



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES – FES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE



PROJET DE FIN D'ETUDES

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

DOSAGE DE LA VITAMINE D
DANS UNE POPULATION MAROCAINE

Présenté par : TAHLIL Dounia

Encadré par :

Dr. GHALIM Nouredin : IPM Casablanca.
Pr. SQALLI HOUSSAINI Hakima : FST Fès.

Soutenu le : 14 Juin 2013

Devant le jury composé de :

- Pr. SQALLI HOUSSAINI Hakima : Président.
- Dr. GHALIM Nouredin : Encadrant.
- Pr. BELRHITI ALAOUI Aziz : Examineur.

Année Universitaire : 2012-2013.

DÉDICACE

À mes parents

Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour
et de l'affection dont ils ne cessent de me combler.

Qu'ils trouvent dans ce travail
un témoignage de mon profond amour et éternelle reconnaissance.
Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

À mes chers frères et Sœur

En leurs souhaitant la réussite dans
leurs études et dans leurs vies

À la mémoire de mes grands parents

Puisse Dieu les accueillir dans son infinie Miséricorde

À toute la grande famille

À tous mes amis

À tous ceux que j'aime et qui m'aiment

À tous ceux-ci je dédie ce modeste travail

REMERCIEMENTS

Au Directeur de l'Institut Pasteur du Maroc, Monsieur HASSAR. Merci pour votre accueil et pour le fait que vous m'avez permis d'être comptée un jour parmi les stagiaires de l'IPM, chose dont je suis la plus fière au monde

C'est avec une reconnaissance sans égal à mon encadrant Madame SQALLI HOUSSAINI Hakima et pour ses efforts et sa disponibilité pour m'avoir appris la méthodologie du travail et de recherche. Je lui présente ici l'expression de mes profondes et respectueuses reconnaissances.

Je tiens à exprimer mes profondes reconnaissances à DR BELIK Abderrahmane, directeur du Laboratoire d'Hématologie, pour ses judicieux conseils durant mon stage. Ces conseils qui n'ont pas cessé de me prodiguer durant toute cette période. Je lui dois aussi une immense gratitude pour ses encouragements, sa patience, sa sympathie et de me faire profiter de son expérience et de ses connaissances ainsi pour tous les moyens qu'il a mis à ma disposition.

Je tiens à exprimer également mon sincère remerciement envers Dr. GHALIM Nourddin directeur du Laboratoire de Biochimie, Dr MOHAMADINE Hicham pour leurs soutiens et pour l'intérêt avec lequel ils ont suivi la progression de mon stage dans de meilleures conditions.

AVANT PROPOS

1- Fiche présentative de l'Institut Pasteur Maroc

Nom du lieu de stage : Institut Pasteur du Maroc : IPM

Adresse : 1 Place Louis Pasteur ; Bd Abdelmoumen ; Charles Nicolle ; Casablanca

N de téléphone : 0522434450

Télécopie : 0522260957

Messagerie : pasteur@pasteur.ma

L'Institut Pasteur a été créé pour permettre à Pasteur d'étendre la vaccination contre la rage, de développer l'étude des maladies infectieuses et de diffuser les connaissances. Suite à la réussite de l'Institut Pasteur, il se constitue un réseau d'Instituts associées qui compte aujourd'hui une vingtaine d'établissements dans le monde.

La présence pasteurienne au Maroc remonte à 1911, date à laquelle une filiale de l'Institut Pasteur avait été créée à Tanger. Rapidement après la signature de la convention de Fès en 1912, l'Institut Pasteur s'est trouvé séparé du Royaume du Maroc sous protectorat français et en décembre 1928, le docteur Edmond Sergent fut chargé d'étudier la création d'un nouvel Institut Pasteur. Le 15 Novembre 1929, fut décidée la création de l'Institut Pasteur du Maroc à Casablanca, sur l'initiative du docteur Emile Roux, à l'époque directrice de l'Institut Pasteur à Paris et de Monsieur Lucien saint, consul général de la république française au Maroc.

Ce n'est qu'en 1967, que les deux Instituts Pasteur furent réunis pour constituer l'Institut Pasteur du Maroc (IPM) par Décret Royal 17666 du 14 Rabia I 1387 (23 Juin 1967).

Après avoir connu des difficultés dans les années 60 et 70 vers la fin des années 80 une restructuration de l'Institut Pasteur du Maroc fut décidée par son conseil d'administration avec comme objectif d'assumer les trois missions principales de l'institut Pasteur : la recherche, l'amélioration de la santé publique et l'enseignement.

Enfin après avoir cessé de fonctionner pendant plusieurs années, l'établissement de Tanger a été rénové pour rouvrir ses portes depuis Octobre 1995.

2- Centre de Biologie Médicale : Département de stage

Le département C.B.M. est le lieu où sont prélevés et analysés divers [liquides biologiques](#) : le sang, les urines, la salive, la bile, le suc gastrique et d'autres ; sous la responsabilité de [biologistes médicaux](#), qui en interprètent les résultats dans le but de participer au [diagnostic](#) et au suivi de certaines maladies

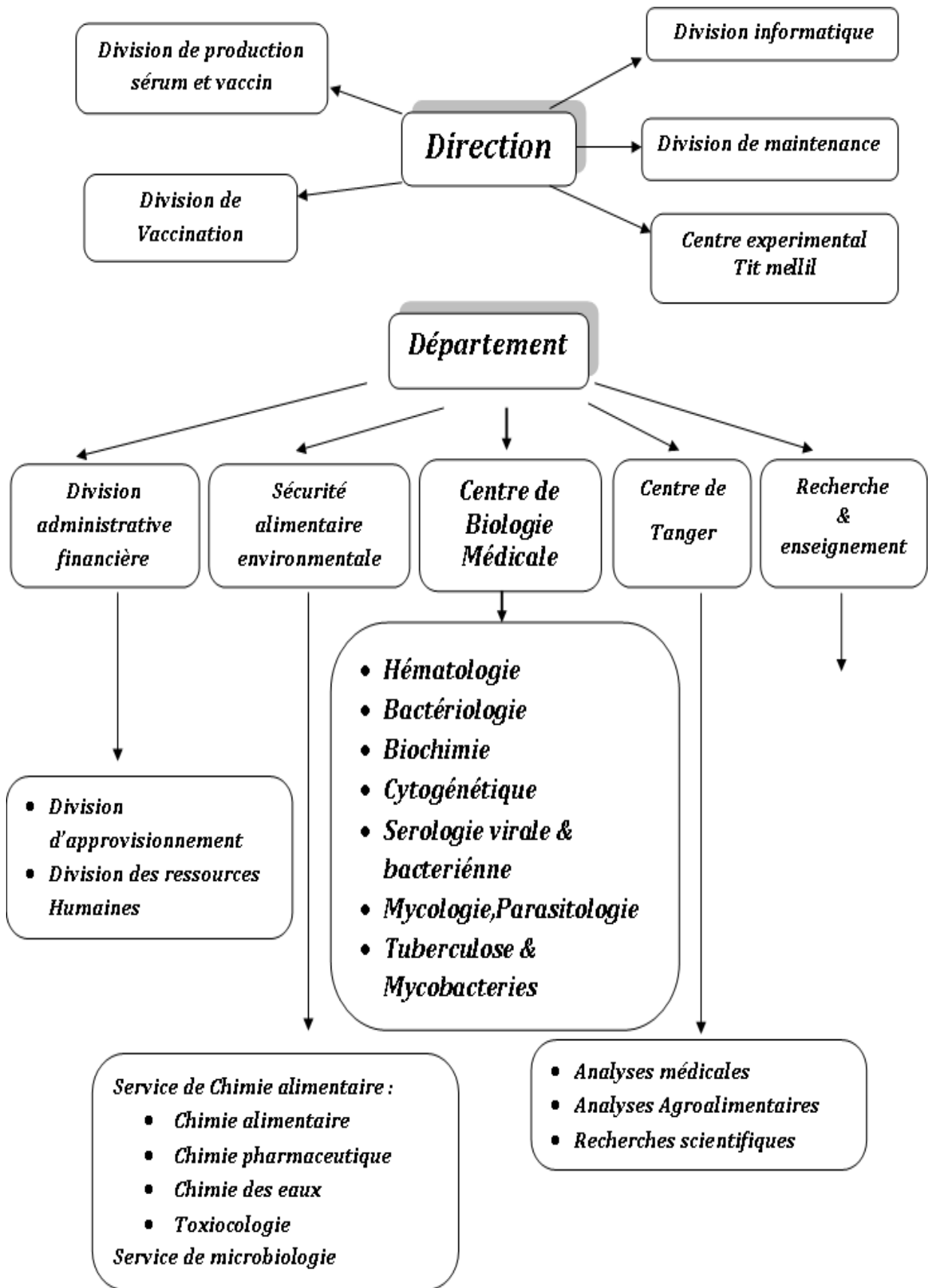
En effet en [biologie médicale](#), il existe deux types principaux d'analyse :

- La [biochimie](#) qui étudie les molécules ;
- La [cytologie](#) qui étudie les cellules.

Au sein de ce laboratoire, on travaille avec le sérum comme matériel biologique dans toutes les analyses sauf hémoglobine glyquée. Pour l'ensemble de ces analyses, on passe par une étape de centrifugation pour récupérer le sérum.

Le lieu de stage regroupe le laboratoire pour effectuer les analyses et deux autres salles. La première contient le système informatique réservé pour la validation des résultats par un médecin biologiste une autre petite salle est consacrée pour la manipulation des urines.

3- Organigramme de l'Institut Pasteur du Maroc



ABRÉVIATIONS

1, 25 (OH)₂D	1,25 dihydroxy-vitamine D
24, 25(OH)₂D	24,25-dihydroxy-vitamin D ₃
25(OH) D-DBP	25-hydroxy-vitamine D lié à son transporteur DBP
25(OH)D	25-hydroxy-vitamine D
AFSSP	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
CYP 450	Cytochrome P 450
D₂	Ergocalciférol
D₃	Cholécalciférol
DBP	Vitamine D Binding Protein
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FGF 23	Fibroblast Growth Factor 23
FGF23	Le fibroblast Growth Factor 23
IDBP3	Intra-cellular vitamin D Binding Protein 3
IDS	Immuno-diagnostic-systems
LDH	Lactate Déshydrogénase
PTH	Hormone Parathyroïdienne
RXR	Retinoic X factor
SUVIMAX	Supplémentation en Vitamines et Minéraux Antioxydants
TBM	Tétra-méthyl-benzidine
UV	Ultraviolets
VDR	Vitamin D Receptor
VDRE	Vitamin D Responsive Element

LISTE DES FIGURES

	Page	
Figure 1	Structure chimique de la vitamine D	3
Figure 2	Différences structurales entre vitamine D et ses métabolites	5
Figure 3	Biosynthèse de la vitamine D	6
Figure 4	Métabolisme de la vitamine D	7
Figure 5	<u>Métabolisme rénal de la 25(OH)D</u>	8
Figure 6	Tubes rouges secs contenant le sang	17
Figure 7	Classement des tubes et récupération du sérum.	17
Figure 8	Appareil de dosage Bio-rad ph D.	18
Figure 9	Schéma représentant le principe général d'Élisa	20
Figure 10	Calibrants et contrôles	21
Figure 11	Portoir pour classement des réactifs	22
Figure 12	Portoir pour classement des échantillons des patients	22
Figure 13	Schéma représentatif du complexe (antigène –anticorps-enzyme-substrat d'enzyme) former dans les puits de la plaque Elisa	24
Figure 14	Différentes étapes effectué par l'appareil de dosage Bio-rad PhD	24
Figure 15	Exemple typique d'une courbe d'étalonnage.	25
Figure 16	Répartition des patients dosant la Vitamine D selon le sexe	26
Figure 17	Répartition des patients selon la valeur sérique de la vitamine D	28
Figure 18	Répartitions des femmes examinant le dosage de la vitamine D selon l'âge	30
Figure 19	Répartition des femmes âgée de plus de 50 ans selon la valeur sérique de la vitamine D	32

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1 : Valeur sérique normale et valeur pathologique de la vitamine D	13
Tableau 2 : Valeur de la vitamine D en ng/mL et nm/mL	25
Tableau 3 : Répartition des patients selon la valeur sérique de la vitamine D	27
Tableau 4 : Répartitions des femmes examinant le dosage de la vitamine D selon l'âge	29
Tableau 5 : Répartition des femmes âgées de plus de 50 ans selon la valeur sérique de la vitamine D	31

