الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة المسيلة
UNIVERSITE DE M'SILA

FACULTEDES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE & BIOCHIMIE

MEMOIRE: **MASTER ACADEMIQUE**

DOMAINE: **SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**

FILIERE: **BIOLOGIE**

OPTION**:ANALYSES BIOCHIMIQUES**

Présenté par
Koudri Nasria

Thème:

ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET ANTIMICROBIENNE DE LA VITAMINE D_3

DEVANT LE JURY:

M^{r} Medjkel S.	**MAA**	**Président**
M^{r} Benkhaled A.	**MAA**	**Promoteur**
M^{eme} Bouzid D.	**MAA**	**Co-Promotrice**
M^{eme} Rabeh N.	**MAA**	**Examinatrice**
M^{r} Dahdouh F.	**MAA**	**Examinateur**

Promotion: 2013-2014

R E M E R C I E M E N T S

JE remercie tout d'abord ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la santé la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire.

Nous tenons à remercier amplement Monsieur Benkhaled AR, Maître assistant classe A au département de microbiologie et analyse biochimie de M'Sila, d'avoir accepté de diriger ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier mon Co promotrice, Bouzid D, Maître assistant classe A au département de microbiologie et analyse biochimie de M'Sila, pour avoir accepté la charge d'être reportrice de ce mémoire, je le remercie pour sa disponibilité, ses pertinents conseils et pour les efforts qu'il a consenti durant la réalisation de ce mémoire.

Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon respect.

Que Monsieur Medjkel S, Maître assistant classe A au département microbiologie et analyse biochimie de M'Sila, trouve ici l'expression de notre sincère et respectueuse gratitude d'avoir bien voulu présider le jury.

Nos remerciements vont également à Monsieur Dahdouh F, Madame Rabeh N, Maître assistant classe A au département de biologie de M'Sila, qui ont bien voulu siéger à ce jury.

Nous remercions beaucoup, Mademoiselle Bali f et madame BenYatou M, et madame Safiya et Mademoiselle Asma et chaabane S les ingénieures de laboratoire de biochimie et microbiologie et Monsieur Sghiri K et responsable de laboratoire de biologie de m'sila.

DEDICACE

A mes parents,

Pour vos mains qui ont tant travaillé,

Pour votre cœur qui m'a tant donné

Pour votre sourire qui m'a tant réchauffé,

Pour vos yeux qui furent parfois mouillés,

Pour vous qui m'avez tant aimé.

A mes sœurs : Malika, Samra, Fatiha et Salma.

A mes frères: Mohammed , Ali , Abd Elhamid et Abd Elaziz.

A mon fiancé Bezi Mourad

A mes belles sœurs.

A mes neveux et nièces.

A mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments au cours de mon cursus à l'université:Bouchra, DJahida ,Zahira, Hadjer,

DJawida, Samira, Naima, Samira, Somia, Lyla ,Yasmine, Amina, Maryeme, Mouna

A mes collegues de la promotion de Master Analyses Biochimie : Samya, Rofia, Imane ,Khadidja

A tous qui me connaisse de prés ou de loin

Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydante et l'activité antimicrobienne de la vitamine D_3. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant le teste DPPH, la vitamine D_3 a montré une très forte activité antiradicalaire vis-à-vis du radical DPPH avec IC50 égale 803,27µg/ml.

L'effet antibactérien de vitamine D_3 a été évalué par le test de diffusion sur disque vis -à-vis de quinze souches bactériennes références Gram $^+$ et Gram $^-$ Les résultats ont révélé que la vitamine D_3 exerce un effet antibactérien considérable, les bactéries les plus sensible sont *M. luteus*, avec CMI est 1,56 µg/ml, suive par *B. cereus* avec CMI est 300 µg/ml. L'effet antifongique de la vitamine D_3 a été évalué sur deux levures. Les résultats ont révélé que la vitamine D_3 exerce un effet antifongique considérable sur *C. albicans* avec une CMI de 1 ,56 µg/ml. Par contre, elle n'a aucun effet sur *S. cerevisiae*.

A l'essor de cette étude, nous pouvons conclure que la vitamine D_3 a un effet antioxydant et antimicrobien intéressant.

Mots clés: Antibactérien, Antifongique, Antimicrobien, Antioxydante, DPPH, Infection, Inflammation, Vitamine D_3.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the antioxydant and antimicrobic activities of the vitamin D3. The antioxydant activity was evaluated while using DPPH test, the vitamin D3 showed a very strong antiradicalaire activity with respect to radical DPPH with IC50 equalizes 803,27µg/ml. the antibactérien effect of vitamin D3 was evaluated by the test of diffusion on disc with respect to fifteen bacterial strains references $Gram^+$ plus and $Gram^-$ the results revealed that the vitamin D3 exerts a considerable antibactérien effect, the bacteria most sensitive are *M. luteus*, with CMI was 1,56 µg/ml, following by *B. cereus* with CMI is 300 µg/ml. The effect antifongic of the vitamin D3 was evaluated on two yeasts. The results revealed that the vitamin D3exerts a considerable effect antifongic on *C. albicans* with one CMI of 1, 56 µg/ml. On the other hand, it did not have any effect on *S. cerevisiae*.

With the rise of this study, we can conclude that the D3 vitamin has an antioxydant and antimicrobic effect interesting.

Key words: Antibactérien, Antifongic, Antimicrobic, Antioxydant, DPPH, Infection, Inflammation, Vitamin D3

ملخــص

تناول هذاالبحث دراسة النشاطية المضادة لأكسدة و النشاطية المضادة للميكروبات. بينت نتائج دراسة المضادة لأكسدة للفيتامين د3 يملك قدرة كبيرة مضادة للأكسدة بإستعمال تقنيةDPPH ., بحيث Ic50 يعادل 825 µغ/مل.

كما تمت دراست النشاطية المضادة للبكتيريا على 15 سلالة بكتيرية مرجعية بتقنية الإنتشار في الوسط الصلب بيكتيرية حيث بينت النتائج أن للفيتامين د3 فعالية كبيرة خاصة ضد البكتريا الموجبة الغرام *Micrococcus luteus* مع CMI يعادل 1.56µغ/مل والبكتيرية موجبة الغرام *Bacillus cereus* مع CMI يعادل 300µغ/مل.

كما تمت دراسة النشاطية المضادة للفطريات التي تدرس ضد خميرتين (خمائر مرجعية) بتقنيةالإنتشار عبر الوسط الصلب النتائج أظهرت أن الفيتامين د3 لديه تأثير معتبر *Candida albicans* مع قطر التثبيط 12مم CMI يعادل 1.56µغ/مل، على عكس خميرة *Saccharomyces cerevisiae* ليس لديها تأثير.

نستنتج ان الفيتامين د3 لديه تأثير كبير على النشاطية المضادة للأكسدة والمضادة للميكروبات.

ألكلمات المفتاحية : الفيتاميند3 , النشاطية المضادة للأكسدة , النشاطية المضادة للميكروبات,إلتهاب,عدوى.

Sommaire

INTODUCTION GENERALE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I généralités sur la vitamine D.....3

1. Généralité sur les vitamines.....4

1.1. Définition et nomenclature 4

1.1.1. Les vitamines hydrosolubles..... 4

1.1.2 Les vitamines liposolubles …….....…….....6

1.2. La Vitamine D_3 6

1.2.1. Aspects biochimiques….....6

1.2.2. Métabolisme.....….....7

1.2.2.1. Synthèse au niveau cutané.....7

1-2-2-2 - Apport alimentaire .....….....7

1-2-2-3 - Voies d'activation….....7

1.2.2.4Régulation de la synthèse de 1,25(OH) 2D 8

1.2.3. Stockage.....9

1.2.4. L'homéostasie phosphocalcique.....….....9

1.2.4.1. Effet de la vitamine D_3.....….....9

1.3. Une hormone à part entière……..10

1.3.1. FONCTIONS VITAMINIQUES.....11

1.3.1.1. Effet sur le métabolisme osseux 12

1.3.1.2.. Effet extra osseux de la vitamine D_3.....14

1.3.1.2.1 Fonction musculaire et chutes 14

a. Cancers 14

b. Risque cardiovasculaire.....14

c. Système immunitaire 15

d. Diabète de type 1 15

e. Maladies inflammatoires.....15

f. Effet anti-infectieux de la vitamine D_3.....15

2.8 Autres effets 16

Chapitre II Carence de vitamine D_3.....17

2. Carence de vitamine D_3 18

2.1 Causes d'insuffisance.....18

2.2 Epidémiologie.....19

2.2.1 Prévalence de l'hypovitaminose D_3.....19

2.2.2. Facteurs influençant la prévalence de la vitamine D_3 19

2.2.3. Risques associés (établis ou supposés) à une insuffisance en vitamine D_3..... 19

2.2.3.1. Rachitisme 19

2.2.3.2. Ostéomalacie.....20

2.2.3.3. Ostéoporose.....20

Chapitre III Matériel et méthode.....21

3. Matériels Et Méthodes.....22

3.1. Matériel.....22

3.1.1. Description de produit utilisé.....22

3.1.3. Solution de travail.....22

3.1.3. Les souches microbiennes utilisées.....22

3.1.4.1. Les bactéries.....22

3.1.4.2. Les champignons 23

3.1.5. L'unité de mesure de la vitamine D3.....24

3.2. Méthodes.....24

3.2.1. Test d'activité anti radicale.....24

3.2.1.1. Test au DPPH.....24

3.2.1.1 Principe.....24

3.3..Activité antimicrobienne.....26

2.3.1. Activité antibactérienne et antifongique 26

2.1.2. Tests de l'activité antibactérienne et antifongique 27

3.4. Analyses statistiques.....30

Chapitre IV. Résulta et discussion.....31

4. Test anti-radicalaire.....31

4.1. Test DPPH.....31

4. Test antimicrobienne.....35

4.1. Test antibactérienne.....35

4.2. Activité antifongique.....43

Conclusion

Référence bibliographique

Annexe

Liste des figures

Figure 1. structure chemique de la vitamine D, (a) Vitamine D_2 (b) vitamine 6

Figure 02. Voies d'activation de la vitamine D_3.....7

Figure 03. Noyau commun aux hormones stéroïdes 10

Figure 04. Structure chimique de la prévitamine D_3.....11

Figure 05. : Fonctions vitaminiques de la vitamine D_3.....12

Figure 06. Densité osseuse en fonction du taux de vitamine D_3.....13

Figure 7. La forme générique de la vitamine D_3.....22

Figure 8. Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive.....25

Figure 09. Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration du BHT.....33

Figure 10. Variation de l'inhibition du DPPH en fonction du concentration initiale du La vitamine D_3.....33

Figure 11. Comparaisons entre BHT et vitamine D.....34

Figure 12. Effet de DMSO sur la bactérie.....35

Figure 13. Effet de vitamine D sur *E. Faecalis*.....37

Figure 14. Effet de vitamine D sur *M. luteus*.....38

Figure 15. Effet de vitamine D sur ***S.typhimurium.s***.....38

Figure 16. Effet de vitamine D sur *S. aureus*.....39

Figure17. Effet de vitamine D sur *S. aureus* 39

Figure 18. Effet de vitamine D sur *B.cereus*.....39

Figure 19. Variation de CMI dans chaque bactérie.....42

Figure 20. Effet de vitamine D_3 sur *Candida albicans* 43

Liste des tableaux

Tableau.1. Classification des substances douées d'une activité vitaminique.....05

Tableau 2. Les bactéries référencées utilisées dans l'étude.....23

Tableau 3. Les levures référencées utilisées dans l'étude….....24

Tableau.4 : présenté les déférents antibiotiques utilisés.....28

Tableau 5. Diamètre de zones d'inhibition (en mm) obtenu sur les bactéries.....37

Tableau 6. Les bactéries qui résistance a vitamine D_3 38

Tableau 7.les différentes concentrations utilisées de vitamine D sur *M. luteus*.....40

Tableau 8. Les différentes concentrations utilisées de vitamine D sur *Salmonella typhimurium*, et *Bacillus cereus*.....41

Tableau 9. Les différentes concentrations utilisés de vitamine D sur *E. faecalis* et P. mirabilis.....41

Tableau 10. Diamètre de zone inhibition de *Candida albicans*.....44

Tableau 11. CMF_S et CMF_C de de vitamine sur *Candida albicans*.....44

Liste des abréviations

ACV: accident vasculaire cérébral

AMH: Agar Muller Hinton

ANOVA: Analyse de variance

APR: Pouvoir anti radicalaire

ATCC: American type culture collection

BHT: Butylated hydroxytoluene

CFU: nombre de colonie formant des unités.

CMB: concentration minimale pour inhibition de croissance de bactérie après 5jours.

CMF$_C$: concentration minimale pour inhibition de croissance de champignon après 5 jours.

CMF$_S$: concentration minimale pour inhibition de croissance de champignon.

CMI: concentration minimale pour inhibition de croissance de bactérie.

DMSO: Diméthylsulfoxide.

FGF23: Fibroblast Growth Factor 23

GN: gélose nutritive

IC50: Concentration inhibitrice à 50**.**

IMC: Indice de Masse Corporelle

NHANES III: National Health and Nutrition Examination Survey

PTH : Hormone Parathyroïdienne.

SEM : Moyenne d'Erreur Standard**.**

SXR : Steroid and Xenobiotic Receptor.

TNF: facteur de nécrose tumoral

TRPV6 : Transient Receptor Potential Cation Channel, Family V, Member 6

UI/j : Unité International Par Jour**.**

VDR : Vitamin D Receptor.

Introduction

Introduction

La vitamine D ou calciférol, appartient au groupe des vitamines liposolubles. Il existe deux formes de vitamine D, la vitamine D_2 (ergocalciférol) synthétisée par les végétaux et la vitamine D_3 (cholécalciférol) présente chez les animaux

La vitamine D_3, découverte au début du XXème siècle, est mieux connue depuis les années 70 mais c'est seulement depuis quelques années (congrès international sur l'ostéoporose en 2006) que l'on s'attache de près à ses multiples propriétés. Preuve concrète de cet intérêt croissant, le laboratoire Crinex, qui produit Uvedose © (Cholécalciférol) depuis 1990, a vu son chiffre d'affaires presque doubler entre 2009 et 2011(Fabienne, 2012).

Pendant des décennies, il a été reconnu que la vitamine D_3 a un rôle fondamental dans l'homéostasie du métabolisme du calcium. Cependant, il est devenu évident que la vitamine D_3 a des fonctions importantes supplémentaires qui affectent les autres cellules, des tissus et systèmes. Une méta-analyse récente a montré que la supplémentation en vitamine D_3 a donné lieu à la réduction de la mortalité. On estime que 1 milliard de personnes dans le monde est déficientes de cette vitamine. Une carence en vitamine D_3 a été associée à diverses maladies inflammatoires et même infections. Toutefois, le mécanisme par lequel la vitamine D_3 réduit ces maladies reste mal compris. Le Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire (BEH) du 24 avril 2012 indique que la vitamine D_3 pourrait également jouer un rôle protecteur à l'égard de l'hypertension artérielle (Fabienne, 2012; Forman *et al*., 2007)), des maladies cardiovasculaires et de certains cancers et constituer un important modulateur du système immunitaire et considérée aussi un antiinflammatoire puissant (Briot *et al.*, 2009). Donc la question qui se pose est-ce que la vitamine D_3 possède une activité anti radicalaire ou une activité antimicrobienne?.

Dans ce contexte, et, afin de recherche de nouvelles activités biologiques et thérapeutiques

De la vitamine D_3 nous sommes intéresses dans cette présente d'étude à :

•Etude de l'activité antioxydante de vitamine D3 de son pouvoir piégeur vis-à-vis d'un radical libre relativement stable (DPPH).

