



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH  
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES-Fès  
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE



## PROJET DE FIN D'ETUDES

Licence en **Sciences & Techniques** :  
Biologie & Santé

# **CORRELATION ENTRE LE TAUX DE VITAMINE D ET LE METABOLISME DU CALCIUM CHEZ UNE POPULATION MAROCAINE**

Réalisé par : SOGODOGO Kadidiatou

Encadré par :

- Dr N. GHALIM
- Dr N. OUKKACHE
- Pr R. BENCHEIKH

Soutenu le : 14 juin 2012

Devant le jury composé de :

- Pr Sefriou Benzerou Samira
- Pr. Rachid Bencheikh
- Dr. Ghalim Norreddine

➤ Année Universitaire : 2011-2012

# DEDICACE

A mes parents : Lamissa SOGODOGO et Mariam DEMBELE

En témoignage de toute mon affection et ma gratitude pour tout ce que vous avez fait et continuez à faire pour moi. Recevez ce travail comme la preuve de ma reconnaissance,

A mon oncle Oumar SOGODOGO pour tes précieux conseils tout au long de mes études

A mes frères et sœurs

Recevez ce travail comme preuve de mon amour et mes remerciements

A OTEMBA Albert

Tu as été pour moi un ami, grâce à toi je me suis facilement intégrée à la fac. Merci pour tes conseils qui m'ont beaucoup aidé tout au long de mon ce jour à la FST.

A tous mes amis, pour leur soutien depuis mon arrivée au Maroc jusqu'aujourd'hui.

# REMERCIEMENTS

Tout d'abord je remercie DIEU le tout puissant de m'avoir donné la chance d'être ici aujourd' hui.

Je tien à remercier mes parents pour tout l'amour kils m'ont octroyé durant toute ma vie et pour leurs aides morale matériel et financier tout au long de mes études.

Je témoigner toute ma reconnaissance aux personnes suivantes, pour leur expérience enrichissantes et pleine d'intérêt qu'elles m'ont fait vivre durant ces mois d'avril et mai 2012 au sein de l'Institut Pasteur du Maroc à Cablanca:

Dr. Ghalim Norreddine, chef du service de biochimie, pour son accueil et la confiance qu'il m'a accordé dès mon arrivée dans son service

Dr. Naoual Oukkache au cheminement de ce projet avec ses spécieux conseils, son aide et sa disponibilité tout au long de mon stage.

Sans oublier la participation de Dr. Hicham Mohammadi, Madame Rassam, Khallessi et Mlle Qarbal, pour m'avoir intégré rapidement au sein du Centre de Biologie Médicale, service biochimie et m'avoir accordé toute leur confiance; pour le temps qu'ils m'ont consacrés tout au long de cette période, sachant répondre à toutes mes interrogations;

Ainsi que l'ensemble du personnel de l'Institut Pasteur du Maroc, Casablanca pour leur accueil sympathique et leur coopération professionnelle tout au long du ces deux mois de stage.

Mes remerciements vont également aux:

Pr Sefriou Benzerou Samira enseignante à la faculté des Sciences et Techniques de Fès pour avoir accepté de juger ce travail.

Pr. Rachid Bencheikh, professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès qui m'a guidé tout au long de ma formation. Son amabilité, sa simplicité, sa disponibilité et son rigueur dans le travail, m'ont marqué. Son expérience m'a été d'un grand apport dans la réalisation de ce travail.

Pr. Tazi, le responsable de notre filière, Biologie et Sante. Ce travail est aussi le fruit de ses encouragements. "Soyez assurés de ma profonde gratitude, Mr. Tazi."

A Tous les professeurs de la Faculté de Sciences et Techniques de Fès (FST).

## Table des matières

PROJET DE FIN D'ETUDES .....	1
RESUME.....	8
I - INTRODUCTION.....	9
II REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....	11
<b>1- Historique</b> .....	12
<b>2- Vitamine D :</b> .....	12
2-1 Structure de la vitamine D .....	13
<b>2-2 Métabolisme de la vitamine D</b> .....	14
2-3 Carence en vitamine D .....	16
2-4 Vitamine D et calcium .....	18
III - MATERIEL ET METHODES .....	20
1- Population .....	21
2- Matériels Biologique « Prélèvement du sang .....	21
3- Dosage de la vitamine D par Technique d'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbon Assay) .....	21
4-Dosage des taux sériques de phosphores et de calcium.....	22
<b>4-1 Principe de dosage du calcium :</b> .....	24
<b>4-2 Principe de dosage du phosphore :</b> .....	24
IV - RESULTATS .....	26
1- Population témoin.....	28
2- Population présentant une déficience en vit D.....	29
3- Population présentant une carence en vit D.....	30
4- Population présentant une Intoxication en vit D.....	31
V – DISCUSSION ET CONCLUSION .....	32

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

Ca.....Calcium sérique

CYP27A1.....cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1

CYP27b1.....cytochrome P450, family 27, subfamily B, polypeptide 1

CYP2R1.....cytochrome P450 2R1

HNF4 $\alpha$ .....hépatocyte nuclear factor 4 alpha

HTA..... hypertension artérielle

P.....Phosphore

PPAR.....peroxisome proliferator-activated receptor

PTH.....Parathormone

SHP .....Small heterodimer partner

TMB.....Tetraméthylbenzidine

UVB.....Ultraviolets B

VDBP.....Vitamin D Binding Protein

VDR.....Vitamin D Receptor

## Liste des tableaux

<b>tableau.1</b> (valeur sérique en 25(OH) D).....	16
<b>Tableau 2</b> (Valeurs de référence du vit D).....	27
<b>Tableau3</b> (Tableau3 : Relation entre la concentration sérique de la Vitamine D et la concentration sérique du calcium chez la population témoin).....	28
<b>Tableau 4</b> (Relation entre la concentration sérique de la Vitamine D et la concentration sérique de calcium Pour les patients en déficit de vit D).....	29
<b>Tableau 5</b> (relation entre la concentration sérique de la Vitamine D et la concentration sérique de Calcium chez les patients carencés).....	30
<b>Tableau 6</b> (relation entre la concentration sérique de la Vitamine D et la oncentration de calcium chez la patiente avec une intoxication).....	31

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Structure de la vitamine D2.....	13
<b>Figure 2.</b> Structure de la vitamine D3.....	14
<b>Figure 3.</b> Métabolisme de la Vitamine D.....	16
<b>Figure 4.</b> L'effet du soleil sur le métabolisme de la vitamine D.....	17
<b>Figure 5.</b> Vitamine D et Calcium.....	19
<b>Figure 6</b> L'automate orthoclinical vitros fusion 5.1.....	21
<b>Figure.7</b> Les différentes couches d'une plaquette et son rôle.....	22
<b>Figure 8.</b> Population de l'étude.....	27
<b>Figure 9.</b> Relation entre la concentration sérique de la Vitamine D et la concentration sérique de Calcium chez la population témoin.....	28
<b>Figure 10.</b> : Relation entre la concentration sérique de la Vitamine D et la concentration sérique de calcium chez population présentant une déficience.....	29
<b>Figure11.</b> : Relation entre la concentration sérique de la Vitamine D et la concentration sérique de calcium chez population présentant une carence.....	30

## RESUME

La vitamine D est reconnue depuis plusieurs décennies comme un acteur important dans le métabolisme osseux. Le rôle principal de la vitamine D est essentiellement basé sur l'équilibre du phosphore et du calcium dans l'organisme. Le déficit en vitamine D empêche l'absorption du calcium par les intestins et provoque la résorption (relarguage) du calcium et du phosphore stockés dans les os avec comme conséquence directe une fragilisation excessive de ceux-ci (os caoutchouteux) et le déclenchement d'une pathologie connue sous le terme de rachitisme. Actuellement au Maroc, la demande du test de vitamine D par les médecins augmente considérablement et la majorité des patients présentant une carence vitamine D sont les femmes d'âge supérieur à 40ans.