SOMMAIRE

	Page
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIE	
I. Historique et définition de la vitamine D	2
I.1. Historique de la vitamine D	2
I.2. Définition	2
II. Epidémiologie de la vitamine D	3
II.1. Facteurs influençant la répartition de la vitamine D	3
II.2. Source de la vitamine D	4
II.2.1. Les rayonnements UVB	4
II.2.2. L'alimentation	4
II.2.3. Suppléments médicamenteux	4
III. Absorption, transport et métabolisme de la vitamine D	5
III.1. Métabolisme de la vitamine D dans le foie	7
III.2. Métabolisme rénal de la vitamine D	8
III.3. Régulation de la synthèse de 1,25(OH) ₂ D	9
IV. Rôles physiologiques de la vitamine D	9
IV.1. Métabolisme osseux, action endocrine	10
IV.2. Rôle extra-osseux, action autocrine ou paracrine	10
V. Vitamine D et Pathologies chroniques	11
VI. Dosage de la vitamine D	12
V.1. Forme de dosage de la vitamine D	12
VI.2. Différentes techniques de dosage	12
VII. Carence, insuffisance et toxicité de la vitamine D	13
VII.1. Risques associés (établis ou supposés) à une insuffisance en vitamine D	13
VII.1.1. Risques osseux	13
VII.1.2. Risques extra-osseux	14
VII.2. Toxicité de la vitamine D	15
VIII. Vitamine D en pratique quotidienne	15

	Page
MATÉRIEL & MÉTHODES	16
I. Matériel	16
II .Méthodes	16
II.1. Préparation préalable du sérum	16
II.1.1. Prélèvement sanguin	16
II.1.2. Centrifugation des tubes	17
II.1.3. Récupération et classement du sérum	18
II 2 Appareil de dosage bio-rad Ph D	19
II.2.1. Utilisation	19
II.2.2. Principe général de la technique Elisa	19
II.2.3 Principe du test d'Élisa trousse IDS 25(OH)D	19
II.2.4. Préparation des réactifs de l'appareil Bio-rad PhD)	20
II.2.5.Disposition des échantillons et des réactifs dans l'appareil Bio-rad PhD	20
II.2.6. Etapes effectuées par l'appareil de dosage Bio-rad PhD	22
II.2.7. Traitement des résultats	25
RÉSULTATS ET DISCUSSION	
I-Répartition d' nombre de patient examinant le dosage D selon le sexe	26
II. Répartition des patients selon la valeur sérique de la vitamine D	27
III Répartition des femmes examinant le dosage de la vitamine D selon l'âge	29
IV. Répartition des femmes âgées de plus de 50 ans selon la valeur sérique de la vitamine D	31
CONCLUSION GÉNÉRALE	32
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

La vitamine D joue un rôle primordial dans la croissance et la santé osseuse .En effet, une carence en vitamine D peut provoquer du rachitisme chez l'enfant et de l'ostéomalacie chez l'adulte. Son rôle dans la prévention des fractures ostéoporotiques du sujet âgé (en association avec du calcium) est maintenant bien démontré.

La localisation variée de ses récepteurs suggère, aujourd'hui, son intervention dans différentes autres pathologies : sarcopénie du sujet âgé, évènements cardiovasculaires et hypertension, certains cancers, certaines maladies auto-immunes et infectieuses, troubles psychiatriques. De très nombreuses données épidémiologiques et expérimentales démontrent déjà certains des effets extra-osseux de la vitamine D, mais ses origines variées impliquent encore des difficultés à l'étudier (Holick, 2007).

La vitamine D est considérée comme une hormone et possède deux origines. L'une alimentaire et l'autre issue de la synthèse cutanée à partir du rayonnement solaire.

Qu'elle soit synthétisée par la peau ou apportée par l'alimentation ou par supplément médicamenteux, la vitamine D (D2 ou D3) est absorbée dans l'intestin grêle stockée dans le tissu adipeux et éliminé par voie fécale. Pour son métabolisme la vitamine D, libérée dans la circulation sanguine liée à une protéine porteuse, la VDBP, et l'albumine, est ensuite métabolisée dans le foie et les reins.

L'évaluation du statut vitaminiq ue D peut être réalisée par le dosage de la 25-hydroxyvitamine D 25(OH)D sérique. La plupart des revues récentes sur le sujet suggèrent que les valeurs de référence de la 25(OH)D obtenues dans des populations apparemment en bonne santé sont beaucoup trop basses (Elsevier *et al.*, 2004).

Afin d'évaluer la teneur sérique de la vitamine D de la population marocaine, nous avons analysé un échantillon de 114 individus dont 108 femmes et 6 hommes par méthode immunologique qui utilise Elisa, comme principale technique.

Cette méthode consiste en deux grandes étapes. D'abord, la préparation préalable du sérum (centrifugation du sang, récupération du sérum). Ensuite, classement du sérum dans l'appareil Bio Rad PhD qui dose automatiquement la vitamine D. Cet appareil nous donne à la fin une courbe d'étalonnage, qui permet la lecture des résultats (valeur sérique de la vitamine D pour chaque patient).

I. HISTORIQUE ET DEFINITION DE LA VITAMINE D

I.1. HISTORIQUE DE LA VITAMINE D (Tavera, 2008)

En 1782, Dale Perceval, médecin anglais, fit absorber de l'huile de foie de Morue, aux rickets (enfants chétifs, contrefaits, jambes arquées et dos bossu, des quartiers pauvres de Londres).

En 1827, Bretonneau, médecin français, administra aux enfants atteints de rachitisme, de l'huile de foie de morue. En 1890, Palm affirme le pouvoir guérisseur des expositions au soleil.

En 1865, Trousseau est le premier, dans son manuel de médecine clinique, à recommander à la fois l'absorption de l'huile de foie de morue et l'exposition au soleil. En 1919, l'effet curatif des rayons Ultra-violet est prouvé.

En 1921, Huldechinsky traita le rachitisme par les UV. En 1932, les cristaux de vitamine D₂ pure sont isolés. En 1936, les cristaux de vitamine D₃ pure sont isolés à partir de l'huile de foie de thon. En 1952, Woodward synthétise pour la première fois la vitamine D₃, ce qui lui vaut le prix Nobel de chimie en 1965.

En 1964, Norman détecte l'existence de trois métabolites de la vitamine D. Il établit la structure du calcitriol en 1971.

I.2. DEFINITION

La vitamine D (Figure 1) est une vitamine liposoluble (soluble dans les graisses) et thermostable (résistante à la chaleur), sensible à la lumière, aux acides, aux alcalins et à

. Absorbée dans l'intestin grêle de manière passive, elle rejoint la circulation générale par voie lymphatique, incorporée aux chylomicrons. Ses principaux sites de stockage sont le foie, la peau, les reins, la rate, les muscles, le tissu adipeux et le sang. L'élimination de la vitamine D se fait par voie fécale (Vieth *et al.*, 2005).

La vitamine D regroupe en réalité un ensemble de cinq vitamines D différentes, numérotées de 1 à 5, dont une petite partie est apportée par l'alimentation (20%). Le reste étant synthétisé par le corps à partir de la lumière (80%) (Elsevier *et al.*, 2004).

En effet, la vitamine D en réalité est une pro-hormone, et ne peut être considérée comme une vitamine proprement dite. C'est un produit dont l'organisme a besoin en petite quantité mais qu'il ne peut pas être fabriqué, puisque la peau ne peut synthétiser de la vitamine D₃ (cholécalférol) qu'à partir du 7-dehydrocholesterol lorsqu'elle est exposée à des rayonnements UVB. Cette pro-hormone est d'origine double, l'une endogène (action du rayonnement solaire sur la peau), l'autre exogène (alimentation) (Elsevier *et al.*, 2004).

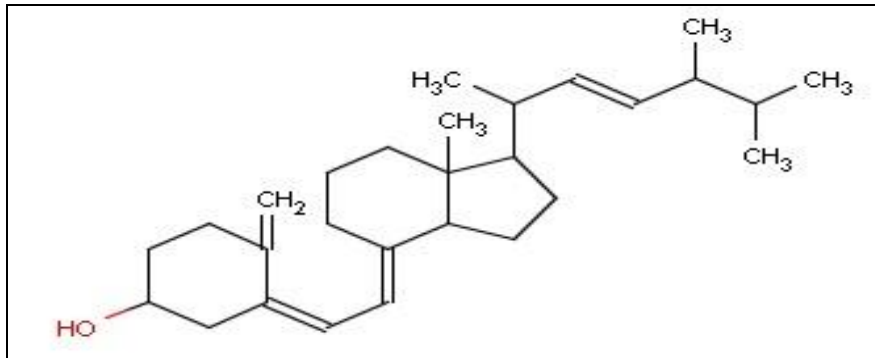


Figure 1 : Structure chimique de la vitamine D (Holick, 2007).

II. EPIDEMIOLOGIE DE LA VITAMINE D

II.1. FACTEURS INFLUENÇANT LA REPARTITION DE LA VITAMINE D

Plusieurs facteurs peuvent influencer la répartition de la vitamine D (Holick *et al.*, 2007), tels que :

- **Diminution globale de la consommation du lait ;**
- **Diminution globale de l'activité physique** de plein air, surtout chez les jeunes, au profit du temps passé devant la télévision ou l'ordinateur ;
- **Augmentation de la prévalence du surpoids** et de l'obésité.

Le statut de la vitamine D diffère selon :

- **L'âge :** les sujets âgés ont en moyenne une concentration sérique de 25-hydroxy-Vitamine D (25(OH)D) plus basse que la population jeune d'une même région dont la pigmentation est comparable ;
- **Le sexe :** en moyenne, les femmes ont des concentrations de 25 (OH)D plus basses que les hommes ;

- **La pigmentation de la peau :** plus la peau est foncée, plus la concentration de 25(OH)D est basse dans une zone géographique donnée ;
- **Les habitudes vestimentaires :** le diamètre du port vestimentaire ;
- **Les habitudes alimentaires :** les populations qui consomment beaucoup de poissons marins ont souvent des concentrations de 25 (OH)D plus élevées que celles qui consomment moins.

II.2. SOURCE DE LA VITAMINE D

II.2.1. Les rayonnements UVB

Les rayonnements UVB principalement apportés par le soleil, sont la majeure source de la vitamine D, induisent une photolyse du 7-déhydro-cholesterol en pré-vitamine D₃ dans les cellules des couches profondes de l'épiderme.

Sous l'influence de la température (optimale à 37 C), cette pré-vitamine D₃ est ensuite isomérisée en vitamine D₃ (cholécalférol) (Holick, 2007).

II.2.2. L'alimentation

Les sources alimentaires étant très peu nombreuses et donnent à l'organisme de la vitamine D₃ (d'origine animale tel que le poisson) ou de la vitamine D₂ (d'origine végétale) (Rosen 2011)

II.2.3. Suppléments médicamenteux

La vitamine D existe également sous forme de suppléments médicamenteux. Différentes spécialités contiennent, à doses variées, soit de la vitamine D₂ soit de la vitamine D₃ (A.F.S.S.P., 2009).

III. ABSORPTION, TRANSPORT ET METABOLISME DE LA VITAMINE D

Qu'elle provienne de l'alimentation ou de supplément médicamenteux, la vitamine D est absorbée dans tout l'intestin grêle, associée à des sels biliaires et des acides gras libres. Cette absorption est lente de l'ordre de trois jours pour une dose de vitamine D relativement importante (Souberbielle, 2010).

L'intestin peut également absorber des métabolites de la vitamine D (Figure 2), comme la 25-hydroxy-vitamine D (25(OH)D) ou la 1,25(OH)₂D. L'absorption intestinale de ces dérivés est beaucoup plus rapide que celle de la vitamine D (Souberbielle, 2010)

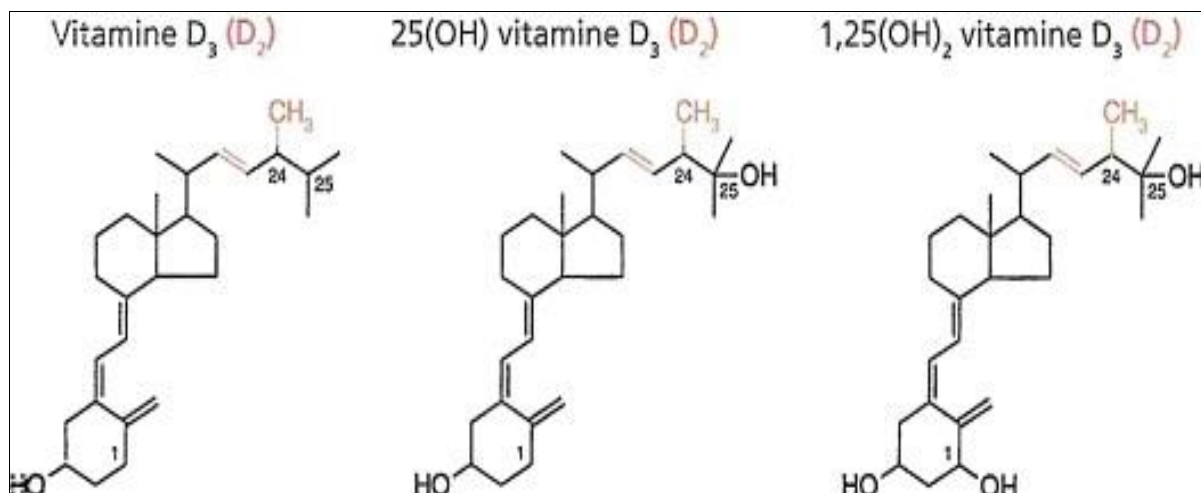


Figure 2 : Différences structurales entre vitamine D et ses métabolites
(Souberbielle, 2010).

