

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID DE TLEMCCEN

Faculté des Sciences
Département de Chimie

Laboratoire de recherche de Spectrochimie et Pharmacologie Structurale

Mémoire

Post-Graduation de *Magister en Chimie*
Option : *Spectrochimie et Méthodes d'Analyse*

Thème

Recherche de la carence en vitamine D par Dosage du
Cholécalciférol par RP-HPLC chez les enfants de 12 à 56 mois dans
la wilaya de Tlemcen, CHU Tlemcen.

Présenté par: M^r KADARI MOHAMED

Soutenu en décembre 2009

Composition du jury

Mr Ziani Chérif Chewki	Président de jury	Maître de conférences A	U. A. B Tlemcen
Mr Bensaoula Abdelhakim	Examineur	Maître de conférences A	U. A. B Tlemcen
Mr Massen Zouhir	Examineur	Docent	U. A. B Tlemcen
Mr Dahmani Benamar	Encadreur	Maître de conférences A	U. A. B Tlemcen

Année Universitaire 2009/2010



Remerciements

écrit sous le N° :
date le: 24/01/2010
Code: 10.14

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Recherche en Spectrochimie et Pharmacologie Structurale à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen sous la direction du docteur DAHMANI Benamar. Je tiens ici à lui exprimer mes plus vifs remerciements et ma profonde reconnaissance pour m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail dans un environnement aussi enrichissant tant sur le plan scientifique que personnel.

Je tiens aussi à remercier vivement Mr DJELLOULI Omar pour sa permanente disponibilité, la pertinence et la qualité de ses conseils et avis sur les travaux que j'ai pu mené. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance la plus sincère.

Je tiens à remercier également l'ensemble des membres de jury, Dr ZIANI CHERIF Chawki en tant que président de jury, Dr BEN SAOULA Ahmed et Dr MASSEN Zoheir pour avoir mobilisé de leur temps pour examiner et juger ce travail, en tant qu'examineurs.

Qu'auraient été ces trois années sans la bonne ambiance qui règne au sein de l'équipe ? Pour cela, j'adresse ma profonde gratitude et assure mon amitié à RACHID a su comment souvent me remonter le moral, FOUZI, TAREK, MERIEM, IMAD, BEN SALEH, MUSTAPHA, SALAH

, AMINE, KHALED, ABD ELKADER et YAHIA pour nos fous rires et séances de papotage intensif, AISSA pour les moments de folies passés ensemble.

Enfin, au – delà du laboratoire, il y a la vraie vie. Les connaissances, les amis , la famille, qui ont tous, sans en être nécessairement conscients, joué à leur échelle un rôle important et rendu cette période fort supportable.

Bref, un grand merci à tous...
Mohamed KADARI

Sommaire

Introduction

Chapitre 1 : Biochimie et propriété de la vitamine D

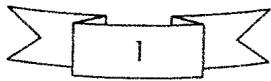
1. Les vitamines	5
2. Biochimie de la vitamine D	5
2.1 Métabolisme de la vitamine D	5
2.2 Source naturelle	7
2.3 Rôle physiologique	8
2.4 Fonction biologique	9
2.5 Vitamine D Binding Proteine DBP	10
2.6 Absorption intestinal	11
2.7 Evaluation de la carence en vitamine D	12
3. Chimie de la vitamine D	13
3.1 Nomenclature	13
3.2 Structure	15
3.3 Propriétés chimique	17
3.4 Propriétés spectroscopique d'absorption UV visible de la vitamine D	17
3.4.1 Excitation électronique et groupement fonctionnels	19
3.4.2 Types de transitions	19
3.4.3 Mesure expérimentale de l'absorbance	22
3.4.4 Limite de la loi de Beer Lambert	23

Chapitre 2 : Méthode de dosage de la vitamine D

1. Dosage de la vitamine D par RP-HPLC	25
1.1 Principe de la méthode	26
1.2 Description du système RP-HPLC utilisé	26
1.3 Mise en marche du système RP-HPLC	31
2. Analyse quantitative par chromatographie liquide à haute performance RP-HPLC	32
2.1 Principe	32
2.2 Etalonnage externe	32
2.3 Etalonnage interne	34

2.4 Détermination du degré de pureté de cholécalciférol	35
2.5 Identification du pic de cholécalciférol dans un échantillon de plasma	38
2.6 Préparation de la droite d'étalonnage externe	39
2.6.1 Matériels et réactifs	39
2.6.2 Préparation des solutions primaires	39
2.6.3 Préparation des solutions secondaire	40
2.6.4 Préparation des solutions étalons	41
2.7 Résultats	41
2.8 Discussion	44
2.9 Evaluation de la méthode	45
2.9.1 Linéarité	45
2.9.2 Limite de détection et de quantification	46
2.9.3 La répétabilité	47
2.9.4 La récupération	49
Chapitre 3 : Dosage des échantillons de plasma par RP-HPLC	50
1. Dosage des échantillons de plasma	51
1.1 Nature des échantillons	51
1.2 Traitement des échantillons	51
1.3 Résultats	53
1.4 Discussion	57
1.4.1 Distribution des hauteurs des pics	57
1.4.2 Variation de la température	58
Conclusion	61
Référence bibliographiques	63

Introduction



Les vitamines sont des substances organiques indispensables, sans valeurs énergétique propre que l'homme ne synthétise pas ou en quantité insuffisantes. Les structures moléculaires des vitamines sont variées, ce qui leur confère des propriétés physicochimiques différentes, leur solubilité dans les milieux aqueux ou lipidiques permet de les diviser en deux grands groupes : les vitamines liposoluble (A, E, D, K) et les vitamines hydrosolubles (groupe B, C).

La vitamine D3 ou cholécalciférol présente dans les produits d'origine animale, elle est synthétisée dans les couches basales de l'épiderme à partir de 7-déhydrocholestérol sous l'effet des rayonnements UV. Cette synthèse n'étant cependant pas suffisante pour couvrir les besoins, en particulier lors de faible exposition au soleil, un apport alimentaire est indispensable.