L'objectif de cette étude est d'établir une relation entre la vitamine D et le métabolisme de calcium chez un échantillon de patientes Marocaines constitué de 27 femmes âgées de 29 à 69 ans durant la période Mars et Avril 2012. Nous avons subdivisée notre population d'étude en 4 groupes (1- Témoin; 2- patients présentant une déficience en vit D; 3- patients présentant une carence en vit D et 4- patients présentant une intoxication en vit D). Le dosage de la vit D sérique a été fait par la méthode ELISA Sandwich (test spécifique et sensible) et le dosage sérique du calcium et du phosphore a été effectué par la chimie sèche (Test sensible).

Dans ce travail, nous avons trouvé que les patientes présentant une concentration normal en vit D (groupe témoin) présentent un taux sérique normal en phosphore et calcium. Pour les patientes avec déficience et carence en vit D (groupe 2 et 3), nous avons observé qu'une diminution de la concentration sérique en vitamine D entraîne une diminution significative de la concentration sérique du calcium Nous n'avons pas observé une diminution de la concentration de phosphore dans les deux groupes présentant une déficience et une carence en Vit D (concentration sérique normale). On constate que la seule patiente avec une intoxication en vitamine D présente une très faible diminution de taux sérique de calcium avec un taux normal de phosphore.

On peut conclure qu'il y'a une bonne corrélation entre le taux de vitamine D et le métabolisme du calcium.

# I - INTRODUCTION

La vitamine D est reconnue depuis plusieurs décennies comme un acteur important dans le métabolisme osseux. Le rôle principal de la vitamine D est essentiellement basé sur l'équilibre du phosphore et du calcium dans l'organisme. En effet, au niveau intestinal la vitamine D favorise l'absorption intestinale du calcium et du phosphore en modifiant la structure de la membrane des cellules intestinales. Au niveau de l'os, la vitamine D entraîne une résorption osseuse et un remodelage, ce qui est responsable d'une élévation du taux de calcium dans le sang. Au niveau rénal, la vitamine D est responsable d'une réabsorption du phosphore. La vitamine D intervient également au niveau d'autres organes tels que le muscle (en régulant la concentration de calcium), la glande mammaire (régulation de la quantité de calcium dans le lait maternel), le pancréas (pour la synthèse en insuline), la peau, le cerveau et le sang (fabrication de macrophages et augmentation de l'agrégation des plaquettes).

La déficience en vitamine D empêche l'absorption du calcium par les intestins. Ce déficit provoque le relargage du calcium et du phosphore stockés dans les os avec comme conséquence directe, une fragilisation excessive de ceux-ci (os caoutchouteux) et le déclenchement d'une pathologie connue sous le terme de rachitisme.

Ces dernières années, de nouvelles fonctions de cette vitamine ont été découvertes grâce à des études épidémiologiques et cliniques. On remarque à l'échelle de l'Institut Pasteur du Maroc (à Casablanca) que beaucoup de patients surtout les femmes présentent une déficience ou une carence en vit D mais aucune étude n'a été effectuée dans ce sens pour voir s'il y a une corrélation entre la diminution du taux sérique de vit D et la diminution sérique de calcium.

L'objectif de cette étude est d'établir la relation entre la vitamine D et le métabolisme de Calcium chez une quelque dizaines de patients qui consultent pour un dosage de la vitamine D au sein de l'institut Pasteur du Maroc.

## **II REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1- Historique

La découverte de la vitamine D a suivi une évolution proche de celle des autres composés vitaminés. Les propriétés curatives des produits, où l'on retrouve la vitamine D, étaient connues bien avant l'identification de cette biomolécule. Au milieu du 18<sup>ème</sup> siècle déjà, on connaissait l'action de l'huile de foie de morue et son efficacité dans le traitement du rachitisme. Ce n'est qu'au début de ce siècle que la forme active, enfin isolée, a pu être caractérisée sur le plan analytique.

Deux molécules distinctes sont actives dans le traitement du rachitisme: l'ergocalciférol (vitamine D2) d'origine végétale et le cholécalciférol (vitamine D3) d'origine animale. Ces deux composés n'existent pas nativement sous ces formes. Les plantes contiennent de l'ergostérol et l'animal synthétise «in vivo» du 7 déhydrocholestérol qui, absorbé, est ensuite converti en une forme active de vitamine D par l'action de la lumière U.V. sur la peau. Avant d'exercer pleinement son activité, deux modifications chimiques vont encore intervenir. La première résulte d'une hydroxylation au niveau hépatique pour former le 25-hydroxydérivé; elle est suivie d'une seconde hydroxylation, cette fois sur la position 1, pour produire le 1,25 dihydroxycholécalciférol [1,25 (OH)<sub>2</sub>]. Le dérivé monohydroxylé présente une certaine activité mais le produit dihydroxylé constitue en fait la véritable forme active de la vitamine D. Comme ce composé est synthétisé au niveau des organes de l'animal, une controverse existe sur le caractère vitaminique ou hormonal du 1,25 dihydroxycholécalciférol.

## 2- Vitamine D :

La vitamine D joue un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie phosphocalcique, elle est essentielle au développement et au maintien de la minéralisation osseuse. Le terme vitamine est inapproprié pour la vitamine D qui doit être plutôt considérée comme une prohormone (Catherine Cormier et coll., 2006). La vitamine D est une hormone liposoluble dont la biosynthèse commence au niveau cutané sous l'effet du rayonnement ultraviolet, et se termine au niveau rénal par l'hydroxylation en position 1, après plusieurs étapes successives. Sous le terme "vitamine D" sont regroupées les vitamines D3 (cholécalciférol) qui est la molécule synthétisée par la peau sous l'influence des UVB ou retrouvée dans les rares sources alimentaires animales (poissons gras en particulier) et vitamine D2 (ergocalciférol) qui est la vitamine D des plantes (Jean-Claude

Souberbiellea et coll., 2009). La production de la vitamine D par la peau dépend de la durée et l'heure de l'exposition, de l'intensité lumineuse ; de la pigmentation de la peau ; de l'âge et de la surface corporelle soumise aux UV.

