <sub>6</sub> dans diverses populations" .....	p 138
Annexe 5 - "Le traitement par "end capping" " .....	p 143
Annexe 6 - "L'action d'un contre-ion" .....	p 145
Annexe 7 - "Un exemple de calibrations obtenues pour 4 composés vitaminiques B <sub>6</sub> et pour l'étalon interne dans le cadre de l'étude de la linéarité de notre technique de dosage de la vitamine B <sub>6</sub> " .....	p 147
Annexe 8 - "Tableau des conversions de concentrations de vitamères B <sub>6</sub> exprimées en ng/ml, à des concentrations exprimées en nmol/l." .....	p 151



## RÉSUMÉ

Le terme de vitamine B<sub>6</sub> recouvre aujourd'hui au moins six composés hydrosolubles de structure chimique différente : la pyridoxine (PN), le pyridoxal (PL) et la pyridoxamine (PM) qui représentent la vitamine B<sub>6</sub> exogène, le phosphate de pyridoxal (PLP) et le phosphate de pyridoxamine (PMP) qui sont des métabolites dérivés des trois premiers, et enfin l'acide 4-pyridoxique (4-PA), ou principal catabolite urinaire de la vitamine B<sub>6</sub>. La vitamine B<sub>6</sub> exogène est ubiquitaire : on la trouve aussi bien dans des aliments d'origine animale que végétale.

La forme active de la vitamine B<sub>6</sub> dans l'organisme est le phosphate de pyridoxal (PLP), qui intervient à titre de cofacteur enzymatique dans de très nombreuses réactions, telles que des transaminations et des décarboxylations dans le métabolisme des acides aminés.

Devant le vaste contexte pathologique existant autour de la vitamine B<sub>6</sub> (hypovitaminoses, maladies métaboliques pyridoxino-dépendantes et hypervitaminoses), une évaluation des statuts vitaminiques B<sub>6</sub> s'est avérée nécessaire.

Ainsi, une étude expérimentale a été entreprise et a permis la mise au point d'une technique de dosage de 4 composés vitaminiques B<sub>6</sub> (PLP, PL, PN et PA) dans le plasma humain, par chromatographie liquide haute performance (CLHP), couplée à une détection spectro- fluorimétrique. Cette technique a permis la détermination des taux plasmatiques humains normaux en ces 4 vitamines B<sub>6</sub>.

## MOTS-CLÉS

Vitamine. Pyridoxine. Pyridoxal. Pyridoxamine. Phosphate de pyridoxal. Phosphate de pyridoxamine. Acide 4-pyridoxique. Métabolisme. Carence. Toxicité. Dosage. CLHP. Spectrofluorimétrie.