La vitamine D contrôle le développement des os dès les premières étapes de la différenciation prolifération cellulaire. En effet, la carence en vitamine D entraîne un rachitisme chez le jeune.

Le développement de la chromatographie liquide à haute performance au cours de ces dernières années a en effet permis d'ouvrir de nouveaux horizons pour la conception de méthodes très spécifiques pour le dosage de cette vitamine.

L'objectif de ce mémoire est de réaliser le projet d'étude du statut de ce micronutriment chez les enfants de la région de Tlemcen. Le thème de cette étude est « **Dosage des vitamines plasmatiques (Vit. D) par RP-HPLC dans des échantillons du service pédiatrie au CHU de Tlemcen** ». Ce projet est réalisé au laboratoire de recherche en Spectrochimie et Pharmacologie structurale de l'université Aboubekr Belkaid de Tlemcen de la faculté des sciences.

Le dosage de Cholécalciférol se fait par chromatographie liquide de partage à polarité en phase inversée RP-HPLC, qui est considérée comme la méthode analytique la plus utilisée et la plus fiable pour la mesure régulière de la concentration de cet élément dans le plasma. La quantification de cet élément est réalisée par un étalonnage externe.

Le présent manuscrit est réparti en trois chapitres :

- ❖ En premier chapitre, nous traitons la biochimie et les propriétés de la vitamine D ; dans cette partie on va montrer son origine, son métabolisme, ses actions physiologiques et les indicateurs d'évaluation de la carence en cette vitamine ainsi que ces propriétés spectroscopiques.

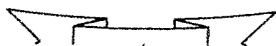
- ❖ Le deuxième chapitre nous explique la méthode de dosage de la vitamine D par la chromatographie liquide à haute performance.

- ❖ Pour le chapitre trois, on évoquera au dosage de la vitamine D dans des échantillons de plasma du service de Pédiatrie du CHU de Tlemcen en appliquant la méthode expliquée dans le deuxième chapitre.

- ❖ Finalement nous terminons avec la conclusion et les perspectives de nos recherches.

Chapitre I

Biochimie et propriétés de la vitamine D



1. Les vitamines

Les vitamines sont des substances organiques indispensables, sans valeur énergétique propre, que l'homme ne synthétise pas, ou en quantité insuffisante. Aujourd'hui, seules treize molécules répondent à cette définition : si elles ne sont pas apportées par l'alimentation, des troubles fonctionnels puis anatomiques apparaissent, qui s'avèrent fatals à plus ou moins longue échéance. Les vitamines ont des fonctions métaboliques variées, dont les mécanismes commencent à être mieux connus. De nombreuses études épidémiologiques ou expérimentales suggèrent que certaines d'entre elles avaient un rôle protecteur vis-à-vis du développement de certaines pathologies dégénératives.

Les structures moléculaires des vitamines sont variées, ce qui leur confère des propriétés physicochimiques différentes. Leur solubilité dans les milieux aqueux ou lipidiques permet de les diviser en deux grands groupes, les vitamines liposolubles (A, E, D, K) et les vitamines hydrosolubles (groupe B, C).

Cette classification rend relativement bien compte de la stabilité des vitamines : les vitamines liposolubles sont particulièrement sensibles à la lumière et à l'oxydation, alors que les vitamines hydrosolubles sont généralement plus sensibles à l'humidité, aux agents réducteurs, aux acides et aux bases [1].

2. La biochimie de la vitamine D

2.1. Métabolismes de la vitamine D

La vitamine D est très importante pour la croissance et la santé osseuse. Le terme vitamine est inapproprié pour la vitamine D qui doit être plutôt considérée comme une pro hormone [6]. En effet, la peau peut la synthétiser à partir du 7-déhydrocholestérol sous l'effet de certains rayonnements UVB (dont la longueur d'onde est comprise entre 290 et 315 nm). En situation d'exposition intense à un ensoleillement important, l'excès de prévitamine D₃ formé est transformé en composé inactif et il n'y a pas d'intoxication à la vitamine D suite à une exposition trop forte au soleil. La vitamine D existe sous deux formes, la vitamine D₃ (Cholécalciférol) qui est la molécule synthétisée par la peau sous l'influence des UVB ou retrouvée dans les rares sources alimentaires animales (poissons gras en particulier) et la vitamine D₂ (Ergocalciférol) qui est la vitamine D des plantes.