## 2-1 Structure de la vitamine D

Il existe 2 formes de vit D: Ergocalciférol (origine végétale) et Cholécalférol (origine animale)

Formules brutes:

\* Vitamine D2: C<sub>28</sub> H<sub>44</sub> O

\* Vitamine D3: C<sub>27</sub> H<sub>44</sub> O

Formules développées:

\* Vitamine D2 : Ergocalciférol (voir Figure. 1)

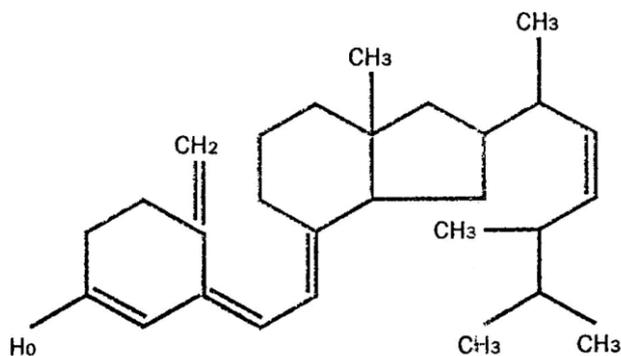
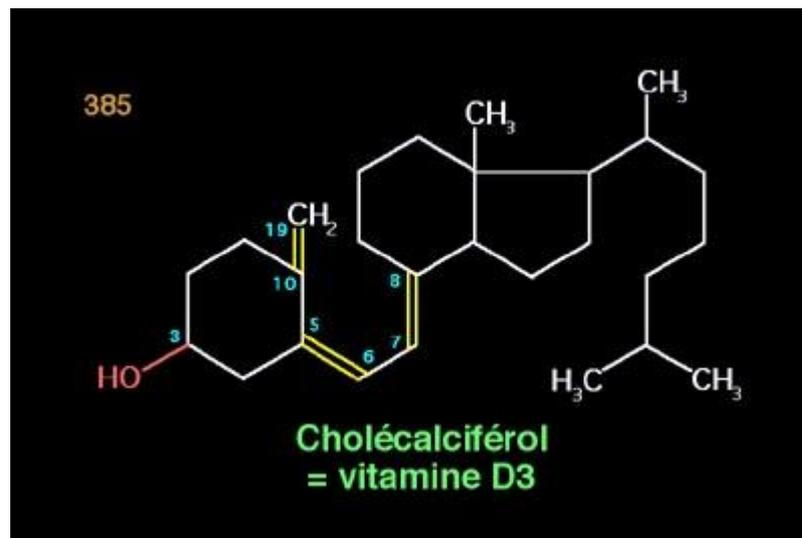


Figure 1. Structure de la vitamine D2

\* Vitamine D3 : Cholécalférol (Voir Figure. 2)



**Figure 2.** Structure de la vitamine D3

Un des cycles des stérols est ouvert et un ensemble de trois liaisons éthyléniques conjuguées se forme sur les Carbones 5, 6, 7, 8, 10 et 19. Cette structure est favorable au déplacement des électrons .

## 2-2 Métabolisme de la vitamine D

La vitamine D circulante a deux origines : exogène alimentaire (ergocalciférol D2 d'origine végétale et cholécalférol D3 d'origine animale) et endogène par synthèse cutanée à partir d'un précurseur. Lors de l'exposition solaire de la peau, le 7-déhydrocholesterol (ou provitamine D3) est transformé par les rayons UVB (290–315 nm) en prévitamine D3 qui est secondairement isomérisée en vitamine D3 (ou cholécalférol). Les sujets à peau. L'absorption intestinale de la vitamine D native d'origine alimentaire se fait de façon passive dans l'intestin grêle. Elle rejoint ensuite la circulation générale par voie lymphatique, incorporée aux chylomicrons. La vitamine D2 ou D3 passe ensuite dans le sang circulant et est transportée jusqu'au foie grâce à une protéine porteuse, la vitamin D binding protéine (VDBP). La vitamine D d'origine cutanée représente habituellement environ 90 % de la vitamine D circulante. Dès qu'elle arrive dans le foie, la vitamine D2 ou D3 est hydroxylée en position C-25 par la 25-hydroxylase (CYP2R1) et est ainsi transformée en 25(OH) vitamine D (25[OH]D) ou « calcidiol ». D'autres enzymes, telle que la CYP27A1, peuvent également catalyser cette hydroxylation. Ce

métabolite représente la forme de stockage. La synthèse de 25(OH) vitamine D est peu régulée. Plus la quantité de vitamine D synthétisée ou absorbée est grande, plus la concentration sérique de 25(OH)D s'élève. Pour autant, la transcription de CYP27A1 est sous la dépendance de facteurs nucléaires tels que PPAR  $\alpha$  et  $\gamma$  (activés par des acides gras poly-insaturés), Small heterodimer partner (SHP) et hépatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 $\alpha$ ). La 25(OH)D est stockée dans le tissu adipeux et les muscles ce qui a pour conséquence que les sujets maigres ont une capacité de stockage plus faible que les sujets gras et sont donc susceptibles d'être plus facilement carencés. La 25(OH)D, liée à la VDBP, est filtrée par le glomérule et réabsorbée par les cellules tubulaires grâce à un récepteur appelé « mégaline » qui permet l'endocytose du complexe 25(OH)D/VDBP. Dans le rein, et plus précisément dans le tubule proximal, elle est hydroxylée en position C-1 par la 25(OH)D 1-alpha hydroxylase (CYP27b1) et ainsi transformée en 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamine D (1,25[OH]<sub>2</sub>D) ou « calcitriol ». Le rein est à l'origine de l'essentiel du calcitriol circulant, néanmoins d'autres tissus cibles de la vitamine D (monocytes, peau, placenta, os, parathyroïdes, pancréas, peau, ganglions lymphatiques, poumon et glandes surrénales) expriment également cette enzyme. La production extrarénale de 1,25(OH)<sub>2</sub>D est connue depuis 1982 et a été confirmée plus récemment. Il a par exemple été montré que des ostéoblastes en culture expriment la mégaline et génèrent du calcitriol après ajout de 25(OH)D. (Karine Briot et coll., 2008 ;Guillaume Jean et coll., 2009).

Enfin, la concentration circulante en 1,25(OH)<sub>2</sub> D dépend de l'activité de son catabolisme. Contrairement à la longue demi-vie dans le sang de la 25(OH) D, son précurseur, celle de la 1,25(OH)<sub>2</sub> D est très courte, de l'ordre de 11-12 heures. Son catabolisme s'effectue dans les cellules cibles et implique de nombreuses étapes de dégradation enzymatique. La première et la mieux connue de ces étapes est la conversion de la 1,25(OH)<sub>2</sub> D en 1,24,25-trihydroxyvitamine D sous l'action d'un complexe enzymatique comprenant un cytochrome P450, la CYP24. Cette étape est contrôlée par divers facteurs dont la 1,25(OH)<sub>2</sub> D, qui stimule l'enzyme, et la PTH, qui l'inhibe. Ainsi, les concentrations circulantes de 1,25(OH)<sub>2</sub>D sont rétrocontrôlés par l'hormone elle-même à deux niveaux, en diminuant la production rénale de 1,25(OH)<sub>2</sub>D et en stimulant la première étape de sa dégradation au sein des cellules cibles. Cet effet est à la fois direct et médié par l'hypercalcémie résultant de l'action de la 1,25 (OH)<sub>2</sub>D sur l'intestin et l'os. (Michèle Garabedian et coll., 2000)

