

Licence Sciences et Techniques (LST)

GENIE CHIMIQUE

PROJET DE FIN D'ETUDES

Application de la spectrophotométrie : Dosage du calcium et intérêts dans le métabolisme phosphocalcique

Présenté par :

- ◆ Lakhlii Lamyae

Encadré par :

- ◆ Pr. Haoudi Amal (FST Fès)
- ◆ Pr. Ben-saghroune Hayat (CHU Fès)
- ◆ Pr. Benbella (CHU Fès)

Soutenu Le 05 Juillet 2022 devant le jury composé de :

- Pr. Ben-saghroune Hayat
- Pr. Khalil Fouad
- Pr. Lhassani Abdelhadi

**Stage effectué au sein du laboratoire central d'analyse médicale à CHU Fès
Année Universitaire 2021 / 2022**

Dédicaces :

J'offre ce modeste travail à :

Mes parents pour leurs sacrifices et soutien toute la période de ma scolarité, pour leur amour et confiance éternels depuis mon enfance.

Nulle dédicace n'est susceptible d'exprimer mon profond amour, mon immense gratitude et mon respect pour tous leurs efforts et encouragements. Que Dieu leur prête une longue heureuse vie.

Mes amis, mes sœurs et toutes les personnes qui m'ont prodigué l'encouragement et le soutien durant cette année de formation.

Remerciements :

Je tiens tout d'abord à remercier « le laboratoire d'analyses médicales au centre hospitalier universitaire Hassan II » de m'avoir accueillie pour effectuer ce stage, et de m'avoir donné l'opportunité de découvrir le métier, à travers des missions très intéressantes que j'ai pu explorer durant mon stage.

Je remercie tout particulièrement, ma directrice de stage Pr. BENBELLA Imane de m'avoir encadré et conseillé tout au long de la période du stage. Je remercie également Pr. Aissaoui, qui m'a toujours aidé depuis mon premier jour jusqu'au dernier, en m'expliquant le fonctionnement de chaque matériel et en me guidant pendant toute la durée de stage. Mes remerciements sont aussi dédiés à Dr. Ben-saghroune Hayat, qui était très généreuse avec moi, pour son soutien, remarques, conseils et suggestions. Je suis très reconnaissable du temps qu'ils m'ont consacré car ils ont bien enrichi mon apprentissage durant ce stage.

Je tiens à remercier vivement Pr. A. HAOUDI, professeur au sein de la Faculté Des Sciences et Techniques de Fès qui a assuré le suivi de ce travail, je la remercie pour le temps qu'elle m'a offert pour réaliser un travail à la hauteur, pour sa patience et pour ses recommandations et conseils précieux, également Pr. Harrach pour son soutien.

Je tiens à remercier Pr. F. Khalil et Pr. A. LHASSANI, les membres de jury qui ont accepté d'évaluer mon travail malgré leurs occupations.

L'ensemble des enseignants de la FST qui ont attribués à ma formation.

Je remercie ainsi mes collègues du secteur, qui m'ont aidé durant mon stage à résoudre tous les problèmes que j'ai rencontré. J'ai beaucoup apprécié leur compagnie et leur soutien.

Liste de figures :

Figure 1 : Onde électromagnétique (page 2).

Figure 2 : le spectre électromagnétique (page 4).

Figure 3 : les Ultra-Violets dans le spectre de rayonnement électromagnétique (page 5).

Figure 4 : composants du spectrophotomètre (page 8).

Figure 5 : Tubes à hémolyse (page 13).

Figure 6 : Centrifugeuse (page 13).

Figure 7 : Godets (page 13).

Figure 8 : Micropipette (page 14).

Figure 9 : Racks (page 14).

Figure 10 : Automate ARCHITECTE c8000 (page 14).

Figure 11 : Cuves (page 15).

Figure 12 : Spectrophotomètre (page 15).

Figure 13 : exemple de facteur de calibration du calcium (page 17).

Figure 14 : répartition de la population en fonction du sexe (page 19).

Figure 15 : valeurs de calcémie normale en mg/l (page 20).

Figure 16 : répartition des hypocalcémies en fonction du sexe (page 21).

Figure 17 : répartition des hypocalcémies en fonction de l'âge (page 21).

Figure 18 : valeurs des hypocalcémies en mg/l (page 22).

Figure 19 : répartition des hypercalcémies selon le sexe (page 23).

Figure 20 : répartition des hypercalcémies en fonction de l'âge (page 23).

Figure 21 : valeurs des hypercalcémies en mg/l (page 24).

Figure 22 : répartition des principales étiologies d'hypercalcémie (page 25).

Figure 23 : répartition des principales étiologies d'hypocalcémie (page 26).

Liste de tableaux :

Tableau 1 : les différents types des rayonnements U.V. et leurs propriétés physiques (page 5).

Tableau 2 : types d'échantillons validés à utiliser pour le dosage du calcium et les matériels de prélèvement (page 16).

Tableau 3 : température et durée de conservation des échantillons (page 16).

Liste d'abréviations :

UV : ultraviolet

IR : infra-rouge

DO : densité optique

ET : écart type

TE : trouble endocrinien

IR : insuffisance rénale

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra-acétique.

Présentation du centre d'accueil :

(Laboratoire Central d'Analyses Médicales)

1. Description du centre hospitalier Hassan II :

Le Centre Hospitalier et Universitaires Hassan 2-Fès est une structure ayant plus de 16 ans d'expérience. Elle offre des présentations médicales externe et en hospitalisation avec un total de 880 lits. Elle dispose d'un hôpital de spécialités, hôpital mère enfant bloc opératoire, centre de diagnostic, d'un pavillon de consultation externe, des suites d'hospitalisation personnelles et d'un laboratoire moderne d'analyses biomédicales.

2. Description du laboratoire

Le Laboratoire Central d'Analyses Médicales est situé au bâtiment J et conçu comme un pôle d'activité hospitalière comportant plusieurs spécialités d'analyses médicales :

- a. Biochimie et pharmacotoxicologie.
- b. Anatomie pathologique.
- c. Bactériologie-immuno-analyses.
- d. Parasitologie.
- e. Hématologie.
- f. Génétique médicale et biologie

moléculaire. Il se compose de :

- Salle de réception.
- Salle de prélèvements.
- En plus des services correspond à différentes spécialités

Mon stage de fin d'étude a été effectué au sein du service de Biochimie-Pharmacologie, doté de :

- Deux Automates, Architecte c8000
- Appareil d'hémoglobine glyquée, Variant II turbo
- Appareils de Centrifugation.
- Un appareil d'électrophorèse SEBIA.

3. Quelques examens réalisés au laboratoire de Biochimie :

- a. Urée
- b. CPK (Créatine PhosphoKinase) - Ionogramme
- c. Transaminases
- d. Triglycéride
- e. Cholestérol total plus HDL - Amylase
- f. Glycémie
- g. HbA1c (Hémoglobine Glyquée)

Introduction générale	1
Partie I : Aspects théoriques de la spectrophotométrie UV-visible	2
1- Généralités	2
1.1 Le rayonnement électromagnétique : dualité onde – corpuscule.....	2
2- Le spectre électromagnétique	3
2.1 2-1 Décomposition de la lumière blanche (visible)	4
2.2 Le rayonnement ultraviolet (UV)	4
3- Interaction rayonnement-matière.....	5
3.1 L'absorption	6
3.2 L'émission.....	6
3.3 Spectrophotométrie et domaine d'application	6
3.4 Spectrophotométrie UV-visible.....	6
3.5 Principe.....	7
3.6 Loi de Beer-Lambert	7
3.7 Conditions de validité de la loi de Beer-Lambert	7
3.8 Appareillage	8
3.9 Domaine d'application de la spectrophotométrie UV-visible.....	9
Partie 2 : Exemple d'application de la spectrophotométrie UV-visible	10
1- Dosage du calcium	10
1.1 Introduction	10
1.2 Intérêt du dosage du calcium	10
1.3 Intérêts dans le métabolisme phosphocalcique	10
1.4 Métabolisme du calcium	10
1.4.1 Rôle physiologique	10
1.4.2 Besoins en calcium.....	11
1.4.3 Répartition dans l'organisme	11
1.4.4 Régulation du métabolisme phosphocalcique	11

2-	Technique de dosage du calcium.....	11
2.1	Méthode complexométrique.....	11
2.2	Méthode potentiométrique	11
2.3	Méthodes physiques	11
2.3.1	Dosage par spectrophotométrie d'absorption moléculaire	11
2.3.2	Photométrie à émission de flamme.....	12
2.4	Méthodes colorimétriques	12
2.4.1	Orthocrésolphtaléine	12
2.4.2	Bleu de méthyl thymol.....	12
2.4.3	Arsenazo III	12
2.5	Principe de la méthode.....	12
3-	Matériels et méthodes	12
3.1	Type d'étude.....	12
3.2	Matériels de laboratoire utilisés au cours du dosage.....	13
3.3	Étape pré-analytique.....	15
3.3.1	Types d'échantillons	15
3.3.2	Conditions de prélèvement	16
3.3.3	Transport et conservation des échantillons.....	16
3.3.4	Préparation pour l'analyse	16
3.3.5	Calibration et étalonnage	17
3.3.6	Procédures du contrôle de qualité.....	18
3.3.7	Pratique en laboratoire	18
3.4	Etape analytique et valeur de référence	18
	Valeur de référence.....	18
4-	Résultats et discussion.....	18
4.1	Données épidémiologiques	18
4.2	Répartition des résultats de calcémie en fonction de l'âge et du sexe	19
4.2.1	Calcémie normale : $88\text{mg/l} < \text{Ca}^{++} < 108\text{mg/l}$	19
4.2.2	Hypocalcémie : $\text{Ca}^{++} < 88\text{ mg/l}$	20

4.2.3	2-3- hypercalcémie : $\text{Ca}^{++}>108\text{mg/l}$	22
4.3	Etiologies des anomalies de la calcémie	24
4.3.1	Répartition des principales étiologies de l'hypercalcémie (Figure 22)	24
4.3.1.1	Troubles endocriniens	24
4.3.1.2	Cancer.....	25
4.3.1.3	Autres	25
4.3.2	Répartition des principales étiologies de l'hypocalcémie.....	25
4.3.2.1	Insuffisance rénale.....	25
4.3.2.2	Cancer.....	26
4.3.2.3	Infection	26
4.3.2.4	Autres	26
Conclusion		27

Introduction générale :

La spectrophotométrie est une technique d'analyse quantitative et qualitative, qui a pour objet de mesurer l'absorbance d'une espèce se trouvant généralement en solution, c'est-à-dire sa capacité d'absorber la lumière. Plus l'échantillon est concentré, plus il absorbe plus de lumière ; ceci est illustré dans la loi de Beer-Lambert, cette loi qui décrit l'absorption de tout rayonnement et qui lie proportionnellement l'absorbance à la concentration. La densité optique est équivalente à l'absorbance en spectrophotométrie.