Tout médicament empêchant l'absorption des graisses risque d'avoir un impact négatif sur l'absorption intestinale de la vitamine D, vue que celle-ci et ses métabolites sont des stéroïdes et sont donc liposolubles /hydrophobes. Ils doivent, par conséquent, être transportés par des protéines dans les milieux aqueux comme le plasma. Qu'elle soit synthétisée par la peau (Figure 3) ou apportée par l'alimentation ou la supplémentation, la vitamine D (D2 ou D3) est transportée dans le sang par une protéine porteuse de 458 acides aminés (DBP = Vitamine D Binding Protein (Speeckaert *et al.*, 2006).

L'affinité de DBP pour la 25(OH)D est plus importante que pour la vitamine D ou la 1,25 (OH)D. En effet, la DBP est en grand excès par rapport à la quantité totale de la vitamine

D si la concentration de DBP est fortement diminuée par exemple cas de syndrome néphrotique en raison d'une perte rénale de cette protéine ; ou augmentée comme pendant la grossesse. La concentration de vitamine D (et ses métabolites) libre semble rester constante.

Le rôle de la DBP, outre le transport plasmatique des métabolites de vitamine D, est d'augmenter la demi-vie et de moduler la distribution des métabolites de la vitamine D aux tissus (Speeckaert *et al*, 2006).

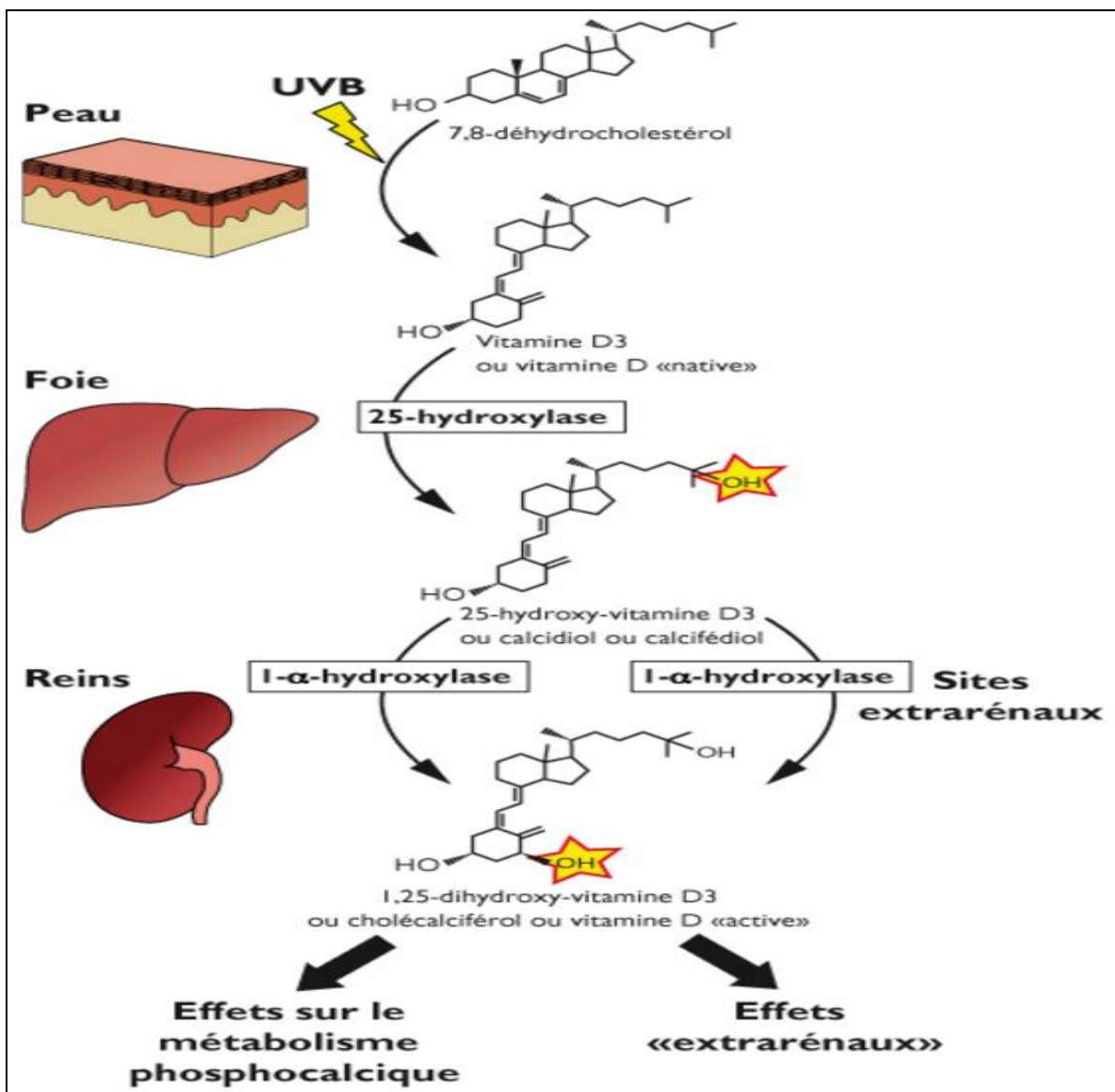


Figure 3 : Biosynthèse de la vitamine D (Ernandez *et al.*, 2012).

III.1. METABOLISME DE LA VITAMINE D DANS LE FOIE

Dans le foie (Figure 4), la vitamine D est hydroxylée sur le carbone 25 sous l'action d'une vitamine D-25-hydroxylase pour former la 25(OH)D. La nature exacte de cette 25-hydroxylase n'est pas totalement claire.

La vitamine D est liposoluble et une partie est stockée dans le tissu adipeux. Pour une quantité donnée de vitamine D ingérée ou synthétisée, ce stockage dans la graisse sera beaucoup plus important chez les obèses que chez les sujets maigres et la production hépatique de 25(OH)D sera, par conséquent, moindre (Holick, 2007).

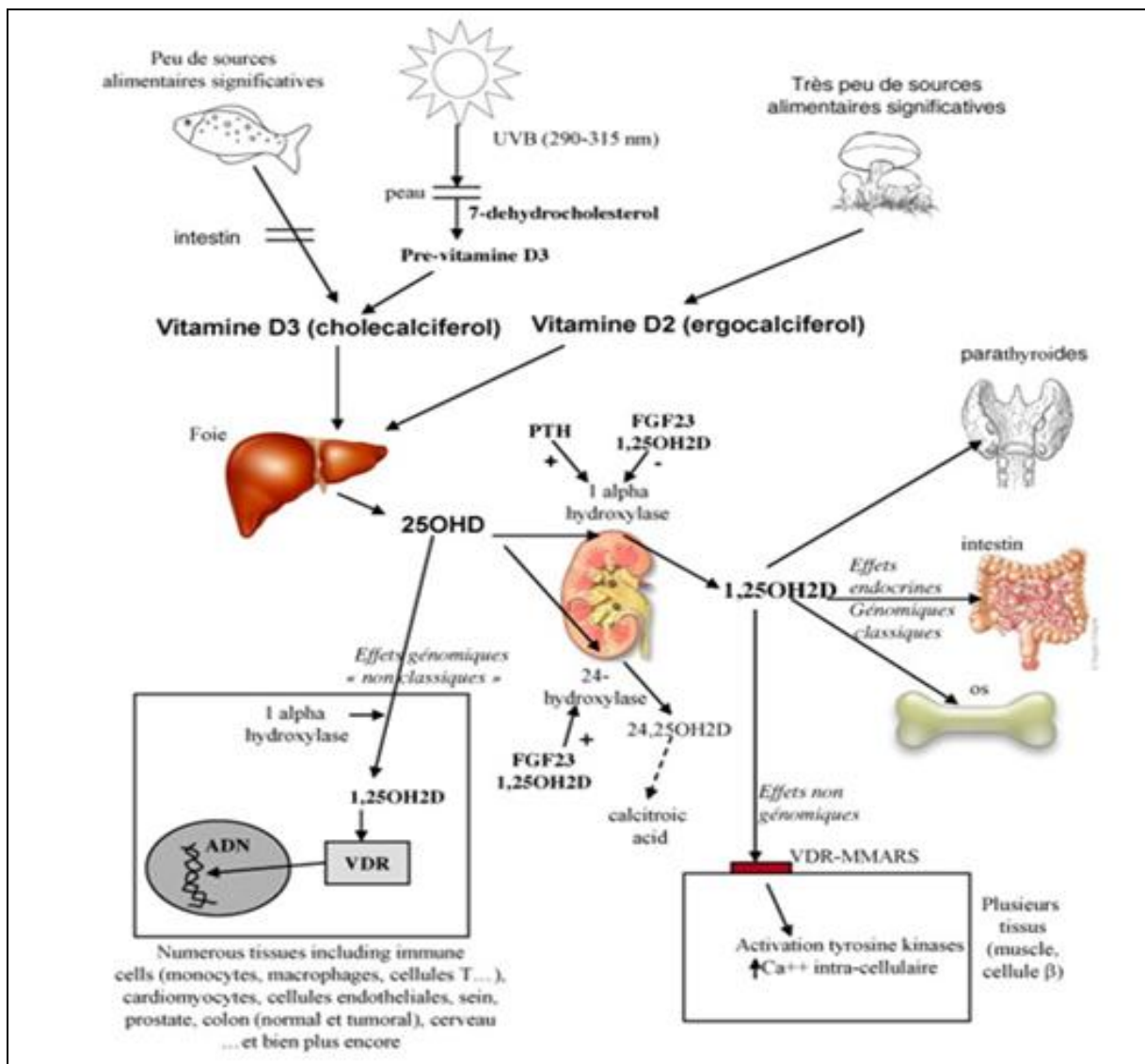


Figure 4 : Métabolisme de la vitamine D (Souberbielle, 2010).

III.2. METABOLISME RENAL DE LA VITAMINE D

La 25(OH)D, circule dans le sang, transportée par DBP, avec une demi vie de l'ordre de 3 à 4 semaines. Le complexe 25(OH)D-DBP est filtré par le glomérule rénal et subit une endocytose dans les bordures en brosse des cellules du tubule proximal (Figure 5). Cette endocytose est un processus actif, faisant intervenir un certain nombre de protéines. La mégaline et la cubiline, deux protéines exprimées sur la bordure en brosse de la cellule, attirent et lient le complexe 25(OH)D-DBP présent dans le filtrat glomérulaire (Nykjaera *et al.*, 1999).

La mégaline permet l'endocytose du complexe 25(OH)D-DBP. Après l'endocytose, le complexe est internalisé dans les lysosomes où la DBP est dégradée. La 25(OH)D ressort des lysosomes et est prise en charge par une autre protéine (IDBP3) qui va la diriger vers les mitochondries où elle va hydroxylée sur le carbone 1 sous l'action de la 1-alpha hydroxylase pour former la 1,25(OH)₂D. Cette dernière va sortir aussi de la cellule et se lier à la DBP libre présente dans le vaisseau sanguin qui va pouvoir la transporter jusqu'aux tissus cibles (Bimh *et al.*, 2000).

