

VALIDATION DU DOSAGE DU RÉTINOL PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE : APPLICATION À L'ÉTUDE DU STATUT VITAMINIQUE A CHEZ LES ENFANTS EN MILIEU RURAL AU BURKINA FASO

Issa T. SOME^{1*}, Noël Marie ZAGRE¹, Salam DERME¹, Boubacar SAVADOGO¹,
Patrick E. KAFANDO¹ et Pierre I. GUISSOU²

¹ Laboratoire de Chimie Analytique, de Toxicologie et de Bromatologie, UFR/SDS, 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Université de Ouagadougou, Burkina Faso; email : tsome@univ-ouaga.bf

² Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie, UFR/SDS, 03 BP 7021 Ouaga 03, Université de Ouagadougou, Burkina Faso.

(Reçu le 30 / 06 / 04 - Accepté le 20 / 04 / 05)

Summary : La carence en vitamine A (CVA) constitue un véritable problème de santé publique et ses conséquences sanitaires sont surtout ressenties dans les pays en développement. Elles se traduisent par des retards de croissance chez les enfants et le développement de la cécité nocturne. L'évaluation du statut en vitamine (VA) des individus est importante dans l'appréciation correcte de la situation dans les processus d'intervention et lors des essais d'efficacité ou des études d'impact. En Afrique occidentale, le dosage du rétinol dans les milieux biologiques est réalisé par peu de laboratoires. Nous rapportons dans ce travail, les résultats de la validation complète d'une méthode de dosage du rétinol et de l'acétate de rétinol par chromatographie liquide haute performance. Une excellente linéarité est obtenue pour le rétinol et l'acétate de rétinol dans l'hexane et d'extractions faites à partir du sérum. La gamme de linéarité va de 0,25 pmol/μL à 1,5 pmol/μL pour les deux substances. Les taux de recouvrement sont dans l'intervalle 100 ± 10 % et l'étude de fidélité montre des coefficients de variation inférieurs à 10 %. Cette méthode validée est utilisée pour la

* Auteur correspondant : Issa T SOME, UFR/SDS, Université de Ouagadougou, 03 BP 7021 Ouaga 03, Burkina Faso. Tel : 00226.70.26.44.41, email : tsome@univ-ouaga.bf, tsome@ulb.ac.bc

détermination des teneurs en vitamine A dans le cadre d'une étude d'évaluation de l'état de carence en vitamine A en milieu rural au Burkina Faso. Elle confirme que la carence en vitamine A est un problème de santé publique chez des enfants en âge scolaire et que des politiques d'interventions sont nécessaires.

Mots clés : CLHP, Carence en vitamine A, Burkina Faso

Abstract : Vitamin A deficiency (VAD) is a major public health problem in developing countries with damaging consequences. It causes growth retardation, xerophthalmia and induces high level of morbidity and mortality among children under five years. The assessment of serum vitamin A level is of great importance either in clinical diagnosis of vitamin A deficiency or in intervention strategies. In West Africa, few laboratories perform vitamin A assay and this constitute a major limitation in eradication policies. We report in this work, the results of vitamin A assay validation by high performance liquid chromatography method using liquid-liquid extraction and UV detection. A good linearity was obtained both for retinol and retinol (internal standard) either in hexane or in spiked serum. The dynamic range is 0,25 pmol/ μ L to 1,5 pmol/ μ L. The recoveries at different concentrations were 100 ± 10 % and the precisions were within ± 10 %. The validated method was used to assess serum vitamin A level among children under five years, parturient women and scholar children in rural area (Petit Samba, Burkina Faso). The study confirms that vitamin A is a real health problem among this population.

Key words : HPLC, Vitamin A deficiency, Burkina Faso

1 – INTRODUCTION

La vitamine A (VA) est impliquée dans de nombreuses fonctions de l'organisme humain telles que la morphogenèse, la reproduction et la différenciation cellulaire^[1]. Son rôle dans la vision est parfaitement établi et la carence en vitamine A (CVA) est responsable d'atteintes visuelles telles que la xérophtalmie ; cette dernière pouvant évoluer vers la cécité. Le rétinol serait également impliqué dans la réduction de la fréquence et de la sévérité de certaines infections, dont l'infection