L'objectif de notre travail est de présenter la technique de la spectrophotométrie UV-visible et son application en Biologie clinique et plus précisément en Biochimie clinique.

La spectrophotométrie UV-visible est une méthode physique non destructive, basée sur l'interaction rayonnement-matière. Un rayonnement électromagnétique est caractérisé par sa longueur d'onde (λ) dont les différents domaines sont : rayons gamma, rayons X, UV, visible, IR, micro-ondes, ondes-radio.

Cette technique nécessite l'utilisation d'un spectrophotomètre et permet de caractériser des molécules, de déterminer des concentrations d'espèces chimiques [1].

Le spectrophotomètre a été inventé en 1940 par Arnold J. Beckmann. Cet appareil a simplifié et modernisé les analyses chimiques en permettant aux chercheurs d'effectuer en quelques minutes l'analyse précise à 99,9 % d'une substance [2].

Le calcium est l'un des paramètres courants du bilan biologique « osseux ». Nous décrivons les conditions de prélèvement, de dosage, et discutons des modalités d'interprétation du calcium dans le sang.

Partie I : Aspects théoriques de la spectrophotométrie UV

Visible

1- Généralités :

1.1 Le rayonnement électromagnétique : dualité onde – corpuscule

La lumière est une association de deux ondes : une **magnétique** et l'autre **électrique** qui ont la même longueur d'onde. La longueur d'onde est la distance entre deux maximums d'une onde. Parmi les ondes électromagnétiques, on trouve que la lumière correspond à un petit nombre d'entre-elles, s'étendant de 100nm à 1mm(1000nm), plus précisément, la lumière visible correspond à des ondes qui s'étendent de 390nm à 780nm. Tandis que les longueurs d'onde de l'UV s'étendent de 100 à 400nm plus précisément entre 200 et 300nm [3].

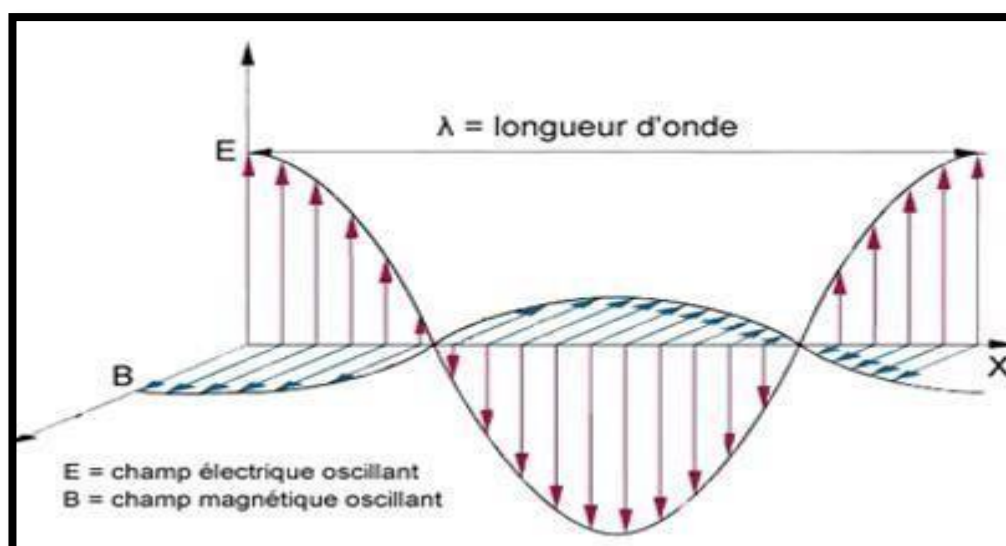


Figure 1 : Onde électromagnétique [4].

La lumière est d'un côté une onde électromagnétique. Le rayonnement électromagnétique désigne une forme de transfert d'énergie. Il peut être décrit de manière corpusculaire comme la propagation de photons ou de manière ondulatoire comme une onde électromagnétique. Le champ électromagnétique qui se trouve même dans le vide, est créé par la présence de particules chargées et par leur déplacement. L'onde électromagnétique est formée lorsqu'une perturbation de ce champ est propagée, ce qui donne à ces ondes la propriété de pouvoir se déplacer dans le vide. En fait, la lumière visible n'est en fait qu'une fenêtre étroite de l'ensemble des ondes

électromagnétiques, qui comprennent les rayons gamma, X, ultraviolets, infrarouges, les ondes radios, etc. Le spectre du visible s'étend à peu près de 400 nm (violet) à 700 nm (rouge) [4].

La dualité onde-corpuscule décrit en physique, un concept qui permet de clarifier certaines observations liées à l'interaction rayonnement-matière. Selon ce concept, les objets peuvent présenter à la fois une propriété corpusculaire et ondulatoire [5].

2- Le spectre électromagnétique :

Le spectre électromagnétique est la description de l'ensemble des rayonnements électromagnétiques classés par fréquence, longueur d'onde [6]. C'est la gamme qui contient toutes les ondes électromagnétiques [7].

Dans un milieu donné, la fréquence et la longueur d'onde sont inversement proportionnelles, et sont liées par la relation : $\lambda = c/f$ où :

λ : longueur d'onde en mètre

c : célérité de propagation en m/s

f : la fréquence en Hz [8].

Le spectre électromagnétique s'étend théoriquement de zéro à l'infini en fréquence (ou en longueur d'onde), de façon continue. On le divise en plusieurs grandes classes de rayonnement, qui s'étudient par des moyens particuliers à chacune d'entre elles [4].

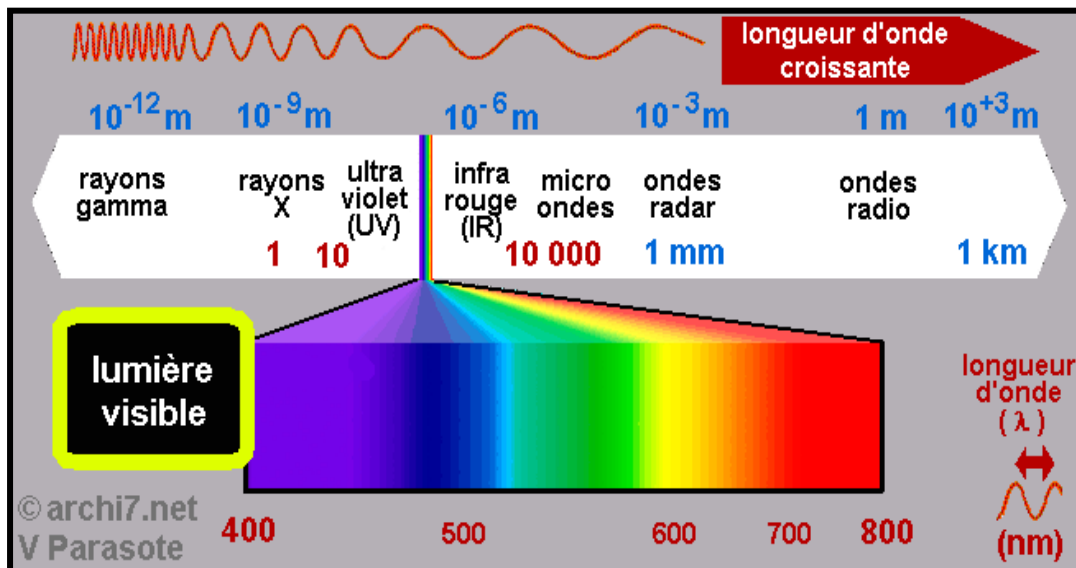


Figure 2 : le spectre électromagnétique [9]

2.1 2-1 Décomposition de la lumière blanche (visible) :

- La lumière blanche est composée d'une infinité de couleurs, comme nous pouvons le voir au quotidien en observant un arc-en-ciel. La lumière blanche résulte de la superposition des radiations monochromatiques de longueur d'onde dans le vide comprise entre 400 et 800 nm. C'est une radiation polychromatique [6].

2.2 Le rayonnement ultraviolet (UV) :

- Les UV, également appelés lumière noire, parce qu'ils ne sont pas visibles à l'œil nu, sont un rayonnement électromagnétique d'une longueur d'onde plus courte que celle de la lumière visible. Ils ne peuvent être observés qu'indirectement, soit par fluorescence, soit à l'aide de détecteurs spécialisés [6].

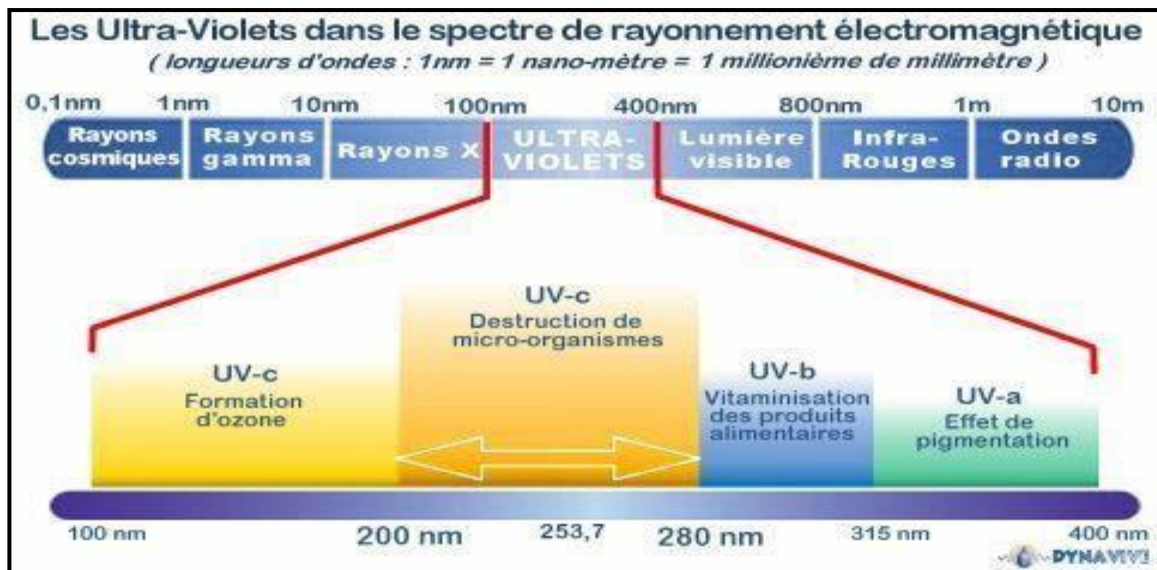


Figure 3 : les Ultra-Violets dans le spectre de rayonnement électromagnétique [10].