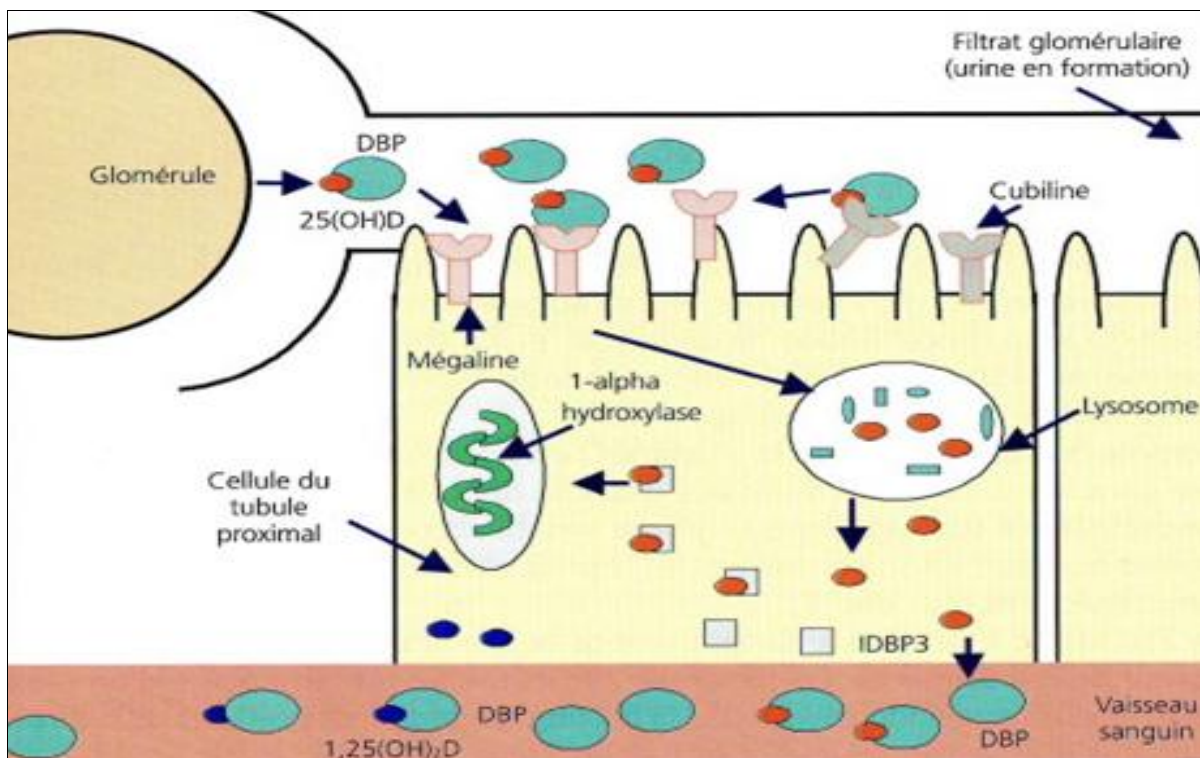


Figure 5 : Métabolisme rénal de la 25(OH)D (Soubrielle, 2010).

III.3. REGULATION DE LA SYNTHÈSE DE 1,25(OH)₂D

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

À l'opposé, la production de 1,25(OH)₂D est inhibée par le fibroblaste 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 (Briot *et al.*, 2004).

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 (Holick, 2009).

IV. ROLES PHYSIOLOGIQUES DE LA VITAMINE D

Le rôle le mieux connu de la vitamine D 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)₂ D induit la synthèse :

- de la protéine TRPV6 (potentiel canal cationique transient receptor, la famille V, membre 6) qui crée un canal calcique au niveau de la bordure en brosse apicale de l'anthérocyte, permettant l'entrée de calcium dans la cellule.
- des protéines qui transportent le calcium dans l'anthérocyte.
- Des protéines qui sont des co-transporteurs sodium-phosphate favorisant l'entrée du phosphate dans l'anthérocyte (White *et al.*, 1998 ; Hoenderop *et al.*, 2005).

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 du calcium et du 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) (Briot, 2009).

IV.1. METABOLISME OSSEUX, ACTION ENDOCRINE

La vitamine D joue un rôle majeur dans la croissance et la minéralisation osseuses. La 1,25(OH)₂D (calcitriol), la forme active de la vitamine D, intervient dans l'homéostasie phosphocalcique en agissant sur les parathyroïdes, les reins et l'intestin. La calcémie est ainsi contrôlée dans une fourchette très étroite. Une diminution de la calcémie stimule la production de parathormone laquelle stimule à son tour celle de calcitriol pour augmenter l'absorption intestinale de calcium.

À l'inverse, la 1,25(OH)₂D et la 25(OH)D exercent une action inhibitrice sur la sécrétion de parathormone. Un déficit profond en vitamine D peut ainsi entraîner les défauts de minéralisation osseuse observés dans le rachitisme et l'ostéomalacie (Briot *et al.*, 2009 ; Courbebaisse *et al.*, 2011).

IV.2. ROLE EXTRA-OSSEUX, ACTION AUTOCRINE OU PARACRINE

De nombreux tissus expriment à la fois des récepteurs à la vitamine D (VDR) et la 1- α -hydroxylase : la 25(OH)D peut ainsi être localement convertie en 1,25(OH)₂D (calcitriol) qui contrôle l'expression de plusieurs centaines de gènes. Cette action serait à la base des actions non phosphocalciques attribuées à la vitamine D : différenciation et prolifération cellulaires, apoptose, angiogénèse...etc.

Cependant, le rôle exact du calcitriol sur les différents tissus et ses conséquences physiologiques restent encore à préciser (Briot *et al.*, 2009 ; Cavalier, 2009 ; Courbebaisse *et al.*, 2011 ; Ross *et al.*, 2012).

V. VITAMINE D ET PATHOLOGIES CHRONIQUES

Les pathologies chroniques induisant une hypovitaminose D sont les suivantes (Schwalfenberg, 2007) :

- **Insuffisance rénale chronique** : entraînant un défaut de transformation de la 25(OH)D en 1,25(OH)₂D. Les insuffisances rénales modérées (clairance de la créatinine inférieure à 30 ml/min) entraînent une diminution des taux de vitamine D dans le sang. Les insuffisances rénales sévères et terminales (clairance à la créatinine inférieure à 30 ml/min) entraînent rapidement une hypocalcémie, une hyperparathyroïdie secondaire avec ostéopathies due à des taux de Calcitriol effondrés ;
- **Malabsorption** : maladie de Crohn, maladie cœliaque, maladie de Whipple, pancréatite chronique, mucoviscidose, obstruction biliaire. Le tube digestif servant à absorber les précurseurs de la vitamine D, toute pathologie digestive affectera les taux circulant de 25OHD ;
- **Chirurgie gastrique (By pass)** ;
- **Insuffisance hépatique entraînant** : un défaut d'hydroxylation de la vitamine D en position 25 ;
- **Syndrome néphrotique** : entraînant une fuite de 25(OH)D dans les urines ;
- **Séquelles de brûlures étendues** : diminution de la capacité de la peau à synthétiser la vitamine D₃ ;
- **Hyperparathyroïdie primaire** : qui engendre un excès de transformation de 25(OH)D en 1,25(OH)₂D, d'où une concentration basse de 25(OH)D ;
- **Granulomatoses, sarcoïdose, tuberculose et certains lymphomes** : via les macrophages qui transforment également excessivement la 25(OH)D en 1,25(OH)₂D ;
- **Hyperthyroïdie** : Responsable d'une accélération du métabolisme de la 25(OH)D ;
- **Maladies génétiques** : Défaut de production de la 1,25(OH)₂D (rachitisme pseudo-carentiel de type I) ; résistance à la 1,25(OH)₂D (rachitisme pseudo-carentiel de type II par mutation/délétion récepteur VDR) ; tubulopathies héréditaires avec perte urinaire de phosphates.

VI. DOSAGE DE LA VITAMINE D

VI.1 FORME DE DOSAGE DE LA VITAMINE D

Compte tenu de sa régulation (Holick *et al.*, 2006 ; World *et al.*, 2008 ; Ross *et al.*, 2011) le dosage de la 1,25(OH)₂D ne permet pas d'évaluer le statut vitaminique D (Tableau 1). Seul le dosage de la 25(OH)D permet d'apprécier les stocks de l'organisme (Sobrielle *et al.*, 2010 ; Rosen *et al.*, 2011 ; Ross *et al.*, 2011 ; Duhamel *et al.*, 2012).

Pour la supplémentation des patients, deux formes de vitamine D sont disponibles sur le marché, la vitamine D₂ et la vitamine D₃. Les kits de dosage doivent pouvoir doser les deux formes de vitamine D sous peine de minimiser les résultats d'un dosage effectué chez une personne supplémentée en vitamine D₂ (Benhamou *et al.*, 2010 ; Ross *et al.*, 2011).

VI.2. DIFFERENTS TECHNIQUES DE DOSAGE

Actuellement, deux types de méthodes sont utilisés, les méthodes immunologiques et les méthodes séparatives, non immunologiques.

- **Les méthodes immunologiques compétitives :** consistent en un système de dosage dans lequel la 25(OH)D et un traceur marqué entrent en compétition pour la reconnaissance par un anticorps anti 25(OH)D.
- **Les méthodes séparatives non immunologiques à détection directe :** reposent sur un processus de séparation physique des molécules à analyser, par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) ou spectrométrie de masse, détection directe.

Les marqueurs peuvent être des isotopes (méthodes radio immunologiques), des enzymes (méthodes enzymo-immunologiques) ou des molécules phosphorescentes (méthodes lumino-immunologiques) (Ingrand *et al.*, 2010 ; Hunty *et al.*, 2013).

Tableau 1 : Valeur sérique normale et valeur pathologique de la vitamine D
(Hollick, 2007).

Statut de la vitamine D	Concentration sérique de la vitamine D (ng/mL)
-------------------------	--

Déficit sévère	0-10
Déficit	10-20
Insuffisance	20-30
Vitamine D optimal	30-50
Supérieur à la normal	50-100
Vitamine D Toxique	>100

VII. CARENCE, INSUFFISANCE ET TOXICITE DE LA VITAMINE D

VI.1. RISQUES ASSOCIES (ETABLIS OU SUPPOSES) A UNE INSUFFISANCE EN VITAMINE D

VI.1.1. Risques osseux

- **Le rachitisme** : C'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. Le rachitisme carenciel peut survenir pour des concentrations sériques de 25(OH)D inférieures à 25 nmol/L (David *et al.*, 2007).
- **L'ostéomalacie** : C'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. Une concentration de 25(OH)D inférieure à
- 25 nmol/L est constamment retrouvée dans l'ostéomalacie carencielle (Lafage *et al.*, 2000).

- **L'ostéoporose et fractures osseuses** : La vitamine D joue un rôle important dans le métabolisme phosphocalcique. Lorsqu'il existe un déficit en vitamine D, l'absorption intestinale du calcium est diminuée et la tendance à l'hypocalcémie induite stimule la sécrétion de PTH favorisant le remodelage et la fragilité osseuse. A long terme, ces deux facteurs contribuent à l'installation d'une ostéoporose. Utilité clinique du dosage de la vitamine D (Holick, 2007).

VI.1.2. Risques extra-osseux

Sur la base d'études épidémiologiques et observationnelles, des liens entre des concentrations basses de vitamine D et des maladies non osseuses ont été suggérés. Les actions paracrine, autocrine et le rôle physiologique extra -osseux de la vitamine D confortent la plausibilité de ces associations. Toutefois, les valeurs de référence de 25(OH)D liées à l'apparition ou l'aggravation de pathologies non osseuses sont rarement précisées.

- **Cancer** : des enquêtes épidémiologiques ont également suggéré des associations possibles entre les Concentrations basses de vitamine D et la survenue de certains cancers (colorectal, prostate, pancréas, poumons...). L'effet anti tumoral serait lié au fait que la forme active de la vitamine D [1,25 (OH)₂D] régulerait des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Briot *et al.*, 2009 ; Cavalier *et al.*, 2009).
- **Système immunitaire** : Le VDR et la 1- α -hydroxylase sont présents dans les lymphocytes T et B. Il est supposé que la 1,25 (OH)₂D pourrait atténuer voire prévenir l'apparition de maladies telles que la sclérose en plaques, le lupus systémique, le diabète de type 1 et la polyarthrite rhumatoïde. Des études épidémiologiques seraient en faveur d'associations entre la fréquence de ces maladies auto-immunes et de faibles apports en vitamine D ou des concentrations sériques basses de 25(OH)D (Briot *et al.*, 2009 ; Cavalier *et al.*, 2009).
- **Risques cardiovasculaires** : des études observationnelles de Duhamel *et al.* (2012) suggèrent également une association entre la vitamine D et les risques

cardiovasculaires qui serait liée à l'effet de la vitamine D sur la pression artérielle.

VII.2. TOXICITE DE LA VITAMINE D

La vitamine D peut être toxique à hautes doses. Elle entraîne alors une hypercalcémie qui peut se caractériser notamment par une anorexie, des nausées, une polyurie, une constipation, de la fatigue, une perte de poids, des céphalées, une dépression, des calcifications rénales et vasculaires, de l'hypertension et une anémie. Lors d'intoxications sévères, l'hypercalcémie peut conduire à une insuffisance rénale irréversible et à une insuffisance cardiaque pouvant entraîner le coma et la mort (Rosen *et al.*, 2011).

L'intoxication à la vitamine D est rare mais peut être provoquée par une supplémentation quotidienne à des doses trop élevées (Hoclich *et al.*, 2006 ; Briot *et al.*, 2009 ; Audran *et al.*, 2011 ; Benhamou *et al.*, 2011 ; Ross *et al.*, 2011).