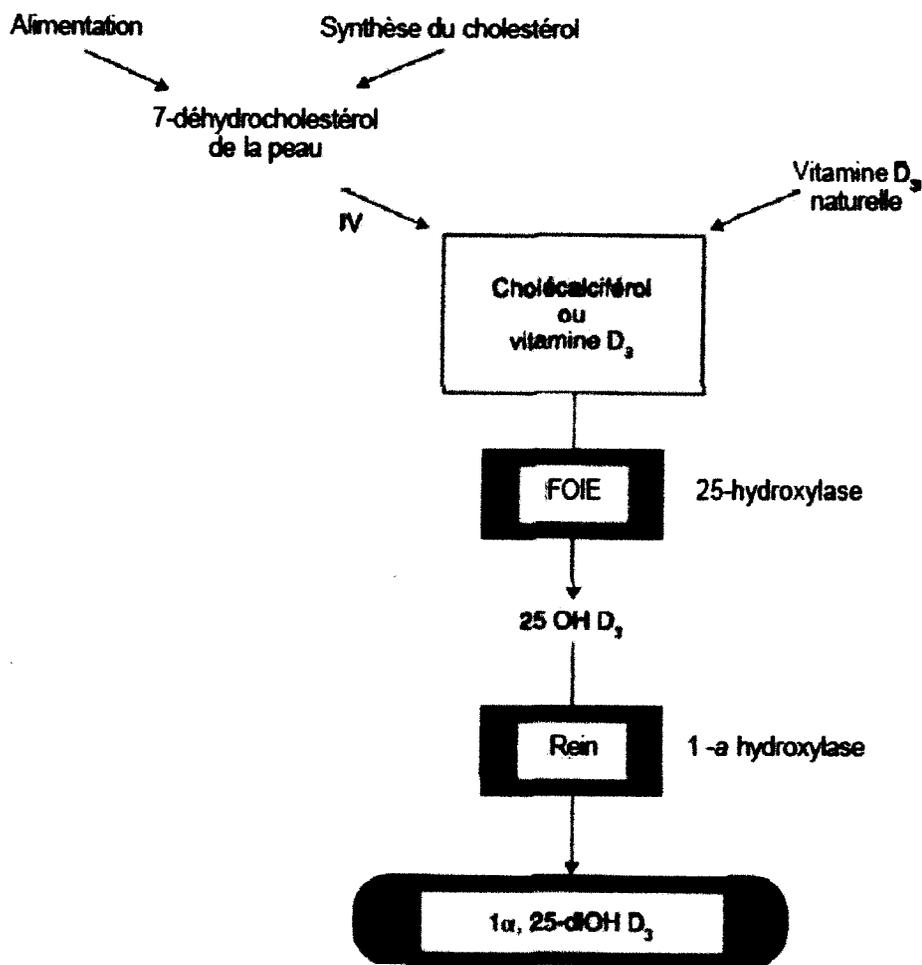


Figure 1.1 : Métabolisme de la vitamine D3 [3].

2.2. Sources naturelles de vitamine D

Très peu d'aliment contiennent naturellement des quantités significatives de vitamine D (Tableau 1). D'une part, la D2 naturelle d'origine végétale est synthétisée à partir de l'ergostérol: l'ergocalciférol est donc d'origine exogène uniquement. D'autre part, la D3 naturelle d'origine animale est synthétisée dans l'épiderme et le derme sous l'action des UVB solaires : le cholécalciférol est donc d'origine endogène et exogène.

La source principale de vitamine D chez l'homme provient de l'exposition au soleil (90-95%). Durant cette exposition, les rayonnements UVB (290-315 nm) photolysent le 7-déhydrocholestérol (7-DHC) de l'épiderme en prévitamine D3. Une fois formé, celle-ci subit une isomérisation thermique pour former la D3 [4].



Parmi les spécialités médicamenteuses, certaines sont de la vitamine D2 et d'autre de la vitamine D3. Qu'elle soit synthétisée par la peau ou apportée par l'alimentation, la vitamine D (D2 ou D3) est transportée dans le sang par une protéine porteuse, la « vitamin D binding protein » (DBP), jusqu'au foie où elle est hydroxylée sur le carbone 25 pour former la 25-hydroxy-vitamine D (25OHD) (Figure 1.3).

La 25OHD circule dans le sang avec une demi-vie de l'ordre de 3 à 4 semaines. Elle entre dans les cellules du tubule proximal rénales, soit sous sa forme libre (non lié à la DBP), soit associée à la DBP en se liant à une protéine de surface, la Mégaline. Grâce à une enzyme, la 1 alpha hydroxylase (CYP27B1) ; la 25OHD y'est hydroxylée sur le carbone 1 pour former la 1,25-dihydroxy-vitamine D [1,25(OH)₂D] ou calcidiol.

La 1,25(OH)₂D est le métabolite actif de la vitamine D [7] et sa demi-vie dans le sérum est de quatre heures environ, il existe par ailleurs une voie d'inactivation de la vitamine D via une enzyme, la 24 hydroxylase (CYP24) qui induit la production de composés inactifs [24,25(OH)₂ vitamine D et 1,24,25(OH)₃ vitamine D] transformés ensuite en acide calcitroïque inactif [2].



Tableau 1.1 : Aliments contenant naturellement de la vitamine D [4].

Aliment	Teneur en UI par 100 g
Huile de flétan (D3)	200 000
Huile de foie de morue (D3)	8 500
Anguille de mer (D3)	520
Anguille de rivière fumée (D3)	3 600
Cabillaud (D3)	50
Flétan (D3)	200
Flétan noir (D3)	600
Hareng (D3)	1 250
Loup de mer (D3)	20
Maquereau (D3)	40
Sardine (D3)	300
Saumon (D3)	650
Saumon en conserve (D3)	450
Sébaste (D3)	90
Sole (D3)	60
Thon (D3)	200
Huitre (D3)	300
Beurre (D3)	50
Margarine (D3)	300
Crème fraîche (D3)	40
Foie de veau (D3)	130
Foie de volaille (D3)	50
Lait entier (D3)	1
Fromage (D3)	De 10 à 20
Œuf (D2 et D3)	70
Jaune d'œuf liquide (D2 et D3)	220

2.3. Rôle physiologique

La vitamine D joue un rôle important dans le métabolisme phosphocalcique : elle agit essentiellement au niveau de l'intestin en stimulant l'absorption intestinale du calcium (Ca) et du phosphore (P), entraînant une augmentation de la calcémie et de la phosphorémie. Ainsi, une carence profonde en vitamine D se traduit par un déficit de minéralisation de l'os, appelé rachitisme chez l'enfant et ostéomalacie chez l'adulte.

Tout fois, de nombreux autres tissus de l'organisme sont équipés de récepteurs à la vitamine D [8] et de l'enzyme (1 α -hydroxylase) capable de transformer la 25(OH)D en 1,25(OH)₂D, hormone active capable d'agir comme un véritable facteur de croissance.

Ainsi, de nombreuses études, rétrospectives, ont suggéré un rôle important de la vitamine D dans plusieurs processus physiologiques autres que le métabolisme osseux et



associent le déficit en vitamine D à la prévalence de nombreuses maladies (cancers, maladies auto-immunes comme la sclérose en plaque, le diabète de type 1, la polyarthrite rhumatoïde, l'HTA etc.)