Les rayonnements UV sont donc compris dans une bande de longueurs d'ondes allant de 100nm à 400nm. Cette bande est elle-même découpée en trois parties, UV-Types A, B et C, allant en longueurs d'ondes décroissantes et que l'on peut caractériser grossièrement par leurs effets :

Tableau 1 : les différents types des rayonnements U.V. et leurs propriétés physiques [10].

U.V. type A	400 à 315 nm	"les rayons qui bronzent"
U.V. type B	315 à 280 nm	"Les rayons qui brûlent"
U.V. type C	280 à 100 nm	"Les rayons qui détruisent"

3- Interaction rayonnement-matière :

Le rayonnement est un mode de propagation de l'énergie dans l'espace. Les rayonnements ne peuvent être détectés que grâce à leurs interactions avec la matière : ils cèdent totalement, ou en partie leur énergie et en subissent des modifications. [11].

L'interaction du rayonnement électromagnétique avec la matière peut prendre différentes formes. On va s'intéresser aussi progressivement aux processus qui sont à la base de tous les phénomènes spectroscopiques : l'absorption et l'émission [12].

3.1 L'absorption :

L'atome peut absorber un photon lorsqu'il est soumis à une onde lumineuse. L'atome, initialement dans un état d'énergie électronique E_a , passe alors dans un état électronique d'énergie supérieur $E_b > E_a$. [13].

3.2 L'émission :

Le rayonnement incident peut induire un atome dans un état excité, à émettre un photon vers un état de plus basse énergie. [12]

3.3 Spectrophotométrie et domaine d'application :

La spectrophotométrie est le domaine qui étudie la mesure de l'énergie transportée par les rayonnements électromagnétiques dans le domaine de la lumière visible. C'est une méthode analytique quantitative et qualitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée, généralement en solution. Plus l'échantillon est concentré, plus il absorbe la lumière dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer-Lambert [14]. La spectrophotométrie peut être utilisée dans divers domaines : chimie, pharmacie, environnement, agroalimentaire, biologie etc...., aussi bien au laboratoire que sur site industriel [15].

3.4 Spectrophotométrie UV-visible :

Permet d'accéder qualitativement à des renseignements liés à la nature des liaisons présentes dans l'échantillon, et aussi de déterminer quantitativement la concentration des espèces absorbant dans ce domaine spectral. Cette spectrophotométrie est non destructive, rapide, et très répandue dans les travaux pratiques de chimie ainsi qu'en analyses chimiques et biochimiques [16].

3.5 Principe :

- Le principe de la spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible repose sur l'absorption du rayonnement par les molécules dans le domaine allant de 190 à 800 nm, ce qui correspond à l'ultraviolet (190-400 nm) et au visible (400-800 nm) [12].
- Lorsqu'une lumière d'intensité I_0 passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le(s) soluté(s). L'intensité I de la lumière transmise est donc inférieure à I_0 . On définit l'absorbance de la solution comme le logarithme décimal du rapport entre l'intensité énergétique I_0 à une longueur d'onde donnée, avant traversée du milieu, et l'intensité énergétique transmise I [4].

3.6 Loi de Beer-Lambert :

La loi de Lambert indique que l'absorbance est directement proportionnelle à l'épaisseur du milieu traversé. En 1852, BEER complète la loi de Lambert par la relation de proportionnalité entre l'absorbance et les concentrations des constituants responsables de l'atténuation. La loi est très utilisée en chimie pour déterminer la concentration de produits en solution. Cette loi s'applique également pour décrire l'absorbance de tout rayonnement [17].

La relation de Beer-Lambert décrit que, à une longueur d'onde λ donnée, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des espèces de la solution, et à la longueur du trajet optique. Alors, pour une solution limpide contenant une seule espèce absorbante [4] :

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda l c$$

3.7 Conditions de validité de la loi de Beer-Lambert :

- ✓ La lumière utilisée est monochromatique.
- ✓ La concentration n'est pas trop élevée (généralement inférieure $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$) ; car à des concentrations trop élevées les molécules qui constituent l'espèce chimique colorée sont très proches les unes des autres, donc elles peuvent interagir et par ailleurs leurs propriétés d'absorption vont être modifiées.

- ✓ La solution n'est pas fluorescente : pas de réémission de lumière dans toutes les directions
- ✓ La solution doit être limpide (pas de précipité ou de trouble qui entraîneraient une diffusion de lumière) [4].

3.8 Appareillage :

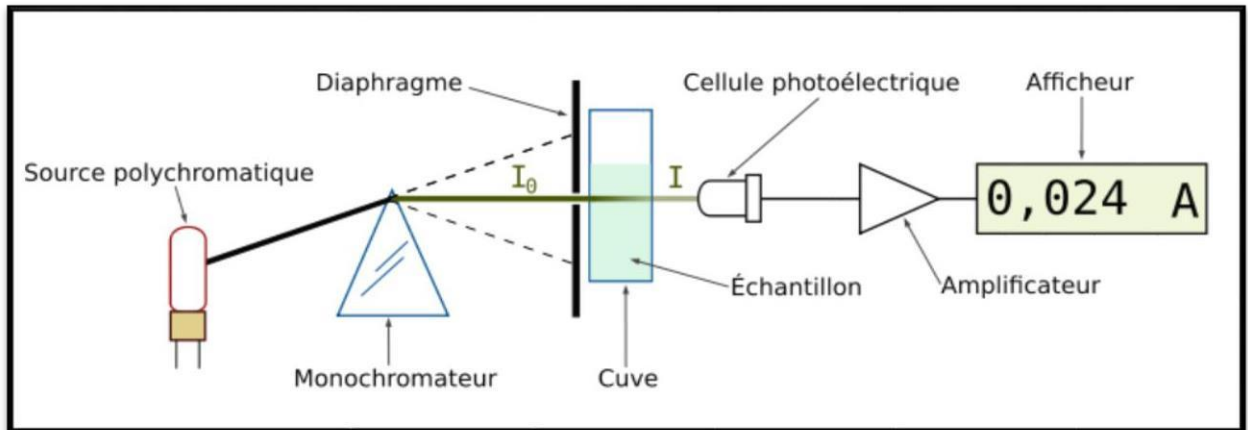


Figure 4 : composants du spectrophotomètre [18].

- L'instrument utilisé pour effectuer un spectre UV-visible est appelé spectrophotomètre UV-visible.
- Le spectrophotomètre UV-visible est constitué des éléments suivants :
 - a- Source de lumière polychromatique : émet tout le spectre électromagnétique. La lumière est décomposable, de sorte que la lumière blanche est la combinaison de toutes les couleurs.
 - b- Le monochromateur : son rôle est de rendre la source de lumière polychromatique, une source de lumière monochromatique ; c'est-à-dire constitué d'un seul faisceau lumineux, qu'une seule raie. Il disperse la lumière blanche. I_0 est la source de lumière incidente, qui sort du monochromateur, elle peut provenir de l'UV.
 - c- Diaphragme : ne laisse passer qu'une seule source de lumière monochromatique, celle dont on a besoin.

d- La cuve : comporte l'échantillon que nous voulons mesurer. Le but est d'obtenir la concentration de l'échantillon.

Une partie de la source incidente I_0 rentre dans la cuve, et sort avec une intensité plus faible, ceci est dû à la concentration de l'échantillon, d'où vient la loi de Beer-Lambert qui déclare que l'absorbance est proportionnelle à la concentration ; c'est-à-dire que plus l'échantillon est plus concentré, plus il absorbe plus de lumière. La source de lumière I qui sort, est appelée le rayonnement transmis.

e- Cellule photoélectrique : composé électronique et détecteur très sensible à la lumière. Il génère une tension en fonction de l'éclairement, qui sera proportionnelle au rayonnement transmis I qu'il a capté.

f- Amplificateur : amplifie le rayonnement transmis, et affiche au niveau de l'écran la valeur de l'absorbance qui est proportionnelle à la concentration [18].

3.9 Domaine d'application de la spectrophotométrie UV-visible :

La spectrophotométrie UV-visible est principalement efficace sur des composés purs, il est donc préférable de séparer les molécules au préalable. Ainsi, après une CCM, les molécules invisibles à l'œil nu ne permettent pas une interprétation directe. Aussi, la plaque est placée sous une lumière UV, et certaines molécules vont apparaître car absorberont les rayons incidents. La spectrophotométrie UV-visible est également utilisée dans le cadre de certains dosages qui produisent un complexe coloré. C'est le cas pour l'analyse des polyphénols, par exemple. Les polyphénols sont des molécules complexes présentes dans la plupart des végétaux, notamment le raisin [20].

Partie 2 : Exemple d'application de la spectrophotométrie UV-visible

Meilleure compréhension de l'intérêt et de l'application de la spectrophotométrie UV-visible à travers une étude descriptive des dosages du calcium.

1- Dosage du calcium :

1.1 Introduction

Le dosage du calcium est un exemple des dosages qui font appel à la spectrophotométrie, on s'intéresse dans ce rapport au dosage du calcium car il est fréquent, très demandé et important.

Le calcium est le sel minéral le plus abondant dans l'organisme. Il assure la solidité du squelette, contribue à la contraction musculaire, à la conduction nerveuse et à la coagulation sanguine. Un taux de calcium faible dans le sang peut être le signe d'une maladie osseuse.

C'est un minéral indispensable au fonctionnement de toutes les cellules de l'organisme. La plus grande partie se trouve dans les os. Son absorption par les os est possible grâce à la vitamine D.

Il participe à l'entretien du capital osseux chez les adultes et contribue à la prévention de l'ostéoporose chez les seniors [27].

1.2 Intérêt du dosage du calcium

Le médecin prescrit un dosage du calcium s'il soupçonne une maladie osseuse rénale ou hépatique. Cet examen est aussi demandé en cas de suspicion de certains cancers ou si le patient présente des symptômes liés à un problème de glandes parathyroïdes [28].