VIII. VITAMINE D EN PRATIQUE QUOTIDIENNE

La vitamine D peut être de forme D2 ou D3, la forme D2 (ergocalciférol) et la forme D3 (cholécalfiérol). En cas de supplément quotidien, on peut donner indifféremment les formes D2 ou D3, alors qu'en cas de supplément mensuel ou trimestriel, il faut préférer une forme D3 du fait de sa demi-vie plus longue. Ainsi, la vitamine D3 semble au moins 3 fois plus efficace que la vitamine D2, même si les 2 peuvent avoir un effet biologique (Misra *et al.*, 2008).

Pour un supplément médicamenteux, plusieurs formes de vitamine D sont disponibles sur le marché (Armas *et al.*, 2004).

I. MATERIEL

Dans cette étude, nous avons utilisé le sérum comme matériel biologique de 114 patients, dont 104 femmes et six hommes. Tous ces patients se sont présentés au laboratoire de Biochimie de l'Institut Pasteur Maroc à Casablanca, afin de réaliser un dosage de la vitamine D durant le mois d'Avril 2013.

II .METHODES

Afin de doser la vitamine D, nous avons utilisé, la méthode d'Elisa qui passe par le recueil du sang du patient dans un tube sec jusqu'à le mettre dans l'appareil Bio-rad PhD. C'est un appareil qui utilise la technique d'Elisa pour le dosage des vitamines A, B, C, D et E. Puisque la vitamine D est plus demandée par le médecin vue son importance pour la croissance et la santé osseuse, l'Institut Pasteur s'intéresse essentiellement au dosage de cette vitamine.

La technique d'Elisa (Annexe 1) consiste en deux grandes étapes : la préparation préalable du sérum et le passage à l'appareil de dosage Bio-rad PhD.

II.1. PREPARATION PREALABLE DU SERUM

II.1.1. Prélèvement sanguin

On récupère (prélèvement) le sang de chaque patient dans des tubes rouges secs (Figure 6) qui ne contiennent pas d'anticoagulant. En effet, dans le laboratoire de Biochimie, toutes les analyses (Urée, Créatinine, Calcium, Magnésium, Phosphore, Transaminases, Phosphatases alcalines, LDH, Fer, vitamine D) se font dans ce type de tubes, sauf l'analyse de l'hémoglobine glyquée, qui se fait dans des tubes qui contiennent l'EDTA (anticoagulant).

Chaque tube a son propre code barre qui porte le nom et le prénom du patient, la date, la référence et le type de l'analyse.

II.1.2. Centrifugation des tubes

Pour récupérer le sérum, on centrifuge le sang à une vitesse 1000 tours par minute, pendant 10 minutes grâce à la centrifugeuse sigma 3-18k (Annexe 2a).

Les tubes sont disposés dans le rotor de ce dernier de façon à éviter tout déséquilibre. Ainsi, le poids des tubes qui se font face dans le rotor doit être identique.



Figure 6 : Tubes rouges secs contenant le sang.

II.1.3. Récupération et classement du sérum

Après centrifugation des tubes, on prend une quantité de sérum de chaque tube avec une micropipette et on les aliquote dans d'autres tubes secs différents des premiers et qui portent des étiquettes qui contiennent la date, la référence et le nom de l'analyse. Ces tubes sont, ensuite, congelés à température de -20°C afin de les conserver et éviter ainsi la dégradation de la vitamine D. Les congélations et décongélations répétées sont déconseillées.

On répète les mêmes étapes chaque jour, sur d'autres échantillons collectés jusqu'à ce qu'on obtient un nombre total de tube (80 à 88 tubes).

Pour homogénéiser le sérum, on mélange au vortex (Annexe 2b) les tubes, pendant 5 secondes avant de les disposer et les classer dans la plaque spécifique de l'appareil Bio-rad PhD (Figure 7).

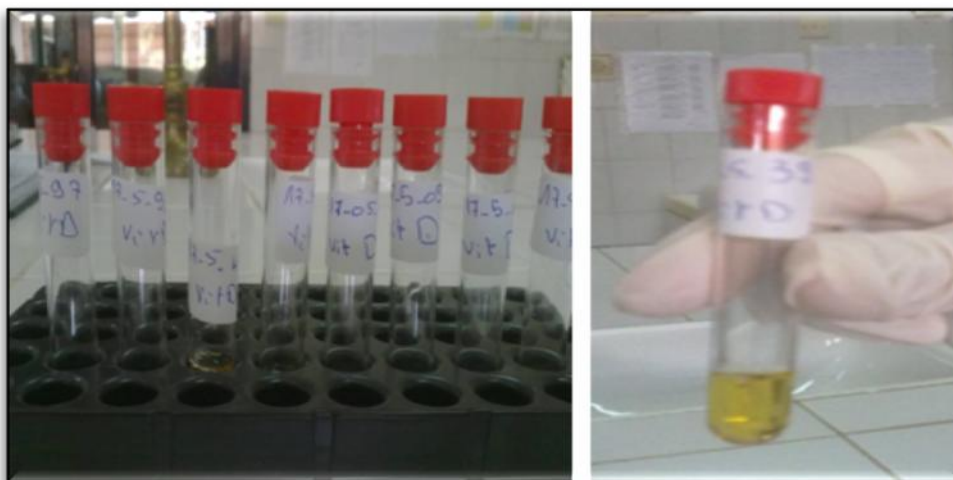


Figure 7: Classement des tubes et récupération du sérum.

II 2 APPAREIL DE DOSAGE BIO-RAD PH D

La trousse IDS 25(OH)D est une technique immuno-enzymatique destinée au dosage quantitatif de la 25(OH)D (D2/D3) et d'autres métabolites hydroxylés présents dans le sérum ou le plasma humain.

Ce dosage direct ne nécessite pas d'étapes de précipitation ou de centrifugation. Il est automatisable sur les plateformes ouvertes Elisa (Figure 8). Les laboratoires de plus petite taille peuvent utiliser la trousse sans automate. Dans tous les cas, ceci évite l'envoi d'échantillons à un centre de dosage et réduit, ainsi, le coût et les délais d'obtention de résultats.

L'anticorps utilisé est un anticorps monoclonal, c'est à dire, un anticorps spécifique pour un seul antigène qui est la vitamine D.



Figure 8 : Appareil Bio-rad PhD de dosage de la vitamine D.

II.2.1. Utilisation

Pour un usage diagnostique in vitro, la trousse IDS 1,25(OH)₂D est un système de dosage complet servant à la purification de la 1,25(OH)₂D du sérum ou du plasma humain par immunoextraction, puis à la détermination quantitative au moyen d'un dosage immuno-enzymatique.

Le dosage obtenu permet, conjointement à d'autres données cliniques et de laboratoire, au médecin d'évaluer un déficit éventuel en 1,25(OH)₂D associé à des maladies rénales chez l'adulte (Holick, 2008).

II.2.2. Principe général de la technique Elisa

La technique Elisa (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) est une technique immuno-enzymatique de détection, qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps, grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps (Figure 9).

II.2.3 Principe du test d'Élisa trousse IDS 25(OH)D

Le test Elisa est conçu pour la détermination in-vitro de la 25(OH)D dans des échantillons de sérum ou de plasma humains.

Dans la première étape d'analyse, les étalons (calibrant) et les échantillons des patients sont dilués à la biotine, et ajoutés à un puits de microplaques contenant des anticorps monoclonaux anti-25(OH)D.

Une incubation à une température entre 18°C et 25°C est ensuite effectuée, au cours de cette incubation, une quantité inconnue de la 25(OH)D dans l'échantillon du patient et une quantité connue de la biotine entrent en compétition pour les sites de fixation des anticorps dans les puits de la microplaque. La 25(OH)D non liée est éliminée par lavage.

Pour la détection complexe anticorps-antigène, une seconde incubation est réalisée à l'aide de streptavidine marquée à la peroxydase (enzyme de couleur bleu).

Dans une troisième incubation utilisant le substrat de la peroxydase tétra-méthylbenzidine (TMB) (substrat), la peroxydase liée favorise la couleur de la réaction. L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la concentration en 25(OH)D dans l'échantillon.

Les doses pour les échantillons peuvent être calculées directement à partir d'une courbe standard.

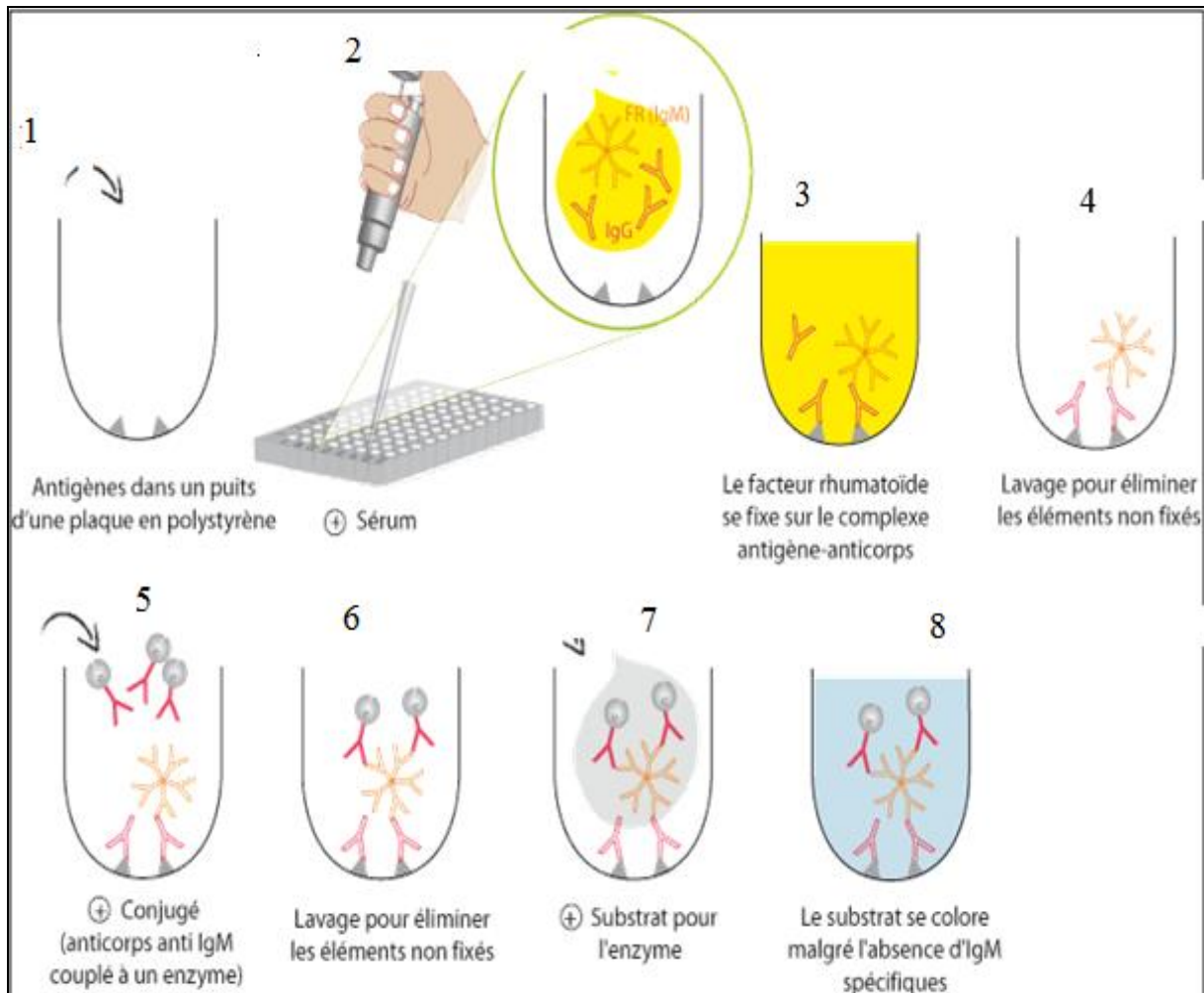


Figure 9 : Schéma représentant le principe général d'Élisa.

II.2.4. Préparation des réactifs de l'appareil Bio-rad PhD)

L'appareil nécessite, des calibrants, des contrôles, une solution de lavage et une solution de la biotine pour faire le dosage automatiquement de la vitamine D.

a. Calibrants et contrôles

Les contrôles et les calibrants sont constitués de sérum humain tamponné contenant de la 25(OH)D et de l'acide de sodium (Figure 10). La valeur exacte de 25(OH)D pour chaque calibrant est imprimée sur l'étiquette. Ils sont fournis lyophilisés, prêt à l'emploi.

Grâce à ces calibrants et ces contrôles, l'appareil peut construire la courbe d'étalonnage.

On prend avec une micropipette 1 ml de chaque calibrant, et on le met dans des tubes numérotés.