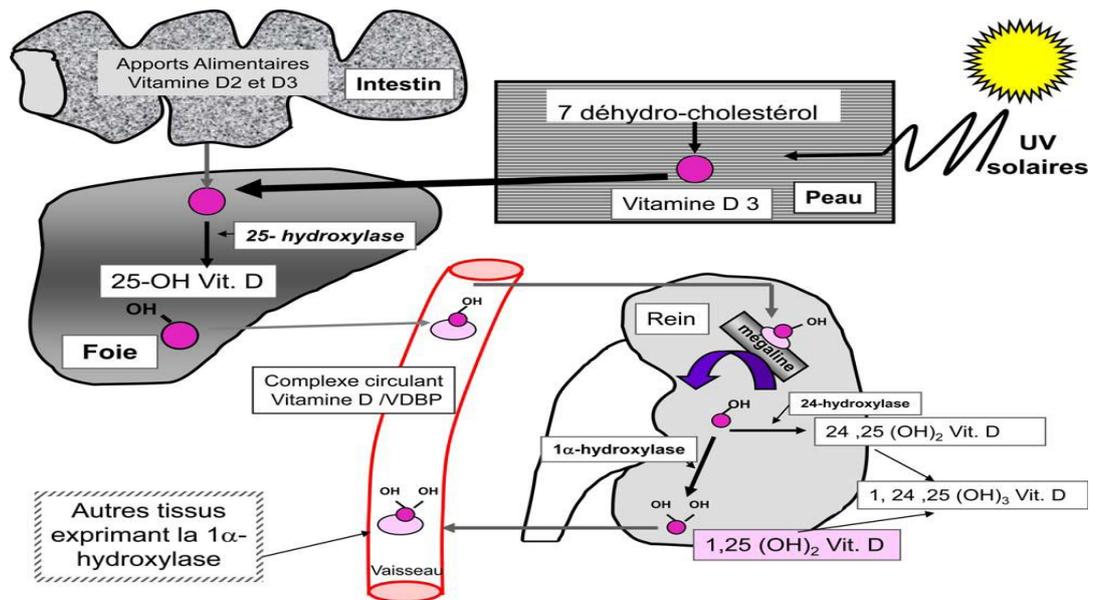


Figure 3. Métabolisme de la Vitamine D

Il n'existe pas de concentration universelle quant à la concentration optimale de 25 (OH) D. Les plages devront être basées sur les valeurs de décision clinique applicables aux deux sexes de tous âges. Ainsi on peut prendre comme valeur sérique en 25(OH) D supérieur à 30ng/ml. (voir tableau. 1)

Tableau 1. Les valeurs sériques en 25 (OH) D

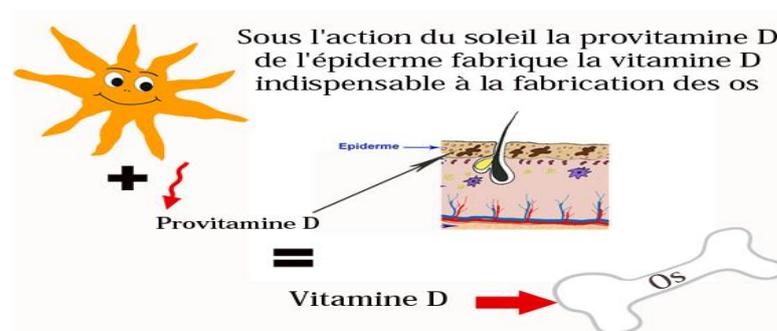
les valeurs sériques en 25(OH)D		
Niveau	nmol/L	ng/ml
Carence	<25	<10
Insuffisant	25-74	10-29
suffisant	75-250	30-100
toxicité	>250	>100

## 2-3 Carence en vitamine D

La carence en vitamine D est définie par un taux inférieur à 25nmol/L (10ng/L) (Marie Courbebaisse et coll., 2011). Elle est souvent surveillée aux 2 âges extrêmes de la vie : chez le nourrisson et les personnes âgées. Chez le nourrisson, on a le rachitisme qui se caractérise par une mauvaise calcification des os qui perdent leur rigidité et se déforme. Cette carence se traduit par une déformation du squelette, un retard de croissance et des troubles de la dentition. À l'autre extrémité

de la vie, chez le sujet âgé de plus de 70 ans, on constate des carences très fréquentes, et volontiers très profondes en vitamine D. La carence profonde en vitamine D expose à l'ostéomalacie, d'autant plus qu'elle est très souvent associée à une insuffisance d'apports calciques (Claude Laurent Benhamou et coll., 2008). Outre les conséquences sur le tissu osseux, les personnes carencées en vitamine D posséderaient un risque accru de développer une hypertension artérielle (HTA), un diabète ou une obésité, trois facteurs de risque de maladies cardiovasculaires (biologiste infos., 2009). Aussi, il y a un risque de cancer et les maladies auto-immunes (Marie Courbebaisse et coll., 2011). Cette carence peut être corrigée par administration de vitamine D à des doses qui dépendent de la concentration de 25(OH)D initiale, par exemple 4 ampoules de 100 000 UI de D3 (1 toutes les 2 semaines) si la 25(OH)D est inférieure à 10 ng/ml ; 3 ampoules de 100 000 UI de D3 (1 toutes les 2 semaines) si la 25(OH)D est comprise entre 10 et 20 ng/ml et ou 1 ou 2 ampoules de 100 000 UI de D3 si la 25(OH)D est comprise entre 20 et 30 ng/ml (CAROLE ÉMILE. 2008) .

Aussi, à la suite de l'exposition au soleil, le 7-dihydrocholestérol, localisé au fond des couches de l'épiderme à croissance active, subit un clivage protéolytique de l'anneau « B » résultant dans la libération de pré-vitamine D3 qui est ensuite transformée par isomérisation en vitamine D3 (cholécalférol). La vitamine D2 est métabolisée de la même façon que la vitamine D3. En été, 15 à 30 minutes /jour d'exposition des bras et du visage pour apporter à un adulte en bonne santé les 2/3 des besoins quotidiens en vitamine. La production de la vitamine D par la peau dépend de la durée et l'heure de l'exposition, de l'intensité lumineuse de la pigmentation de la peau, de l'âge, de la surface corporelle soumise aux UV. (Voir Figure. 4).



**Figure 4.** L'effet du soleil sur le métabolisme de la vitamine D

## 2-4 Vitamine D et calcium

La  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$  joue un rôle dans le maintien de l'homéostasie phosphocalcique par augmentation de l'absorption intestinale du calcium et du phosphore. Dans la cellule intestinale, la  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$  induit la synthèse de la protéine TRPV6 (créant un canal calcique au niveau de la bordure en brosse apicale de l'entérocyte pour l'absorption de calcium dans la cellule), de la calbindine 9K (transportant le calcium dans l'entérocyte) et de la protéine NPT2b (co-transporteur sodium phosphate favorisant l'entrée de phosphate dans l'entérocytes). Ce processus actif est prépondérant lorsque les apports calciques ou phosphorés sont faibles ou dans des conditions physiologiques (croissance, grossesse) ou pathologiques (granulomatoses hyperparathyroïdies...) ou la concentration plasmatique de  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$  est élevée. Grâce à ce processus, la fraction de calcium et de phosphate absorbée est significativement augmentée par rapport à la quantité ingérée. Cela favorise un environnement minéral optimal pour le tissu osseux, et donc la minéralisation osseuse. Un déficit profond en vitamine D peut ainsi entraîner des pathologies osseuses caractérisées par un défaut de minéralisation (rachitisme chez l'enfant, ostéomalacie chez l'adulte), notamment lorsque ce déficit est associé à une malabsorption. En cas de déficit en vitamine D moins profond, il n'y a pas de troubles de la minéralisation, mais la diminution de l'absorption intestinale du calcium et la tendance hypocalcémique résultante sera corrigée par l'effet de Parathormone (PTH) qui stimule le remodelage osseux, la libération du calcium qui, à long terme, contribue l'ostéoporose du sujet âgé.