•Etude de son l'activité antimicrobienne, quinze (15) bactéries références et deux (2) levure en utilisant la méthode de diffusion en milieu solide.

Synthèse Bibliographique

1. Généralités sur les vitamines

1.1 Définition et nomenclature des vitamines

Étymologiquement, « amines nécessaires à la vie », les vitamines ont en fait des structures variées et ne sont pas toutes des amines. Contrairement aux nutriments habituels utilisés pour la production d'énergie ou incorporés au cours de la synthèse des constituants de l'organisme (glucides, acides aminés ou acides gras essentiels), les besoins quotidiens en vitamines ne sont que de quelques fractions de microgramme à quelques milligrammes. Ceci est dû au fait que la plupart agissent comme des coenzymes ou des cofacteurs au cours des réactions enzymatiques. Les vitamines doivent être apportées en faible quantité dans l'alimentation. Quelques vitamines font exception car il existe pour elles d'autres sources pouvant remplacer les apports alimentaires : exposition de la peau aux ultra-violets solaires pour la vitamine D, synthèse à partir du tryptophane pour la niacine, synthèse par la flore microbienne digestive pour la vitamine K. (anonyme, 2011).

La nomenclature peut, au début, prêter à confusion car, à côté des dénominations chimiques des molécules, des notations abrégées sous forme de lettre sont également utilisées. De même les unités sont parfois exprimées en unités internationales (Anonyme, 2011). La classification des substances douées d'une activité vitaminique est résumée dans le tableau 1.

1.1.1 Les vitamines hydrosolubles

Ce sont les vitamines hydrosolubles, soit la vitamine C ou acide ascorbique et les vitamines du groupe B : la vitamine B_1 ou thiamine, la vitamine B_2 ou riboflavine, la vitamine PP ou niacine ou acide nicotinique (ou vitamine B_3pour les Anglo-Saxons), l'acide pantothénique ou vitamine B_5, la vitamine B_{12} ou cobalamine, la choline (ou vitamine B_4 ou B_7 pour les Anglo-Saxons), la biotine ou vitamine H ou B_8, la vitamine B_6 ou pyridoxine, les acides foliques ou vitamine B_9 et l'inositol (Dchadeau, 2001).

Tableau 1.Classification des substances douées d'une activité vitaminique (Dchadeau, 2001).

Formes naturelles	**Présentation commerciales usuelles**	**Activité exprimée en**
Vitamines A **A_1** : rétinol (alcool) 11 cis rétinal (aldéhyde) A_2 :3-déshydrorétinol acides rétinoïques : acide rétinoïque tout trans acide rétinoïque 9 cis	Acétate et palmitate de vitamine A rétinol sur support protecteur (microbilles) hydrodispersible	Unité intentionnels (UI), soit 0,33µg d'A1 ou 0.6µg de β-carotène
Provitamine A **β, α carotènes cryptoxanthine**	β-carotène	
Vitamine D **D_2 :** ergocalciférol **D_3 :** cholécalciférol	Vitamine D_2 Vitamine D_3 libre ou fixe Support (microbilles, produit hydrodispersible)	UI sont 0,025µg de vitamine D_2 ou vitamine D_3
Vitamine e αtocophérol βtocophérol	αTocophérol acétate de αTocophérol	UI et mg (1 UI=1mg) D'acétate de αTocophérol
Vitamine k **K_1** : phylloquinone **K_2** : ménaquinones	**K_1** **K_3** ménadione	mg de k1 et k3 (1mg De k3 = 3,8 mg de k1)

1.1.2 Les vitamines liposolubles

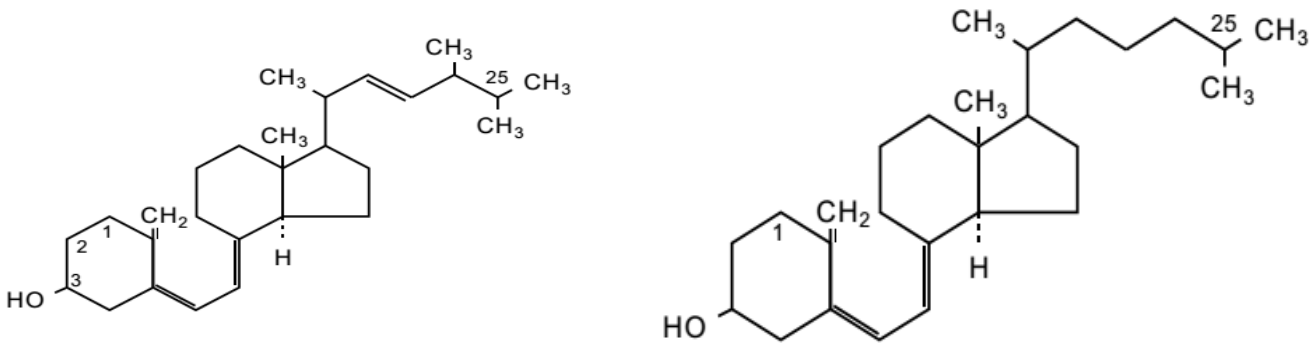
Les vitamines liposolubles sont les vitamines A, D, E et K ; elles sont solubles dans les lipides et les solvants organiques. Les matières grasses de la ration assurent leur transfert et leur absorption, selon les mêmes mécanismes que les lipides. Elles sont ensuite stockées en quantité relativement importante (variable en fonction de l'apport alimentaire) dans le tissu adipeux et le foie ; elles peuvent donc être administrées de façon discontinue. Cette capacité de stockage présente à la fois l'avantage de fournir régulièrement à l'organisme les quantités nécessaires à ses besoins, mais aussi l'inconvénient d'une toxicité potentielle si l'accumulation est excessive, donc une altération de la santé des animaux et de leurs performances.

Le mode d'action de ces vitamines est lié à leur caractère liposoluble (insertion membranaire, modulation de l'expression de différents gènes). Il existe plusieurs structures ayant une activité vitaminique A, D, E ou K : cette hétérogénéité structurale conduit à parler des vitamines A, des vitamines D, des vitamines E et des vitamines K (Dchadeau, 2001).

1.2. La Vitamine D

La vitamine D est une vitamine liposoluble mais qui doit être considérée comme une prohormone. Elle fait partie des sécostéroïdes. Elle existe sous 2 formes qui sont toutes deux converties en leur principal métabolite actif la 1,25-dihydroxyvitamine D ou Calcitriol.

1.2.1.aspects biochimiques



a **b**

Figure 1. structure chemique de la vitamine D, (a) Vitamine D_2 (b) vitamine D_3 (Khennaf, 2010; Murry, 2011).

1.2.2 Métabolisme de vitamine D_3

1.2.2.1 Synthèse au niveau cutané

Chez toutes les espèces, l'apport alimentaire de vitamine D_3 est complété par une synthèse au niveau de la peau si l'animal est exposé aux rayons ultra-violets du soleil ou de lampes. Un précurseur stéroïde (le 7 déhydrocholestérol) présent dans les sécrétions cutanées est en effet transformé en vitamine D à la surface de la peau sous l'action des rayons ultra-violets (Dchadeau, 2001).

1.2.2.2 Apport alimentaire

La vitamine D_3 est absorbée surtout au niveau du jéjunum, en présence de sels biliaires ; elle est liée à une globuline qui la protège de l'oxydation, donc de l'inactivation (Dchadeau, 2001).

1.2.2.3 Voies d'activation

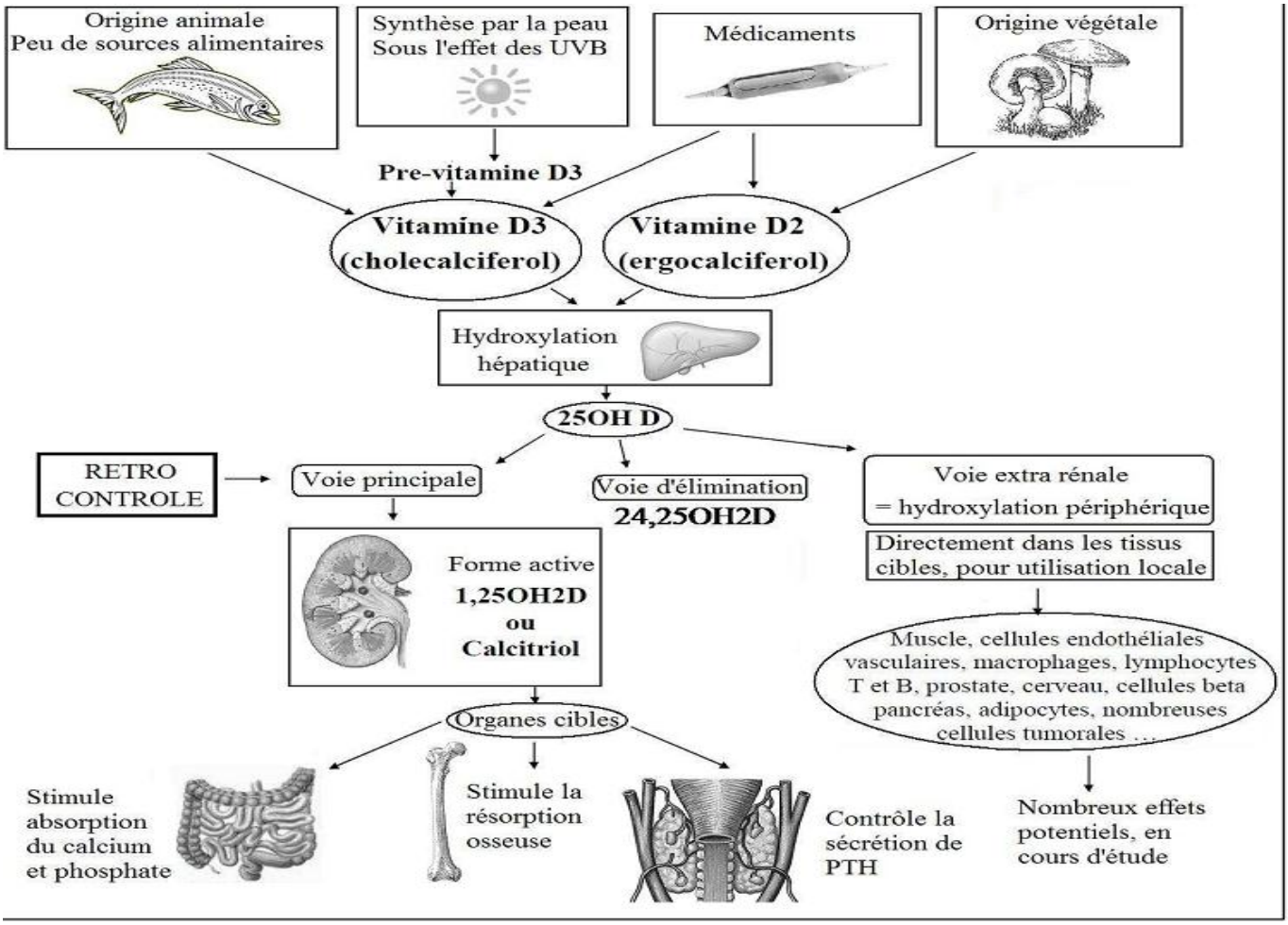


Figure2. Voies d'activation de la vitamine D (Fabienne., 2012).

Dans le foie, la vitamine D_3 subit une première hydroxylation en position 25 en présence d'un enzyme 25 hydroxylase. Comme la plupart des ligands hydrophobes, cette molécule est ensuite transportée de façon spécifique par une globuline, la D Binding Protein et de façon non spécifique par l'albumine jusqu'au rein où elle subit une deuxième hydroxylation en 1α (en position axiale) : la molécule obtenue est le 1α, 25 dihydroxycholécalciférol ou calcitriol qui correspond à la forme active douée d'une action hormonale lors de la régulation de la calcémie.

Cette synthèse de vitamine D_3 est régulée par plusieurs molécules : la parathormone, hormone peptidique produite par les parathyroïdes, active la 25 hydroxylase hépatique et la 1αhydroxylase rénale et inhibe les autres enzymes hydroxylases hépatiques qui agissent en 23, 24 et 26. Par conséquent, elle augmente la synthèse du calcitriol et conduit à l'obtention d'un composé qui est une hormone apolaire à part entière. Au contraire, les dérivés hydroxylés du calciférol limitent la production du calcitriol : la 25 hydroxylase subit une rétroinhibition de faible importance par le25 hydroxycholécalciférol ; mais surtout, le 1α, 25 dihydroxycholécalciférol (ou calcitriol) induit la synthèse des différentes hydroxylases hépatiques 23, 24 et 26 et des récepteurs nucléaires du calcitriol et réprime la synthèse de la 25 hydroxylase et de la 1αhydroxylase. Ainsi, le calcitriol favorise sa propre distribution et son élimination tout en réprimant une exacerbation de sa synthèse (Dchadeau, 2001).

1.2.2.4 Régulation de la synthèse de 1,25(OH) 2D

La synthèse de 1,25(OH) 2D est stimulée par des concentrations croissantes de parathormone (PTH) répondant elles-mêmes à de faibles concentrations sériques de calcium. De faibles concentrations en phosphate peuvent également induire une production accrue de 1,25(OH) 2D. A

l'opposé, la production de 1,25(OH)2D est inhibée par le Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) sécrété par les ostéocytes. Les concentrations de 1,25(OH) 2D exercent également un rétrocontrôle négatif sur sa propre production en inhibant la 1-α-hydroxylase et en stimulant la 24-hydroxylase qui transforme la 1,25(OH) 2D en 24,25(OH)2D, forme biologique inactive du calcitriol. En cas d'insuffisance en vitamine D, l'absorption intestinale de calcium est diminuée, ce qui engendre une diminution de la calcémie ionisée, elle-même responsable d'une augmentation de la production de PTH. Or, la PTH augmente la production de 1,25(OH) 2D.

Ainsi, en cas de déficit en 25(OH) D, la concentration sérique de 1,25(OH) 2D peut être augmentée (Murry, 2011).

1.2.3. Stockage

Contrairement aux autres vitamines liposolubles, la vitamine D n'est pas stockée dans le foie mais majoritairement dans le tissu adipeux et dans les muscles sous forme de 25 OHD. Elle est donc mobilisable en cas de diminution des apports qu'ils soient alimentaires ou issus de la synthèse cutanée (période hivernale par exemple). La distribution de la vitamine D_3 dans l'organisme varie selon la molécule. Le cholécalciférol (D3) qui représente 65 % de l'ensemble de la vitamine D de l'organisme est principalement stocké dans le tissu graisseux (à 75%) tandis que la 25 OHD qui représente 35 % de la vitamine D de l'organisme, possède une distribution plus ubiquitaire : 20 %dans les muscles, 30 % dans le sérum, 35 % dans le tissu graisseux et 15 % dans les autres tissus (Briot et al., 2009; Heaney *et al*., 2009; Murry, 2011).

1.2.4 L'homéostasie phosphocalcique

1.2.4.1 Effet de la vitamine D_3

Le rôle le mieux connu de la vitamine D_3 est le maintien de l'homéostasie phosphocalcique par augmentation de l'absorption intestinale du calcium et du phosphore. Dans la cellule intestinale, la 1,25 (OH) 2D induit la synthèse : de

•la protéine TRPV6 (transient receptor potential cation Channel, family V, member 6) qui crée un canal calcique au niveau de la bordure en brosse apicale de l'entérocyte, permettant l'entrée de calcium dans la cellule

•la calbindine 9K qui transporte le calcium dans l'entérocyte.