Une métaanalyse récente colligeant des études ayant utilisé une supplémentation en vitamine D à différentes fins a retrouvé une diminution de la mortalité totale d'environ 10% chez les sujets ayant reçu de la vitamine D comparés à ceux des groupe placebo.

Par ailleurs, des études d'intervention ont montré que la vitamine D pouvait réduire significativement le risque relatif de fractures périphériques et de chutes chez les sujets âgés [9]. Enfin, une étude publiée en 2007 a montré, chez 1179 femmes en bonne santé ménopausées, suivies 4 ans que dans un groupe traité par 1100 UI/J de vitamine D3 (dose élevées), comparé à un groupe contrôle sous placebo, le nombre de cancers était réduit de manière très significative : -60% ou -80% si l'on ne considère que les trois dernières années de l'étude [5].

2.4. Fonctions biologiques

L'effet du Calcidiol est de fournir des quantités suffisantes de calcium et de phosphore au niveau de l'os [10] pour permettre la minéralisation de ce dernier.

Elle agit surtout sur l'intestin et sur l'os :

- Au niveau de l'intestin elle favorise l'absorption du calcium et du phosphore.
- Au niveau de l'os la carence en vitamine D entraîne un défaut de minéralisation du tissu ostéoïde responsable du rachitisme chez l'enfant et de l'ostéomalacie chez l'adulte [3].



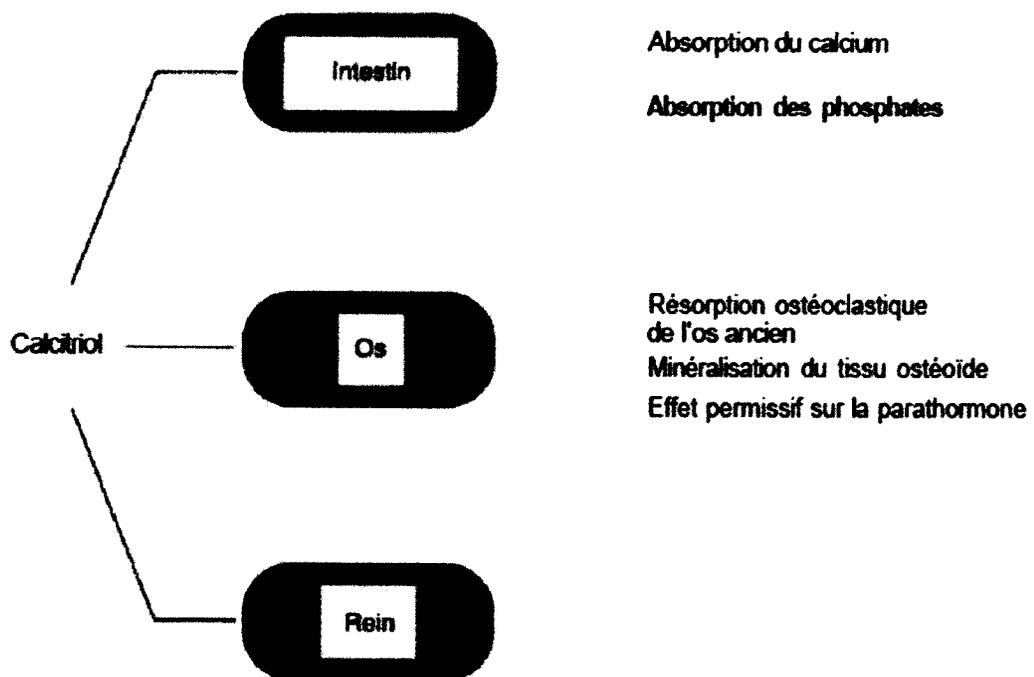


Figure 1.2 : Fonctions biologiques du calcitriol

2.5. Vitamine D binding protéine DBP

Cholécalciférol, calcidiol, calcitriol et 24 hydroxycalcidiol sont tous transportés dans le plasma par une protéine qui s'appelle vitamine D binding protéine. Il y'a trois formes importantes de DBP avec les structures primaires différentes et un certain nombre de variantes mineures de chacun en raison des différences dans la Glycosylation postsynthétique. IL y'a polymorphisme considérable parmi les populations humaines ; pour cette raison, la DBP a été étudiée pour son intérêt pour la génétique de population et également sa valeur potentielle dans la médecine légale. Toutes les variantes lient la vitamine D et ses métabolites avec l'affinité semblable.

Il est remarquable que l'absence de la DBP n'ait été jamais détectée, suggérant qu'une suppression de cette protéine puisse être mortelle. Cholécalférol est également transporté en lipoprotéines de plasma, de sorte qu'environ 60% soit normalement lié au DBP et 40% aux lipoprotéines.

C'est seulement que la partie spécifique aux lipoprotéines qui est prise par le foie pour l'hydroxylation 25 (Haddad et autres, 1988). En plus de son rôle dans le



transport de la vitamine D en plasma, la DBP représente le dépôt principal pour la vitamine D, principalement comme calcidiol.

La DBP a une affinité plus élevée pour le calcidiol et 24 hydroxycalcidiol que pour le calcitriol ou le cholécalciférol. La concentration en plasma du DBP est de 6 mmole /l [11] considérablement plus haut que les concentrations d'autres protéines, comme la Thyroxine binding protéine (300µmole/l), Cortisol binding protéine (800µmole/l), ou l'hormone sexuelle (40µmole/l pour les males et 80µmole/l pour les femelles), et loin au dessus de vitamine D circulée [12].

2.6. Absorption intestinal

En nature, seulement quelques nourritures contiennent la vitamine D : huiles de foie de poisson, poissons gras, et jaune d'œuf. Plusieurs pays pratiquent la fortification de nourritures avec la vitamine D, aux Etats-Unis, le lait est le composant diététique principal qui est sujet à la fortification avec la vitamine D2 ou la vitamine D3. Cependant, la quantité de la vitamine D peut varier.