due aux virus de l'immunodéficience humaine (HIV)^[2, 3, 4, 5, 6]. La carence en vitamine A concerne plus de 250 millions d'enfants âgés de moins de 5 ans dans le monde. En Afrique occidentale francophone, on estime que la carence en vitamine A contribue à 57.000 décès par an chez les enfants de 6 à 59 mois^[7]. Par ailleurs, l'apport adéquat de VA diminuerait le taux de transmission du VIH de la mère à l'enfant^[11]. Une méta-analyse a montré que dans les régions où la CVA est un problème de santé publique, un enrichissement des aliments en VA permet de réduire de 23% la mortalité chez les enfants de moins de 5 ans^[8]. Au Burkina Faso, les données sur la CVA sont parcellaires et basées sur des enquêtes épidémiologiques et des indicateurs cliniques. Très peu d'études y ont été conduites sur la situation de la carence en vitamine A évaluée sur la base du rétinol sérique. Les seuls résultats disponibles montrent une prévalence de 85% et de 64% de rétinol sérique inférieur à 0,70 $\mu\text{mol/L}$, respectivement chez les mères et leurs enfants dans la région de Kaya^[9, 10].

La question de l'évaluation du statut en VA des individus représente une importance capitale dans l'appréciation correcte de la situation, dans les essais d'efficacité ou lors de l'évaluation de l'impact des interventions. Les méthodes d'évaluation du statut consiste soit en la mesure directe des stocks de VA de l'organisme par l'usage des isotopes stables, soit par l'utilisation de la méthode de la réponse relative à la dose ou sa version modifiée (RDR ou MRDR)^[11, 12], soit enfin au dosage du rétinol sanguin. Malgré les limites associées au rétinol sérique pour apprécier le statut en VA au niveau individuel^[13, 14, 15], on reconnaît néanmoins qu'il est valide pour évaluer l'efficacité des programmes ou pour apprécier la situation des populations.

Le dosage de la vitamine A dans le sérum est décrite par plusieurs méthodes; la plus utilisée étant celle de la chromatographie liquide

haute performance^{116, 17, 181}. Elle est désormais considérée par l'International Vitamin A Consultative Group (IVACG) comme la plus performante pour mesurer le rétinol sérique^{110, 191}. Le but de ce travail est de valider une méthode de dosage du rétinol sérique par chromatographie liquide haute performance (CLHP). Cette méthode est utilisée pour la détermination du rétinol sérique dans le cadre d'une étude d'évaluation comparative de la carence en vitamine A au Burkina Faso.

II - MATERIEL ET METHODE

1. Matériel

Les échantillons de sérum, prélevés dans des microtubes de couleur ambrée sont conservés à -32°C , à l'abri de la lumière jusqu'aux analyses. Les standards analytiques de rétinol et d'acétate de rétinol sont de pureté analytique et obtenus auprès de Hoffman Laroche (Suisse). Le méthanol (CARLO ERBA, Italie) et l'hexane (ACROS, France) sont de qualité CLHP. Toutes les solutions aqueuses ont été faites avec de l'eau distillée et déionisée.

Les analyses sont réalisées à l'aide de chaîne de chromatographie liquide haute performance constituée d'une pompe de type JASCO PU-980 (Tokyo, Japon) équipée d'une boucle d'injection de 20 μL et d'une colonne chromatographique SUPELCO LC-18 (Bellefonte, USA) de 25 cm de longueur et 4,6 mm de diamètre ; la taille particulaire étant de 5 μm . La phase mobile est un mélange ternaire constitué de méthanol (95%) et d'acétonitrile (3%) et d'eau (2%) à un débit de 2 mL par minute. La détection est faite à 325 nm avec un détecteur de type JASCO UV 975 (Tokyo, Japon). L'acquisition des données est réalisée par un ordinateur muni d'un logiciel de traitement des données de type BORWIN (JMBS, France) et simultanément avec un intégrateur de type HP 3395 (Hewlett Packard, USA).

2 - Méthode d'analyse

Toutes les analyses sont effectuées à l'abri de la lumière blanche et les contenants des échantillons sont protégés par du papier aluminium.

2.1 - Méthode de validation

La méthode de validation utilisée dans ce travail est celle décrite par Caporal-Gauthier et collaborateurs [20] et a consisté à déterminer les critères de performance d'une méthode de dosage de la vitamine A sur trois jours ; chaque jour représentant une expérience indépendante. La validation est entreprise d'une part avec le rétinol et l'acétate de rétinol diluée dans l'hexane et d'autre part dans le sérum enrichi de ces deux substances.