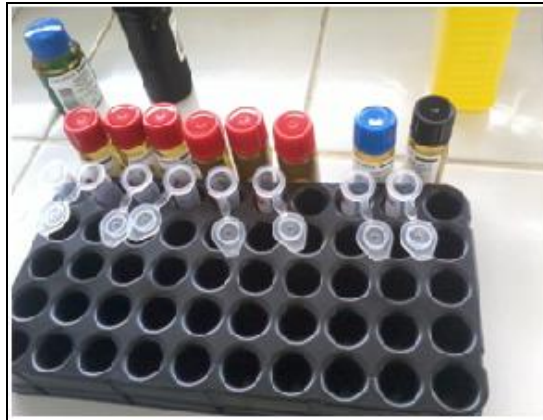


Figure 10 : Calibrants et contrôles.

b. Solution de 25(OH)D biotine

La biotine est un tampon qui a le même caractère, physiologique que le sérum, il est concentré de 100 fois, fourni lyophilisé, prêt à l'emploi aussi, on mélange bien le flacon avant de le diluer. Ensuite, on prend 1 mL biotine concentré auquel on ajoute 99 mL de tampon.

c. Solution de lavage

On mélange 100 mL de tampon avec 900 mL d'eau distillé afin de préparer 1000 mL de solution de lavage.

Tous les autres réactifs (enzyme, substrat d'enzyme) sont fournis prêts à l'emploi. Ces réactifs sont ensuite, amenés à une température ambiante avant l'utilisation. Ils doivent être homogénéisés en retournant plusieurs fois le flacon avant usage.

II.2.5. Disposition des échantillons et des réactif dans l'appareil Bio-rad ph D

L'appareil Bio-Rad PhD contient quatre portoirs :

- Un pour le classement des réactifs (Figure 11) ;
- Un pour le classement des échantillons des patients (Figure 12) ;
- Un pour le classement des calibrants ;
- Une plaque d'Elisa avec des anticorps monoclonaux spécifiques pour la 25(OH)D préalablement fixée.



Figure 11 : Portoir pour classement des réactifs.



Figure 12 : Portoir pour classement des échantillons des patients.

II.2.6. Etapes effectuées par l'appareil de dosage Bio-Rad PhD

Après la disposition des réactifs déjà préparés, l'appareil peut faire sa propre méthode d'élution, d'ajout d'enzyme, d'ajout de substrat d'enzyme, d'incubation ou de lavage, ...etc selon le schéma suivant (Figure 13).

- a) **Dilution** : l'appareil effectue une dilution de $1/10^{\text{ème}}$ pour chaque échantillon et chaque calibrant. Il prend $20\mu\text{L}$ de chaque calibrant et $0,5\ \mu\text{L}$ de la biotine

(tampon). Il fait la même chose pour les échantillons. Ensuite, il les dispose (les calibrants et les échantillons) dans la plaque Elisa.

- b) Première incubation :** l'appareil effectue une incubation pendant 2h pour permettre la fixation anticorps -antigène (Figure 14b) sur les anticorps préalablement fixes sur la plaque (Figure 14a).
- c) Premiers lavage :** l'appareil effectue trois lavages. 100µL de solutions de lavage est utilisé pour chaque lavage qui est effectué pour éliminer l'excès d'antigène non fixé sur la plaque.
- d) Solution d'enzyme :** l'appareil ajoute 100 µL d'enzyme streptavidine marquée à la peroxydase (Figure14c).
- e) Seconde Incubation :** pendant 30 min pour permettre la fixation d'enzyme sur le complexe antigène anticorps.
- f) Seconds lavages :** l'appareil effectue trois lavages, il prend 100 µL de la solution de lavage pour chaque lavage effectué pour éliminer cette fois tout l'enzyme non fixée sur le complexe antigène –anticorps.
- g) Révélation du complexe immunitaire (antigène –anticorps) :** pour révéler et détecter le complexe antigène-anticorps l'appareil utilise le substrat d'enzyme, la peroxydase tétra-méthyl-benzidine (TMB) (Figure 14d).
- h) Troisième incubation :** réalisée pendant 15 min, pour permettre la fixation du complexe antigène, anticorps, enzyme, substrat d'enzyme.
- i) Arrêt des réactions :** réalisée pour arrêter les réactions, l'appareil utilise le Hcl comme solution d'arrêt (solution stop).



Figure 13 : Etapes effectuées par l'appareil de dosage Bio-rad PhD.

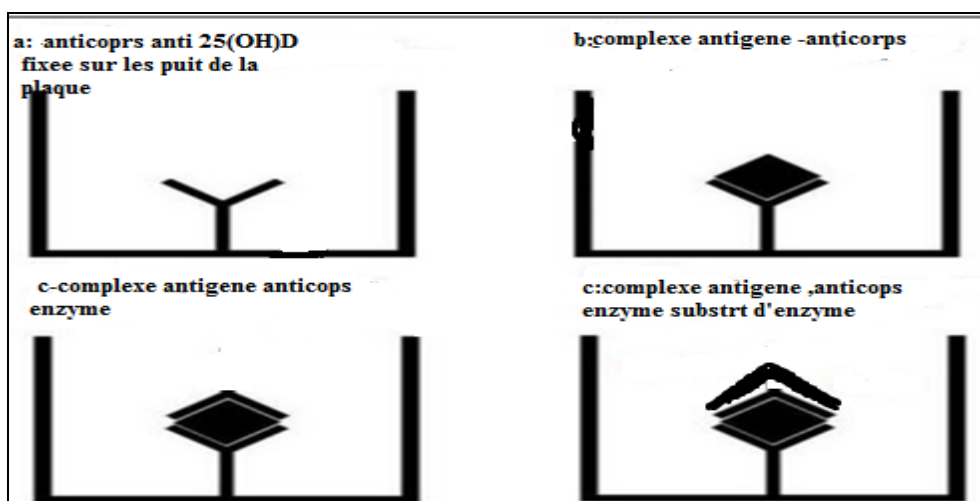


Figure 14 : Schéma représentatif complexe (antigène-anticorps-enzyme-substrat d'enzyme) formé dans les puits de la plaque Elisa.

II.2.7. Traitement des résultats

La courbe standard à partir de laquelle les concentrations de 25(OH)D dans les échantillons de sérum peuvent être prises, et s'obtient par le traçage des points des valeurs d'extinction mesurées par l'étalonnage des 6 calibrants de sérum contre les unités correspondantes (linéaire/log). On utilise le traçage pour le calcul de la courbe standard par ordinateur. Le graphique suivant est un exemple typique d'une courbe d'étalonnage.

En effet, les résultats peuvent être exprimés en nano-gramme/ml ou en nano mol/ml.

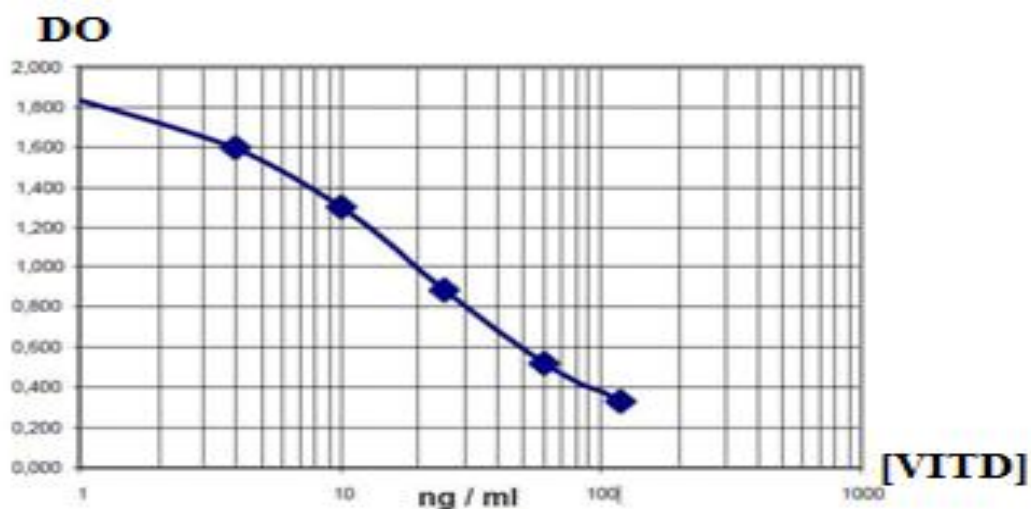


Figure 15 : Exemple typique d'une courbe d'étalonnage.

Tableau 2 : Valeur de la vitamine D en ng/mL et nm/mL.

Valeur de la vitamine D (ng/ml)	Valeur de la vitamine D (nmol/ml)
10	25
20	50
30	75
40	100
50	125
60	150
70	175
80	200
90	225
100	250

I. REPARTITION DU NOMBRE DE PATIENTS EXAMINANT LE DOSAGE DE LA VITAMINE D SELON LE SEXE

Le dosage de la vitamine D porte sur 114 patients dont 104 femmes et six hommes. On constate que le nombre de patients féminins examinant le dosage de la vitamine D est beaucoup plus important (95%) que les patients hommes (5%) ayant consulté le laboratoire de Biochimie de l'Institut Pasteurs du Maroc le mois d'avril 2013.

De ce fait, et tout le long de cette partie des résultats, nous nous intéressons uniquement à la population féminine pour faire les différentes analyses. La population totale montre un effectif négligeable des hommes (Figure 16)

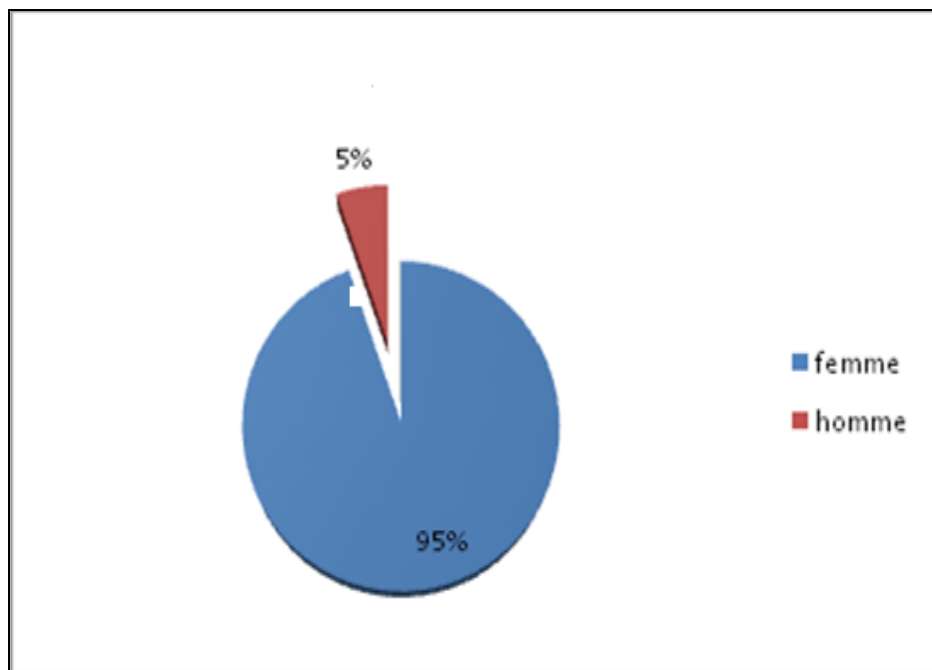


Figure 16 : Répartition des patients dosant la Vitamine D selon le sexe

II REPARTITION DES PATIENTS SELON LA VALEUR SERIQUE DE LA VITAMINE D

Le Tableau 3 donnant la présente étude le nombre de femmes en fonction de la valeur sérique de la vitamine D en ng/mL et nmol/mL montre que :

- Le nombre des femmes qui ont une valeur sérique de vitamine D inférieure à 10 ng/ml (déficit sévère) représente 15% de la population étudiée.
- Le nombre de patient qui ont une valeur entre 10 et 20 ng/mL (déficit) est très important représente 61% de la population étudiée
- Les femmes qui ont une valeur sérique de vitamine D entre 20 et 30 ng/mL(insuffisance) représente 11% de la population étudiée
- Le nombre des femmes qui ont une valeur sérique de la vitamine D entre 30 et 50 ng/mL(valeur normale) représente 9% de la population étudié
- Les femmes qui ont une valeur sérique de vitamine D entre 50 et 100 ng/mL(supérieure a la normale) représente 0,96% de la population étudier les femmes qui ont une valeur supérieure ou égale a 100 ng/mL(toxique)

Tableau 3: Répartition des femmes selon la valeur sérique de la Vit D.