Les études ont prouvé que jusqu'à 80% d'échantillons de lait essayés n'a pas contenu 80% à 120% de la vitamine D, et environ 14% n'a eu aucune vitamine D. Dans d'autre pays, des céréales, de la margarine, et des pains ont supplémente par la vitamine D.

Quand la vitamine D est ingérée, ce composé soluble dans la graisse est incorporé à la fraction de chylomicron, et environ 80% est absorbé dans le système lymphatique.

Après l'ingestion d'une dose unique de 50000 UI de la vitamine D, les concentrations de circulation de la vitamine D commencent à augmenter dans des heures, font une pointe à 12 heures, et diminuent graduellement à la ligne de base proche de 72 heures.

Cet essai provocateur d'absorption de la vitamine D a été utile en déterminant si un patient présentant un syndrome de malabsorption intestinal est capable d'absorber cette vitamine liposoluble.

Une prise de sang est dessinée juste avant et après 12 ou 24 heures une administration par voie orale simple de 50000 UI de la vitamine D.

Si on n'observe aucune altitude dans la concentration circulante de la vitamine D, on devrait suspecter la malabsorption complète de la vitamine D ; Cependant, n'importe



quelle augmentation de la concentration circulante de la vitamine D reflète l'absorption de cette vitamine, et la dose de cette vitamine peut donc être travaillée en conséquence.

2.7. Evaluation De la carence en vitamine D

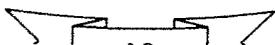
Plusieurs facteurs influent sur la suffisance en vitamine D. La vitamine D₃, tributaire de la lumière de soleil, est produite par des précurseurs cutanés en réponse aux rayons ultraviolets.

L'exposition au soleil varie considérablement et dépend de facteurs comme la latitude, la pigmentation de la peau, les vêtements et l'utilisation d'écran solaire.

L'évaluation des concentrations des métabolites de la vitamine D est comme suit :

Tableau 1.2 : Concentration plasmatique des métabolites de la vitamine D [12]

		nmol/L
Cholecalciferol		1.3-156
24-Hydroxycalcidiol		2-20
Calcitriol		0.038-0.144
Calcidiol	Adults, summer	37-87
	Adults, winter	20-45
	Adults with osteomalacia	<10
	Children, summer	50-100
	Children, winter	27-52
	Children with rickets	<20
	Risk of hypercalcemia	>400



3. Chimie de la vitamine D

3.1 Nomenclature

Bien que tous les composés avec l'activité de la vitamine D puissent être décrits utilisant un nom stéroïde semi systématique.

Les noms tendent à être encombrants pour l'usage général. Un nouveau et plus court nom pour (5R, 10R)-9,10- secocholestane a été considéré en tant que molécule apparente.

Mais on l'a décidé que le rapetissement réalisé n'était pas en valeur de rupture impliquée dans le changement.

La confusion principale dans l'application de la règle stéroïde 2S-8.1 aux dérivés de la vitamine D et que les descripteurs « α » et « β » appliquez seulement quand l'anneau A est orienté comme dans le stéroïde de parent.

Bien que la vitamine soit souvent représentée dans sa conformation alternative [comparez (1) à (2)] nous recommandons que ces descripteurs devraient ne jamais être appliqués pour le cycle A ou à C-6 ou à C-7 des composés de la vitamine D.

Des centres chiraux devraient être indiqués R ou S et des doubles liaisons E ou Z, des exemples sont donnés dans le tableau (1.3).

En raison de la nature des règles d'ordre il n'est pas possible de transférer R ou S à partir d'un composé à ces dérivés, des exemples des effets de ceci sont montrés dans la figure (1.3).

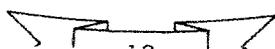


Tableau 1.3 : Nomenclature des composés de la vitamine D

Current trivial name	Recommended trivial name	Systematic steroid name ^a
Cholecalciferol	calcioi or cholecalciferol	(5Z,7E)-(3S)-9,10-seco-5,7,10(19)-cholestatrien-3-ol
25-Hydroxycholecalciferol	calcidiol	(5Z,7E)-(3S)-9,10-seco-5,7,10(19)-cholestatriene-3,25-diol
1 α ,25-Dihydroxycholecalciferol	calcitriol	(5Z,7E)-(1S,3R)-9,10-seco-5,7,10(19)-cholestatriene-1,3,25-triol
Ergocalciferol	ercalcioi or ergocalciferol	(5Z,7E,22E)-(3S)-9,10-seco-5,7,10(19),22-ergostatetraen-3-ol ^b
1 α ,25-Dihydroxyergocalciferol	ercalcitriol	(5Z,7E,22E)-(1S,3R)-9,10-seco-5,7,10(19),22-ergostatetraen-1,3,25-triol ^c
22,23-Dihydroergocalciferol	(24S)-methylcalcioi or 22,23-dihydroercalcioi	(5Z,7E)-(3S)-9,10-seco-5,7,10(19)-ergostatrien-3-ol ^c
1 α ,24R,25-Trihydroxycholecalciferol	calcitetrol	(5Z,7E)-(1S,3R,24R)-9,10-seco-5,7,10(19)-cholestatriene-1,3,24,25-tetrol
Previtamin D ₃	(6Z)-tacalcioi	(6Z)-(3S)-9,10-seco-5(10),6,8-cholestatrien-3-ol
Tachysterol ₃	tacalcioi	(6E)-(3S)-9,10-seco-5(10),6,8-cholestatrien-3-ol
Isovitamin D ₃	(5E)-isocalcicoi	(5E,7E)-(3S)-9,10-seco-1(10),5,7-cholestatrien-3-ol
Dihydrotachysterol ₃	dihydroercalcioi	(5E,7E)-(3S,10S)-9,10-seco-5,7-cholestadien-3-ol

^a To conform with the convention used in the Steroid Rules (Rule 2S-4.1.1 [4]) and IUPAC Nomenclature of Organic Chemistry [7] double bond locants are cited before the stem name.