•la protéine NPT2b qui est un cotransporteur sodium-phosphate favorisant l'entrée du phosphate dans l'entérocyte (White *et al;* 1998; Hoenderop *et al*; 2005; Murry; 2011).

Au niveau rénal, la 1,25(OH) 2D augmente la réabsorption tubulaire distale de calcium et la réabsorption tubulaire proximale de phosphore. Ce processus permet une augmentation significative de la fraction de calcium et de phosphore absorbée par rapport à la quantité ingérée. Ce mécanisme nécessite une concentration plasmatique élevée de vitamine D et il est donc prépondérant lorsque les apports en calcium et phosphore sont faibles dans certaines conditions physiologiques (pendant la croissance ou la grossesse) ou pathologiques (comme l'hyperparathyroïdie) (Holick, 2007; Murry; 2011).

1.3. Une hormone à part entière

La 1,25(OH) 2 D doit être considérée comme une hormone stéroïde, au même titre que le cortisol, l'aldostérone ou les hormones sexuelles (œstradiol, progestérone et testostérone). Tout d'abord d'un point de vue moléculaire, sa structure est comparable, issue du noyau cyclopentanoperhydrophénanthrène(4noyaux accolés)(figure 3 et 4) (Norman, 2008; Briot *et al*, 2009). Ensuite, le récepteur à la vitamine D (VDR) présente toutes les caractéristiques des récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdes. En particulier, il est organisé en domaines: domaine de liaison au ligand, domaine de liaison à l'ADN, domaines variables et domaine de transactivation. Comme pour les autres hormones, l'interaction entre la 1,25(OH) 2D et son récepteur induit un changement de conformation. C'est ce complexe nouvellement formé qui permet alors l'activation de la machine transcriptionnelle, et l'expression de nombreux gènes.

A ce jour, le VDR a été retrouvé dans plus de 35 tissus différents, outre les classiques organes du métabolisme osseux. Tous ces organes ont montré leur capacité à produire leur propre 1,25(OH)2 D, car ils expriment l'enzyme 1,alpha, hydroxylase. Cela engendre une production paracrine de 1,25(OH) 2D, qui n'est pas détectable dans la circulation sanguine mais qui a bel et bien des effets cliniques (Norman ; 2008; Murry, 2011).

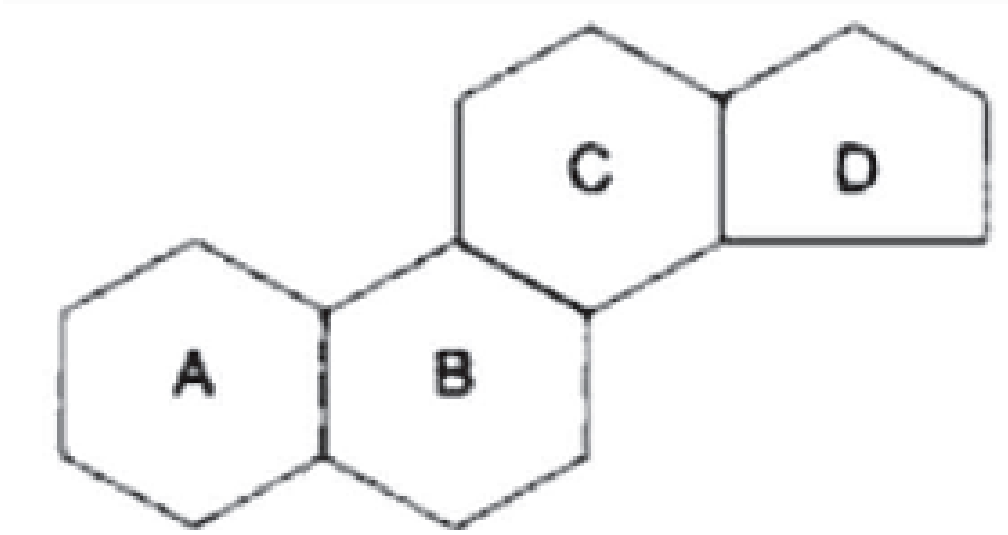


Figure 3. Noyau commun aux hormones stéroïdes (Norman, 2008 ; Murry, 2011).

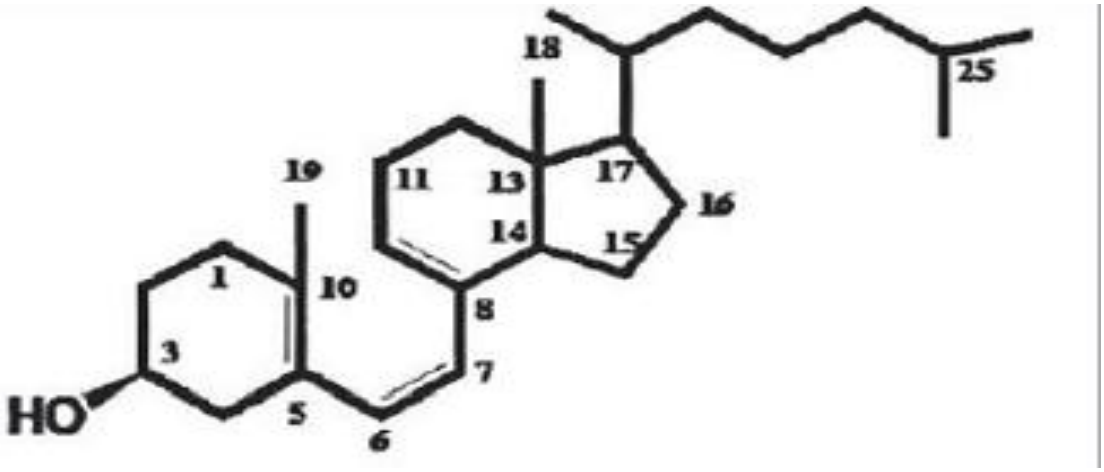


Figure 4. Structure chimique de la prévitamine D_3 (Norman, 2008 ; Murry, 2011)**.**

1.3.1. Fonctions vitaminiques

Le calcitriol agit comme une véritable hormone apolaire sur plusieurs organes cibles (intestin, os, rein, parathyroïde) et se comporte en facteur hypercalcémiant. Elle a un effet similaire, mais moindre, sur le phosphore la figure 5 qui présente la vitamine D_3 est donc indispensable à l'absorption intestinale du calcium et indirectement du phosphore. Lors de carence en vitamine D_3, il n'y a pas de modification majeure (taille, composition) des protéoglycannes de la corticale diaphysaire de l'os; par contre, la substance hyaluronique est plus abondante car sa synthèse est régulée par un facteur dont la production serait influencée par la vitamine D_3 (Dchadeau, 2001).

La vitamine D ou calciférol est apportée par l'alimentation (20 % de la vitamine D), sous la forme de provitamines liposolubles : la vitamine D2 ou ergocalciférol d'origine végétale et la vitamine D_3 ou cholécalciférol d'origine animale. Mais pour l'essentiel (80 % de la vitamine D), elle est synthétisée dans la peau sous l'influence des rayons UV du soleil. Cette synthèse dépend de l'ensoleillement, des habitudes vestimentaires, de l'état de la peau. La pigmentation cutanée (noirs), le vieillissement cutané réduisent la synthèse de vitamine D_3. Quelle que soit son origine, la vitamine D_3 s'accumule dans le foie où elle subit une première hydroxylation qui conduit au 25-hydroxycholécalciférol ou 25-OH-D3 ou calcidiol. Une seconde hydroxylation a lieu dans le rein et donne le 1,25-dihydrocholécalciférol ou 1,25-OH 2 -D ou calcitriol qui constitue la forme active de la vitamine D_3.

La vitamine D_3 se comporte comme une hormone. Elle permet l'absorption intestinale du calcium et diminue son élimination urinaire. Elle fixe le calcium sur l'os à dose physiologique (calciférol = qui porte le calcium) mais le libère à forte dose, provoquant une hypercalcémie. C'est le calcidiol ou 25-OH-D3, forme circulante prépondérante, qui est dosé dans le sérum. Le dosage du 1,25-OH 2-D3 ou calcitriol est possible mais n'est utile que dans des cas particuliers (dans une sarcoïdose par exemple) (Briot *et al*.2009).

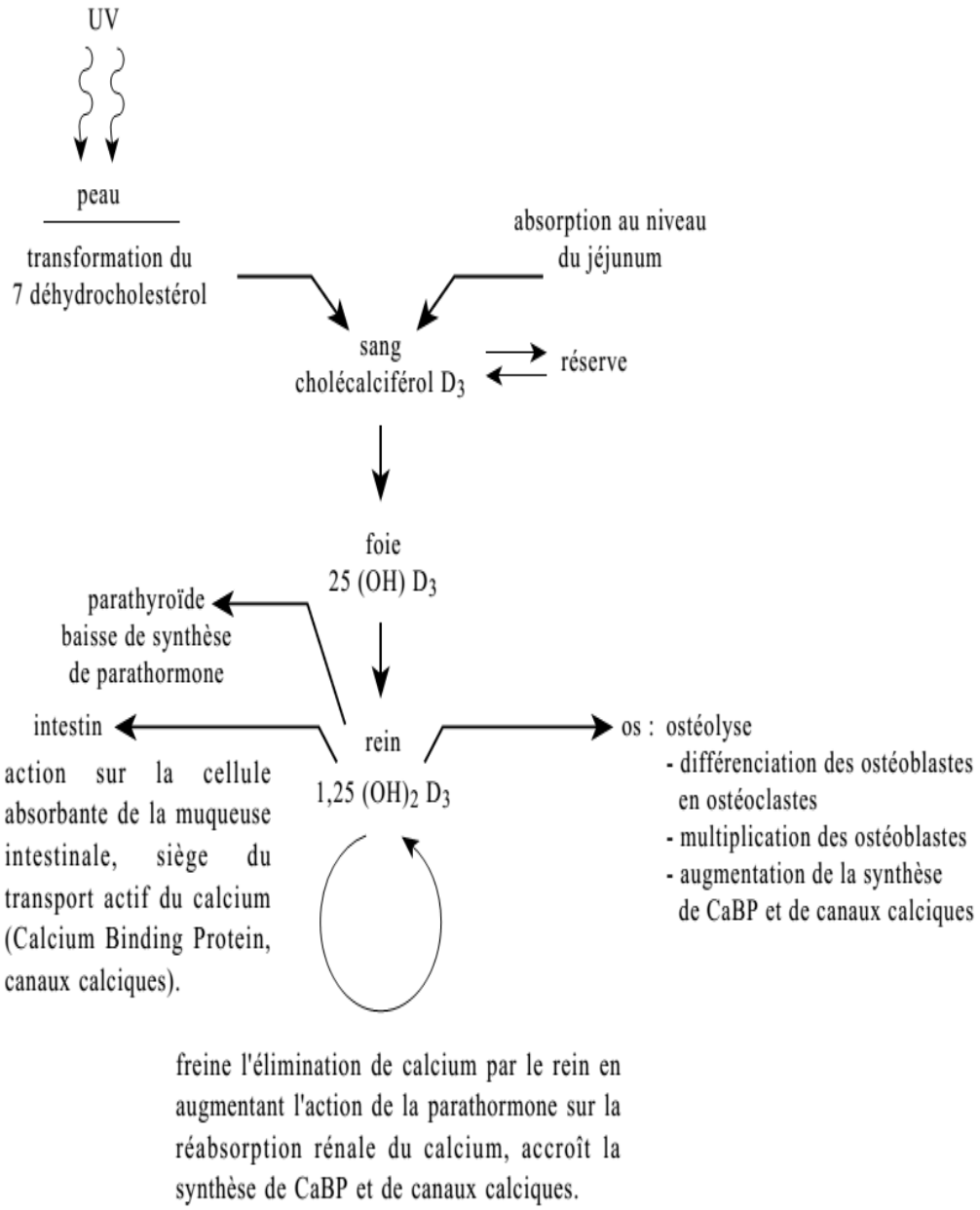


Figure 5. Fonctions vitaminiques de la vitamine D (Dchadeau, 2001).

1.3.1.1 Effet sur le métabolisme osseux

La vitamine D_3 stimule l'absorption intestinale du calcium, ce qui est bénéfique à la minéralisation osseuse. Un déficit en vitamine entraine donc, dans les cas extrêmes, un défaut de minéralisation (rachitisme chez l'enfant et ostéomalacie chez l'adulte). Dans un premier temps, la diminution de l'absorption intestinale du calcium stimule le remodelage osseux (par une élévation de la PTH) et, à long terme, contribue à l'ostéoporose et à une diminution du contenu minéral osseux (Bischoff, 2004).

Une étude américaine de décembre 2005, compare les densitométries osseuses (DMO) en fonction du taux de vitamine D_3 figure 6. Les données sont ajustées en fonction du sexe, de l'âge, de l'Indice de Masse Corporelle, du tabagisme, des apports calciques, de l'utilisation d'œstrogène, du mois durant lequel le dosage de vitamine D_3 a été effectué et de la pauvreté du patient. Cette étude montre bien que lorsque le taux sérique de vitamine (en abscisse) est trop bas, la densité osseuse mesurée (en ordonnée) diminue, donc le risque fracturaire augmente (Bischoff, 2006).

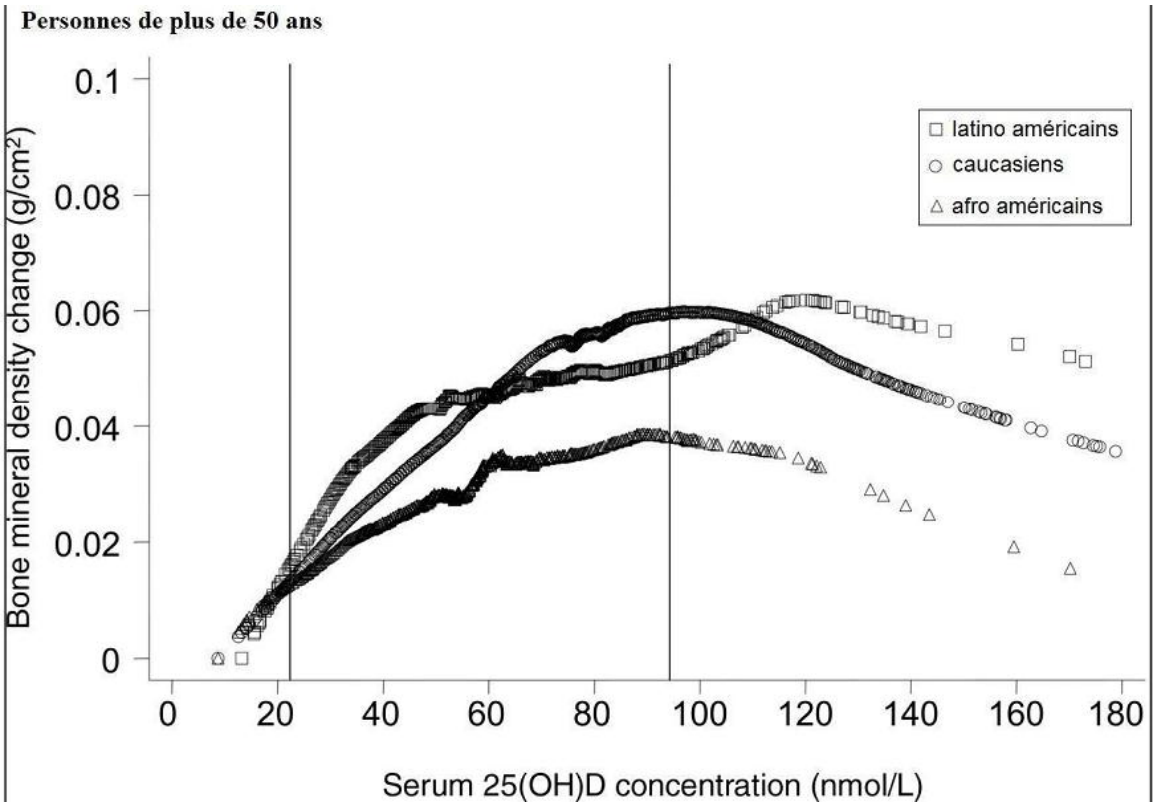


Figure7. Densité osseuse en fonction du taux de vitamine D_3 (De Cock, 2008; Fabienne, 2012).