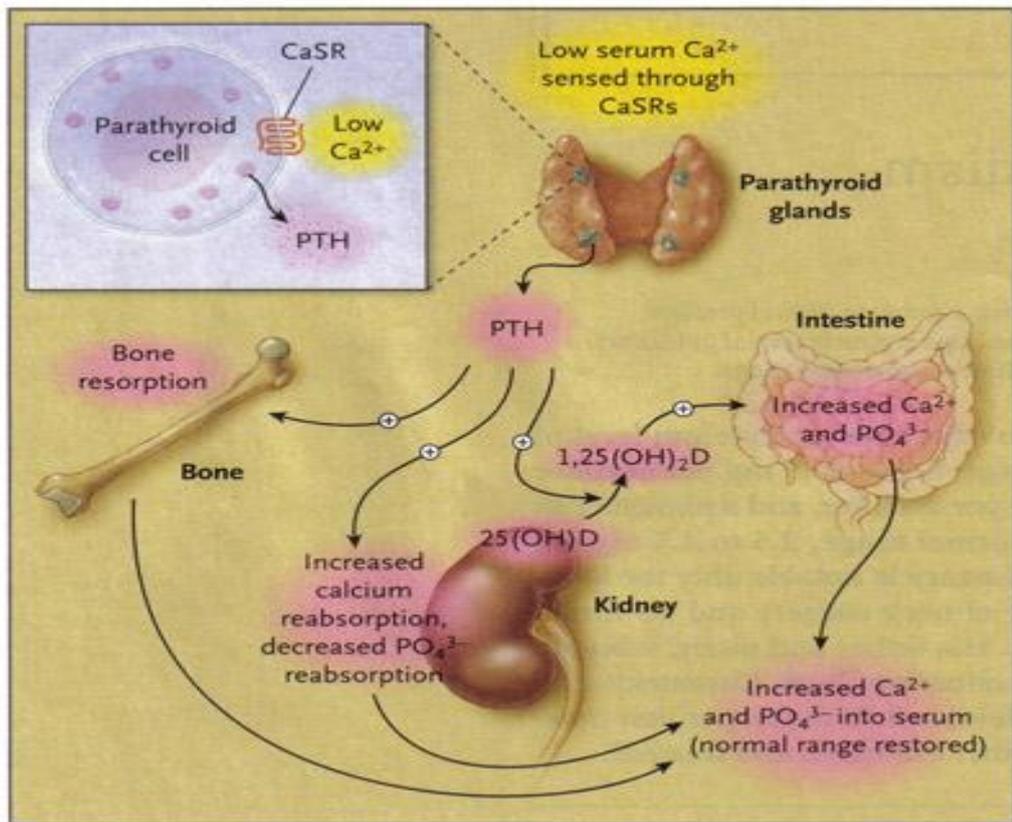


Figure 5. Vitamine D et Calcium

OBJECTIFS DE L'ETUDE :

L'Institut Pasteur de Casablanca reçoit beaucoup de patients surtout des femmes demandant l'analyse de la vitamine D et la majorité présente une déficience ou une carence. De nos jours aucune étude n'a été faite dans l'institut sur la vitamine D.

L'objectif de cette étude est d'établir la relation entre la vitamine D et le métabolisme de Calcium chez une quelque dizaines de patients qui consultent pour un dosage de la vitamine D au sein de l'institut Pasteur du Maroc.

## **III - MATERIEL ET METHODES**

## **1- Population**

La population d'étude est constituée de 25 femmes âgées de 29 à 69 ans ayant consulté entre le mois de mars et Avril 2012.

## **2- Matériels Biologique « Prélèvement du sang**

Les prélèvements du sang ont été effectués dans un tube sec chez les patients à jeun. Le sang a été centrifugé à une vitesse de 3000 tours pendant 10min et après on aliquote le surnageant (sérum) dont on va doser la vitamine D (25-Hydroxy vitamin D), le calcium et le phosphore sériques.

## **3- Dosage de la vitamine D par Technique d'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)**

Le dosage de 25-Hydroxy vitamin D a été fait par la technique EIA(Enzymeimmunoassay) d'IDS (immunodiagnostic systems) (Kit commercialisé) et une technique immuno-enzymatique a été utilisée pour le dosage de la 25-OH D présents dans le sérum ou le plasma.

Le kit est constitué de :

Standards (sérum humain tamponné contenant de la 25-OH D et de l'acide de sodium 0.09%) ;

Contrôles (sérum humain lyophilisé contenant de la 25-OH D et de l'acide de sodium à 0.09%)

Les échantillons sont dilués avec de la 25-OH D marquée avec de la biotine. Les échantillons dilués sont incubés dans des puits de micro titrage recouverts d'un anticorps de mouton anti-25-OH D hautement spécifique, pendant 2 heures à la température ambiante, avant aspiration et lavage. De l'avidine marquée par une enzyme (peroxydase de raifort) est ajoutée et se fixe de façon sélective au complexe de biotine et, après une étape supplémentaire de lavage, une réaction de coloration est obtenue en ajoutant un substrat chromogène (TMB : Tétraméthylbenzidine). Après 30min après l'ajout de la solution d'arrêt, la densité optique des mélanges est mesurée par un lecteur de plaques de micro titrage à 450nm.

L'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la concentration de la (25-OH) D.

## 4-Dosage des taux sériques de phosphores et de calcium

Le dosage des concentrations sériques de phosphores et de calcium a été réalisé par l'automate Vitros fusion 5.1.

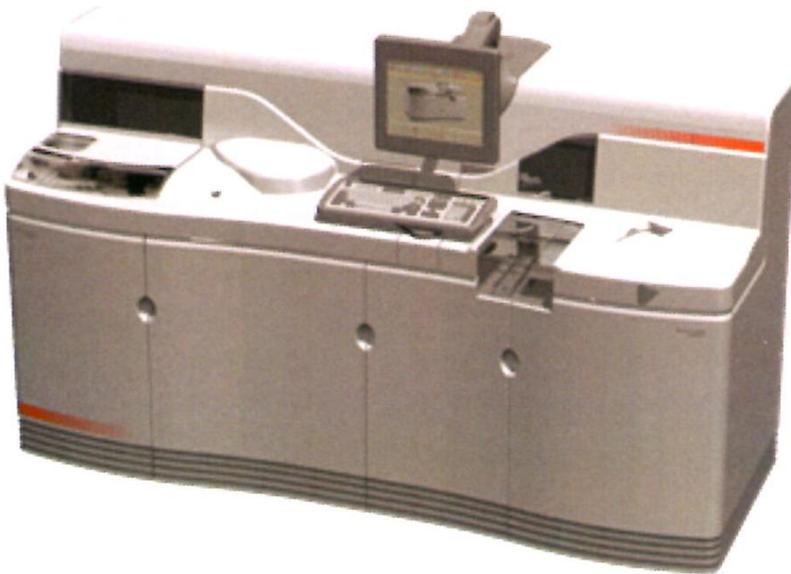


Figure 6 : L'automate orthoclinal vitros fusion 5.1.

L'activité de cet automate se base sur la chimie sèche sur plaques, cette technologie permet d'obtenir des résultats plus précis en éliminant le risque d'une erreur de manipulation humaine. Chaque cartouche correspond à une méthodologie que l'analyseur identifie grâce à un code barre. Après l'insertion des cartouches nécessaires dans l'appareil, on programme les analyses souhaitées et les échantillons sont chargés sur le portoir réservé aux analyses.