^b 24R-configuration.

^c 24S-configuration.

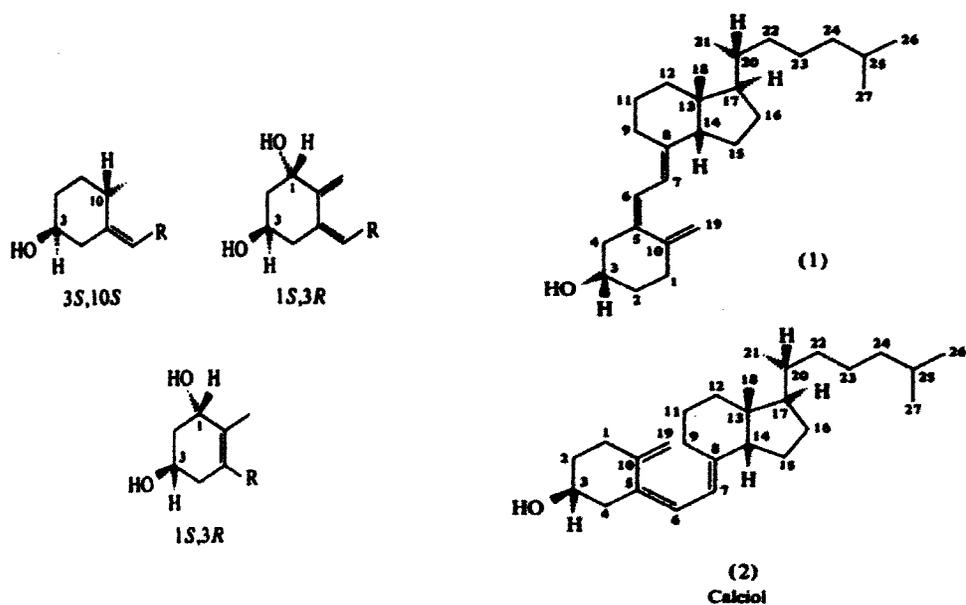


Figure 1.3 : exemple en stéréochimie du cycle A [14].

3.2 Structure

La vitamine D se rapporte à une famille des composées qui possèdent l'activité antirachitique. Des membres de la famille sont dérivés du système d'anneau de cyclopentanoperthydrophenanthrane, ce qui est commun à d'autres stéroïdes, tels que le cholestérol, la vitamine D a seulement trois anneaux intacts ; l'anneau B a subi la fission de la liaison entre les carbones 9 et 10, ayant pour résultat le système conjugué de triène des doubles liaisons qui est possédé par toutes les vitamines de D, la structure de la vitamine D₃ est montrée dans la figure (1.4).

Les membres naturels de la famille de la vitamine D diffèrent entre eux seulement dans la structure de leurs chaînes latérales ; les structures des chaînes latérales des divers membres de la famille de la vitamine D sont données dans le tableau (1.3).

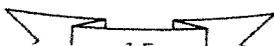
Du travail cristallographique de rayon X de Crowfoot-Hodgkin (Prix Nobel), on le sait maintenant que le système de diène de la vitamine D qui s'étend de C₅ à C₈ est transoïd et presque planaire. Cependant, le système diène qui s'étend de C₆ à C₁₉ est cisoïd et planaire et la double liaison C₁₀-C₁₉ est tordu hors de plan par un angle de 60° et la configuration de l'anneau A est une configuration de chaise.

Il est également connu que les anneaux C et D sont rigides et que la chaîne latérale préfère une longue configuration.

En 1974, Okmura et autres ont indiqué que la vitamine D et ses métabolites ont un niveau important de mobilité conformationnelle.

Et par l'utilisation de la résonance magnétique nucléaire (RMN), ils ont été capables de détecter que l'anneau A subi rapide interconversion entre les deux conformations chaise. C'est une conséquence directe de la rupture de la liaison C₉-C₁₀ de l'anneau B qui sert à libérer l'anneau A.

En raison de cette mobilité, des substituant sur l'anneau A sont rapidement et conformationnellement alterner entre les positions axiales et équatoriales [15].



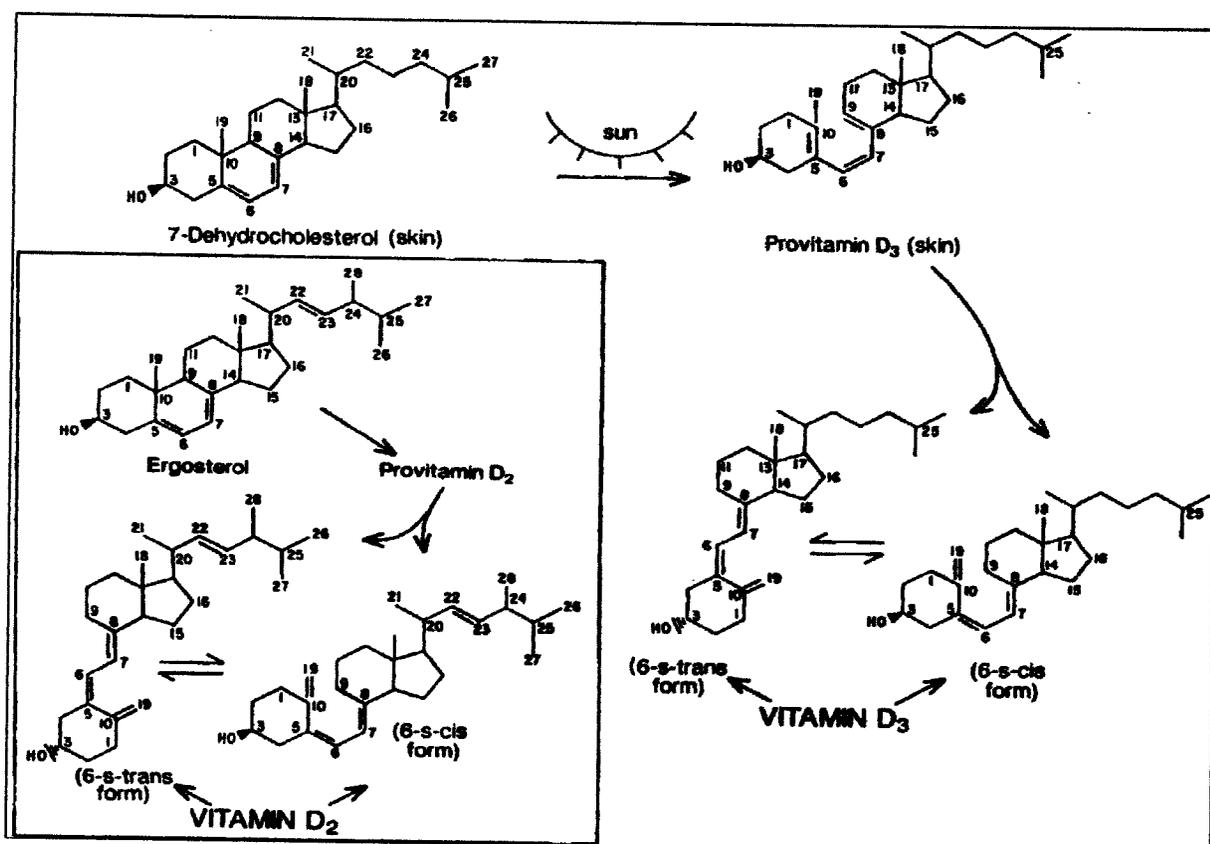
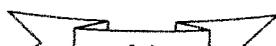