1.3 Intérêts dans le métabolisme phosphocalcique :

- ❖ Le calcium et le phosphore sont les principaux constituants de l'os. Ils forment un complexe : phosphate tricalcique, insoluble au pH de l'organisme.
- ❖ Leur métabolisme, étroitement lié, est contrôlé par trois hormones : la parathormone, la vitamine D et la calcitonine [29].

1.4 Métabolisme du calcium :

1.4.1 Rôle physiologique :

- Formation des os.
- Excitabilité neuromusculaire.
- Assure le bon fonctionnement des systèmes enzymatiques.
- Coagulation sanguine.

1.4.2 Besoins en calcium :

- Adulte : 300 à 500 mg/j
- Augmentent chez le nouveau-né, l'enfant en croissance, grossesse, allaitement et ménopause
- Apport : lait, fromage, eaux minérales riches en calcium.

1.4.3 Répartition dans l'organisme :

Le calcium est l'ion le plus abondant de l'organisme :

- 1,6% de la masse corporelle ($\approx 1\text{kg}$ chez un sujet de 70kg), 99% au niveau de l'os (sous forme de cristaux d'hydroxyapatite) et 1% dans les tissus mous (muscle, peau, viscère...) et dans les liquides extracellulaires.

1.4.4 Régulation du métabolisme phosphocalcique :

Il y a :

- Trois sites de régulation : intestin, os et rein.
- Trois principales hormones : Parathormone (PTH), Vit D3, Calcitonine (CT) [30].

2- Technique de dosage du calcium :

2.1 Méthode complexométrique :

La réaction entre le calcium (ion métallique) à doser et un composé organique complexant, souvent l'EDTA conduit à la formation d'un complexe [31].

2.2 Méthode potentiométrique :

Cette méthode dérive de la première. L'EDTA associé au calcium forme le même complexe. On peut connaître la quantité de calcium pour une solution tamponnée à pH de 10, titrée avec l'EDTA potentiométriquement en utilisant une électrode de mercure dont le potentiel est directement lié à la concentration en agent complexant libre [31].

2.3 Méthodes physiques :

2.3.1 Dosage par spectrophotométrie d'absorption moléculaire :

L'absorption atomique semble être une méthode de choix pour le dosage des métaux. C'est une méthode très sensible permettant le dosage à l'état de traces [31].

C'est la méthode de référence pour le dosage du calcium actuellement. La technique demande le rajout de chlorure de lanthane pour éviter l'interférence des phosphates [32].

2.3.2 Photométrie à émission de flamme :

C'est une méthode ancienne.

Les appareils qui permettent le dosage du sodium, potassium et le lithium par cette méthode utilisent une flamme propane-air qui n'est pas assez chaude pour exciter les atomes de calcium. Ces appareils donnent de bons résultats, mais sont rares au niveau du marché et sont très onéreux [32].

2.4 Méthodes colorimétriques :

Cette méthode nécessite différentes substances qui complexent le calcium en formant un dérivé coloré. Sa coloration est proportionnelle à la concentration de l'échantillon qu'on souhaite doser [32].

2.4.1 Orthocrésolphtaléine :

Se complexe avec le calcium en milieu alcalin, pour donner un dérivé rouge avec un maximum d'absorption à 575nm [32].

2.4.2 Bleu de méthyl thymol :

Ce réactif chélate le calcium, en donnant un dérivé de couleur bleue, avec un maximum d'absorption de 612nm [32].

2.4.3 Arsenazo III :

Le complexe coloré en noir, dont le maximum d'absorption est à 680nm [32].

2.5 Principe de la méthode :

Le colorant arsenazo III réagit avec le calcium dans une solution acide pour former un complexe bleu-pourpre. La couleur qui se développe est mesurée à 660nm. Elle est proportionnelle à la concentration en calcium de l'échantillon.

3- Matériels et méthodes

3.1 Type d'étude :

Il s'agit d'une étude transversale, réalisée au CHU Hassan II de Fès et qui s'est étendue sur une période de deux mois du 25avril-25juin 2022. Notre étude a inclus tous les patients ayant bénéficié d'un dosage sanguin de calcium au sein de l'unité de Biochimie du laboratoire centrale d'analyses médicales. Les critères d'exclusion étaient : tout tube non conforme aux conditions pré-analytiques liées au dosage du calcium.

3.2 Matériels de laboratoire utilisés au cours du dosage :

- **Tubes à hémolyse** (Figure 5)

Dispositif en verre à usage unique, utilisés lors des prélèvements sanguins pour les analyses. Pour le service de biochimie les tubes sont de couleur verte et parfois rouge.

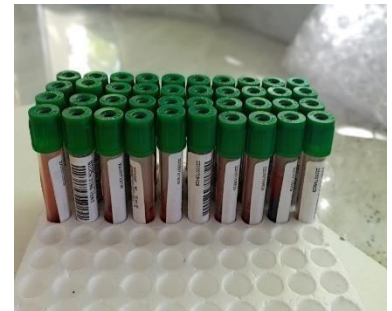


Figure 5 [21].

- **Centrifugeuse** : (Figure 6)

Appareil qui exerce une force centrifuge, par un mouvement de rotation, sur un mélange le plus souvent liquide/ solide. Cette force centrifuge est une accélération qui s'exerce vers l'extérieur de l'axe de rotation et permet la sédimentation au fond du tube des particules les plus lourdes (ex : les cellules), le liquide plus léger représente le surnageant (ex : sérum, plasma). Elle permet ainsi la séparation du plasma et du sérum de la phase cellulaire du sang.

Les tubes sont placés au sein de la centrifugeuse dans des godets (fig7). Ces derniers constituent un dispositif, porteur de tubes à hémolyse. Chaque godet doit comporter le même nombre de tubes placés dans le même emplacement que le godet d'en face pour réaliser un équilibre.



Figure 6 [21]



Figure 7 [21]

- **Micropipette** : (Figure 8)

Outil permettant de prélever de très faibles volumes de liquide avec une grande précision.



Figure 8 [21]

- **Racks** : (Figure 9)

Dispositif dans lequel on stocke les tubes de sang centrifugés pour les lancer dans l'automate. Le code -barre des tubes doit être lisible pour l'automate.

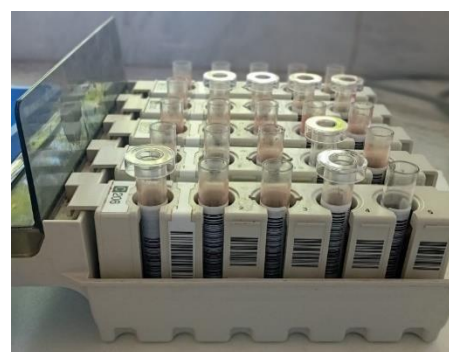


Figure 9 [21]

- **Automate ARCHITECTE c8000** : (Figure 10)



Figure 10 [23]

Ce système réalise une analyse automatisée des échantillons de sérum, plasma, urine, liquide céphalorachidien, ainsi que d'autres liquides biologiques.

Il mesure les différents composants de l'échantillon et génère automatiquement les résultats.

Cet automate se compose de :

- ❖ Deux rotos tournantes des réactifs ;
- ❖ Une station de lavage ;
- ❖ Un mixeur automatique ;
- ❖ Un rotor ;
- ❖ Une unité des ions ;
- ❖ Deux seringues robotisées
- ❖ Plusieurs portoirs des racks ;
- ❖ Une station de réfrigération

Cuves : (Figure 11)

Matériel où on met l'échantillon, se trouve dans l'automate.



Figure 11 [21]

Le spectrophotomètre : (Figure 12)

Un spectrophotomètre est un instrument permettant de réaliser une mesure spectrophotométrique. [24]

Il est inclus dans l'automate.



Figure 12 [25]

3.3 Étape pré-analytique :

3.3.1 Types d'échantillons :

Tableau 2 : types d'échantillons validés à utiliser pour le dosage du calcium et les matériels de prélèvement [26].

Type d'échantillon	Type de tube de prélèvement
Sérum	Tube sec en verre ou en plastique avec ou sans gel séparateur
Plasma	Tube hépariné en verre ou en plastique utilisés comme anticoagulant (héparinate de lithium +++ ; héparinate de sodium)

3.3.2 Conditions de prélèvement :

Le taux de calcium dans le sang est mesuré à partir d'un prélèvement de sang veineux réalisé au pli du coude. Le dosage est appelé calcémie [27].

Le prélèvement doit être effectué à jeun, la prise d'aliments surtout riche le calcium pourra fausser la calcémie. Le prélèvement est effectué sur un tube sec ou hépariné [27].

3.3.3 Transport et conservation des échantillons :

Le transport des échantillons consiste en un acheminement rapide au laboratoire.

Tableau 3 : température et durée de conservation des échantillons [26].

Type d'échantillon	Température de conservation	Durée maximale de conservation
Sérum/plasma	20 à 25°C	7 jours
	2 à 8°C	3 semaines
	-20°C	8 mois

3.3.4 Préparation pour l'analyse :

Sérum : s'assurer que la coagulation est terminée avant d'effectuer la centrifugation. Centrifuger selon les spécifications du fabricant des tubes pour garantir la séparation correcte du sérum des cellules sanguines.

Plasma : centrifuger selon les spécifications du fabricant des tubes pour éliminer les plaquettes et garantir la séparation correcte du plasma des cellules sanguines.