1.3.1.2. Effet extra osseux de la vitamine D_3

1.3.1.2.1 Fonction musculaire et chutes

A partir de l'âge de 70 ans, une femme sur trois tombe chaque année et après une fracture du col du fémur, 20% à 25% des patient(e)s décèdent dans l'année (De Cock, 2008; Fabienne, 2012) c'est pourquoi il est particulièrement important de prévenir les chutes chez le sujet âgé. Deux études principales ont mis en évidence l'association significative qu'il existe entre carence en vitamine D_3 et chutes :

• Tout d'abord, une étude hollandaise, en 2003, a montré que l'hypovitaminose D_3 et l'hyperparathyroïdie étaient responsables d'un risque accru de sarcopénie chez la personne âgée(Visser; 2003; Fabienne; 2012).

• Ensuite, une étude américaine, en 2006, randomisée contre placebo, a montré que la supplémentation en vitamine D_3 permet une diminution du risque de chute de 46% chez les femmes de plus de 60 ans. Ce bénéfice est encore plus marqué chez les femmes n'ayant que peu ou pas d'activité physique (diminution du risque relatif de 65%). (Bischoff; 2006; Fabienne; 2012).

a. Cancers

De nombreuses enquêtes épidémiologiques ont suggéré que des concentrations élevées de vitamine D_3 sont associées à une réduction de la fréquence des cancers et à une réduction de la mortalité liée aux cancers (Elisabeth., 2011), entre autres : colorectal, de prostate, du poumon, des ovaires, et du sein (Gilberto et Claudia; 2009; Briot et Audran; 2010; Fabienne, 2012).

b. Risque cardiovasculaire

L'hypovitaminose D_3 serait un facteur de risque cardio-vasculaire direct (Wang et al, 2008): une étude américaine menée en 2008 montrait que pour les sujets carencés en vitamine D_3, le risque relatif de développer un premier évènement cardio vasculaire (AVC, angor, infarctus) était augmenté de 62%. La vitamine D_3 aurait aussi plusieurs rôles indirects dans le risque cardiovasculaire, en agissant sur :

• L'hypertension artérielle : une étude de 2007 montre que la concentration de vitamine D_3 est inversement corrélée au risque de développer une hypertension (Forman *et al*; 2007).

• L'athérosclérose : la vitamine D_3 diminuerait l'inflammation et la calcification des artères.

• Le diabète de type 2 : la carence en vitamine D_3 diminue la production d'insuline, augmente la résistance à l'insuline et est associée au syndrome métabolique (Chiu *et al*; 2004).

c. Système immunitaire

Des observations réalisées *in vitro* indiquent une action stimulatrice de la vitamine D_3 sur les macrophages et les cellules dendritiques (Gilberto et Claudia, 2009; Fabienne; 2012). Cependant, ce n'est qu'en 2009 que la preuve de cette action a été apportée *in vivo*, dans un modèle d'infection mammaire par *Streptococcus uberis* chez la vache.

Cette stimulation permettrait de diminuer le risque infectieux chez les patients ne présentant pas de carence en vitamine D_3 (Elisabeth, 2011). D'après l'étude NHANE III, le risque d'infections des voies respiratoires hautes serait plus élevé en cas de carence en vitamine (Fabienne, 2012)

d. Diabète de type 1

L'administration de vitamine D_3 semble empêcher le développement du diabète de type I. Une étude réalisée dans des régions du Grand Nord de la France, très peu ensoleillées a montré que la supplémentation en vitamine D_3 durant la première année de vie réduit de 78% le risque de développer un diabète de type I avant l'âge de 30 ans. Les enfants chez lesquels on soupçonnait la présence de rachitisme présentaient quant à eux, trois fois plus de risques de développer un diabète que des enfants en bonne santé (Fabienne, 2012).

e. Maladies inflammatoires

D'études transversales ont montré que des taux élevé de 1,25(OH) 2D éteint à une diminution du risque de poussées au cours de la polyarthrite rhumatoïde, et des entérocolopathies inflammatoires (Briot *et al.*, 2009).

F. Effet anti-infectieux de la vitamine D

Des liens significatifs pourraient aussi exister entre apport de vitamine D_3et réduction de la mortalité, des risques d'infections (Briot et Audran., 2010).

L'expression des peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales et les macrophages en présence d'un agent infectieux est dépendante de la présence de vitamine D_3. De plus dans le macrophage, la vitamine D_3 supprime l'activité des cytokines proinflammatoires (TNF_{γ}, TNFα, IL12).la carence en vitamine D_3, plus fréquente durant l'hiver pourrait participer au caractère saisonnier des infections grippales. L'analyse a posteriori d'un essai randomisé a suggéré que L'administration de 2000 UI/j de vitamine D_3 réduit la fréquence des infections respiratoires (Briot *et al* ,2009).

g. Autres effets

-La dépression

il existe des récepteurs à la vitamine D_3 dans le système nerveux central. En Angleterre, une étude menée en 2010, et regroupant plus de 2000 participants âgés en moyenne de 65 ans, a montré que les symptômes dépressifs étaient associés à une carence en vitamine D_3 (Fabienne, 2012).

-Troubles dentaires

Dans une étude menée en 2001, les dentitions de 145 patients ont été examinées (moyenne d'âge : 71 ans). Dix-huit mois plus tard, puis à 5 ans, le risque relatif d'avoir perdu une ou plusieurs dents était augmenté de 40% puis 50% chez les patients non supplémentés par rapport à ceux qui avaient reçu une supplémentation vitamino-calcique (Fabienne, 2012).

Carence de vitamine D_3

2. Carence de vitamine D_3 :

2.1 Causes d'insuffisance

Les causes de carence et d'insuffisance en vitamine D_3 sont nombreuses et souvent intriquées. La principale est la diminution de la synthèse cutanée, pouvant résulter du manque d'exposition solaire (vie en milieu urbain, port de vêtements couvrants, application des consignes de photo protection en prévention des cancers cutanés, photosensibilité ou allergie solaire), de la situation géographique (au-delà du 35^{e} degré de latitude Nord, comme en France métropolitaine, la capacité de synthèse est considérée comme nulle ou quasi-nulle entre novembre et février), du phototype du fait de l'absorption des ultraviolets B par la mélanine (la diminution de la synthèse de vitamine D_3 peut atteindre 99% en cas de phototype très foncé) , de l'application d'écrans solaires qui empêchent la pénétration des ultraviolets B(diminution de la synthèse de vitamine D_3 de l'ordre de 99 % pour un indice 15) (Holick., 2007), ou encore du vieillissement par le biais d'une diminution de la quantité de 7-déhydrocholestérol au niveau de la peau (capacité de synthèse de vitamine D_3 réduite de 75 % à l'âge de 70 ans).

Parmi les autres causes, on citera la carence d'apport alimentaire qui est généralisée compte-tenu des teneurs extrêmement faibles en vitamine D_3de la majorité des aliments en dehors des poissons gras, l'obésité qui diminue la biodisponibité de la vitamine D_3 parle biais d'une séquestration de la vitamine D_3, liposoluble, dans le tissu adipeux, certains médicaments comme les corticoïdes et certains inducteurs enzymatiques qui activent le récepteur nucléaire Steroid and Xenobiotic Receptor (SXR) et induisent par ce biais une expression accrue de CYP3A4 qui augmente le catabolisme de la1,25(OH)2D (Holick., 2007). Plus récemment, des associations entre des polymorphismes des gènes DBP, VDR, CYP2R1, CYP24A1 et du gène codant pour la 7-déhydrocholestérol réductase et le taux sérique de 25(OH)D, ont été décrites (Schoindre., 2012).

2.2 Epidémiologie

2.2.1 Prévalence de l'hypovitaminose D_3

La prévalence du déficit en vitamine D_3 varie selon les seuils retenus pour définir la carence ou l'insuffisance. Toutefois, quel que soit le seuil retenu, l'insuffisance en vitamine D_3 serait largement répandue à travers le monde (Holick., 2006; Holick., 2007; Cavalier et Souberbielle., 2009; Benhamou *et al*., 2011).

Une revue de la littérature s'intéressant au statut vitaminique D_3 des populations de 6 régions du monde (Asie, Europe, Moyen-Orient, Amérique du Nord, Amérique du Sud et Océanie), rapporte que l'hypovitaminose D_3 est un phénomène très répandu. Les niveaux de 25(OH)D sériques inférieurs à 75 nmol/L sont répandus dans toutes les régions tandis que les taux sériques les plus bas (< 25 nmol/L) touchent davantage les populations de l'Asie du Sud et du Moyen-Orient (Mithal *et al*., 2009; Benhamou *et al*., 2011).

2.2.2 Facteurs influençant la prévalence de la vitamine D_3

L'exposition solaire représente la principale source de vitamine D_3. Ainsi, la prévalence des déficits en vitamine D_3 est influencée par la durée moyenne d'ensoleillement du département de résidence et elle est plus importante dans le Nord que dans le Sud de la France (Chapuy *et al*., 1997; Benhamou et al., 2011; Vernay *et al*., 2012). L'étude nationale Nutrition Santé 2006-2007 montre également que cette prévalence est fonction de la période des prélèvements biologiques, le risque d'insuffisance étant plus important en hiver et au début du printemps. Cette même étude montre que le niveau d'activité physique, la sédentarité, l'âge, le lieu de naissance et même l'Indice de Masse Corporelle (IMC) sont corrélés aux concentrations de 25(OH) D (Benhamou *et al.*, 2011; Vernay M et al., 2012). De même, Mithal *et al.*, 2009, rapportent des différences selon la pigmentation de la peau et les habitudes culturelles des populations testées.

2.2.3 Risques associés (établis ou supposés) à une insuffisance en vitamine D

2.2.3.1. Rachitisme

Le rachitisme est un syndrome résultant d'un défaut de minéralisation osseuse. Il existe plusieurs formes étiologiques de rachitisme dont le principal est lié à une carence en vitamine D_3. Le rachitisme carentiel peut survenir pour des concentrations sériques de 25(OH) D inférieures à 25 nmol/L (Lafage, 2000).

2.2.3.2. Ostéomalacie

L'ostéomalacie est une ostéopathie métabolique étendue à l'ensemble du squelette. Elle correspond à un défaut de minéralisation osseuse conduisant à une accumulation de tissu ostéoïde. Le tissu osseux devient fragile et le risque de fracture important. L'ostéomalacie se manifeste par des douleurs osseuses diffuses et une difficulté à la marche liée à une faiblesse musculaire. L'étiologie la plus fréquente des ostéomalacies est la carence en vitamine D_3. Une concentration de 25(OH)D inférieure à 25nmol/Lest constamment retrouvée dans l'ostéomalacie carentielle (Lafage, 2000).

2.2.3.3. Ostéoporose

Un approvisionnement sous-optimal en vitamine D_3 contribue à l'apparition de l'ostéoporose chez le sujet âgé. Les principaux symptômes de celle-ci sont à la fois une fonte de la masse osseuse et une porosité croissante de l'os. Ils conduisent à une fragilisation du squelette avec risque accru de fractures. À relever qu'un apport de vitamine D_3 adapté non seulement solidifie les os, mais accroît aussi la force musculaire et réduit ainsi le risque de chutes (Elisabeth *et al*., 2011).

Matériels Et Méthodes

3. Matériels Et Méthodes

3. Matériels

3.1.1. Description de produit utilisé

Le matériel utilise est vitamine D_3 sous forme huile produit pharmaceutique composition cholécalciférol vitamine D_3 200 000UI, triglycéride a chaine moyenne q. s. 1ml fabriqué par laboratoires de BOUCHARA RECORDATI, France.

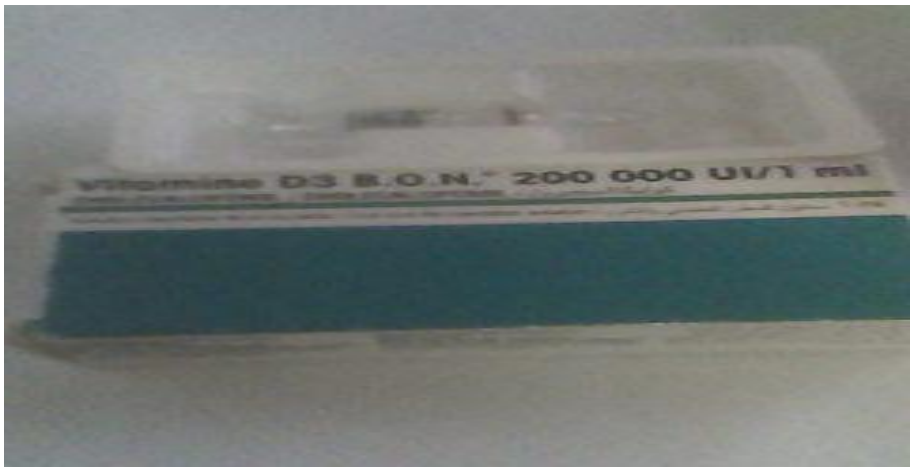


Figure7. La forme générique de la vitamine D_3

3.1.2. Solution de travail

- **Préparation de DPPH**

4mg de DPPH dans 100ml d'éthanol.

- **Préparation l'eau physiologique**

4.5g de NACL dans 500 ml de l'eau distillé.

- **Préparation de BHT**

20mg de BHT dans 10 ml d'éthanol

3.1.3. Les souches microbiennes utilisées

3.1.3.1. Les bactéries

Les souches utilisées sont des souches de référence de l'American type culture collection (ATCC), gracieusement fournies par le laboratoire de microbiologie des universités de Sétif et M'sila puis conservées à 4 °C dans des tubes à essais contenant de la gélose inclinée.

En effet quinze souches bactéries ont été tests pour l'étude de l'activité antibactérienne doute 9 sont à gram^{+} et 06 gram^{-} sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 2. Les bactéries référencées utilisées dans l'étude

bactéries	ATCC	Gram	La source
Escherichia coli	25922	-	Université de M'sila
Klebsiella pneumoniae	4352	-	Université de M'sila
Klebsiella pneumoniae	700603	-	Université de Sétif
Proteus mirabilis	35659	-	Université de Sétif
Salmonella typhimurium	13311	-	Université de Sétif
Pseudomonas aeruginosa	27853	-	Université de Sétif
Lysteria monocytogenes	15313	+	Université de Sétif
Enterococcus faecalis	2035	+	Université de M'sila
Bacillus cereus	10876	+	Université de M'sila
Staphylococcus aureus	25923	+	Université de M'sila
Micrococcus luteus	533	+	Université de M'sila
Staphylococcus epidermidis	12228	+	Université de M'sila
Bacillus subtilis	9372	+	Université de M'sila
Staphylococcus aureus	9763	+	Université de Sétif
Bacillus cereus	10876	+	Université de Sétif

3.1.4.2. Les champignons

Les levures sont obtenues du laboratoire département microbiologie et biochimie de l'université de M'sila contrairement aux bactéries on leur nombre était très représentatif et malgré des efforts dispensé, deux levures pour acquérir des souches fongique seulement ont été utilisés pour l'activité antifongique et qui sont trouvés dans le tableau 3

Tableau 3. Les levures référencées utilisées dans l'étude

levure	ATCC	La source
Candida albicans	10231	Université de M'sila
Saccharomyces cerevisiae	9763	Université de M'sila

3.1.5. L'unité de mesure de la vitamine D_3

Son unité de mesure est exprimée en Unité Internationale (UI) ou en microgramme (µg) dans les médicaments, les compléments alimentaires ou l'alimentation et en nano mole par litre (nmol/L) ou nano gramme par millilitre (ng/mL) dans les bilans sanguins. Les équivalents entre les différentes unités sont :

100 UI= 2,5 µg et 1nmol/L= 0,4ng/mL (Murry, 2011).

3.2. Méthodes

3.2.1 Évaluation de l'activité par le test DPPH

3.2.2. Activité antioxydante

De nos jours, Il existe un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire(Harrar, 2012).