Au lancement du programme, le vitros 5.1 suit les étapes suivantes :

**Identification des analyses** : elle se fait par lecture du code barre qui existe sur le tube. .

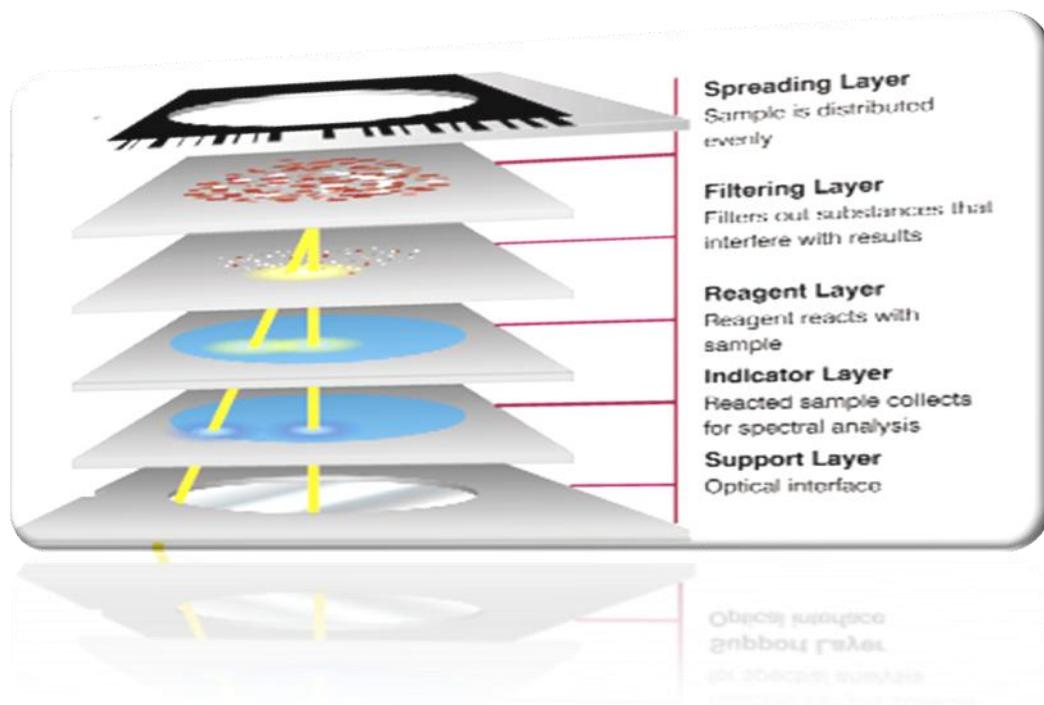
Déplacement des plaques vers la station de dépôt des échantillons.

**Pipetages d'échantillons** : A l'intérieur de l'appareil ; une micropipette récolte un volume de 2 à 17  $\mu$ l du sérum, ensuite elle le dépose sur les plaquettes.

l'échantillon est déposé sur la plaque qui passe dans l'incubateur pour les plaques colorimétriques et les plaques immunologiques. Deux autres pompes aspirent aussi les liquides de lavage et de référence.

**Incubation** : elle permet aux différentes réactions de se dérouler dans les conditions optimales de température.

**La mesure** : les plaques colorimétriques et immunologiques passent dans le réflectomètre. Si les résultats dépassent les limites de lecture, l'utilisateur introduit un facteur de dilution.



**Figure. 7** Les différentes couches d'une plaquette et son rôle

Les fonctions des différentes couches des plaquettes :

- ❖ Couche d'étalement : poreuse, ce qui permet aux liquides dans l'échantillon de pénétrer à travers les autres couches. Elle distribue l'échantillon de façon uniforme sur toute la surface de la plaque.
- ❖ Couche de réactif : contient des enzymes, des tampons, et des catalyseurs nécessaires à la formation de la réaction.
- ❖ Couche d'indicateur : contient un colorant ou indicateur similaire destiné à produire un complexe coloré. Le complexe coloré est proportionnel à la concentration de l'analyse.
- ❖ Couche support : est constituée de plastique transparent et sur elle que reposent toutes les autres couches de la plaque, elle permet à la lumière de passer de sorte que le complexe coloré peut être mesuré.

#### 4-1 Principe de dosage du calcium :

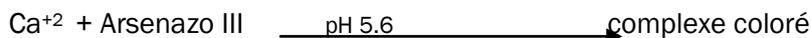
La méthode de dosage sur la plaque analytique VITROS Ca est réalisée à l'aide de plaques analytiques VITROS Ca et du jeu d'échantillon de calibrage VITROS Chemistry Products Calibrator Kit 1 sur les systèmes de chimie clinique VITROS.

La plaque VITROS Ca est constituée d'un support en polyester recouvert d'un film multicouche.

Une goutte d'échantillon patient est déposée sur la plaque, puis répartie uniformément par la couche d'étalement dans les couches sous-jacentes. Le calcium lié est dissocié des protéines de liaison et peut ainsi pénétrer la couche de réactif sous-jacente à travers la couche d'étalement. Le calcium forme alors un complexe avec le colorant Arsenazo III provoquant un déplacement du maximum d'absorption.

Après incubation la densité de réflexion du complexe coloré est mesurée par spectrophotométrie. La quantité du complexe coloré est proportionnelle à la quantité de calcium présent dans l'échantillon.

La séquence réactionnelle est :



La concentration normale du calcium est entre 2,15-2,5 mmol/l

#### 4-2 Principe de dosage du phosphore :

L'analyse repose sur la réaction à pH acide du phosphate inorganique avec le molybdate d'ammonium pour former un complexe et Ubbarow qui réagit ensuite avec le sulfate de *p*-méthylaminophénol, réducteur organique, pour donner du chromophore bleu d'hétéropolymolybdénum stable.

Une goutte d'échantillon patient est déposée sur la plaque, puis répartie uniformément par la couche d'étalement dans les couches sous-jacentes. Le phosphore présent dans l'échantillon forme un complexe avec molybdate d'ammonium, qui est réduit par le sulfate de *p*-méthylaminophénol pour donner un chromophore bleu.

La concentration en phosphate de l'échantillon est déterminée en mesurant le chromophore bleu d'hétéropolymolybdénum par spectrophotométrie de réflectance.

La séquence réactionnelle est :

Phosphate inorganique + molybdate  $\xrightarrow{\text{ph } 4,2}$  complexe ammonium-phosphomolybdate

Complexe ammonium-phosphomolybdate + sulfate de p-méthylaminophénol  
 $\longrightarrow$  bleu d'hétéropolymolybdate

La concentration normale du phosphore est entre 0,8 - 1,45 mmol/l

## **IV - RESULTATS**

Nous avons divisé notre population d'étude en quatre groupes selon leur concentration en vit D (voir Figure. 5) :

Le groupe 1 est la population **Témoin** est constituée de 29% de la population présentant les patients avec un taux sérique en vitamine D suffisant (Voir Tableau. 2);

Le groupe 2 est constitué de 52% de la population des patients présentant une déficience en vit D (Voir Tableau. 2) ;

Le groupe 3 est constitué de 15% de la population des patients en vitamine D présentant une carence en vit D (Voir Tableau. 2) ;

Le groupe 4 est constitué de 4% de la population des patients présentant une intoxication en vit D (Voir Tableau. 2).