2.2 - Préparation des solutions standards

Pour le rétinol et l'acétate de rétinol, quelques milligrammes sont dissoutes dans 3 mL d'hexane. Des dilutions au 1/10, 1/100, 1/1000 de cette solution sont effectuées. Les densités optiques respectives sont mesurées à 325 nm. La solution dont la densité optique est comprise entre 0,1 et 0,9 est retenue. Sa concentration est alors calculée selon la formule :

$$C = \frac{D.O.}{\epsilon} \times 10^{-3} \mu\text{g} / \text{mL}$$

(1)

où D.O est la densité optique lue, ϵ est le coefficient d'extinction molaire.

2.3 - Préparation du mélange de calibration

A partir de la solution de référence ainsi préparée et dont la concentration a été déterminée, le mélange de calibration est préparé en prélevant des volumes précis de chaque solution de rétinol et d'acétate de rétinol de manière à obtenir une solution de concentration finale après reprise de 15 picomoles dans 20 μL pour chaque composé. Les volumes ainsi prélevés sont réunis, évaporés sous un flux d'azote et le résidu est repris par 500 μL d'hexane pour obtenir les concentrations indiquées ci-dessus.

2.4 - Préparation des mélanges de validation dans l'hexane

Les mélanges à injecter sont réalisés de la même manière que les mélanges de calibration et ce, à partir des standards purs. Des dilutions indépendantes sont alors effectuées afin d'obtenir les concentrations requises par la gamme de concentrations étudiée. Le mélange final pour chaque niveau de concentration est obtenu en prélevant les volumes requis. Une fois le mélange réalisé, on procède à une évaporation du mélange sous un flux d'azote. Le résidu obtenu est ensuite récupéré dans l'acétonitrile pour constituer le mélange d'injection.

2.5 - Procédure de la validation du rétinol dans le sérum

Un enrichissement des sérums en vitamine A suivi d'une extraction et du dosage ont été effectués. Pour cela, le sérum, dont l'innocuité a été vérifiée, est exposé durant deux heures à la lumière vive du soleil afin de détruire la vitamine A éventuellement présente. Les dosages des sérums après exposition montrent qu'ils ne contiennent plus de rétinol. Ces sérums sont alors enrichis en rétinol de concentration connue dont on fait l'extraction et le dosage.

2.6 - Procédure d'extraction du rétinol sérique

A 200 μL de sérum de l'échantillon à doser, 500 μL de solution d'acétate de rétinol (standard interne) dans de l'éthanol sont ajoutés et le mélange est extrait par deux fois dans 1 mL d'hexane après usage d'un agitateur de type vortex. Après centrifugation à 3000 tours par

minute pendant 5 min à -5°C , les phases hexaniques sont réunies et évaporées sous un flux d'azote. Le résidu est repris dans 200 μL de méthanol. Une partie aliquote de 20 μL est injectée dans le chromatographe. Le volume de reprise est calculé de telle sorte que la solution à injecter ait une concentration de 15 picomoles de standard interne pour 20 μL .

2.7 - Calcul de la concentration de rétinol dans le sérum

Pour le calcul des concentrations des échantillons en rétinol, deux déterminations ont été effectuées pour chaque échantillon et la moyenne a été retenue. La concentration a été calculée à l'aide de la formule (3) obtenue de la manière suivante :

Après injection du mélange de calibration, de concentration définie et comprenant le standard interne, on calcule un facteur de calibration relatif :

$$f_i = \frac{A_i * C_{SI}}{C_i * A_{SI}} \quad (2)$$

où f_i est le facteur de calibration du rétinol par rapport au standard interne (SI), A_i est l'aire sous la courbe ou la hauteur de pic du rétinol, C_i est la concentration du rétinol dans le mélange de calibration. A_{SI} est l'aire sous la courbe du standard interne (SI) et C_{SI} , sa concentration dans le mélange de calibration.

La concentration C_x d'un rétinol dans un échantillon est donnée par:

$$C_x = \frac{1}{f_i} * \frac{A_{ix} * C_{SIE}}{A_{SIE}} \quad (3)$$

C_x est la concentration du rétinol dans l'échantillon et A_x l'aire obtenue du pic de rétinol après injection de l'échantillon. C_{SIE} et A_{SIE} sont respectivement la concentration et l'aire sous la courbe du standard interne introduit dans l'échantillon.