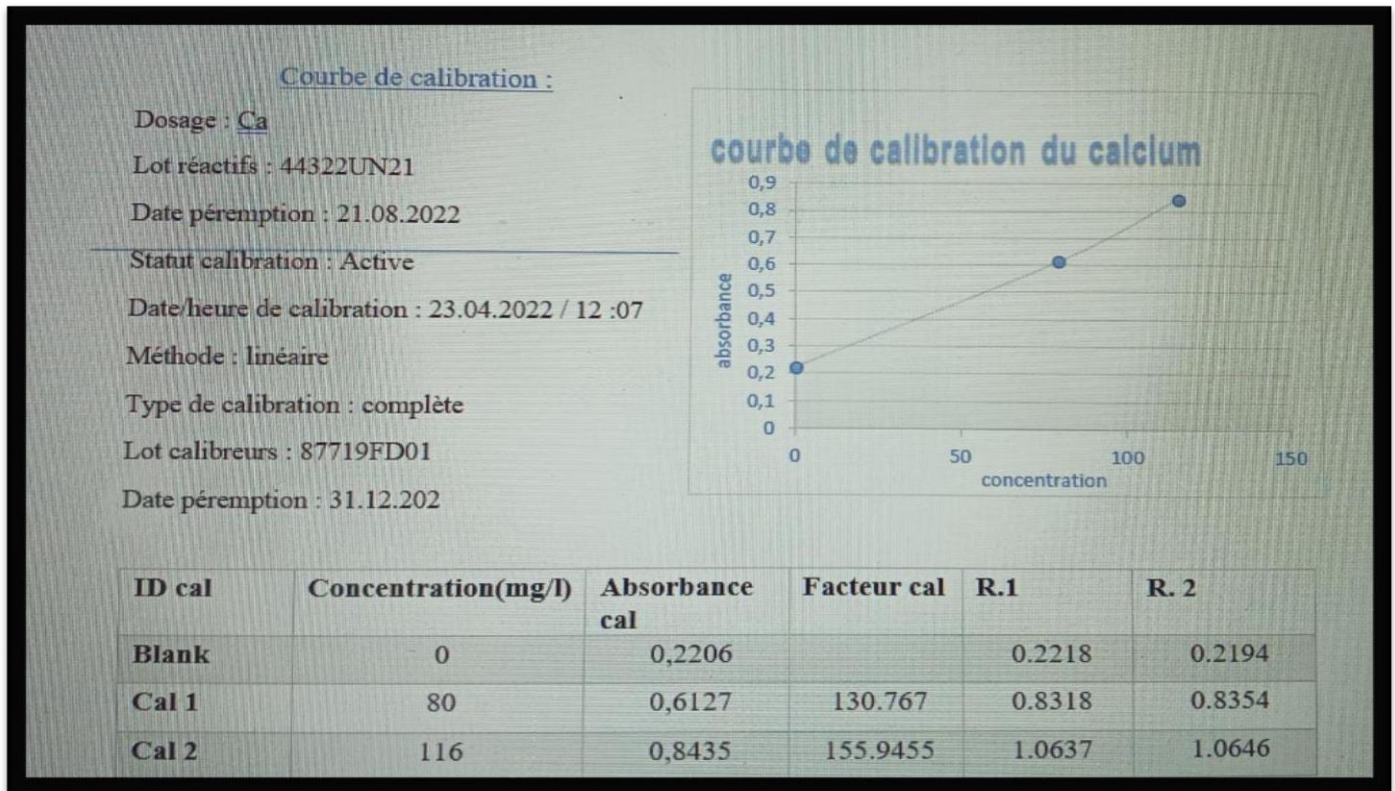


Figure 13 : exemple de facteur de calibration du calcium [26].

3.3.5 Calibration et étalonnage :

En biochimie, il est généralement nécessaire d'étalonner (ou de calibrer) la méthode de dosage. Il s'agit de comparer la DO des échantillons à tester avec celle d'une solution dont on connaît la concentration avec précision et que l'on appelle étalon.

Etapes de calibration :

Etape 1 : Choisir la longueur d'onde maximale.

Etape 2 : Faire le blanc (mesurer l'absorbance de la cuve et du solvant pour définir l'origine de l'absorbance)

Etape 3 : Mesurer l'absorbance de différentes solutions de concentrations connues en solutés.

Etape 4 : tracer la courbe d'étalonnage.

Etape 5 : Mesurer l'absorbance de la solution dont il faut déterminer la concentration.

Etape 6 : Lire la concentration correspondante sur ma courbe. [2]

La calibration est stable pendant environ 30 jours, mais est requise à chaque changement de lot de réactifs.

3.3.6 Procédures du contrôle de qualité :

la calibration doit être vérifiée avec au minimum deux niveaux de contrôles (normal et haut ou bas), selon les procédures de contrôle de qualité établies dans le laboratoire. Si les résultats des contrôles se situent en dehors des limites acceptables, une recalibration peut s'avérer nécessaire [26].

3.3.7 Pratique en laboratoire :

Au cours de la période de stage passé au sein de l'unité de biochimie du laboratoire de CHU Hassan II de Fès, nous étions chargés d'une partie de l'étape pré analytique, sous la supervision des techniciens de l'unité. Notre tâche consistait à réaliser le triage des différents prélèvements reçus : sang, urines, ponctions de liquides biologiques. Initialement, nous recevons les prélèvements associés à une feuille d'application contenant les différents paramètres à doser prescrit par les médecins. Après triage, les tubes fermés et identifiés sont placés dans des godets qui sont à leur tour placés dans la centrifugeuse. Les 2 godets opposés doivent contenir le même nombre de tubes ainsi les mêmes positions. Nous procédons par la suite à la centrifugation de nos tubes à 4000tr/mn pendant 4minutes. Une fois, nos tubes centrifugés, on obtient un surnageant fait de sérum ou de plasma en fonction du type de tube utilisé. Ces tubes sont par la suite mis dans des racks, remis au technicien qui les placera dans l'automate. La phase pré analytique de triage et de préparation des échantillons est terminée laissant place à la phase analytique au cours de laquelle l'automate procédera au dosage des paramètres demandés

3.4 Etape analytique et valeur de référence :

La méthode de dosage utilisée est la méthode colorimétrique Arsenazo III.

Valeur de référence :

Calcémie : entre 2,2mmol/l et 2,7mmol/l, l'équivalent en mg/l est : de 88mg/l et 108mg/l [26].

4- Résultats et discussion :

4.1 Données épidémiologiques

Notre étude a colligé 107 patients, l'âge moyen de nos patients est de 37ans avec des extrémités d'âge entre 78ans et 1 an.

Par ailleurs, nous avons constaté une légère prédominance du sexe féminin (51%) au sein de notre échantillon (figure 14).

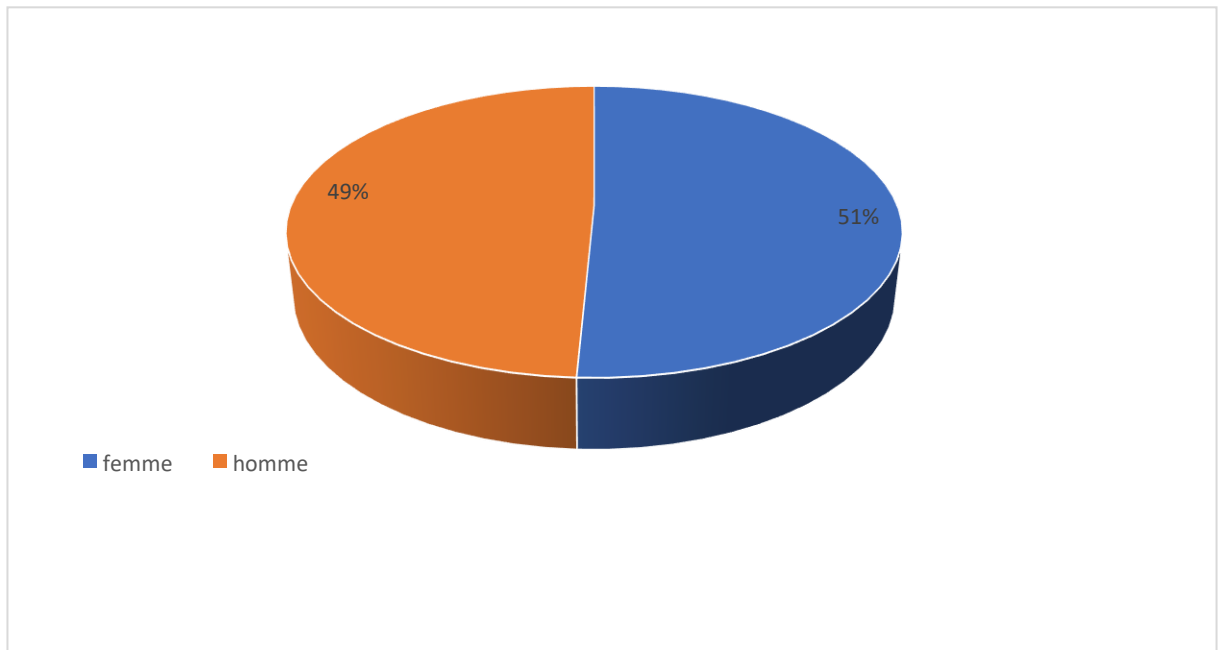


Figure 14 : répartition de la population en fonction du sexe

4.2 Répartition des résultats de calcémie en fonction de l'âge et du sexe :

4.2.1 Calcémie normale : $88\text{mg/l} < \text{Ca}^{++} < 108\text{mg/l}$

Dans notre étude, 44 patients ont une calcémie normale avec une moyenne de $95,61\text{mg/l}$ (ET = 3,89) (figure 15).