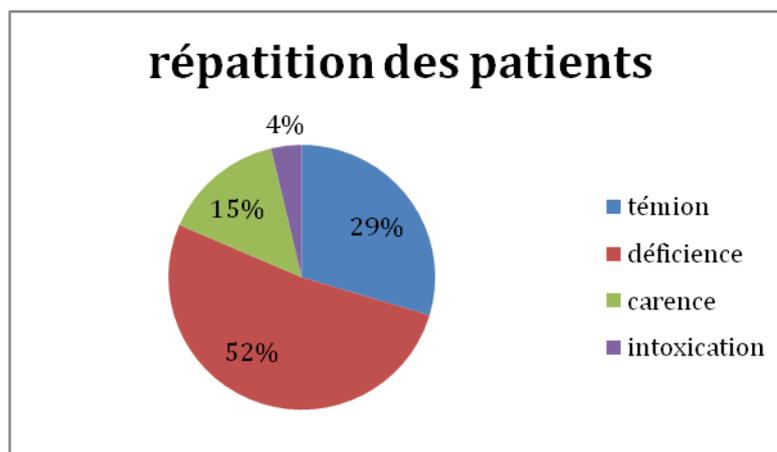


Figure 8. Population de l'étude

Tableau 2. Valeurs de référence du vit D

Niveau	Vit D (ug/l)
Suffisant	30-75
Insuffisant	10,-30
carence	<10
toxicité	>75

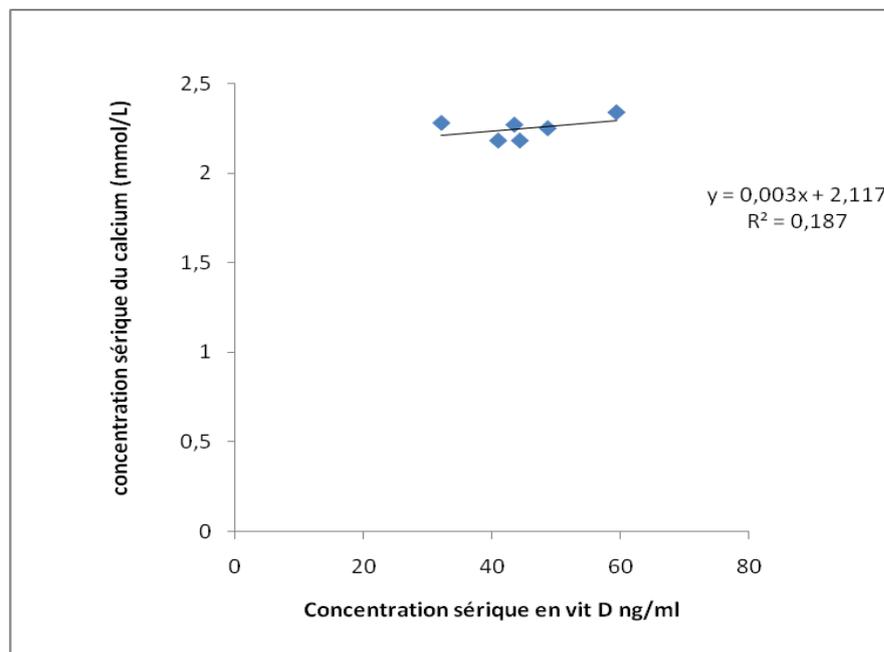
## 1- Population témoin

La population témoin constituée de 6 femmes avec une concentration sérique en vitamine D suffisante et présentant une concentration sérique en calcium normal. Nous avons un seul témoin avec le résultat de taux sérique en phosphore et dont le taux est normal (Voir Tableau 3).

**Tableau3** : Relation entre la concentration sérique de la Vitamine D et la concentration sérique du calcium chez la population témoin

Age (ans)	Vitamine D (ug/l)	Calcium (mmol/l)	Phosphore (mmol/l)
54	43,39	2,27	
58	40,86	2,18	1,04
64	32	2,28	
66	44,25	2,18	
69	59,33	2,34	
69	48,61	2,25	

D'après la figure. 9, on peut dire qu'on a une bonne corrélation entre la concentration sérique normale de la vitamine D et la concentration sérique normale de calcium.



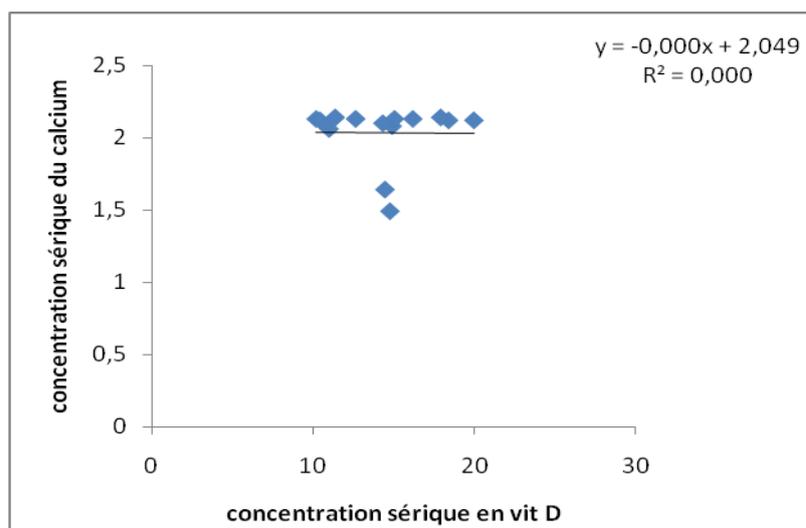
**Figure 9.** Relation entre la concentration sérique de la Vitamine D et la concentration sérique de calcium chez la population témoin

## 2- Population présentant une déficience en vit D

On constate que la population est constituée de 14 femmes, présente une déficience en vit D (selon les recommandations du kit déficit = 10-29 ug/l) et présente une concentration sérique faible en calcium. On observe un taux sérique normal en phosphore (voir tableau 4)

**Tableau 4:** Relation entre la concentration sérique de la Vitamine D et la concentration sérique de calcium pour les patients en déficit de vit D

Age (ans)	Vit D (ug/l)	Calcium (mmol/l)	Phosphore: (mmol/l)
36	14,46	1,64	
44	14,91	2,08	
49	18,41	2,12	
50	15,05	2,13	1,06
52	10,99	2,06	
52	10,19	2,13	1,09
54	11,37	2,14	
55	12,64	2,13	1,03
61	19,98	2,12	
65	10,42	2,12	1,09
65	16,19	2,13	
67	14,33	2,1	
68	14,77	1,49	1,25
87	17,92	2,14	



**Figure 10. :** Relation entre la concentration sérique de la Vitamine D et la concentration sérique de calcium chez la population présentant un déficit en vit D

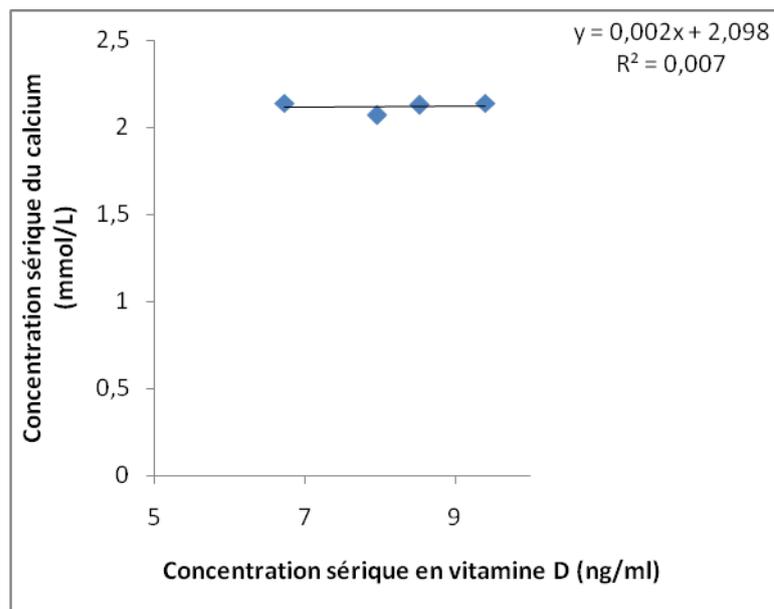
### 3- Population présentant une carence en vit D

On constate que la population est constituée de 4 femmes présentant une carence en vit D (d'après les recommandations du kit carence < 10) et une concentration sérique faible en calcium avec une concentration sérique normale en phosphore.