Figure 1.4 : La chimie et la voie de l'irradiation pour la synthèse de la vitamine D₃ (un processus naturel) et de la vitamine D₂ (un procédé commercial).

Tableau 1.3 : Chaînes latérales de la provitamine D.

Provitamin trivial name	Vitamin D produced upon irradiation	Empirical formula (complete steroid)	Side chain Structure
Ergosterol	D ₂	C ₂₈ H ₄₄ O	
7-dehydrocholesterol	D ₃	C ₂₇ H ₄₄ O	
22,23-dihydroergosterol	D ₄	C ₂₈ H ₄₆ O	
7-dehydrositosterol	D ₅	C ₂₉ H ₄₈ O	
7-dehydrostigmasterol	D ₆	C ₂₉ H ₄₆ O	
7-dehydrocompesterol	D ₇	C ₂₉ H ₄₆ O	



3.3. Propriétés chimiques

- Vitamine D3 (C₂₇ H₄₄ O).
- Trois doubles liaisons.
- Point de fusion 84-85°C.
- Masse moléculaire 384.65 g/mole.
- Insoluble dans l'eau.
- Soluble dans le Benzène, le chloroforme, l'éthanol et l'acétone.
- Instable à la lumière.
- Oxydable en cas d'exposition à l'air et à 24°C pendant 72h [15].

3.4. Propriétés spectroscopique d'absorption UV-Visible de la vitamine D

La lumière est une onde électromagnétique composée de deux vecteurs oscillant : un champ électrique \vec{E} et un champ magnétique \vec{H} . Ces deux champs sont orientés perpendiculairement l'un à l'autre, et perpendiculairement à la direction de la propagation de l'onde.

Le spectre complet des ondes électromagnétique est continu, comme le montre le schéma ci-dessous. En examinant ce spectre, on constate que la région analytique de la lumière ultraviolette et visible ne représente qu'une infime partie de ce spectre. La région de l'ultraviolet se situe de 200 à 350 nm, tandis que celle du visible s'étend de 350 à 800 nm.

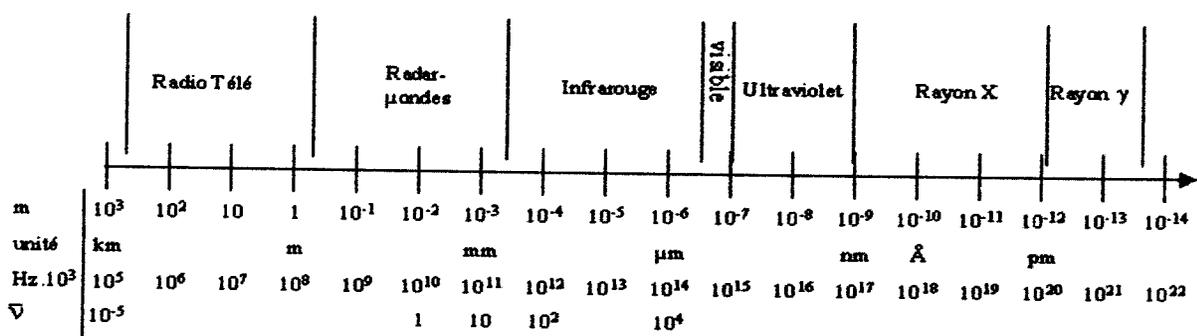
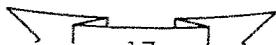


Figure 1.5 : Spectre du rayonnement électromagnétique.

L'énergie qui possède une onde électromagnétique est reliée à sa fréquence de propagation par l'équation de Planck qui est la suivante :



$$E = h\nu$$

Où :

h : Constante de Planck ($h = 6,63 \times 10^{-34}$ j.s)

ν : Fréquence du rayonnement (s^{-1}).

D'autre part, la fréquence d'une onde électromagnétique est reliée à sa longueur d'onde par la relation suivante :

$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$

L'équation de Planck montre donc que l'énergie lumineuse est proportionnelle à la fréquence de l'onde et inversement proportionnelle à sa longueur d'onde :

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = hc\bar{\nu}$$

Où :

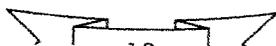
c : Vitesse de la lumière dans le vide ($c = 3.10^8$ m s^{-1}).

λ : Longueur d'onde (m).