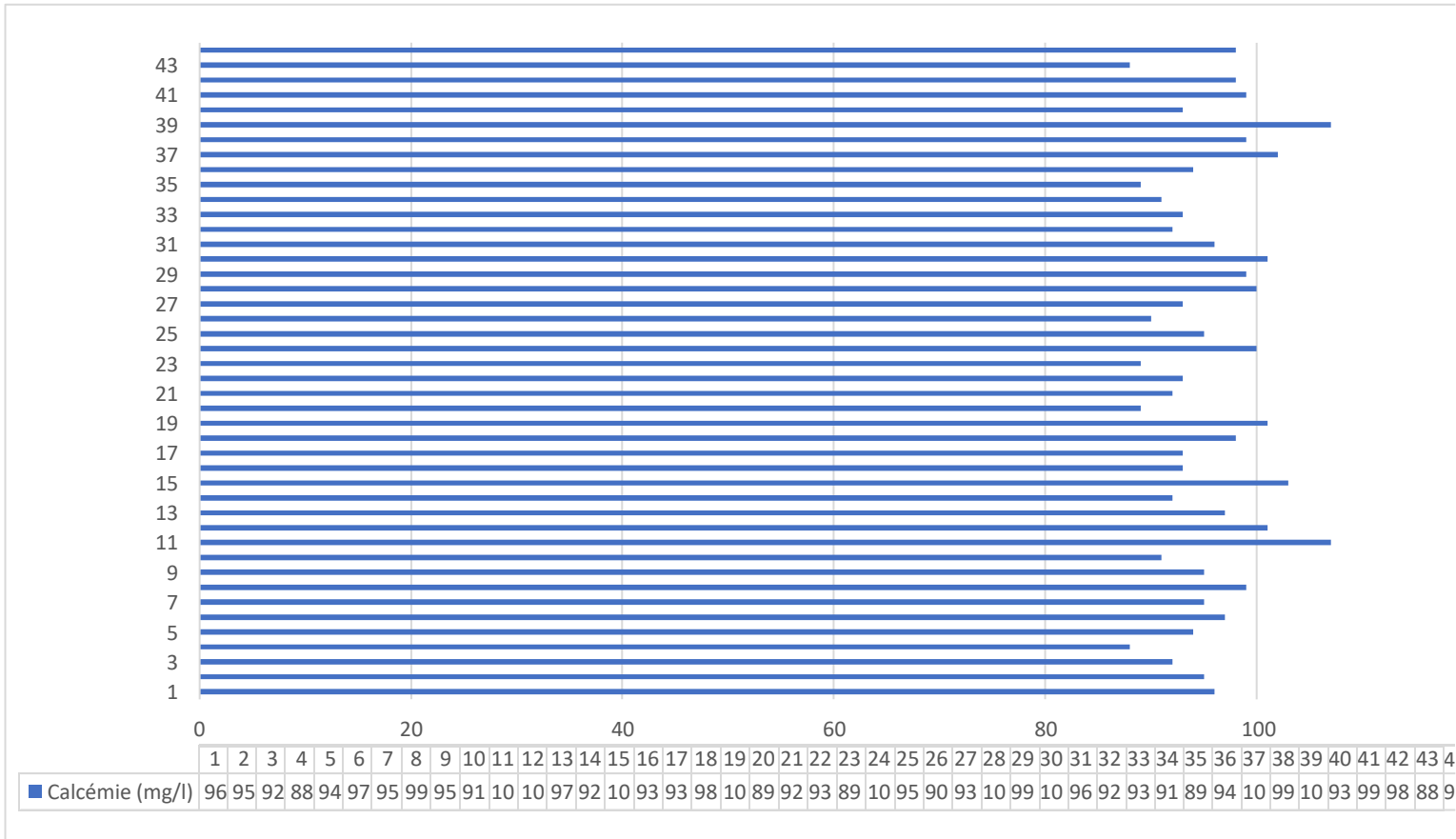


Figure 15 : valeurs de calcémie normale en mg/l.

4.2.2 Hypocalcémie : $Ca^{++} < 88 \text{ mg/l}$

Au sein de notre population, nous constatons une prédominance féminine des hypocalcémies avec un pourcentage de 52% versus 48% d'hommes présentant une hypocalcémie. (Figure 16).

Par ailleurs, l'âge moyen des patients porteurs d'hypocalcémie est de 40,4 ans avec des extrémités d'âge entre 69ans et 3ans. (Figure 17).

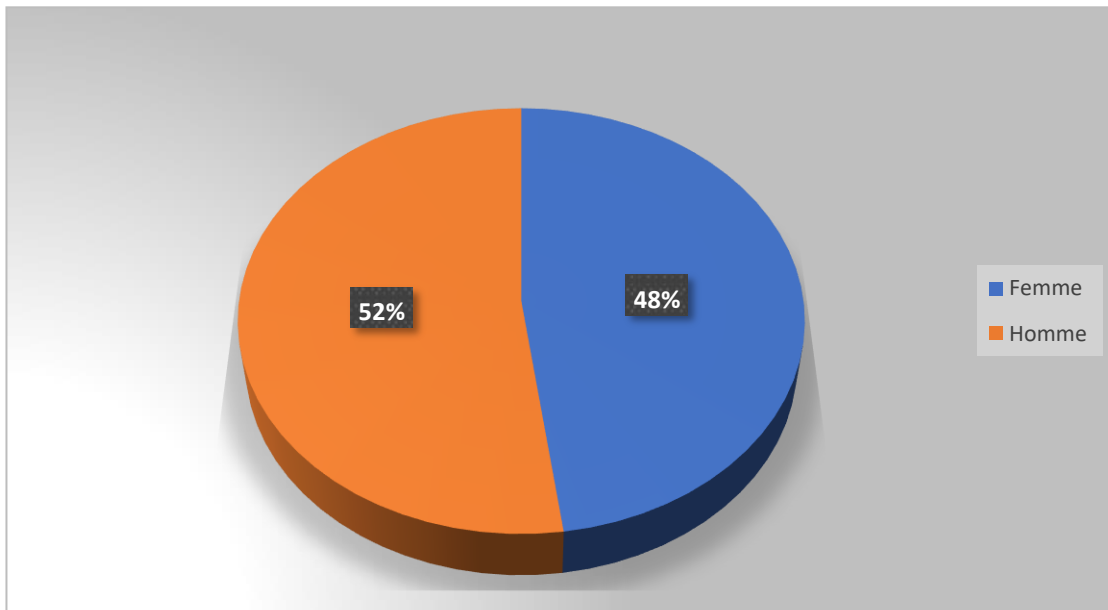


Figure 16 : répartition des hypocalcémies en fonction du sexe

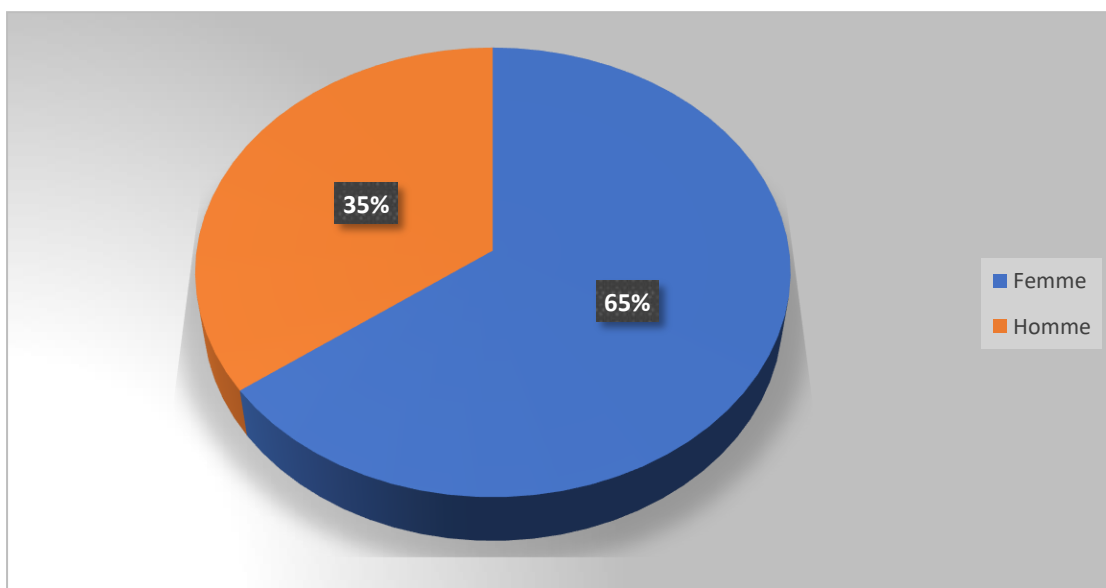


Figure 17 : répartition des hypocalcémies en fonction de l'âge.

- Au cours de la période de notre étude 45 hypocalcémies ont été retrouvées avec une moyenne de 74mg/l (ET=8,26) (figure 18).

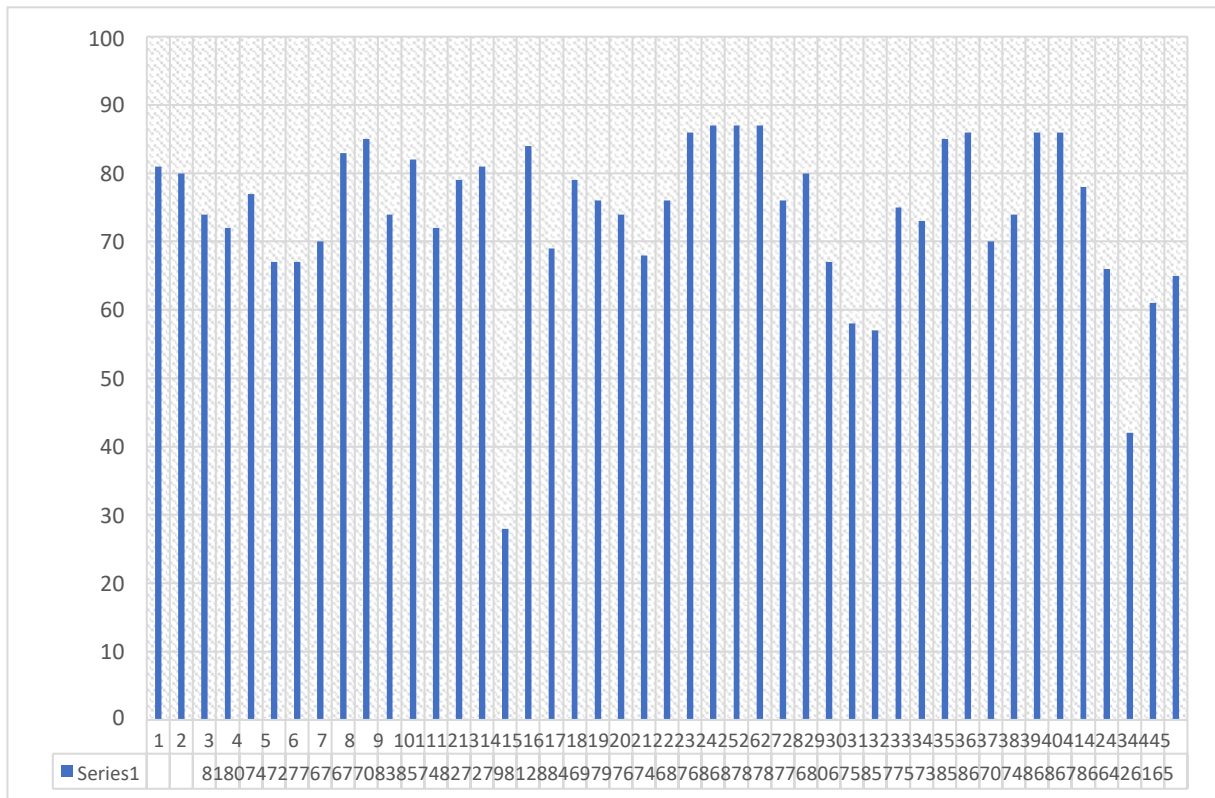


Figure 18 : valeurs des hypocalcémies en mg/l.

4.2.3 Hypercalcémie : $Ca^{++} > 108mg/l$

Au sein de notre population, nous constatons toujours une prédominance féminine des hypercalcémies avec un pourcentage de 53% versus 47% d'hommes présentant une hypercalcémie. (Figure 19).