Aussi on remarque que la diminution du taux de calcium est à peu près le même pour la population avec déficience en vit D. (voir tableau 5)

**Tableau 5:** Relation entre la concentration sérique de la Vitamine D et la concentration sérique de calcium chez les patientes avec une carence en vit D

Age (ans)	Vit D (ug/l)	Calcium (mmol/l)	Phosphore: (mmol/l)
46	9,4	2,14	1,04
50	6,73	2,14	
61	8,53	2,13	
69	7,96	2,07	0,98



**Figure 11. :** Relation entre la concentration sérique de la Vitamine D et la concentration sérique de calcium chez population présentant une carence en vit D

#### 4- Population présentant une Intoxication en vit D

Nous avons constaté qu'une patiente présente une intoxication en vit D (selon les recommandations du kit : intoxication >100 ug/l) avec une diminution de la concentration sérique du calcium et une concentration normale de phosphore. (Voir tableau6)

**Tableau 6:** Relation entre la concentration sérique de la Vitamine D et la concentration sérique de calcium chez la patiente avec une intoxication

Age (ans)	Vit D (ug/l)	Calcium (mmol/l)	Phosphore: (mmol/l)
27	139,45	2,11	1,35

## **V – DISCUSSION ET CONCLUSION**

La vitamine D est un nutriment qui aide l'organisme à utiliser le calcium et le phosphore pour former et maintenir des os et des dents solides. Le rôle principal de la vitamine D est essentiellement basé sur l'équilibre du phosphore et du calcium dans l'organisme. En effet, au niveau intestinal, la vitamine D favorise l'absorption intestinale du calcium et du phosphore en modifiant la structure de la membrane des cellules intestinales. Donc, une carence en vitamine D peut entraîner une réduction des taux de calcium et de phosphore dans le sang, laquelle cause une diminution du calcium des os. Le calcium qui est puisé des os aide à stabiliser son niveau sanguin. Une carence en vitamine D peut causer le rachitisme chez les enfants et l'ostéomalacie (ramollissement des os) ou l'ostéoporose (fragilisation des os) chez les adultes. Par ailleurs, un excès de vitamine D peut entraîner le dépôt d'une quantité excessive de calcium dans l'organisme, qui peut causer la calcification des reins et d'autres tissus mous, notamment le cœur, les poumons et les vaisseaux sanguins.

Les principaux signes cliniques liés à une carence en vitamine D sont en rapport avec le système ostéo-articulaire. Le rachitisme chez l'enfant en est la démonstration la plus typique, alors que chez l'adulte une carence en vitamine D se caractérise par des déformations osseuses, l'apparition de tuméfactions (grosseurs) au niveau des extrémités des os longs, de douleurs osseuses diffuses et musculaires. A un stade évolué, le sujet peut avoir d'importantes difficultés pour marcher. Il s'agit d'une ostéomalacie carentielle.

La détection de la carence en vitamine D, suspectée sur des signes cliniques, sera confirmée par des dosages biologiques sanguins. Dans ce cadre, nous avons effectué des prélèvements sanguins chez 26 femmes âgées de 29 à 69 ans durant la période entre Mars et Avril, que nous avons divisé en 4 groupes selon leur concentration en vit D :

Le groupe 1 est la population Témoin est constituée de 29% de la population présentant les patientes avec un taux sérique en vitamine D suffisant, donc ce groupe n'a aucun risque présenter un des pathologies causée par le manque de vit d et du calcium.

Le groupe 2 est constitué de 52% de la population des patientes présentant une déficience en vit D ;

Le groupe 3 est constitué de 15% de la population des patientes en vitamine D présentant une carence en vit D ;

Le groupe 4 est constitué de 4% de la population des patientes présentant une intoxication en vit D

D'après les résultats de ce travail, seule les patientes présentant une concentration normale en vitamine D (groupe témoin) présentent une concentration sérique normale en phosphore et calcium.

Pour les patientes avec déficience et carence en vit D (groupe 2 et 3), nous avons observé qu'une diminution de la concentration sérique en vitamine D entraîne une diminution significative de la concentration sérique de la concentration de calcium. Nous n'avons pas observé de diminution de la concentration de phosphore dans les deux groupes présentant une déficience et une carence en Vit D (taux sérique normal). D'après la littérature (Catherine Cormier ; 2006), nous avons trouvé qu'une carence en vitamine D peut entraîner une réduction des concentrations de calcium et de phosphore dans le sang.

On constate que la seule patiente avec une intoxication (excès de vitamine D) présente une très faible diminution de la concentration sérique de calcium avec un taux normal de phosphore. Alors que dans la littérature (J. Bacchetta et coll., 2010), une hypersécrétion de vitamine D doit entraîner une hypercalcémie qui pourrait être à l'origine d'un dépôt d'une quantité excessive de calcium dans l'organisme provoquant une calcification des tissus mous tel que le cœur et les artères. Cette hypocalcémie retrouvée chez notre patient peut-être expliquée, par une carence d'apport alimentaire en calcium, souvent observée dans les pays en voie de développement ou par certaines maladies qui peuvent être responsables de la diminution de la concentration en calcium dans le sang entraînant la survenue d'une ostéomalacie carentielle. Il s'agit de maladies en rapport avec l'appareil digestif comme les malabsorptions chroniques, les maladies de l'estomac (ou chirurgie), l'atteinte du pancréas et du foie. Les maladies rénales peuvent également être impliquées dans cette carence, telles de l'insuffisance rénale, le syndrome néphrotique et l'atteinte des tubules ou encore, à un stade évolué, la réalisation d'une dialyse.

L'hypocalcémie retrouvée chez la patiente présentant une intoxication en vitamine D pourrait s'expliquer par le fait que l'excès de la vitamine D inhiberait la sécrétion de la PHT par feed back négatif. L'effet hypercalcémiant de la PTH se trouverait affaibli.

Dans ce travail, nous avons observé qu'une déficience en vitamine D entraîne une malabsorption digestive du calcium dont les concentrations, tendent à s'abaisser dans le plasma, ce qui va entraîner peut être une hypersécrétion de PTH qui mobilise le calcium osseux pour maintenir une calcémie subnormale. Cette déficience entraîne ainsi une déminéralisation osseuse avec des symptômes qui

peuvent correspondre au rachitisme ou à l'ostéomalacie. L'organisme, en absence de vitamine D, utilise le calcium de l'os pour maintenir une calcémie normale sous l'action de la PTH.

Une hypoparathyroïdie (baisse d'activité de la parathyroïde) ainsi que l'alcoolisme chronique sont des causes classiques de survenue d'une carence en vitamine D avec ostéomalacie carencielle clinique.

On peut conclure qu'il y'a une bonne corrélation entre le taux de vitamine D et le métabolisme du calcium.

En perspective de ce projet, d'autres dosages peuvent être faite tels que le dosage de la PTH, phosphore (nombre de dosage de ce paramètre a été faible) avec l'augmentation de la population d'étude pour montrer que toute diminution de vit D entraine une diminution de phosphore, calcium et une hypersécrétion de PTH.