Statut de la vitamine D	Valeur sérique Vit D		Effectif	Pourcentage
	En(ng/mL)	en (nmol/mL)		
Déficit sévère	<10	<25	16	15%
Déficit	[10-20]	[25-50]	64	61%
Insuffisance	[20-30]	[50-75]	12	11%
Vitamine D optimal(normal)	[30-50]	[75-125]	10	9%
Supérieur a la normale	[50-100]	[125-250]	1	0,96%
Vitamine D toxique	≥100	≥250	1	0,96%

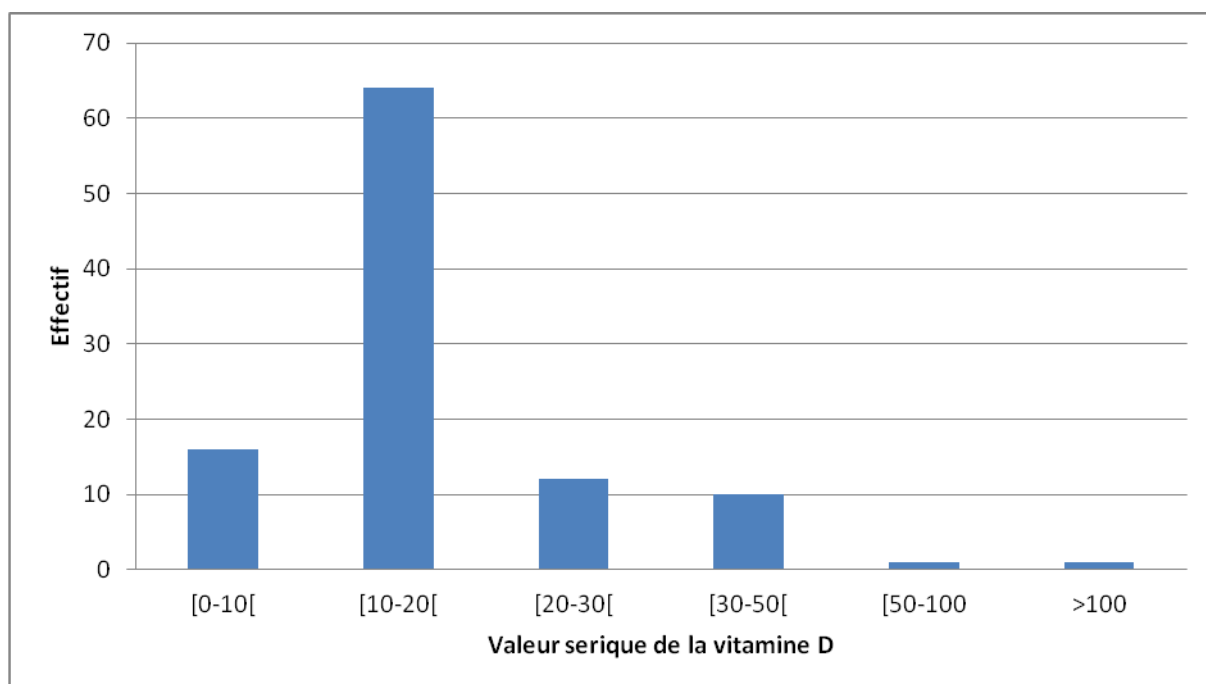


Figure 17: Répartition des patientes selon la valeur sérique de la vitamine D.

D'après ces résultats, on constate qu'on assiste à une hypovitaminose D (diminution de la valeur sérique de la vitamine D). Cette hypothèse est en accord avec les résultats des études de Holick, (2006); Cavalier et al; ENMS(2007), qui montrent que la prévalence du déficit en vitamine D varie selon les seuils retenus pour définir la carence ou l'insuffisance. Toutefois, quel que soit le seuil retenu, l'insuffisance en vitamine D serait largement répandue à travers le monde.

Nos résultats concordent aussi avec les résultats des études de : Holick,(2007); Van *et al*; Mithal *et al*, (2009) qui indiquent respectivement que :

- Le déficit en vitamine D est fréquent et sous-diagnostiqué. Au niveau mondial, on estime qu'un milliard de personnes auraient un tel déficit
- Dans les pays occidentaux, plus de 40% de la population de plus de 50 ans présenteraient un déficit
- L'hypovitaminose D des populations de six régions du monde (Asie, Europe, Moyen-Orient, Amérique du Nord, Amérique du Sud et Océanie), 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 d'avantage les populations de l'Asie du Sud et du Moyen-Orient.

Une étude de l'ENMS (2007) sur une population française avec des seuils de définition de l'insuffisance en vitamine D différents ,montre que

- 79 % des hommes et 81 % des femmes avaient une concentration sérique en 25(OH)D inférieure à 75 nmol/L (seuil optimal).
- Pour 36 % des hommes et 49 % des femmes elle était inférieure à 50 nmol/L(déficit modéré)
- pour 4 % des hommes et 6 % des femmes cette teneur est inférieure à 25 nmol/L(déficit sévère).

III REPARTITIONS DES FEMMES EXAMINANT LE DOSAGE DE LA VITAMINE D SELON L'AGE

Le graphe montre que 69% des femmes qui se préneste au laboratoire sont des femmes âgées de plus de 50 ans et 31% des femmes âgée de moins 50 ans

Tableau 4 :Répartitions des femmes examinant le dosage de la vitamine D selon l'âge.

Catégories	Âge des femmes	Effectif	Résultat en %
1	≥50 ans	72	69
2	<50ans	32	31

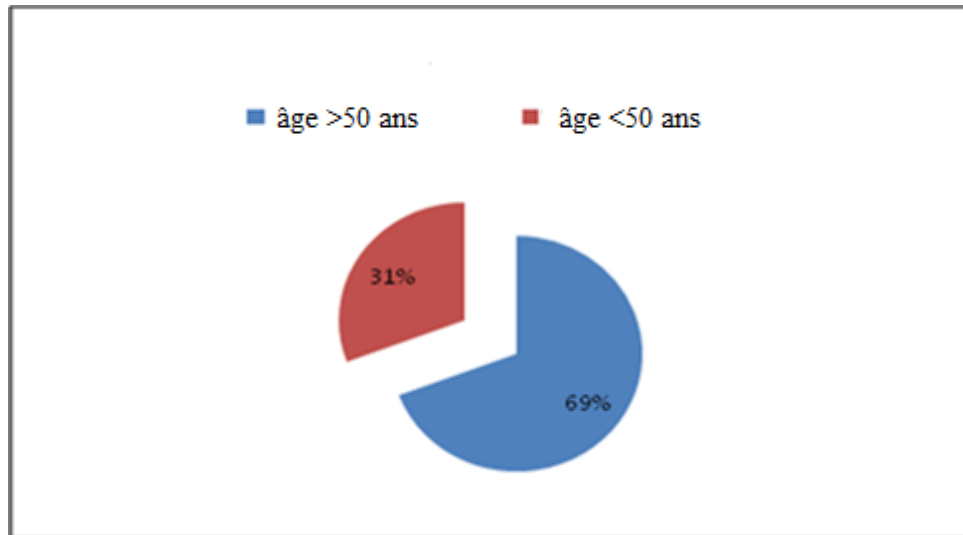


Figure 18: Répartitions des femmes examinant le dosage de la vitamine D selon l'âge.

Le nombre des femmes âgées de plus de 50 ans qui se présentent au laboratoire de Biochimie Institut Pasteur Maroc est beaucoup plus important (69%) par rapport aux femmes âgées de moins de 50 ans (31%)

La première catégorie (femmes âgées de plus de 50 ans) présentant une valeur sérique de la vitamine D inférieure à la normale ceci pourra être due au problème lié à la ménopause chez les femmes âgées. En effet, cette période se manifeste par des ostéoporoses et des troubles hormonaux graves.

En effet l'ostéoporose est fréquente chez les femmes ménopausées, Elle est due à une modification de la trame osseuse liée aux changements hormonaux de la ménopause. La diminution des apports en [calcium \(Ca\) et vitamine D](#) sont également essentiels : le calcium permet une bonne minéralisation de l'os, la vitamine D est nécessaire à l'assimilation du calcium. Or, des études récentes ont mis en évidence une carence importante en Ca et Vitamine D, en particulier chez les françaises (Reginster, 2008).

IV.REPARTITION DES FEMMES AGEES DE PLUS DE 50

ANS SELON LA VALEUR SERIQUE DE LA VITAMINE D

Le Tableau 5 donnant la présente étude de la 2^{ème} (femme âgée de plus de 50 ans) en fonction de la valeur sérique de la vitamine D en ng/ml et nmol/mL montre que :

- Le nombre des femmes qui ont une valeur sérique de la vitamine D inférieure à 10ng/ml (déficit sévère) représente 16% de la population étudiée
- Le nombre de patient qui ont une valeur entre 10et 20ng/mL (déficit) est très important représente 62% de la population étudiée
- Les femmes qui ont une valeur sérique de la vitamine D entre 20et 30ng/ml(insuffisance) représente 11% de la population étudiée
- Le nombre des femmes qui ont une valeur sérique de la vitamine D entre 30 et 50 ng/ml (valeur normale) représente 1% de la population étudiée
- Les femmes qui ont une valeur sérique de la vitamine D entre 50et 100 ng/mL(supérieure à la normale) représente 5% de la population étudiée
- Les femmes qui ont une valeur supérieure ou égale à 100ng/mL (toxique) représente 2% de la population étudiée .

Tableau 5 : Répartition des femmes âgées de plus de 50 ans selon la valeur sérique de la Vit D.

Statut de la vitamine D	Valeur sérique de la Vit D		Effectif	Pourcentage
	En ng/ml	En nmol/ml		
Déficit sévère	[0-10]	[0-25]	12	16 %
Déficit	[10-20]	[25-50]	45	62 %
Insuffisance	[20-30]	[50-75]	8	11 %

Vitamine D optimal	[30-50]	[75-125]	1	1 %
Supérieur a la normale	[50-100]	[125-250]	4	5 %
Toxique	≥100	≥250	2	2 %

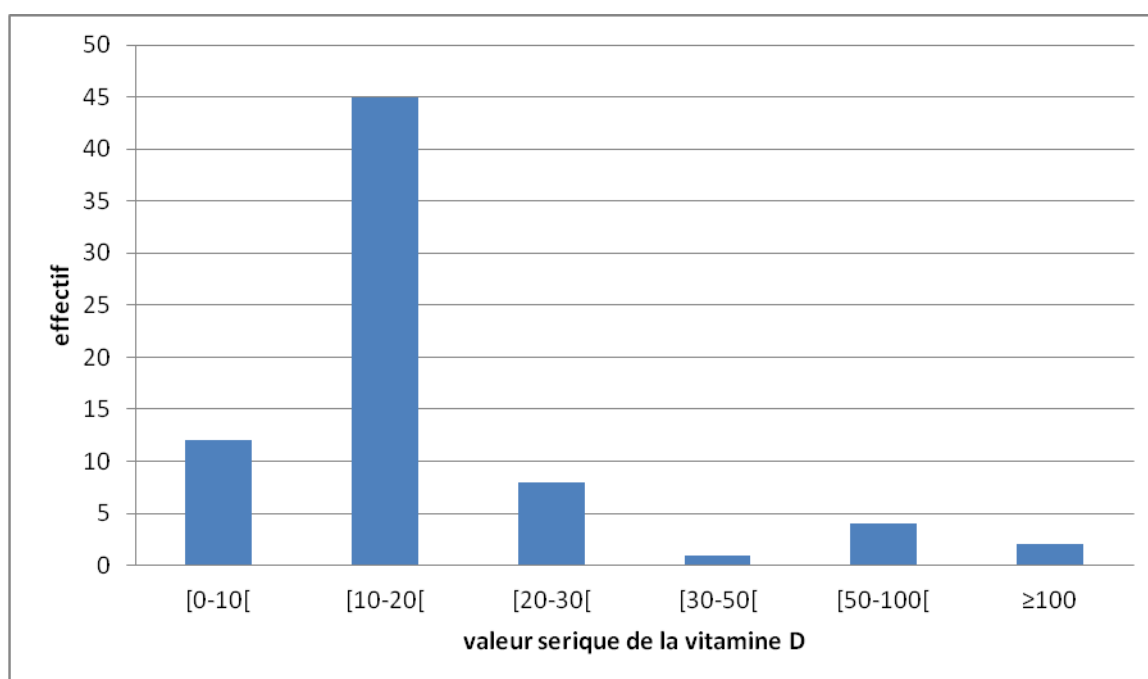


Figure 19: Répartition des femmes âgées de plus de 50 ans selon la valeur sérique de la Vitamine D.