3.2.2.1Test au DPPH

- **Principe**

Le test au 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle (DPPH.) Est réalisé par la méthode décrite par (Ammar *et al*, 2009) qui permet de mesurer le pouvoir réducteur par le calcul de l'IC50 des substances antioxydants contenues dans un extrait. Le DPPH est un radical libre de couleur violette qui devient jaune quand il est réduit par un donneur de proton H^+.

$$DPPH + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H^+ + A^-.$$

Où AH est un composé capable de céder un H+ au radical DPPH (Harrar, 2012).

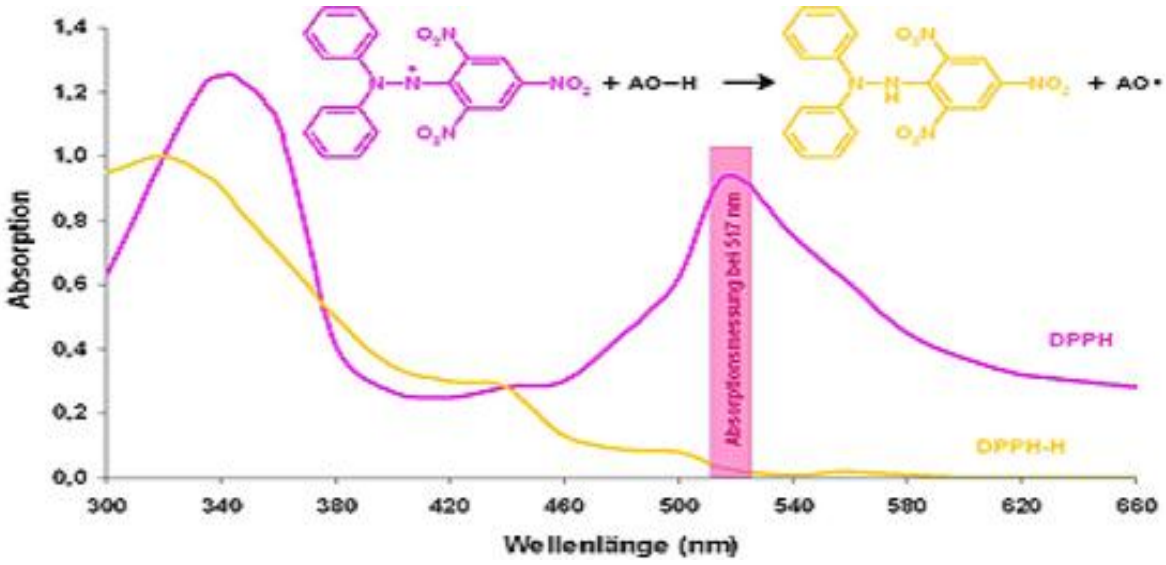


Figure 8. Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive (Brand *et al*., 1995)

➢ Matériels

-Balance de précision (KERN)

-Spectrophotomètre (SHIMADZU)

-Micropipette

➢ Réactifs

-BHT Sigma.

-DPPH Sigma.

-Ethanol Sigma.

➢ Mode opératoire

L'effet scavenger de vitamine D vis-à-vis du radical DPPH est évalué selon la méthode décrite par à Que et ses collaborateurs (2006). Un volume de 0.6 ml de la solution de DPPH (0.04%) est mélangé avec 0.6 ml des solutions de vitamine D_3 à différentes concentrations 666,66 µg/ml à 1416,66 µg/ml. ou des antioxydante standard comme Butylated hydroxytoluene (BHT). Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est lue à 517nm. Le

pourcentage de l'activité antiradicalaire est calculé selon l'équation suivante Activité anti radicalaire (%) = [(AC - At.)/ AC] x100

-**AC** : absorbance du contrôle.

-**At**. : Absorbance du test (vitamine D_3 ou antioxydant standard(BHT).

La concentration effectrice (IC50) définie comme la concentration de l'échantillon qui produit 50% d'effet piégeur du radical DPPH sont déterminée (Attou, 2011 ; Harrar, 2012).

Une fois calcules le, **APR**= 1/EC50 (Prakash *et al*., 2007). Le pouvoir anti radicalaire sont alors déterminante selon l'équation ci-dessus Répéter les mêmes opérations, en remplaçant la vitamine D_3 par le BHT

3.2.2. Étude d'Activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion de disque où les disques sont imbibés de 20µl de vitamine D_3 (Harrar, 2012).

3.2.2.1. Activité antibactérien et antifongique

- **Matériels**

-Balance de précision (KERN)

-Incubateur (memmert)

-Bec benzène

-Spectrophotomètre (SHIMADZU)

- **Réactifs**

-Tween 80 Sigma.

-DMSO Sigma.

- **Choix des milieux de culture**

Le milieu de culture utilisé pour l'activité antibactérienne est l'agar de Muller Hinton (AMH) parce que c'est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériennes, Le milieu de culture utilisé pour l'activité antifongique est Sabouraud (Gachkar *et al*., 2007; Mayachiew & Devahastin., 2008; Hussain *et al*.,2010).

➢ Préparation des suspensions bactériennes

Les bactéries à tester sont ensemencées sur des boites de pétrie contenant la gélose nutritive (GN) incube pour une durée 24 heures pour bactéries et pour levure 48heurs, afin d'obtenir une culture jeune des bactéries et des colonies isolées. Par contre le milieu Sabouraud a été utilisé pour les champignons et ceci pour incubateur de 48 heures. À partir de ces boites, à l'aide d'une anse de platine quelque colonie bien isolée et parfaitement identique sont prélevées et mises dans 5ml d'eau physiologique stérile NaCl à 0.9%. La suspension bactérienne est bien homogénéisée, et la densité optique lue à 625nm est justifiée à 0.08 à 0.10 nm. On admet que cette densité mesurée à 625nm est équivalente à 10^8 CFU/ml (Mohammedi, 2006). L'inoculum est ajusté soit en ajoutant de la culture s'il est trop faible ou de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort. L'ensemencement doit se faire en moins de 15min après la préparation de l'inoculum.

➢ Préparation des disques

Les disques sont préparés à partir du papier wattman N°40, ou 04 avec un diamètre de 6mm (0.28cm^2de surface) par l'emporte-pièce. Ensuite, ces disques sont mis dans un tube à essai, stérilisé à l'autoclave, puis stockés à une température ambiante (tube à essai hermétiquement fermé).

3.2.2.2. Tests de l'activité antibactérienne et antifongique

L'évaluation de l'activité antibactérienne de notre produit est réalisée d'abord par la méthode de diffusion des disques, en raison de sa simplicité et son efficacité pour tester la sensibilité des bactéries.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) sont estimées par la méthode de dilution d'agar. Cette méthode nous permet également de savoir la nature de l'activité antibactérienne (bactériostatique ou bactéricide).

➢ Méthode de diffusion

Méthode de diffusion des disques est la technique choisie pour déterminer l'activité antimicrobienne du produit à tester. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire de produit sur le milieu solide à l'intérieure d'une boite de pétrie .Cette méthode nous permet de mettre en évidence la sensibilité de ses bactéries vis-vis de ce produit.

➢ Ensemencement

Vingt millilitres (20ml) de l'agar de Muller Hinton pour les bactéries (Sabouraud pour les levures) en surfusion sont coulés dans des boites de pétrie. Après solidification du milieu de culture, 100 µl/ml de la suspension bactérienne et levure à tester (108CFU.ml^{-1}) sont étalés en surface.

➢ Dépôt des disques

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques de papier wattman N°40 (03disques/boite) sont déposés sur l'agar, précédemment inocules avec le microorganisme choisi, puis les imbibés par 20µl du produit. Les boites sont maintenues à 4°C pendant 1h pour que la produit puisse diffuser (rozman & Jersek., 2009).

➢ Préparation des solutions de référence d'antibiotiques

Pour les bactéries, l'antibiotique utilisé présente dans tableau 4

Tableau 4. Présenté les déférents antibiotiques utilisés.

antibiotique	abréviation	La masse
Ciprofloxacine	CIP	1µg
Céfotaxime	CTX	10µg
tétracycline	TE	10µg
Imipemam	IPM	10µg
Tobramycin	TOB	30µg
Gentamicine	G	30µg

➢ Incubation

Les boites ont été incubées à l'étuve à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 48h pour les levures montrant une sensibilité vis-à-vis aux produits testés sont sélectionnées pour déterminer (CMI) (Derwich *et al*, 2010).

➢ Méthode de dilution d'agar (Sabouraud)

Cette technique donne un intervalle de valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricide (CMB) des souches éventuellement sensibles. En outre cette technique est économique puisque elle nous permet de tester plusieurs souches bactériennes dans la même boite. Pour déterminer ces concentrations de produit, nous avons employé la méthode de dilution d'agar rapportée par Hammer *et al*. (1999) et Mayachiew & Devahastin (2008).

➢ Préparation des dilutions

Pour pouvoir obtenir différentes concentration de vitamine D, nous l'avons diluée dans le DMSO (diméthylsulfoxide). Ce choix du DMSO est appuyé d'un part de son pouvoir solvant sur la vitamine D_3, et d'autre part c'est le solvant de choix pour la majorité des auteurs, notamment, Gachkar *et al*. (2007) qui ont prouvé que le DMSO n'a aucun pouvoir antibactérien puissant.

➢ Préparation des dilutions d'agar et Sabouraud

Dix-neuf millilitres (19ml) d'AMH(Sabouraud**)** fondus, additionnés de 0.5% (v/v) tween 80, ont été mis dans un tube à essai en lui rajoutant, aseptiquement, 2ml de chaque concentration de vitamine D_3 ($130*10^3$; 15,6 µg/ml).ces concentration dite concentration initiales dans DMSO. (6500 à 0,78 µg/ml).Ces concentration dite concentration finales de produit dans l'agar (Sabouraud). Ont été choisies après des essais préliminaires, elles ont été calculées à partir de l'équation suivante :

Cf=Ci*/20*

Cf=concentration finales de produit dans l'agar.

Ci=concentration initiales de produit dans le DMSO.

Le mélange, constitué de l'AMH (Sabouraud pou les levures), du tween 80et de vitamine D_3, est homogénéisé et ramené à 45°C.

➢ Inoculation

Le mélange (différentes dilutions de vitamine D_3, AMH(Sabouraud) +tween80) est immédiatement coulé dans des boites pétri (90mm de diamètre). Après solidification de la gélose, les boites de pétri sont partagées en six parties dans lesquelles sont mises les mises les six souches bactériennes, pour les bactéries .et un seule partie pour levure sous forme de dépôts de 1µl contenant 10^{+5}UFC

Des témoins sont réalisées pour chaque souche .le DMSO a été utilisé comme contrôle négatif. Les boites de pétri (avec et sans vitamine D_3) ont été incubées à l'étuve à 37°C pendant 24hpour bactéries et 48h pour levures.

- **Lecture et expression des résultats**

Les boites de pétri dont les concentrations ayant montré une absence totale de la croissance bactérienne ont été sélectionnées pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB).

La CMI représente la plus faible concentration de produit inhibant toute croissance visible à l'œil nu après 24heures d'incubation à 37°C pour bactéries et après 48 heures pour les levures (De Billerbeck *et al.* 2002 ; Bassole *et al.* 2002).

Par ailleurs, la CMB représente la plus faible concentration de vitamine D inhibant toute croissance visible à l'œil nu après 5 jours d'incubation à 37°C (Mayachiew & Devahastin., 2008).

Le rapport CMB/CMI nous a permis de déterminer les pouvoirs bactéricide et bactériostatique de produit étudié. Lorsque ce rapport est supérieur à 4, la vitamine D a un pouvoir bactériostatique, et bactéricide quand il est inférieur ou égal à 4(Canillac & Mourey, 2001).

3.3. Analyses statistiques

L'étude statistique a été réalisée par le logiciel statistique Graph Pad Prism. Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne ± SEM. La différence entre le contrôle et les différents tests, est déterminée par le test d'ANOVA univariée suivie du test de Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées significatives. Les valeurs de la concentration inhibitrice à 50% (IC50) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe, pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration.

Résultats et Discussion

4. Résulta et Discussion

4.1Test antiradicalaire

4.1.1. Test DPPH

L'activité anti radicalaire est réalisée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle (DPPH) qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydante qui donne un hydrogène ou un électron, la forme non radicalaire DPPH -H est formée (Bortolomeazzi *et al*. 2007).

L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction de la concentration de vitamine D_3 et du témoin BHT (antioxydant de référence). L'activité antioxydante des produit est exprimée en IC50, ce paramètre très utilisé dans la littérature scientifique par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats (Abdulmajed *et al.,* 2005; Sharma et Bhat, 2009), définit la concentration efficace de la substance qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH. (voir annexe 1,2). Ces IC50 sont déterminées à partir des graphes des Figure 9 et 10 dont l'abscisse représente la concentration de vitamine D_3 brut et ou BHT et l'ordonné l'activité antioxydante en pourcentage (Harrar, 2012).

Le DPPH est un radical stable et synthétique qui ne se désagrège pas dans l'eau, méthanol, ou éthanol. Les activités de balayage de radical libre sur la vitamine D_3 dépendent de la capacité antioxydante de perdre l'hydrogène (Aksoy, 2013).

La vitamine D_3 a présenté l'activité antiradicalaire la plus élevée (72,33%) que celle BHT (69.8%) voir figure 11 une différence significative dans leur activité ($P<0.001$).

A des fins comparatives on a utilisé le BHT comme antioxydant standard, il a montré une activité anti radicalaire intéressante avec une IC50 est 285,67µg/ml et une APR de l'ordre de 0,0035 figure 9 et vitamine D_3il a montré une activité anti radicalaire intéressante avec une IC50 est 803,27µg/ml et une APR de l'ordre de 0,0012 figure 10. En comparaison avec le (BHT), la vitamine D_3 éthanoïque s'avère: moins actifs que le BHT.

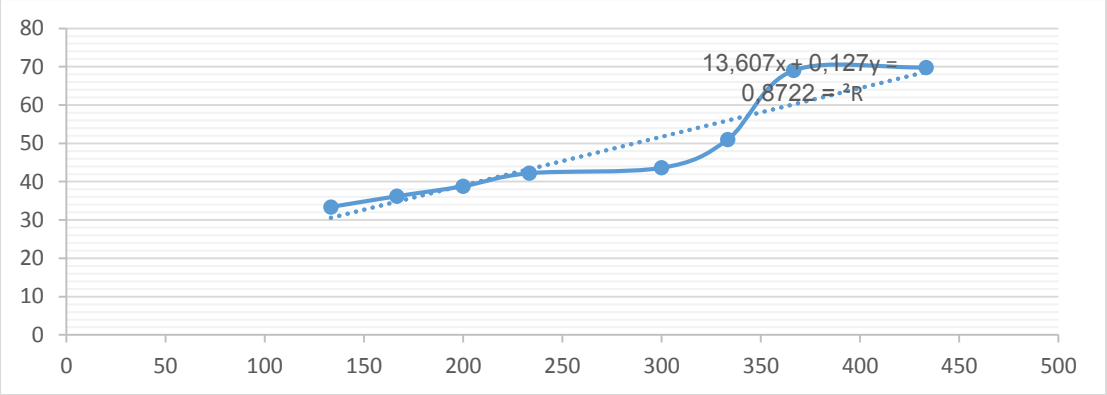


Figure. 9 Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration du BHT (chaque valeur représente la moyenne de trois essais SEM±) une déférence significative p<0.001.