2.8 - Prélèvement des sérums

Les prélèvements sanguins ont été effectués chez des sujets à jeun, à leur domicile et immédiatement transportés dans l'heure qui suit au dispensaire du village. A ce niveau, les sérums sont préparés puis transférés dans des microtubes de couleur ambrée avant de les transporter dans une glacière au laboratoire. Ces microtubes ont été entreposés à -32°C jusqu'aux analyses.

III - RÉSULTATS ET DISCUSSION

1 - Validation de la méthode

1.1 - Paramètres de régression

Le tableau I donne les paramètres de régression du rétinol et de l'acétate de rétinol dans l'hexane et le sérum enrichi. Ces paramètres sont issus des données de validation entreprises sur trois jours. Ils représentent les valeurs issues du traitement statistique d'ensemble de ces données et donne une estimation réelle de la variabilité des dosages de plusieurs séries indépendantes faites sur les trois jours de validation. On peut remarquer qu'une excellente linéarité est obtenue sur la gamme des concentrations analysées pour le rétinol et l'acétate de rétinol aussi bien dans l'hexane que les sérums enrichis sur une

gamme de concentration allant de 0,25 pmol/μL à 1,50 pmol/μL. Les coefficients de détermination sont proches de l'unité et les analyses statistiques faites sur les paramètres montrent que les pentes mesurées sont hautement significatives ($p < 0,005$). Les ordonnées à l'origine ne sont pas significativement différentes de zéro comme l'attestent les valeurs des écarts types d'estimations paramétriques. La comparaison des pentes des analyses réalisées dans l'hexane et dans le sérum ne sont pas non plus significativement différentes, ce qui montre un comportement chromatographique identique des deux substances dans les deux matrices et une procédure d'extraction adéquate. La gamme de concentration où une bonne linéarité et exactitude sont obtenues dans cette étude présente un profil similaire à celle obtenus par d'autres auteurs dans les mêmes conditions notamment de détection^[17, 21].

TABLEAU I : Paramètres de régression obtenus lors de la validation du rétinol et de l'acétate de rétinol

Composés	Paramètres de régression					
	Concentration (pmol/μL)	Pente moyenne (b)	Ordonnée moyen à l'origine	Coefficient de détermination	LOQ	LOD
Rétinol (hexane)	0,25-1,50	2807 (43)*	50 (11)	0,999	0,11	0,03 8
Rétinol (sérum)	0,25-1,50	2886 (16)	-424 (318)	0,999	0,10	0,03 8
Acétate de rétinol (hexane)	0,25-1,50	3275 (56)	-3106 (1087)	0,993	0,11	0,03 6
Acétate de rétinol (sérum)	0,25-1,50	2871 (23)	-143 (448)	0,999	0,12	0,03 8

* Les chiffres entre parenthèses sont les écarts types d'estimation paramétrique (n=3) ; LOQ : limite de quantification ; LOD : limite de détection

1.2 - Exactitude de la méthode

L'exactitude de la méthode est estimée en calculant les valeurs de recouvrement des différentes concentrations par rapport à la droite de régression. Nous avons d'une part effectué ce calcul pour chaque jour de validation et ensuite traité l'ensemble des données par rapport à la droite de régression moyenne. Les résultats sont donnés au tableau II. Les taux de recouvrement obtenus pour les mesures après extraction varient de 95 à 105 % des valeurs nominales. Ces pourcentages de recouvrements montrent que la méthode d'extraction utilisée est très efficace. Les taux de recouvrements aux différentes concentrations analysées à partir d'ajouts dans le sérum vont de 93 à 103 % par rapport à la droite de régression dans l'hexane aussi bien pour le rétinol que pour l'acétate de rétinol. L'acétate de rétinol est le standard interne utilisée dans ce travail. Plusieurs auteurs l'utilisent comme standard interne et la revue de la littérature montre que l'acétate de rétinol est même le référentiel de standard interne dans le dosage du rétinol^[16, 21]. Ces résultats montrent que le dosage du rétinol peut s'effectuer dans nos conditions avec une exactitude suffisante.