Ces résultats concordent avec ceux de l'étude de Bruyère *et al* (2006); Reginster, (2008); Lips *et al*, (2001) qui indiquent respectivement que

- La population européenne 90% des françaises ménopausées manquent de vitamine D, cette étude publiée en 2006 portant sur 8532 femmes ménopausées dans toute l'Europe laisse apparaître que les françaises manquent gravement de vitamine D. De toutes les européennes, les françaises sont même les plus concernées avec un taux moyen de vitamine D de 51,5 (nmo/L)

- Le taux sanguin de vitamine D, sur l'ensemble des femmes étudiées, et en moyenne 61 nmol/l. Il est insuffisant chez 79,6 % d'entre elles, (si l'on prend comme seuil de carence 80 nmol/l,) et chez 32,1 %, (si l'on se base sur un seuil de 50 nmol/L.)
- Les déficit sévère (25(OH)D<10 est fréquent dans le monde chez les femmes ménopausées ostéoporotiques de 65 ans en moyenne

La vitamine D est une vitamine pro-hormone liposoluble et thermostable, sensible à la lumière, aux acides, aux alcalins et à l'oxydation de l'air. Elle est nécessaire à la fixation du calcium sur les os. De ce fait, elle est donc essentielle à notre santé osseuse.

La meilleure source de vitamine D se trouve dans notre peau, qui est capable d'en produire sous l'influence du rayonnement solaire.

Plusieurs facteurs comme l'âge, la saison, l'activité physiologique, les habitudes vestimentaires, alimentaires...etc., influencent sur la répartition de la vitamine D. Soit en augmentant ou en diminuant la valeur sérique de cette dernière.

Pour doser la vitamine D, il existe deux types de méthodes qui sont utilisés, les méthodes immunologiques et non immunologiques à détection directe.

Dans le laboratoire de la Biochimie de l'Institut Pasteur, nous avons utilisé la méthode immunologique basée sur la réaction antigène –anticorps. Ce dosage permet au médecin, conjointement à d'autres données cliniques et de laboratoire, d'évaluer un déficit éventuel en 1,25(OH)₂D associé à des pathologies chroniques.

La présente étude révèle plusieurs résultats :

Le nombre de patientes féminines qui se présentent au laboratoire de Biochimie de l'Institut Pasteur Maroc pour effectuer le dosage, est beaucoup plus important (95%) que l'effectif des hommes (5%).

La présence de l'hypovitaminose D : la valeur sérique de la vitamine D étant baissée par rapport à sa valeur normale (30-50ng/ml). Ces résultats sont en accord avec ceux de Holick (2006), de Cavalier *et al.* (2009) et de l'ENMS (2007) qui montrent une hypovitaminose largement répandue dans le monde.

Les femmes âgées de plus de 50 ans se présentent beaucoup plus au laboratoire, de Biochimie de l'Institut Pasteur pour le dosage de la vitamine D, que les femmes âgées de moins de 50 ans.

La plupart (62%) des femmes âgées de plus de 50 ans ont un déficit en vitamine D. 5% de ces femmes ont une valeur sérique normale de la vitamine D. Ces résultats pourront être dues aux symptômes liés à la ménopause chez les femmes âgées de 50 ans. Cette période est manifestée par des troubles hormonaux et des ostéoporoses.

Ainsi, plusieurs pathologies peuvent être à l'origine de cette hypovitaminose comme le diabète, les maladies rénales, l'hyper-parathyroïdie ou l'insuffisance hépatique.

- Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (2009)** - Recommandations à destination des biologistes concernant la spécificité des dosages de vitamine D. http://www.afssaps.fr/var/afssaps_site/storage/original/application/b8d261e1e6faae42c542393bc104224.pdf.
- Audran M. et K. Briot (2010)** - Analyse critique du déficit en vitamine D. *Revue du Rhumatisme* ; 77 : 139-143.
- Aust J. (2005)** - Australian and New Zealand Bone and Mineral Society, Endocrine Society of Australia, Osteoporosis A. Vitamin D and adult bone health in Australia and New Zealand: a position statement. *Med. J. Aust.* ; 182 (6) : 281-285.
- Bim H., H. Vorum et P.J. Vernoust (2000)** - Receptor-associated protein is important for normal processing of mégaline in kidney proximal tubules. *J. Am. Soc. Nephrol.* ; 11: 191-202.
- Briot K., M. Audran, B. Cortet, P. Fardellone, C. Marcelli et P. Orcel (2009)** - Vitamine D : effet osseux et extra-osseux ; recommandations de bon usage. *Presse Med.* ; 38 (1) : 43-54.
- Bruyère O., O. Malaise, A. Neuprez, J.J.Y. Collette (2006)** - Prévalence élevée de la carence en vitamine D chez la femme ménopausée en Europe et principalement en France : analyse d'une cohorte de 8532 sujets. *Revue du rhumatisme* ; 29: 21-30
- Cavalier E. et J.C. Souberbielle (2009)** - An update on the classical and non classical effects on vitamin D; evaluation of the patient's status. *Médecine Nucléaire.*; 33 : 7-16.
- Courbebaisse M. et J.C. Souberbielle (2011)** - Equilibre phosphocalcique : régulation et explorations. *Nephrol. Ther.* ; 7 (2) : 118-138.
- David L., B. Salle, (2007)** - Rachitismes Pédiatrie-Maladies infectieuses. *Encycl. Méd. Chir.* ; 4-008-A-10.
- Everett P.C. (Année)** - The prevalence of vitamin D deficiency and insufficiency in a haematology- oncology clinic. *Clinical Journal of Oncology Nursing* ; 12 (1) : 33-35.
- Hoenderop J., B. Nilius et R. Bindels (2005)** - Calcium absorption across epithelia *Physiology Rev.* ; 85 : 373-422.
- Holick M.F. (2006)** - High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc.* 2006 Mar ; 81 (3): 353-73.
- Holick M.F. (2007).**- Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* ; 357 (3) : 266-281.

- Holick M.F. (2009).**- Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Ann. Epidemiol.* ; 19 (2) : 73-78.
- Holick M.F., Chen T.C. et Z. Lu (2007).**- Vitamine and skin physiology : a D-lightful story. *J. bone Miner. Res.* 2 (suppl 2) : 28-33.
- Holick M.F., N.C. Binkley, H.A. Bischoff-Ferrari, C.M. Gordon, D.A. Hanley et J. Clin (2011).**- Endocrine Society,.Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *Endocrinol. Metab.*; 96 (7) : 1911-1930.
- Hunty A., A.M. Wallace, S. Gibson, H. Viljakainen, C. Lamberg-Allardt et M. Ashwell. (2013)** - UK Food Standards Agency Workshop Consensus Report: the choice of method for measuring 25-hydroxyvitamin D to estimate vitamin D status for the UK National Diet.
- Ingrand J. (2012)** - La spectrométrie de masse et ses principales applications en biologie médicale. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* ; 27 (2) : 47-53.
- Jones G. (2007)** - Expanding role for vitamin D in chronic kidney disease : Importance of blood 25-OH-D levels and extra-renal 1alpha-hydroxylase in the classical and nonclassical actions of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3). *Semin. Dial.* ; 20 : 316-324.
- Lafage-Proust M.H. (2000)** - Ostéomalacies. Appareil Locomoteur. *Encycl. Méd. Chir.*; 14-024-B-10.
- Lips P., T. Duong et A. Olesksik (2001)** - A global study of vitamine D statut and parathroïde function in post menopause women with osteoporosis :base –line data fomt the multiple outcomes of raloxifene eavalution clinical trial. *J. clin. Endocrinal. metabolisme* ; 86 : 1212-1221.
- Lyon (2008)** - World Health Organization, International Agency For Research On Cancer.Vitamin D and Cancer. www.iarc.fr/en/publications/pdfsonline/wrk/wrk5/Report_VitD.pdf.
- Mithal A., D.A. Wahl, J.P. Bonjour, P. Burckhardt, B. Wson-Hughes et J.A. Eisman (2009)** - opac.invs.sante.fr/docnum.phpexplnum_id=3
- Nykjaer A., D. Dragun et D. Walther (1999)** - An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3. *Cell.* ; 96 : 507-515.
- Reginster (2008)** - Reginster tire la sonnette d'alarme ! Entretien avec le Pr Jean-Yves Reginster (Département de la Santé Publique, Epidémiologie et Economie de la Santé. Université de Liège, Belgique). 17p.

- Rockville (2009)** - Agency for Healthcare Research and Quality. Vitamin D and calcium: A systematic. *ohealthoutcomes.: AHRQ.*
- Rosen C.J. (2011)** - Clinical practice. Vitamin D insufficiency. 364 (3) : 248-254.
- Ross A.C., C.L. Taylor, A.L. Yaktine et H.B. Del Valle (2011)** - Institute of Medicine, Dietary reference intakes for calcium and vitamin D. Washington: National Academics Press.
- Ross A.C., J.E. Manson, S.A. Abrams, J.F. Aloia, P.M. Brannon et S.K. Clinton (2011)** - The report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J. Clin. Endocrinol. Metabolisme* ; 96 (1) : 53-58.
- Salle B., J.F. Duhamel et J.C. Souberbielle (2012)** - Académie nationale de médecine., Statut vitaminique, rôle extra osseux et besoins quotidiens en vitamine D. Rapport, conclusions et recommandations. Paris : ANM.
- Schwalfenberg G. (2008)** - Not enough vitamin D. *Can. Fam. Physician* ; 53 : 841-854.
- Souberbielle J.C., B. Cortet, P. Fardellone, C-L. Benhamou et J.B. Gouvain (2011)** - Groupe de Recherche et d'Information sur les Ostéoporoses, La vitamine D chez l'adulte. *Recommandations du GRIO. Presse Med.* ; 40 : 673-682.
- Souberbielle J.C., J. Body, J.M. Lappe, M. Plebani, Y. Shoenfeld et T.J. Wang (2010).**- Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease,autoimmunity and cancer: Recommendations for clinical practice. *Autoimmun. Rev.*; 9 (11): 709-715.
- Speeckaert M., G. Huang et J.R. Delanghe (2006)** - Biological and Clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globuline) and its polymorphism. *Clin. Chim. Acta* ; 372 : 33-42.
- Tavera L.M. (2008).**- White « La vitamine du soleil » *Pour la Science* mar : 74-80.
- Van R.P., Der Wielen, M.R. Löwik, Van Den et H. Berg (1995)** - Serum vitamin D concentrations among elderly people in Europe. *Lancet* ; 346 : 207-210.
- Vieth R. (2005)** - The role of vitamin D in the prevention of osteoporosis. *Ann. Med.* ; 37 (4) : 278-285.
- White K.E., J.Biber, H. Murer H. et M.J. Econs (1998)** - Chromosomal localization involved in phosphate homeostasis : the type IIb sodium-phosphate cotransporter and stanniocalcin-2. *Somat. Cell. Mol. Genet.*; 24 : 357-362.

ANNEXE 1

TECHNIQUE ÉLISA

A. Petit historique

La technique d'ELISA a été conceptualisée et développée par 2 scientifiques Peter Perlmann (investigateur principal) et Eva Engvall à l'Université de Stockholm en 1971.

A la fin des années 60, Stratis Avrameas et GB Pierce mettent au point la technique d'immunoenzymologie, technique d'analyse par réaction entre antigènes et anticorps et utilisant comme marqueur des enzymes.

B. Principe général de la technique Elisa

La technique ELISA (**Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay**) est une technique **immuno-enzymatique** de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.



Plaque Elisa

ANNEXE 2
APPAREILLAGES UTILISEE DANS LE LABORATOIRE DE
BIOCHIMIE



(a) Centrifugeuse.



(b) Vortex.



(c) Micropipette.

ANNEXE 3
TENEUR SÉRIQUE CHEZ LES PATIENTES SELON L'ÂGE.

Teneur sérique	Âge (ans)
14,28	73
53,25	39
13,91	41
16,22	49
14,34	69
17,07	56
15,68	53
16,09	64
9,93	31
11,7	57
21,65	56
15,44	37
11,86	37
14,08	40
16,89	64
50,85	64
11,21	57
15,44	36
10,94	88
30,48	28
22,55	76
25,87	57
14,45	69
15,65	52
17,82	65
88,92	93
15,35	57
0,52	45
10,18	47
23,89	76
9,59	54
18	48
17,71	48
14,4	53

Teneur sérique	Âge (ans)
8,61	60

20,36	59
12,15	46
9,49	37
21,17	44
11,86	88
7,89	67
8,76	56
11,06	63
12,13	54
18,44	29
13,36	52
8,69	61
8,91	50
11,45	54
17,76	73
10,49	57
52,91	89
23,81	39
17,1	64
10,3	48
13,69	37
10,47	64
11,1	45
10,15	53
10,82	83
39,75	51
9,88	62
16,45	44
18,71	68
10,45	78
4,99	78
11,47	50
9,67	61

Teneur sérique	Âge (ans)
11,19	53
33,63	39
21,34	58
14,15	34

8,84	89
14,53	59
9,7	65
9,7	65
54,25	61
11,85	54
120	84
15,15	56
12,1	40
17,29	23
26,82	48
27,49	58
10,27	60
10,49	60
10,51	55
10,68	69
13,24	54
13,48	65
13,96	60
14,66	70
14,79	53
15,12	62
16,84	59
18,19	48
23,55	43
28,51	56
53	40
7,97	41
7,99	61