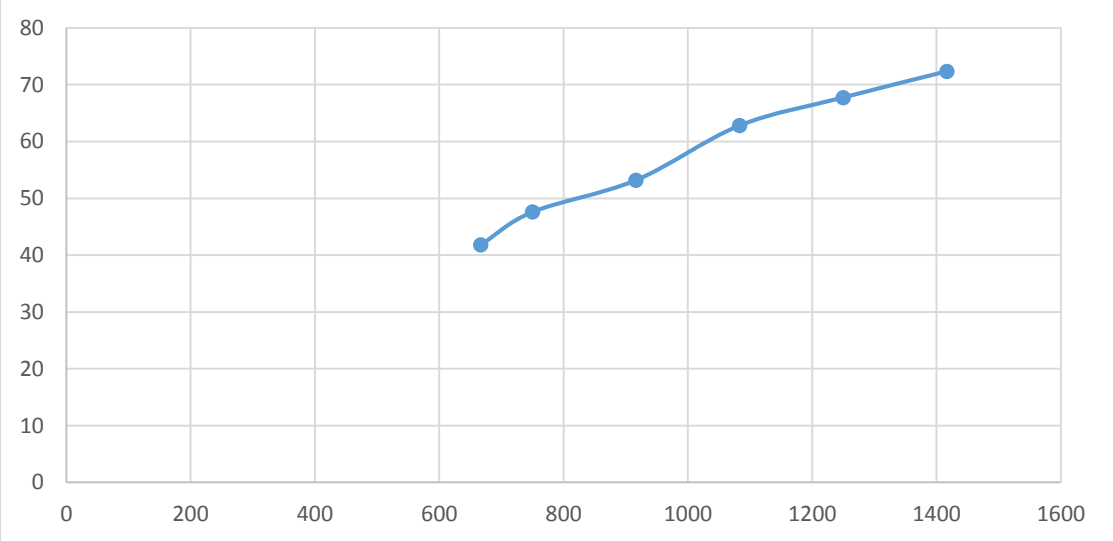


Figure. 10 Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration initiale du La vitamine D_3 (chaque valeur représente la moyenne de trois essais SEM±) une déférence significative p<0.001.

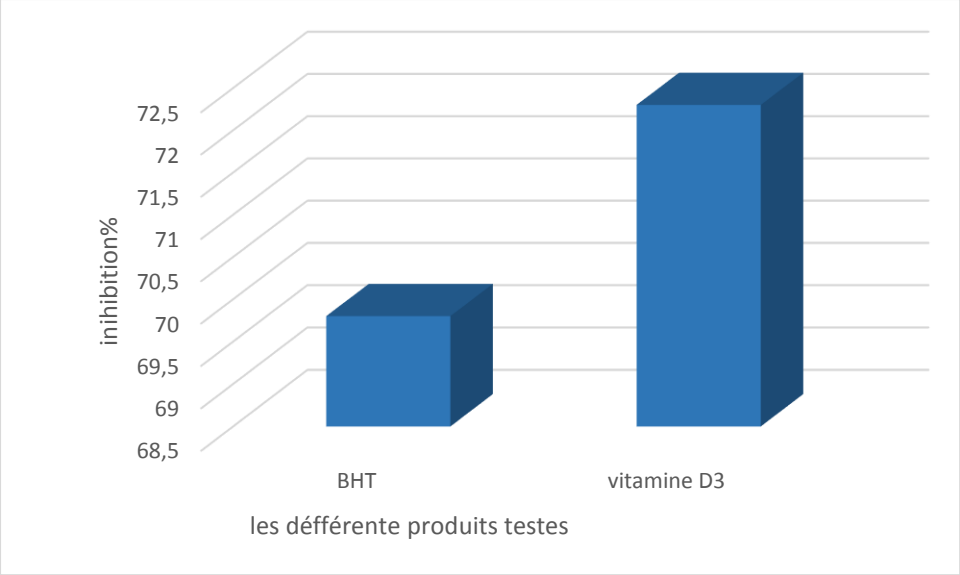


Figure. 11 comparaisons entre BHT et vitamine D.

Dans les études de l'activité antioxydante de vitamine D_3 sur le Zinc dans le CNS, Anya et Lin, 2005 ; Reiter, 1998 et Lin, 2000, ont employé les doses exactes de la vitamine D_3 et la vitamine E, ces médicaments ont été incubés en conditions identiques. Le mélatonine, qui a été employé comme antioxydant liposoluble, s'est avéré à 10^5 en période moins efficace que la vitamine D_3. Le pouvoir antioxydant était comme suit : vitamine D3 > Trolox (un analogue hydrosoluble de vitamine E) ≥ β-estradiol > mélatonine.

En conclusion, nos données *in vitro* ont prouvé que la vitamine D_3 possède une puissante propriété antioxydante (Anya et Lin., 2005). Holick, 2007 a démontré que les causes de carence et d'insuffisance en vitamine D_3 sont nombreuses et souvent intriquées.

La principale est la diminution de la synthèse cutanée, pouvant résulter du manque d'exposition solaire (vie en milieu urbain, port de vêtements couvrants, application des consignes de photoprotection en prévention des cancers cutanés, photosensibilité ou allergie solaire), de la situation géographique (au-delà du 35^e degré de latitude nord, comme en France métropolitaine, la capacité de synthèse est considérée comme nulle ou quasi-nulle entre novembre et février), du phototype ultraviolets B par la mélanine la diminution de la synthèse de vitamine D_3 peut atteindre 99 % en cas de phototype très foncé. En outre Une étude de Briot et Audrana, 2010 a montré que la carence en vitamine D_3 serait également associée à l'augmentation de l'incidence de certains cancers (sein, côlon).

4.2. Activité antimicrobienne

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antimicrobien de la vitamine D_3 par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosés solides, Agar Mueller -Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures. L'activité antimicrobienne de la vitamine D_3 a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant la vitamine D_3 à tester vis-à-vis de dix-sept (17) germes dont quinze (15) bactéries Gram $^+$ et Gram $^-$ et deux (2) champignons à savoir deux levure.

4.2.1. Test antibactérien

Si le produit doit être soumis aux essais biologiques, la toxicité du solvant peut également être critique car même en traces, le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique. L'attention devrait également être prêtée aux interactions possibles entre le solvant et les corps dissous; ainsi que le solvant peut éventuellement réagir avec certains composés pour produire des complexes ou pour causer la décomposition, la déshydratation, ou l'isomérisation de ces composés (Harrar, 2012).

Pour cela on a jugé utile de tester la sensibilité des bactéries vis-à-vis le DMSO, les résultats montrent que le solvant est approprié et ne présente aucun effet sur la croissance normale des souches microbiennes(Fig.12).

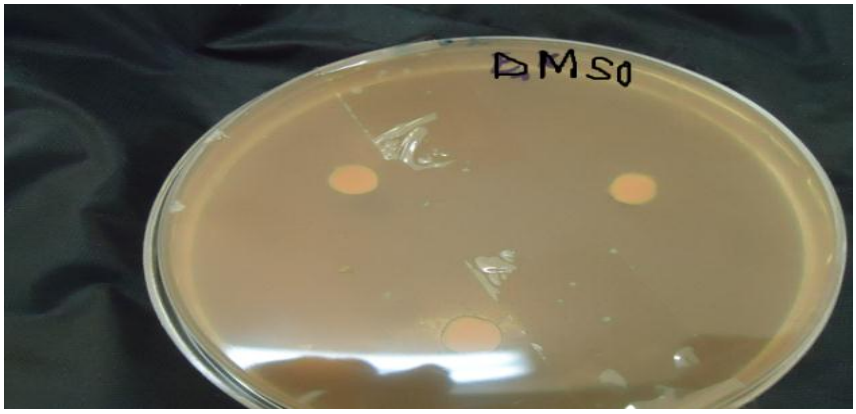


Figure 12. Effet de DMSO sur la bactérie.

4.2.1.1 Les antibiogrammes

Les souches de bactéries à Gram $^+$ et à Gram $^-$ (*Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 2035,

Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC533 ont montré des sensibilités différentes aux antibiotiques standards testés :

Imipénéme (IPM), Céfotaxime (CTX), Ciprofloxacine (CIP), Gentamicine (G), Tétracycline (TE), Tobramycin (TOB).

La bactérie *Micrococcus luteus* est résistance à tous les antibiotiques utilises. *Enterococcus faecalis* est une bactérie à Gram $^{+}$, elle est relativement résistante à certains antibiotiques tels que CTX alors qu'elle a montré une certaine sensibilité vis-à-vis la TE (diamètres des zones d'inhibition est 15mm). *Staphylococcus aureus* est une bactérie à Gram $^{+}$, elle est relativement résistante à certains antibiotiques tels que CTX alors qu'elle a montré une certaine sensibilité vis-à-vis de la G (diamètres des zones d'inhibition est 14 mm). *Proteus mirabilis* est résistante a certain antibiotique tell que (IPM) et a montré une certain sensibilité contre la TOB (diamètres des zones d'inhibition est 15 mm), *Salmonella typhimurium* a montrés une sensibilité à la gentamicine 15 mm, et elle a exprimé certaine résistance vis-à-vis la TE, *Bacillus cereus* est une bactérie à Gram +, elle est relativement résistante à certains antibiotiques tels que CIP alors qu'elle a montré une certain sensibilité vis-à-vis de la CTX (diamètres des zones d'inhibition de 10mm)

4.2.1.2 Sensibilité des souches bactérienne à la vitamine D_3 :

Les effets inhibiteurs de la vitamine D_3 sur croissance des germes sont manifestés par vitamine D à partir d'une concentration mère *de* 100 µg/ml, sur 15 bactéries, Les diamètres d'inhibition sont en fonction de la dose déposée sur le disque. *M. luteus* est la souche la plus sensible, à 100 µg/ml le diamètre d'inhibition est de 22 mm, suivie respectivement *S.aureus* (17,83 mm), *P. mirabilis* (17,5 mm), puis *E. faecalis* (16,5 mm), *B. cereus* (15,17 mm), et enfin *S. typhimurium* (12 mm) et aucune effet inhibiteur de la croissance de les autres bactéries dans concentration 100µg/ml de vitamine D_3 voir tableau 5, 6.

Tableau 5. Diamètre de zones d'inhibition (en mm) obtenu sur les bactéries (chaque valeur représente la moyenne SEM ±de trois essais).

Bactérie	**résultat**	**Diamètre (mm) ±SEM**
Proteus mirabilis ATCC 35659	++	**17,5 ± 1,04**
Bacillus cereus ATCC 10876	++	**15,17 ±1,76**
Staphylococcus aureus ATCC 9763	++	**17,83± 1,20**
Enterococcus faecalis ATCC 2035	++	**16,5± 0,29**
Salmonella typhimurium ATCC 13311	+	**12±**1,32

Sensible (+): diamètre compris entre 9 à 14 mm

Très sensible (++): diamètre compris entre 15 à 19 mm

Extrêmement sensible (+++): diamètre > 20 mm

Figure 13: effet de vitamine D sur *E. Faecalis*.

Tableau 6. Les bactéries qui résistance a vitamine D_3 (chaque valeur représente la moyenne SEM ±de trois essais).

Bactérie	**résultat**	**Diamètre (mm) ±SEM**
Escherichia coli ATCC 25922	-	**0±0**
Klebsiella pneumoniae ATCC 4352	-	**0±0**
Lysteria monocytogenes ATCC 15313	-	**0±0**
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603	-	**0±0**
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	-	**0±0**
Staphylococcus aureus ATCC 25923	-	**0±0**
Escherichia coli ATCC 25922	-	**0±0**
Bacillus cereus ATCC 10876	-	**0±0**
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	-	**0±0**
Bacillus subtilis ATCC 9372	-	**0±0**

Résistante (-): absence de zone d'inhibition

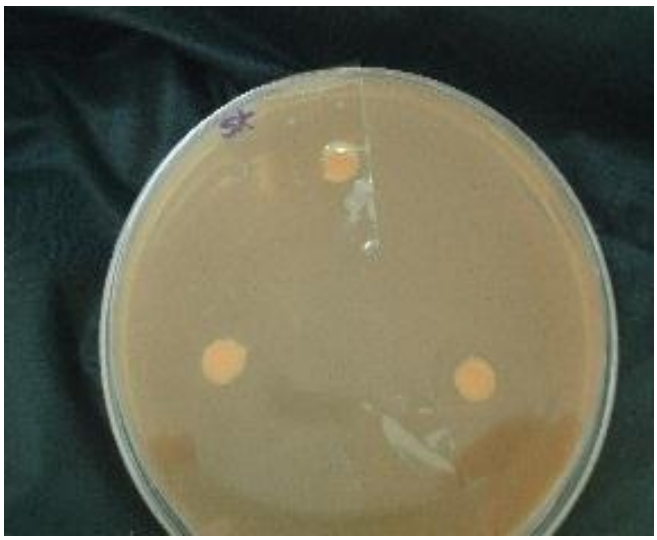


Figure 14. Effet de vitamine D sur *M. luteus*. **Figure 15**. Effet de vitamine D sur *S.typhimurium***.**

Figure. 16effet de vitamine D sur *S. aureus*.**Figure.17 16**effet de vitamine D sur *S. aureus*

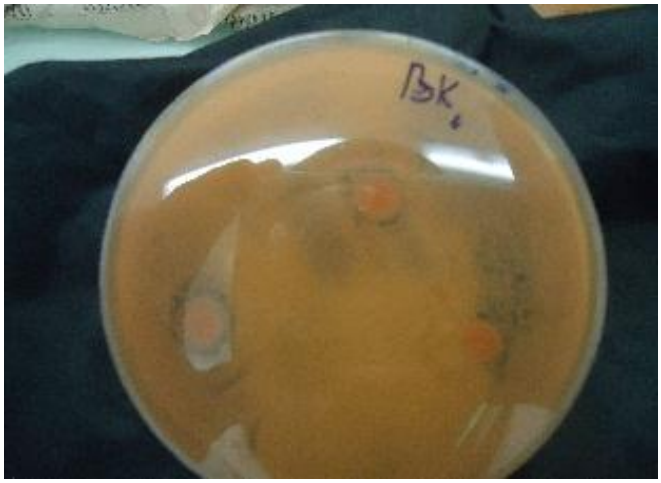


Figure.18 effet de vitamine D sur *B.cereus*

4.2.1.3. La CMI

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) exprimées par vitamine D sur les souches testées ont été de 1,56 µg/ml pour *M. luteus*, 300 µg/ml pour *B. cereus*, 400 µg/ml pour *S.typhimurium*, 625 µg/ml pour *E. faecalis* et *P. mirabilis*, pour déterminer le CMI de vitamine D_3 contre *M. luteus* on utilise méthode de micro- dilution. Voir tableau 7,8 9

Les résultats montrent que le *M. luteus* qui possède une grande sensibilité a vitamine D_3 parce que une concentration très faible de la vitamine D_3 permet une inhibition de la croissance de cette bactérie viennent après *B. cereus*, *S. typhimurium*, enfin *P. mirabilis et E. faecalis* qui possède une sensibilité relativement faible car il faut une concentration de vitamine D_3 très forte pour inhibé sa croissance de cette bactérie, dans le cas de *S. aureus* ATCC 25923dans intervalle de concentration

0,78 à 6500 µg/ml est cultive dans ce cas le concentration CMI supérieure 6500 µg/ml. Voir la figure 19.