TABLEAU II : *Taux de recouvrement en pourcentage aux différentes concentrations mesurées par rapport à la droite de régression*

Composés	Niveau de concentration (pmol/μL)					
	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25	1,5
Rétinol (hexane)	96,36 (13,71) *	103,20 (4,29)	99,66 (7,72)	100,09 (5,17)	98,98 (2,03)	100,49 (1,48)
Rétinol (sérum)	95,46 (1,68)	100,51 (4,52)	98,63 (3,97)	100,06 (2,81)	100,39 (1,51)	99,81 (0,73)
Acétate de rétinol (hexane)	93,40 (7,60)	100,59 (3,68)	101,53 (3,10)	99,10 (3,77)	96,67 (1,50)	101,50 (2,20)
Acétate de rétinol (sérum)	95,68 (1,76)	105,26 (4,79)	101,06 (3,60)	103,05 (2,71)	101,22 (3,75)	100,39 (0,84)

* Les chiffres entre parenthèses représentent les écarts types de recouvrements (n=3)

1.3 - Fidélité de la méthode

La fidélité de la méthode est estimée en effectuant pour chaque jour, trois dilutions indépendantes pour les concentrations intermédiaires (0,75 ; 1,00 et 1,25 pmol/μL). Les résultats rassemblés au tableau III représentent les variabilités sur les trois jours de validation. Ces coefficients de variation sur l'ensemble des trois concentrations étudiées et sur les trois jours de validation varient de 0,69 à 3,78 %. Ils montrent une reproductibilité acceptable pour la méthode pour chacun des composés dosés aussi bien dans l'hexane que dans le sérum et

permet d'envisager l'utilisation d'une telle méthode aux fins de dosages précis.

TABLEAU III : Coefficients moyens (%) de variation des taux de recouvrement aux concentrations intermédiaires (n=9)

Composés	Niveau de concentration (pmol/ μ L)		
	0,75	1,00	1,25
Rétinol (hexane)	2,10	2,18	2,25
Rétinol (sérum)	1,74	1,97	0,63
Acétate de rétinol (hexane)	3,78	2,34	1,23
Acétate de rétinol (sérum)	2,84	1,86	1,07

1.4 - Méthode d'extraction

Plusieurs méthodes d'extraction du rétinol dans le sérum sont décrites dans la littérature. Certains auteurs font de l'extraction solide-liquide^[18, 22]. Cependant, l'extraction liquide-liquide a la préférence de la plupart des auteurs. C'est ainsi que Taibi et coll^[1] utilisent un mélange éthanol-chloroforme pour l'extraction de la vitamine A du sérum. Il est connu de nos jours que le chloroforme est toxique et son utilisation est de plus en plus limitée. L'extraction liquide-liquide utilisant l'hexane est la plus rencontrée^[17, 21, 23]. L'extraction par l'hexane donne de bons résultats comme l'attestent les résultats de cette étude. Cette méthode est simple et facile à mettre en œuvre dans les laboratoires des pays du sud. Le standard interne utilisé dans cette validation présente des critères de performance telle qu'on peut l'utiliser dans le dosage en toute confiance.

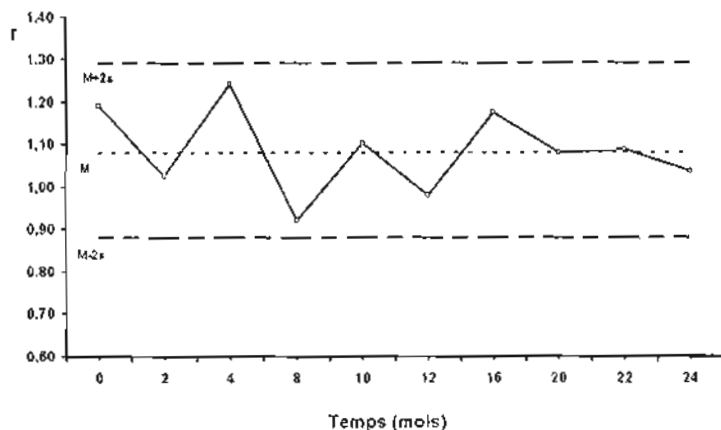
1.5 - Limite de détection et de quantification

Les limites de quantification calculées sont respectivement de 0,10 pmol/ μ L pour le rétinol et de 0,12 pmol/ μ L pour l'acétate de rétinol (Tableau I). Les limites de détection sont de 0,038 pmol/ μ L pour les deux composés. Il faut souligner que la détection UV convient pour le travail de routine de nombreux laboratoires mais que sa sensibilité n'est pas la meilleure. Ainsi des méthodes de détection plus fines comme la détection de masse permet de travailler avec des concentrations de l'ordre de la centaine de femtomoles par microlitre^[21].