Nous notons également que l'âge moyen des patients porteurs d'hypercalcémie est de 47 ans avec des extrémités d'âge entre 73ans et 1an. (Figure 20).

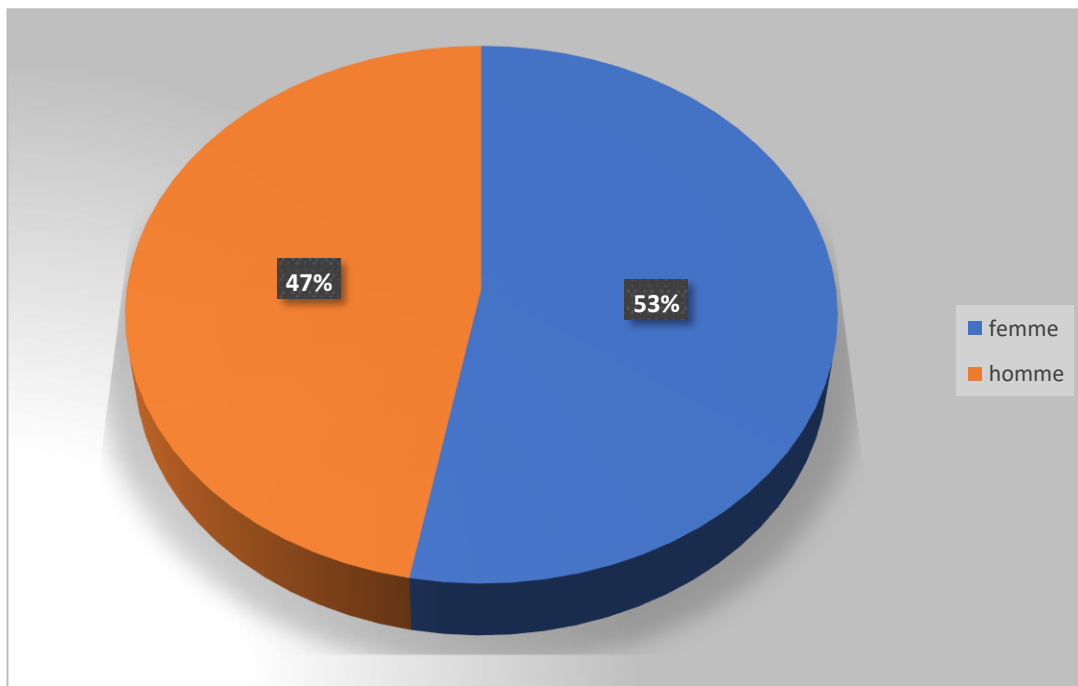


Figure 19 : répartition des hypercalcémies selon le sexe.

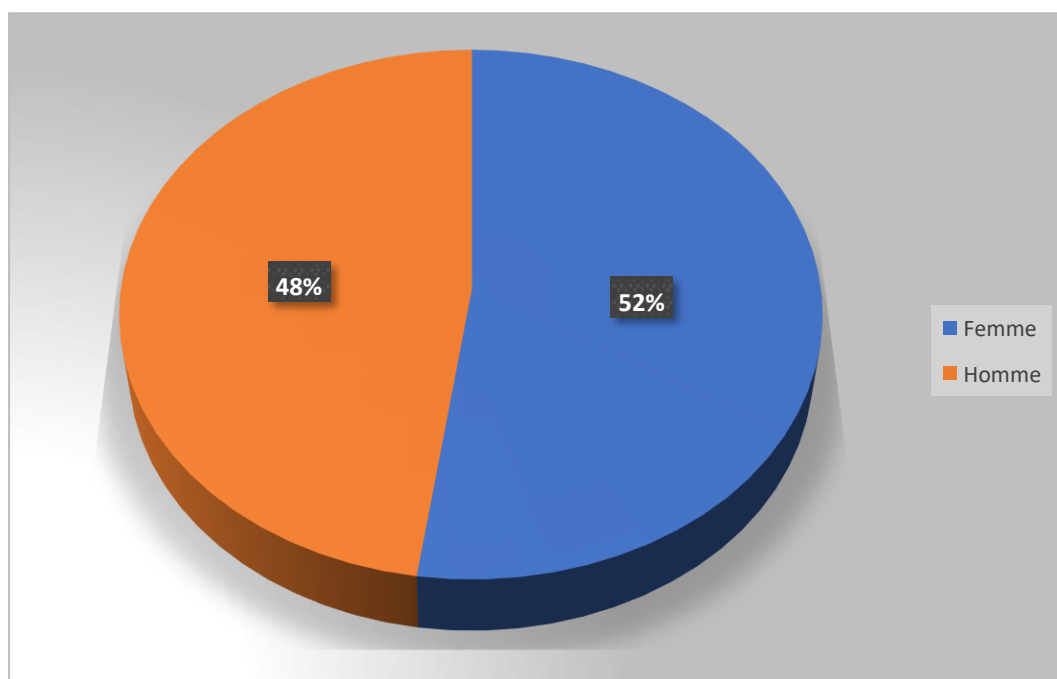


Figure 20 : répartition des hypercalcémies en fonction de l'âge.

- Au cours de la période de notre étude, nous n'avons pas rencontré un nombre important d'hypercalcémie. En effet, seuls 17 hypercalcémies ont été retrouvées avec une moyenne de 124,7mg/l (ET=13,97) (figure 21).

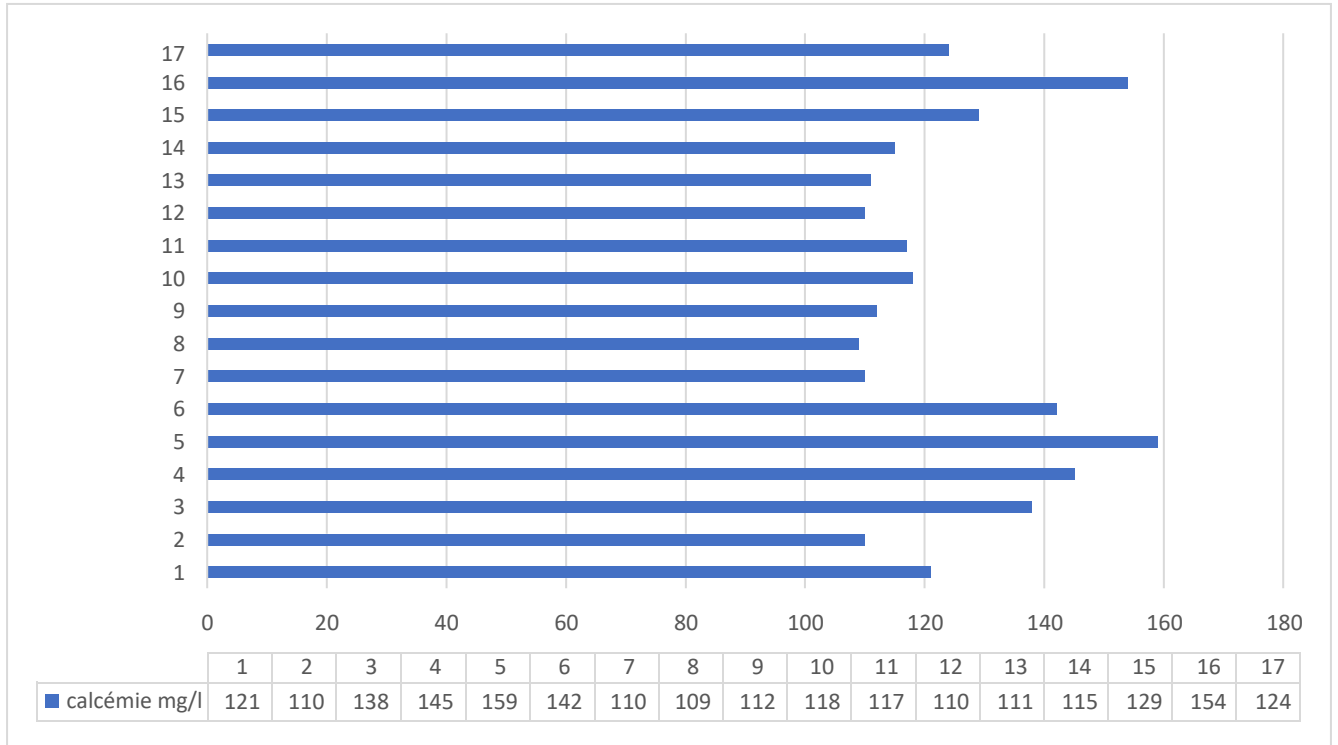


Figure 21 : valeurs des hypercalcémies en mg/l.

4.3 Etiologies des anomalies de la calcémie :

4.3.1 Répartition des principales étiologies de l'hypercalcémie (Figure 22)

Les principales étiologies trouvées concernant les hypercalcémies sont les troubles endocriniens et les cancers.

4.3.1.1 Troubles endocriniens :

Notre étude a inclus 6 patients qui avaient des troubles endocriniens, 4 femmes d'un moyen âge de 48ans, et 2 hommes d'un moyen âge de 73ans.

4.3.1.2 Cancer :

Trois patients que cette étude a regroupé, 2 femmes d'un moyen âge de 63 ans et un homme de 61ans.

4.3.1.3 Autres :

D'autres étiologies d'hypercalcémie ont été marqué comme : l'infection, des défauts d'excrétion rénale, détresse respiratoire, ischémie aigue. Prenons l'exemple de l'infection, notre étude a compris 4 patients qui ont une infection dont 75% sont des hommes, et 25% des femmes.