Tableau 7.les différentes concentrations utilisées de vitamine D sur *M. luteus*

Produit	**Concentration µg/ml**	**culture**
Vitamine D	**500**	**-**
	250	**-**
	125	**-**
	62,5	**-**
	31,25	**-**
	30	**-**
	25	**-**
	20	**-**
	15	**-**
	10	**-**
	6,25	**-**
	3,125	**-**
	1,56	**-**
	0, 78	**+**

Tableau 8. Les différentes concentrations utilisées de vitamine D sur *Salmonella typhimurium*, et *Bacillus cereus*

Produit	**Concentration µg/ml**	**culture**	s. typhimurium	*B. cereus*
Vitamine D	**500**		-	-
	450		-	-
	400		-	-
	350		+	-
	300		+	-
	250		+	+
	125		+	+
	62,5		+	+
	31,25		+	+

Tableau 9. Les différentes concentrations utilisés de vitamine D sur *E. faecalis* et P. mirabilis

Produit	**Concentration mg/ml**	***E. faecalis***	***P. mirabilis***
Vitamine D_3	2500	-	-
	1250	-	-
	625	-	-
	500	+	+
	250	+	+
	125	+	+
	62,5	+	+
	31,25	+	+

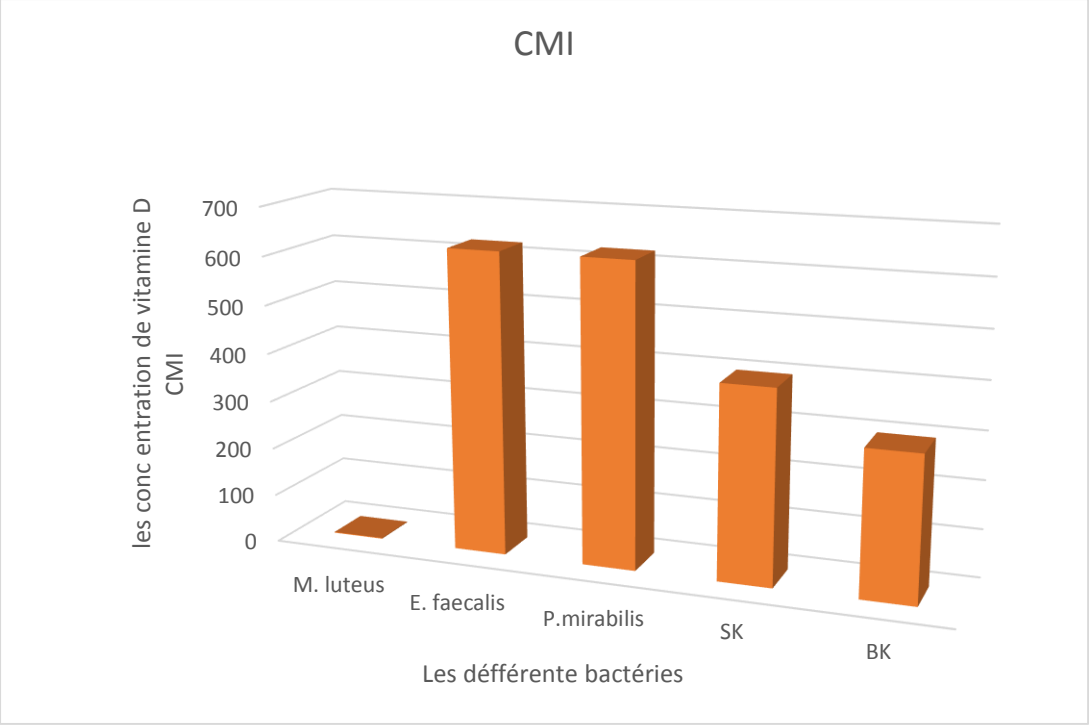


Figure 19. Variation de CMI dans chaque bactérie

4.2.1.4La CMB

Le rapport CMB/CMI nous a permis de déterminer les pouvoirs bactéricide et bactériostatique de produit étudié. Lorsque ce rapport est supérieur à 4, le produit a un pouvoir bactériostatique, et bactéricide quand il est inférieur ou égal à 4 (Canillac & Mourey, 2001).

Le CMB de *M. luteus* est 10 µg/ml. Dans l'intervalle de concentration 0,78 à 500 µg/ml et après 5^{éme} jours on observe la présence de culture *S. Typhimurium, B. cereus* dans tout l'intervalle donc, la concentration minimale pour inhibé la croissance de ces bactéries sont à supérieure 5000 µg/ml. Dans l'intervalle de concentration 2500 à 31,25 µg/ml après 5^{éme} jours on observe la présence de culture *E. faecalis* et *P. mirabilis,* Le rapport de CMB/CMI pour *M. luteus* est 6,41. Donc vitamine D_3 à un pouvoir bactériostatique sur cette bactérie et bactéricide pour les autres bactéries (CMB/CMI $\leq$ 4).

Notre étude est faite pour la première fois puisque on n'a pas une étude expérimentale sur l'activité antibactérienne de la vitamine D_3. Une étude de Liu, 2006; Wang et Zhang, 2006 ; Aloia et Li-Ng, 2007; Pilz *et al*., 2008 a montré que la carence en vitamine D_3 serait également associée à la mortalité dues aux infections. Yamshcikov *et al*,2009 ont observés que l'expérience réalisées *in*

vitro indique une action stimulatrice de la vitamine D_3 sur les macrophages et les cellules dendritiques. Cependant, ce n'est qu'en 2009 que la preuve de cette action a été apportée *in vivo*, dans un modèle d'infection mammaire par *Streptococcus uberis* chez la vache.

Adit, 2009 a montré que cette stimulation permettrait de diminuer le risque infectieux chez les patients. D'après l'étude NHANES III, le risque d'infections des voies respiratoires hautes serait plus élevé en cas de carence en vitamine D_3

Aude *et al*, 2012 ont montré que la vitamine D_3 est ainsi possède un rôle de vitamine à tropisme purement phosphocalcique et osseux à celui d'une hormone pléiotropie jouant un rôle global sur la santé (anti-infectieux, anti-inflammatoire, anti-tumoral, protecteur cardiovasculaire, etc.).

Belderbos *et al*, 2011 ont conclus que sur le plan infectieux, sur une étude prospective, de 156 patients qu'un déficit en vitamine D_3 chez un nouveau-né sain était associé à un risque plus élevé de bronchiolite. Etude in vitro de Martineau *et al*., 2007, sur la tuberculose a montré que la vitamine D_3 permettait d'activer les macrophages pour synthétiser un peptide antimicrobien, la cathélicidine, impliqué dans la défense contre *Mycobacterium tuberculosis*.

4.2.2. Activité antifongique

4.2.2.1. Sensibilité des souches fongiques à vitamine D_3

La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antifongique de vitamine D_3 vis-à-vis des souches fongiques testées (Mironescua et Georgescub, 2008). La vitamine D_3 exprimé une activité antifongique figure 20. Les zones d'inhibition sont résumées dans le Tableau 11aucune activité antifongique sur *Saccharomyces cerevisiae* par. (Le diamètre de disque de 6mm).

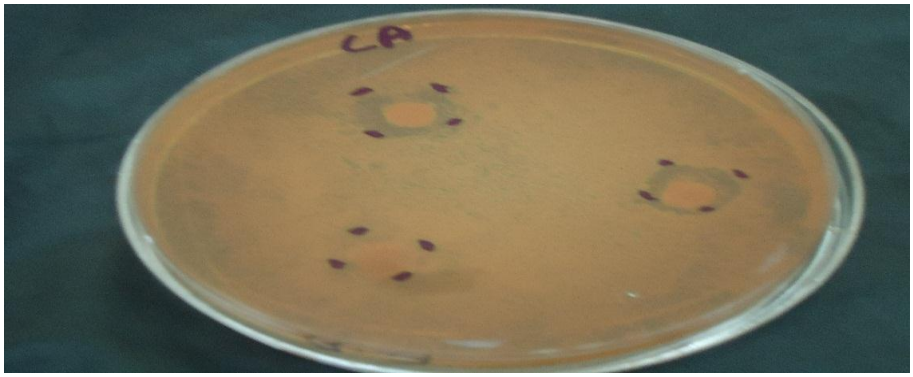


Figure.20 : effet de vitamine D_3 sur *Candida albicans*.

Tableau 10. Diamètre de zone inhibition de *Candida albicans*.

Levure	concentration	Diamètre ± SEM
Candida albicans	100µg/ml	12,5 mm ±0,76
Saccharomyces cerevisiae	100 µg/ml	0,0 mm ± 0.00

2.2.2. Détermination des CMFS et CMFC

La CMF_S est la concentration minimale pour inhiber la croissance du champignon. et CMF_C c'est la concentration minimale pour inhiber la croissance de champignon après 5 jours.

Semblablement à l'activité antibactérienne, avant d'appliquer la vitamine D_3, les concentrations minimales fongistatique (CMFS) doivent être calculées. Ces concentrations sont mesurées dans le but de définir les frontières de l'acceptabilité sensorielle et l'efficacité antifongique du produit (Tiwari *et al*, 2009).Les valeurs de CMF_S et CMF_C de vitamine D_3 sont présentées dans le tableau 12.

Tableau 11. CMF_S et CMF_C de de vitamine sur *Candida albicans*.

levure	CMF_S	CMF
Candida albicans	1,56 µg/ml	ND

ND : non déterminé

Il faut noter que contrôle négatif, le DMSO, n'a pas affecté la croissance des souches fongiques à la concentration utilisée dans cette étude (2ml de DMSO par 18ml de Sabouraud).

Actuellement, le genre Candida comprend 81 espèces de champignons levuriformes. *Candida albicans* est la plus souvent à l'origine de la plupart des manifestations pathologiques chez l'homme. On la rencontre habituellement, à l'état saprophytique, dans le tube digestif de l'homme et, par contiguïté, elle peut être retrouvée au niveau de la muqueuse vulvo vaginal, (ou de la bouche). Mais on ne retrouve qu'exceptionnellement *Candida albicans* au niveau de la peau. Cette espèce est responsable de plus de 80 % des infections connues sous le terme de candidose, comme les infections superficielles cutanées, infections superficielles muco- cutanées (Delorme et

Robert, 1997). Pas de recherche sur les activités antifongiques de la vitamine D_3 ou les vitamines liposolubles a été effectuée auparavant.

Conclusion

Conclusion

La vitamine D connaît aujourd'hui un regain d'intérêt, non seulement en raison de ses effets osseux intéressants dans la prévention des fractures ostéoporotiques que de ses effets extra-osseux protéiformes réduction du risque de cancer, de maladies inflammatoires et même de taux de mortalité.

A la lumière des résultats figurés dans ce mémoire, on peut conclure que Cholécalciférol appelé vitamine D_3 possède une propriété antioxydante et une activité antibactérienne et antifongique notable. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant le test DPPH ; ainsi, la vitamine D_3 a montré une activité antiradicalaire vis-à-vis le radical DPPH avec une IC50 égale 803,27µg/ml. Celle de l'antioxydante standard BHT a été de 285,67µg/ml.

L'effet antibactérien de vitamine D_3 a été évalué par le test de diffusion sur agar vis -à-vis quinze souches bactériennes référenciées 9 Gram $^+$ et 6 Gram $^-$ Les résultats ont révélé que la vitamine D_3 exerce un effet antibactérien considérable sur *M. luteus*, *S. aureus*, *P. mirabilis*, *E. faecalis*, *B. cereus* et *S. typhimurium* avec des zones d'inhibition de 22mm, 17,8 mm, 17,5 mm, 16,5 mm, 15,17 mm et 12 mm respectivement. La CMI de la vitamine D_3 sur ces bactéries sensibles est 1,56 µg/ml pour *M. luteus*, 300µg/ml pour *B. cereus*, 400µg/ml pour *S. typhimurium*, 625 µg/ml pour *E. faecalis* et *P. mirabilis*. L'effet antifongique de la vitamine D_3 a été évalué par le test de diffusion sur l'agar sur deux levures. Les résultats ont révélé que la vitamine D_3 exerce un effet antifongique considérable sur *C. albicans* avec une zone d'inhibition de 12,5 mm et une CMI de 1 ,56 µg/ml. Par contre, elle n'a aucun effet sur *S. cerevisiae*.

La contribution à la recherche des propriétés antioxydante et antimicrobiennes de la vitamine D_3 reste introductive. Ce travail reste préliminaire et peu indicatif sur le mécanisme réel par lequel agit la vitamine D_3 en diminuant l'infection microbienne et l'effet nocif des radicaux libres. Par conséquent, la réalisation d'une étude postérieure sur une espèce animale est d'une importance cruciale qui permettrait une estimation d'éventuelle activité antiradicalaire et antimicrobienne in vivo qui pourrait, également, prévenir contre plusieurs maladies. Il serait encore intéressant de poursuivre les investigations sur d'autres propriétés biologiques de cette vitamine.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

-Abdulmajed K., McGuigan C. and Heard C. M., Topical delivery of retinyl ascorbate: 4. Comparative anti-oxidant activity towards DPPH. *Free Radic.* Res. 2005; 39: 491-498.

-Adit A., Ginde., MD., MPH., Jonathan M., Mansbach MD., Carlos A and Camargo Jr., Association Between Serum 25-Hydroxyvitamin D Level and Upper Respiratory Tract Infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med*., 2009;169(4):384-390. ndocr. Pract., 2009; 15:438-449.

-Aloia J., Li-Ng M. Epidemic influenza and vitamin D. *Epidemiol Infect*., 2007;135:1095-6.

-Ammar R. B., Bhouri W., Sghaier M. B., Boubaker J., Skandrani I., Neffati A., Bouhlel I., Kilani S., Mariotte A. M., Chekir-Ghedira L., Dijoux-Franca M. G. Đ. and Ghedira K. Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of Rhamnus alaternus L. (Rhamnaceae) : A structure-activity relationship study. *Food Chem*., 2009; 116: 258-264.

-AnaymY., LIN. Antioxidative Effect of Vitamin D3 on Zinc-Induced Oxidative Stress in CNS.*Ann. N.Y. Acad. Sci*.,2005;1053: 1-11.

-Anonyme. Les vitamines. Collège des Enseignants de Nutrition. Université Médicale Virtuelle Francophone. 2011.

-Aksoy L, KolayE, Agˇılo¨nu Y ¨, Zeyneb Aslan,Mustafa Kargıoglu .Free radical scavenging activity, total phenolic content, total antioxidant status, and total oxidant.*Saudi Journal of Biological Sciences*. 2013; 20 : 235–239

-Attou Amina. Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante Ruta chalepensis (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent. MEMOIRE diplome de magister en biologie .Universite Abou Bekr. 2011.pp :48.

-Aude Tonson la Tour., Alexandra Wilhelm-Bals., Elsa Gonzalez Nguyen Tang., Eric Girardin and Genèv.Le point sur la vitamine D.*peadiatric*.2012; 23 (4): 17-21.

-Bassole H.N., Kabore Z. and Traore A.S., É tude des profils bactériostatiques et bactéricides d'extraits végétaux vis-à-vis de germes pathogènes impliques dans la contamination des denrées alimentaires d'origine animale. *Pharm. Med.trad.afr*., 2002; 11: 113-122.