1.6 - Robustesse de la méthode

La figure 2 montre l'évolution au cours du temps, du rapport (r) de la surface du standard de l'acétate de rétinol sur la surface du standard de rétinol. Elle montre que la méthode est stable et robuste, le rapport r étant toujours dans l'intervalle de confiance mesuré.

FIGURE 2 : Evolution du rapport r de la surface du standard de l'acétate de rétinol sur la surface du standard de rétinol. M est la valeur moyenne de ce rapport, s est l'écart type



2 - Application à la détermination du rétinol sérique chez les enfants et les femmes

Nous avons utilisé cette méthode de dosage du rétinol sérique à 75 enfants et 75 femmes du village de Petit Samba au Burkina Faso, dans le cadre de l'étude de base d'une intervention de lutte contre la carence en VA. Les enfants et leurs mères ont été aléatoirement choisis selon la méthode de grappe. Il s'agissait d'enfants d'âge scolaire, beaucoup plus représentés dans la classe de 72 à 96 mois (60 %) avec 56 % de sexe masculin. Parmi eux, seulement 44 % étaient inscrits à l'école. La rétinolémie moyenne obtenue chez les enfants d'âge scolaire était de $0,74 \mu\text{mol/L}$ avec un écart type de $\pm 0,25 \mu\text{mol/L}$. Cette moyenne est quasi égale au seuil de $0,70 \mu\text{mol/L}$ en dessous duquel on considère qu'un sujet présente un déficit sérique en vitamine A. Les analyses ont révélé que $47,4 \pm 11,3\%$ des enfants présentent une teneur sérique en rétinol inférieure à $0,70 \mu\text{mol/L}$ et cette tendance est surtout marqué

dans la tranche d'âge de 6 à 8 ans. La prévalence des faibles rétinolémies était de $15,1 \pm 8,2\%$ chez les femmes et le pourcentage était de 31 % chez les femmes enceintes. Dans une localité rurale autour de la ville de Kaya, une prévalence bien plus élevée avait été trouvée chez des femmes de la même tranche d'âge et dans le même état physiologique. En effet, sur 240 femmes étudiées, 65% d'entre elles présentaient de faibles teneurs sériques en rétinol¹¹⁰. La relative meilleure situation des femmes du village de Petit Samba, pourrait être attribuée aux actions de sensibilisation qui y sont menées depuis 12 mois par l'Association française Youndzondo.

Nos résultats ont permis de montrer que la carence en VA dans le village de Petit Samba constitue un problème de santé publique, puisqu'elle touche plus de 20 % des enfants d'âge scolaire et des femmes en âge de procréer^{110, 191}. Ces données constituent les toutes premières à notre connaissance sur la situation de la carence en VA chez des enfants d'âge scolaire au Burkina Faso, évaluée par le rétinol sérique mesuré par CLHP. L'importance de tels résultats est d'une part d'attirer l'attention sur la situation de la carence dans cette catégorie, et d'autre part de fournir des justifications à la prise en compte des écoliers, peu souvent ciblés dans les stratégies nationales de lutte contre les carences en micronutriments.

IV – CONCLUSION

Nous présentons dans ce travail, les résultats de la validation complète d'une méthode de dosage du rétinol et de l'acétate de rétinol par chromatographie liquide haute performance. La méthode présente une bonne linéarité, une bonne exactitude et une bonne précision. La détermination des teneurs en vitamine A dans le cadre d'une étude d'évaluation de l'état de carence, a été effectuée dans le village en

milieu rural (Petit Samba) au Burkina Faso. Cette étude montre que la carence en vitamine A en milieu préscolaire est importante et que le suivi analytique des interventions dans le cadre de la lutte contre les carences en vitamine A dans la sous région Afrique de l'Ouest, particulièrement au Burkina Faso, est possible.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient vivement la firme Hoffmann Laroche (Suisse) pour le don à titre gracieux, des standards analytiques de rétinol et d'acétate de rétinol et l'Association française Yuzondo pour le financement d'une partie de ce travail.