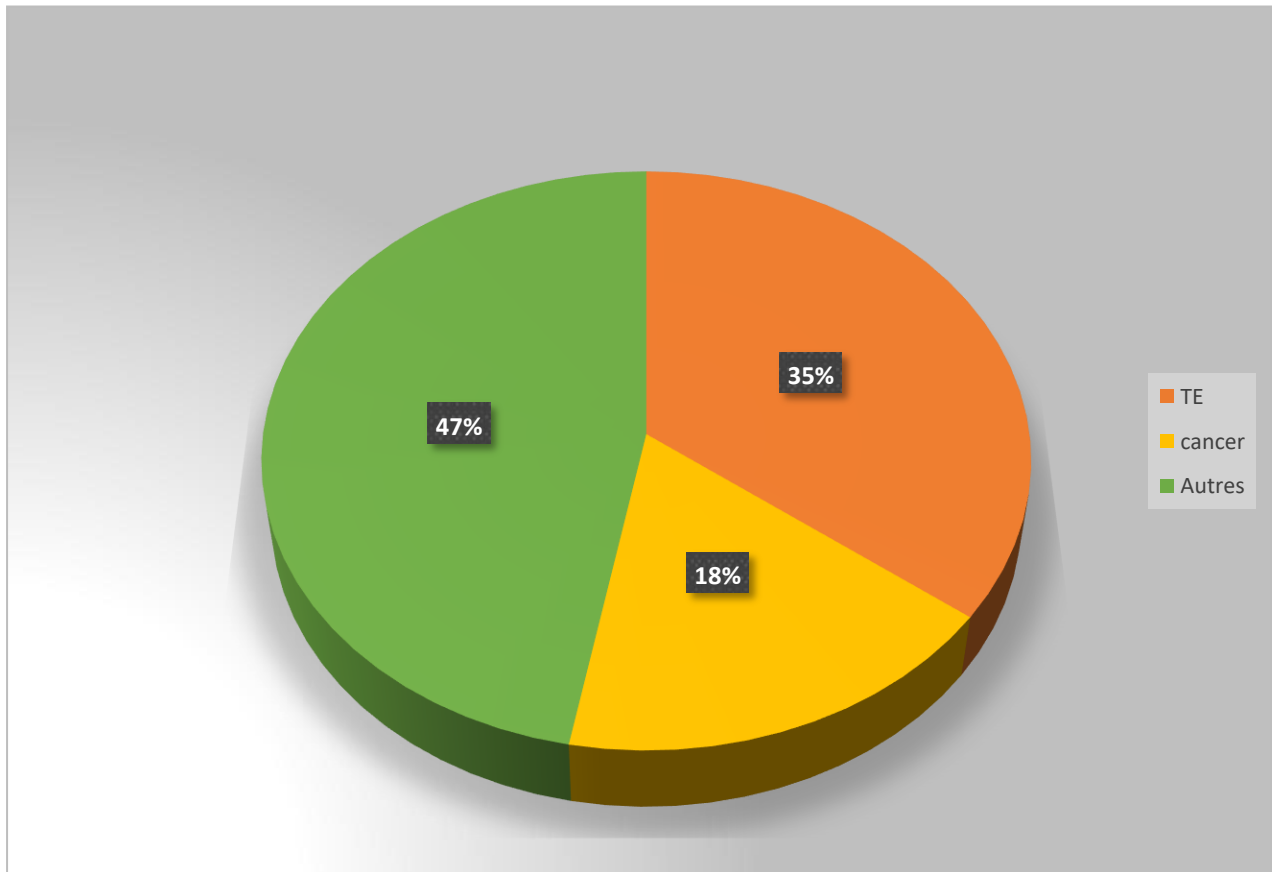


Figure 22 : Répartition des principales étiologies d'hypercalcémie

4.3.2 Répartition des principales étiologies de l'hypocalcémie

L'étiologie la plus retrouvée pour une hypocalcémie est l'insuffisance rénale, suivie par les pathologies néoplasiques et infectieuses.

4.3.2.1 Insuffisance rénale :

Notre étude a inclue 11 patients qui avaient une IR , 72% sont des femmes d'un moyen âge de 78 ans, et 27% sont des hommes d'un moyen âge de 65 ans.

4.3.2.2 Cancer :

Nous avons constaté 6 patients qui ont un cancer, dont 3 sont des femmes d'un moyen âge de 46ans et 3 hommes d'un moyen âge de 55ans.

4.3.2.3 Infection :

Huit patients ont présenté une pathologie infectieuse, dont 5 femmes d'un moyen âge de 41ans, et 3 hommes ayant comme âge moyen 60ans.

4.3.2.4 Autres :

Autres étiologies ont été marquées dont nous citons : les pertes (soit digestive ou cutanée), malabsorption, malnutrition surtout d'aliments riches en calcium.

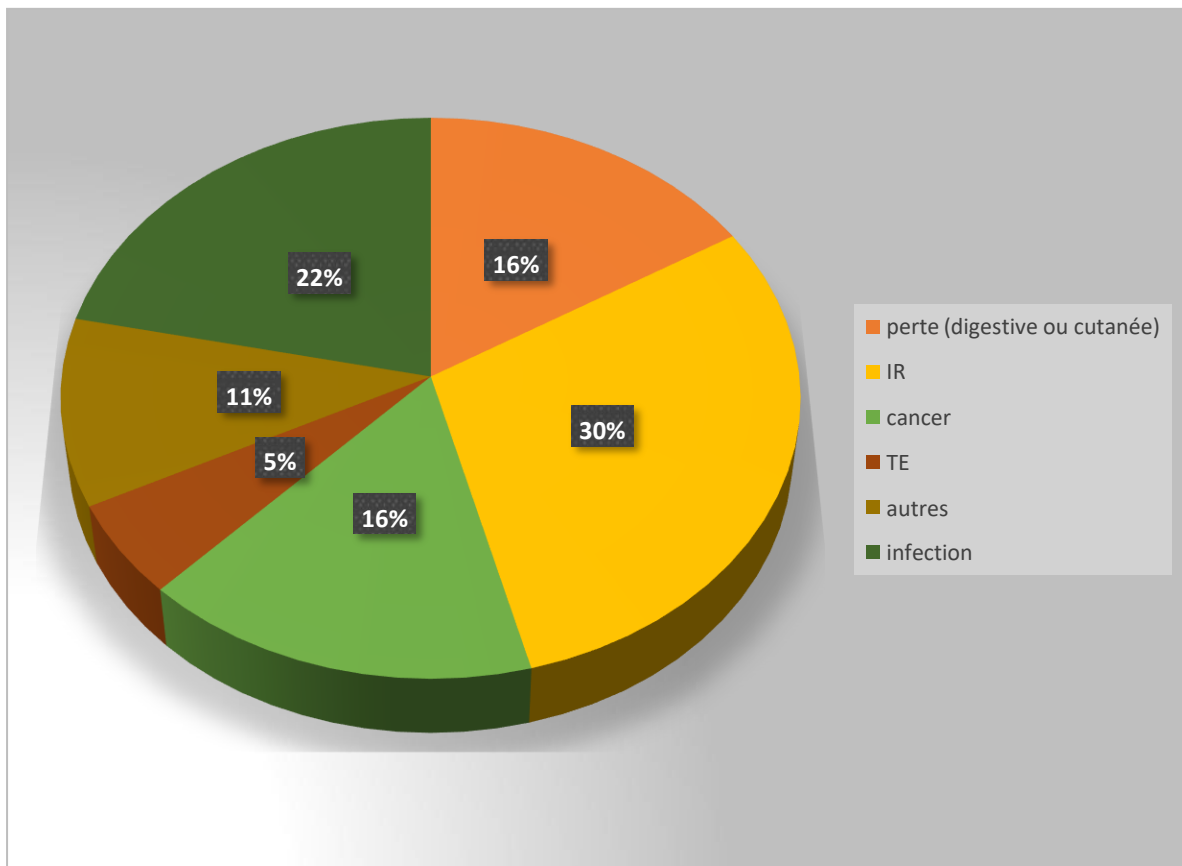


Figure 23 : Répartition des principales étiologies d'hypocalcémie.

Conclusion :

Au bout de notre cursus en licence « génie chimique », nous avons été chargés de réaliser un projet de fin d'étude. Notre travail s'est basé sur l'importance de **la spectrophotométrie** comme méthode de dosage de plusieurs paramètres, y compris **le calcium** que nous avons détaillé dans ce sujet. Ceci nous a mené à découvrir une nouvelle plateforme de développement et à enrichir notre savoir et notre expérience.

Au terme de ce travail au sein du laboratoire de CHU-Fès, ce stage m'a permis d'améliorer mes connaissances théoriques et pratiques, ainsi de se familiariser avec le milieu professionnel, avoir une vue permanente en temps réel sur la procédure par laquelle passent les analyses médicales dans **le domaine clinique** ainsi que la relation hiérarchique du personnel.

Au cours de la réalisation de ce travail, nous avons élaboré une étude sur la **spectrophotométrie** et plus précisément **la spectrophotométrie UV-visible** et son importance dans les dosages afin de mettre en évidence le calcium qui se dose par cette méthode analytique. Quant à ça on a fait une étude sur **un échantillon de 107 patients** dont on a noté la calcémie qu'on a bien discuté et analysé.

Bibliographie :

- [1] : Dunod, Paris, 2012
- [3] : Sabine Orsoni, professeur de biochimie chez lycée de la vallée de Chevreuse BTS, 2021.
- [4] : Haïba Lekhal, Per Einar Ellefsen, 2001-2002 ,la perception des couleurs par l'œil".
- [5] : Nathalie Mayer, journaliste
- [6] : L3 génétique moléculaire technique d'analyse de laboratoire Dr. Semmame.
- [7] : Le spectre électromagnétique, ATG start 2021.
- [8] : Antoine Lorenzi Benjamine Chaix, 2016.
- [9] : Véronique Parasote, 2000
- [10] : DYNAMIVE,
- [11] : Olivier CAUDRELIER, 2010.
- [13] : Techniques spectroscopiques, chapitre 1 ; EL HAJI, 2014.
- [14] : Cf. G. Bruat (2005), Optique, sixième édition, Dunod : § Spectrophotométrie.
- [15] : Dominique DI BENEDETTO, Philippe BREUIL, 2007
- [16] : Nicolas Lévy, Techniques expérimentales en Chimie, Anne-Sophie Bernard et al., Dunod, 2012
- [17] : Jean-Jacques ROUSSEAU 1998
- [18] : Yassine Mrabet, 27 décembre 2007.
- [20] : Yann, 2018.
- [21] : référées au du laboratoire de biochimie – CHU-Fès.
- [22] : Dominique DUTSCHER SAS
- [23] : Abbott Laboratoires, 2018
- [24] : Cf. G. Bruhat (2005), Optique, sixième édition, Dunod : § Spectrophotométrie
- [25] : Domaine public, Raziél, 29 mai 2005.
- [26] : ARCHITECT Abbot.

Webographie :

[2] : https://manuelnumeriquemax.belin.education/physique_chimie-premiere/topics/phychi1-ch02-034-a_dosage-spectrophotometrique-cours

[12] :

<http://www.fsr.ac.ma/DOC/cours/chimie/EI%20hajji/Cours%20SMC5%20Techniques%20Spectroscopiques%20dAnalyse.pdf>

[19] : <https://www.youtube.com/watch?v=aHg6LhVpZA0> consulté le 19 mai 2022.