-Belderbos ME *et al*, Cord blood vitamin D deficiency is associated with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatrics*. 2011; 127 (6) : 1513–20.

-Benhamou C-L., Souberbielle J-C., Cortet B., Fardellone P., Gauvain J-B, and Thomas T., La vitamine D chez l'adulte : recommandations du GRIO. 2011; Tome 40.

-Bischoff Ferrari HA, Dietrich T, Orav EJ and Dawson Hughes B. Positive association between 25 hydroxyvitamin D levels and bonemineraldensity: apopulation basedstudy of younger and olderadults. *Am J Med., 2004*; 116(9):634 9

-Bischoff Ferrari HA, Orav EJ and Dawson Hughes B. Effect of cholecalciferol plus calcium on falling in ambulatoryolder men and women. A 3!year randomizedcontrolled trial. *ArchInternMed*., 2006; 166:424-30.

-Brand-Wiilliams W., Cuvelier M.E and Berset C., use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *lebensm. Wiss. Technol*., 1995 ; 28 :25-30.

-Briot K, Adran M., Cortet B., Fardellone P, et al. Vitamine D : effets osseux et extra osseux ; recommandations de bon usage. *Presse Med*., 2009; 38: 43-54.

-Briot k., Audrana M. ,Analyse critique du déficit en vitamine D. *Revue du rhumatisme*. 2010 ; 77 :139–143

-Chiu KC., Chu A., Go VLW and Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and β celldys function. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:820-5.

-Canillac N., and Mourey A., Antibacterial activity of the essential oil of Picea excelsa on Listeria, Staphylococcus aureus and coliform bacteria. *Food Microbiol*., 2001; 18: 261-268.

-Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, Arnaud S, Galan P, Hercberg S, *et al*.Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int*., 1997; 7: 439-43.

-Cavalier E, Souberbielle J-C. An update on the classical and non classicaleffects on vitamin D; evaluation of the patient's statuts. *Médecine Nucléaire.* 2009;33:7-16.

-Dchadeau. Vitaminothérapie chez les volailles .Toulouse, 2001, P (28-31).

-De Cock C., Bruyere O., Collette J and Reginster JY. Vitamine D inadequacu in French osteoporotic and osteopenicwomen. *Joint BoneSpine*., 2008;75:567-72.

-Delorme J and Robert A. Mycologie médicale. *Ed. Centre collégial de développement de matériel didactique,* [Mont-Royal Québec], 1997, p. 184

-Derwich E., Benziane Z. & Boukir A., *GC/MS* Analysis and antibacterial activity of the essential oil of Mentha pulegiumgrown in Morocco. *Res. J. Agric. & Biol. Sci*., 2010; 6: 191-198.

-Elisabeth Bührer-Astfalk .Nutritionniste diplômée. BuehrerHuman Nutrition. Maillaiter mai, 2011. pp.3-4.

-Fabienne H., Dosage de la vitamine D en EHPAD. Diplôme Inter Universitaire « Formation à la fonction de Médecin Coordonnateur d'Établissement d'Hébergement pour Personnes Âgées Dépendantes». Université René Descartes. Paris V Faculté Cochin. Port Royal. 2012.

-Forman JP, Giovannucci E, Holmes MD, BischoffFerrari HA *et al*. Plasma 25 hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension. *Hypertension* . 2007; 49:1063-9.

-Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. and Rasooli I., Chemical and biological characteristics of Cuminumcyminumand Rosmarinus officinalis essential oils. *Food Chem.,* 2007; 102: 898-904.

-Garland CF., Comstock GM., Garland FC., Helsing KJ and Shaw EK, Gorham study. *Lancet*.,1989; 18: 1176-8.

-Gilberto González V, Claudia Torrejón S. Actualizaciones en Vitamina D.*Rev. chil. reumatol*., 2009; 25:85-86.

-Hammer K. A., Carson C. F., & Riley T. V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. 1999; 86(6): 985-990.

-HarrarA.N., Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de Rhamnus alaternus L. diplôme de Magister. Universite Ferhat Abbas setif 2012,pp. (14..29.28).

-Heaney RP, Horst RL, Cullen DM, Armas LA. Vitamin D3 distribution and status in the body. *J Am Collnutr*. , 2009 ; 28 :252-6.

-Hoenderop J., Nilius B., Bindels R., Calcium absorption. *acrossepitheliaPhysiol Rev* 2005 ; 85 : 373-422.

-Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc.,* 2006;81(3):353-73.

-Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*., 2007;357(3):266-81.

-Hussain A.I., Anwar F., Chatha S.A.S., Jabbar A., Mahboob S., and Nigam P.S., 2010. Rosmarinus officinalis essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. Brazilian Journal of Microbiology41: pp.1070-1078.

-Lafage-Proust M-H. Ostéomalacies. *EncyclMédChir Appareil Locomoteur*, 2000;14-024-B-10.

-LIN, A.M.Y. & L.T. HO.. Melatonin suppresses iron-induced neurodegeneration in rat brain. *Free Radical Biol. Med*., 2000; 28: 904–911.

-Liu PT, Stenger S, Li H *et al*. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response.*Science* 2006; 311: 1773-1774.

-Martineau AR *et al,* Vitamine D in the treatment of pulmonary tuberculosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* ,2007: 103 (3–5); 793–8.

-Mayachiew P. & Devahastin S., Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *Food Science and Technology.,* 2008; 41: 1153-1159.

-Mironescu M., Georgescu C., Preliminary researches on the effect of essential oils on moulds isolated from surfaces. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*,2008; 14: 30-33.

-Mithal A., Wahl DA., Bonjour JP., Burckhardt P., wson-Hughes B., Eisman JA, *et al.* Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *OsteoporosInt.,* 2009; 20(11): 1807-20.

-Mohammedi Z., Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydante des huiles essentielles flavonoïde de quelques plantes de région de tlemcen.deplome de magister. UNIVERSITE de Abou Bakr Belkaïd Tlemcen. 2006. pp.50.

-MURRY Elsa. Actualités Sur La Vitamine D Et Nouvelles Perspectives Thérapeutiques : These Presentee Pour L'Obtention Du Titre De Docteur En Pharmacie Diplôme D'Etat. 2011.

-Nassima Khennaf Belkaddar, -LA VITAMINE D. *L'Officinal*., 2010; 8: 52-56.

-Norman AW. Fromvitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. Am J Clin Nutr 2008; 88(2):491-499.

-Sharma Om P., Bhat Tej K . DPPH antioxidant assay revisited.*Food Chemistry., 2009;113: 1202–1205.*

-Ontario. Association of Medical Laboratories. Guideline for the appropriate ordering of serum tests for 25-hydroxy vitamin D and 1, 25-dihydroxy vitamin D (CLP026). *North York: OAM*., 2010.

- Pilz R S., März W., Wellnitz B., Seelhorst U., Fahrleitner-Pammer A, Dimai HP et al. Association of Vitamin D deficiency with heart failure and sudden cardiac death in alarge cross-sectional study of patients referred for coronary angiography. *J Clin Endocrinol Metab*., 2008; 93: 3927-35.

-Prakash D., Upadhyay G., Brahma N., Single H.B.,.Single antioxidant and free radicalscavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of Soybean(glycine max*). Food Chemistry*. 2007;104:783-790.

-Que F, Linchun M and Xin P .,Antioxidant activities of five chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Foud research inter*., 2006; 39581-587.

-Reiter R.J., Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog. Neurobiol*., 1998; 56: 359–384.

-Rož man T., and Jeršek B., ., *Antimicrobial activity of rosemary extracts (Rosmarinus officinalis L.) against different species of Listeria*. Acta agriculturae Slovenica, 2009: 93(1); 51-58.

-Sanchez A., VITAMINA D: ACTUALIZACIÓN.*REV. MÉD. ROSARIO*., 2010 ; 76: 70-87.

-Schoindre Y., Terrier B., Kahn J.-E., Saadoun D., Souberbielle J.-C., Benveniste O., Amoura Z., Piette J.-C., Cacoub P and Costedoat-Chalumeau N. Vitamine D et auto-immunité. Première partie : aspects fondamentaux. *La Revue de médecine interne* .2012; *33*: 80-86.

-Tiwari B.K., Valdramidis V.P., O'Donnell C.P., Muthukumarappan K., Bourke P. and Cullen P. J., Application of natural antimicrobials for food preservation. J. *Agric. Food Chem.*, 2009; 57: 5987–6000.

-Vernay M., Sponga M., Salanave B., Oléko A., Deschamps V, Malon A, *et al*. Statut en vitamine D de la population adulte en France : l'Étude nationale nutrition santé (ENNS, 2006-2007). *BEH*., 2012; (16-17): 189-201.

-Visser M., Deeg DJH and Lips P., Low vitamin D and highparathyroid hormone as detreminants of loss of muscle strentgh and muscle mass (sarcopenia): the Longitudinal AgingStudy Amsterdam. *J Clin EndocrinolMetab*., 2003; 88(12):5766-72.

-Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL *et al*. Vitamin D deficiency and risk of cardiovasculardisease. *Circulation* 2008; 117:503-511.

-Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, van Meurs JB, Berry D *et al.* Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study.*Lancet* 2010;17(376):180-8.

-White KE, Biber J, Murer H, Econs MJ. Chromosomallocalizationinvolved in phosphate

homeostasis : the type IIb sodium-phosphate cotransporter and stanniocalcin-2. *SomatCell Mol Genet*., 1998 ; 24 : 357-62.

-Yamshcikov AV., Desai NS., Blumberg HM *et al*. Vitamin D for treatment and prevention of infectious diseases: A systematic review of randomized controlled trials. *Endocr. Pract*., 2009; 15:438-449.

.

Annexes

Annexe

Annexe I :

Photo 1. Test de DPPH sur vitamine D (photo original).

Photo 2 Test de DPPH sur BHT

Annexe II

Composition de Gélose Nutritive

Extrait de viande de bœuf……**……1g.**

Extrait de levure**…….. 2g.**

Peptone…**…….5g.**

Chlorure de sodium…**……..…5g.**

Agar**…….....15g.**

PH= 7,2 à 7,4

Annexe

Composition d'Agar Mueller Hinton

Eau distillée…….**1000ml.**

Infusion de viande de bœuf**…….02.0g.**

Hydrolysat de Caséine**…….17.5g.**

Amidon…**……. 1,5g.**

Agar**…….....10g.**

pH= 7.4

Composition de Milieu Sabouraud

Eau distillée**……..….1000ml.**

Peptone**……10g.**

Glucose**……20g.**

Agar-agar**…….15g.**

pH=6.3

Annexe III

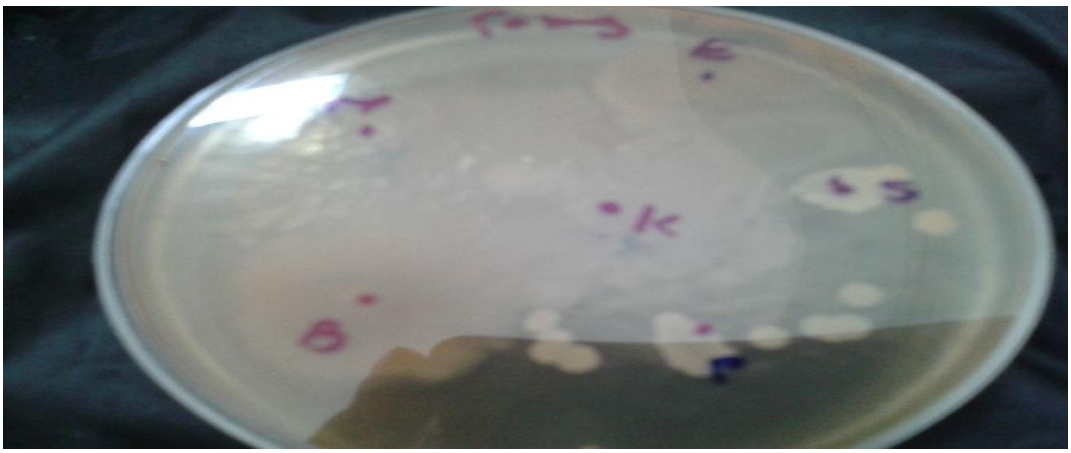


Photo 3 des bactéries sensible après une journée d'incubation avec concentration de vitamine D_3 égale 250 µg/ml.

Annexe

Photo 4 des bactéries sensible après 5eme journée d'incubation avec concentration de vitamine D_3 égale 250 µg/ml.

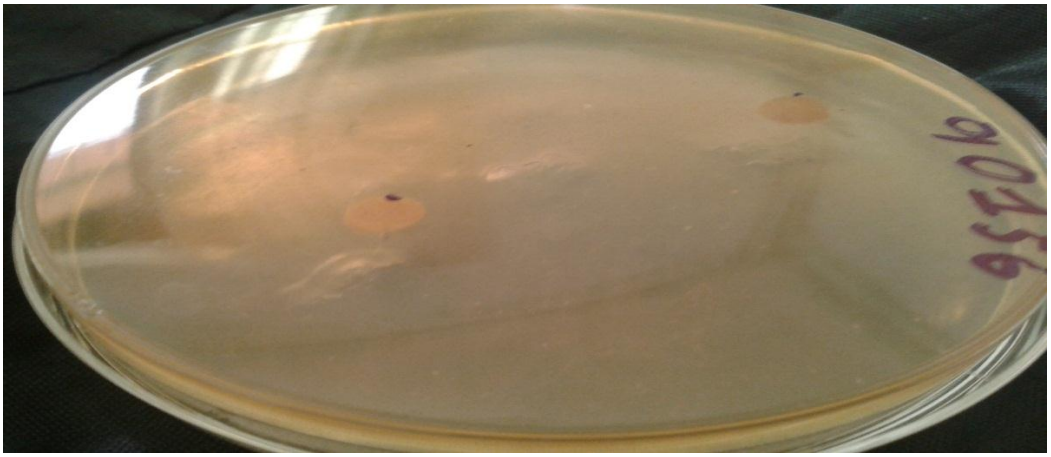


Photo 5 de bactérie M. luteus dans concentration 0,78µg/ml

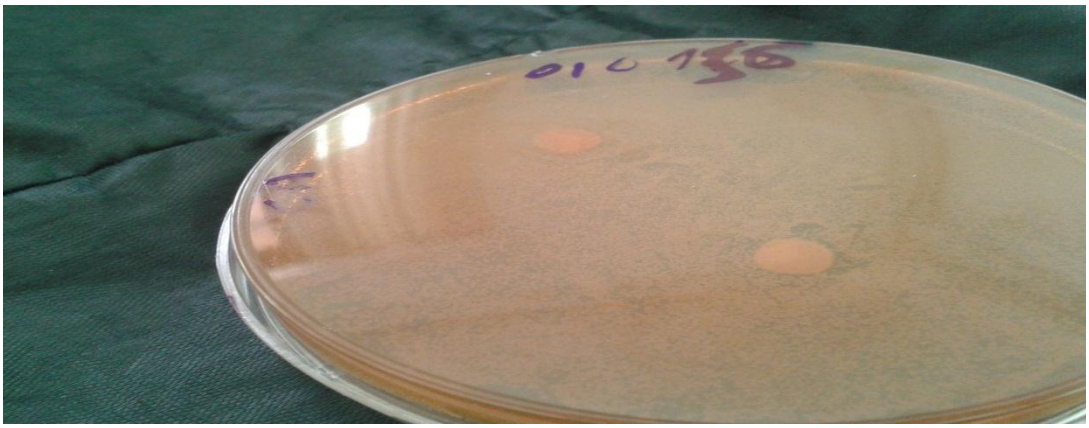


Photo 6 de levure C. albicans dans concentration 0,78µg/ml