Les remerciements vont également Kaboré Guy Roger pour son excellente assistance technique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] - G. TAIBI, C.M.A. NICOTRA, *Journal of chromatography B* 780 (2002) 261-267
- [2] - J.P. ALLARD, E. AGHDASSI, J. CHAU, I. SALIT, S. WALMSLEY, *Am J Clin Nutr.* (1998) 67(1):143-7.
- [3] - J.A. OMENE, C.R. EASINGTON, R.H. GLEW, M. PROSPER, *J Natl Med Assoc.* (1996) 88(12):789-93.
- [4] - W. PHUAPRADIT, K. CHATURACHINDA, S. TANEEPANICHSKUL, J. SIRIVARASRY, K. KHUPULSUP, N. LERDVUTHISOPON, *Obstet Gynecol.* (1996) 87(4):564-7
- [5] - D.A. FRYBURG, R.J. MARK, B.P. GRIFFITH, P.W. ASKENASE, T.F. PATTERSON, *J Biol Med.* (1995) 68(1-2):19-23.
- [6] - H.Y. HUANG, A.J. ALBERG, E.P. NORKUS, S.C. HOFFMAN, G.W. COMSTOCK, K.J. HELZLSOUER, *Am J Epidemiol.* (2003) 157(4):335-44.
- [7] - AG BENDESH M., ACAKPO A., AGUAYO A., BAKER S., DIÈNE S.M., LATHEN L., OUEDRAOGO A., *Les pratiques prometteuses et les leçons apprises dans la lutte contre la carence en vitamine A dans les pays de l'Afrique subsaharienne*, 2000 USAID-Basics, Arlington VA USA.
- [8] - BEATON GH., MARTORELL R., ARONSON KJ., et AL. Effectiveness of Vitamin A supplementation in the control of young child morbidity and mortality in developing countries. ACC/SCN State-of-the-Art Series, Nutrition Policy Discussions Paper N0 13. Genève: United Nations ACC/SCN, 1993:120

- [9] - DIANCOUMBA D, ZAGRÉ, N.M.. Etude des systèmes de sécurité alimentaire et nutritionnelle au Plateau Central. 1997, Rapport de consultation PS-AGF/CES.
- [10] - ZAGRE N.M. *Projet pilote d'introduction de l'huile de palme non raffinée comme source de vitamine A au Burkina Faso: évaluation de l'impact. Thèse de Doctorat en co-tutelle Université de Montréal/Université Montpellier II, 2002, 265p*
- [11] - WHO. *Indicators for assessing VAD and their application in monitoring and evaluating intervention programmes*. Geneva: WHO, 1996 : 66.
- [12] - S.A. TANUMIHARDJO, P.G. KOELLNER, J.A. OLSON, *Am J Clin Nutr* (1990) 52, 1064-67.
- [13] - SOMMER A, WEST K.P., *Vitamin A deficiency: Health, survival and vision*. New York: Oxford University Press, 1996.
- [14] - D.A. SCHAUMBERG, J.O. CONNOR, R.D. SEMBA. *Eur J Clin Nutr* (1996) 50:761-64.
- [15] - SMITH FR, GOODMAN DS.. *J Clin Invest* (1971) 50, 2426-36.
- [16] - K.S. EPLER, R.G. ZIEGLER, and N.E. CRAFT, (1993), *J Chromatogh. Biomed. App.* (1993) 619:37-48
- [17] - K. HOSOTANI, M. KITAGAWA, *Journal of chromatography B* (2003) 791 305-313
- [18] - C.K. SCHMIDTS C.K., A. BROUWER, H. NA U, *Analytical biochemistry* (2003) 315, 36-48.
- [19] - NORTHROP-CLEWES C. *A report of the 21st International Vitamin A Consultative Group Meeting, Marrakech, Morocco, 3-5 February 2003. Sight and Life Newsletter 2003 :10-34.*

- [20] - J. CAPORAL GAUTHIER, J.M. NIVET, P. ALGRANTI, M. GUILLOTEAU, M. HISTE, M. LALLIER, J-J N'GUYEN-HUU, R RUSSOTO, . *S.T.P Pharma Pratiques* (1992) 2, 250-226.
- [21] - R.B. VAN BREEMEN, D. NIKOLIC, X. XU, Y. YANSAN, M. VAN LIESHOUT, C.E. CLIVE, A.B. SCHILLING, *Journal of chromatography A* (1998) 794, 245-251
- [22] - S. HARTMANN, O. F ROESEHEIS, F. R INGENBACH, R. W YSS, F. BUCHELI, S. BISHOP, J. BAUSCH, U.W. WIEGAND, *J of chromatography B* (2001) 751, 265
- [23] - N.E. CRAFT, J. BULUX. C. VALDEZ, Y. LI, N.W. SOLOMONS, *American Journal of clinical Nutrition* (2000) 72, 450-454