$\bar{\nu}$: Nombre d'onde (m^{-1}).

3.4.1. Excitation électronique et groupement fonctionnels

Lorsqu'un composé est exposé à des radiations lumineuses dans la région ultraviolette ou visible, il peut absorber une quantité spécifique d'énergie lumineuse. On dit que la molécule subit une excitation électronique, parce que certains électrons de la molécule sont projetés de leur orbitale normale (état fondamental) E_0 à une orbitale de niveau supérieur (état excité) E_1 .



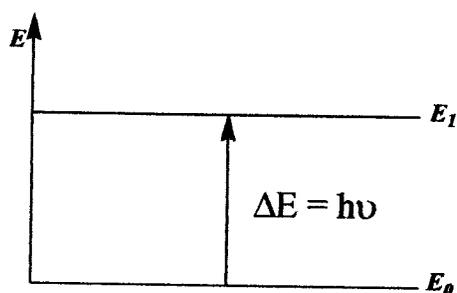


Figure 1.6 : Transition entre deux niveaux énergétiques.

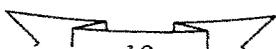
Pour un composé donné, l'énergie nécessaire à une excitation électronique doit correspondre à la différence d'énergie entre l'énergie de l'état fondamental et celle de l'état excité :

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu$$

L'équation de Planck montre qu'un composé spécifique ne peut être excité qu'à une fréquence ou à une longueur d'onde bien précise. La longueur d'onde d'absorption dépend fortement de la nature des orbitales mises en jeu σ , n et π . Les électrons les plus facilement excitables dans un composé sont les électrons π des doubles liaisons et les électrons n , c'est-à-dire les doublets d'électrons libres sur la couche périphérique des hétéro atomes (N, O, S). Ces électrons sont portés par les groupements fonctionnels qu'on appelle chromophores.

3.4.2. Types de transitions

A l'état fondamental les électrons occupent les orbitales liantes de haute énergie (σ , π ou n), Après excitation électronique, l'électron peut promouvoir à occuper une orbital anti liante de plus basse énergie de l'état excité (σ^* , π^*). Les types de transitions permises sont comme suite :



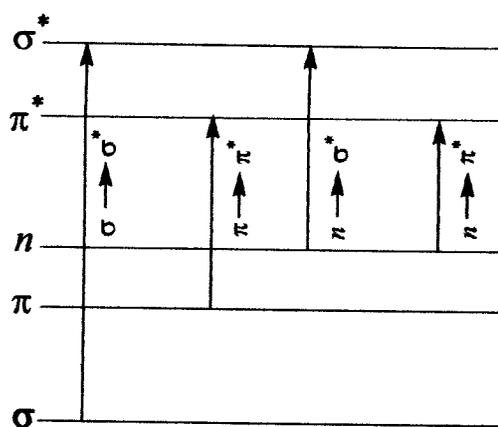


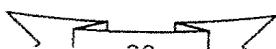
Figure 1.7 : Types de transitions électroniques.

Les transitions $\sigma \rightarrow \sigma^*$ se situent dans l'ultraviolet lointain (vers 130 nm) et ne sont pas exploitées en chimie analytique, car les solvants commencent à absorber, mais également les molécules de l'air rendant la mesure plus que délicate, tandis que les transitions $n \rightarrow \sigma^*$ se situent à l'extrême limite du proche ultraviolet.

La plupart des applications de spectroscopie d'absorption aux composés organique sont basées sur les transitions $n \rightarrow \pi^*$ et $\pi \rightarrow \pi^*$, parce que l'énergie qu'elles requièrent correspond à un domaine facilement accessible expérimentalement (200 à 700 nm) [20].

Les transitions $n \rightarrow \pi^*$ qui sont rencontrés, dans le cas des molécules, comportent un hétéro atome porteur de doublets électroniques libres appartenant à un système insaturé comme pour le groupement carbonyle, dont la bande est observable entre 270 et 280 nm.

Les transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ concernent les composés, qui possèdent une double liaison éthylénique isolée, dont la position de la bande d'absorption peut être affectée par l'effet du solvant ou de la conjugaison.



Dans le cas de la vitamine D, l'effet de conjugaison est très observé, son maximum d'absorption se situe à 265 nm. Le spectre d'absorption UV caractéristique de la vitamine D3 (Cholécalciférol) est montré dans la figure (1.8).

3.4.3. Mesure expérimentale de l'absorbance

L'utilisation de la spectroscopie dans les analyses quantitative est devenue possible grâce à la création d'instruments capables de mesurer l'atténuation du rayonnement.

Lorsqu'un faisceau lumineux monochromatique traverse une cuvette contenant un composé en solution, l'intensité de la lumière incidente I_0 est diminuée si le composé absorbe une certaine quantité de lumière I_A .

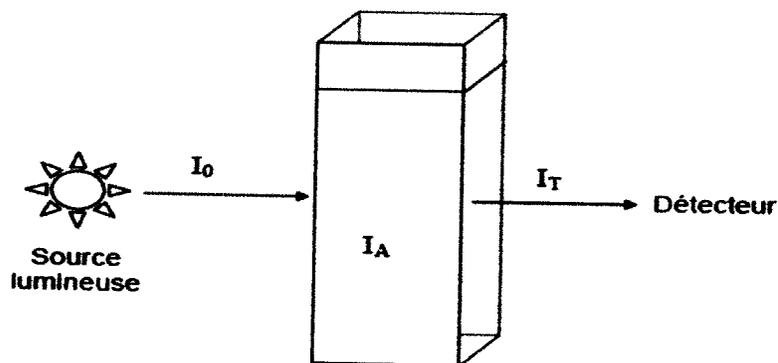


Figure 1.9 : Principe de mesure de l'atténuation du rayonnement.

Si I_0 représente l'intensité du rayonnement incident et I_T l'intensité de la lumière transmise, la transmittance T de milieu est défini comme la fraction du rayonnement incident qui est transmise par ce milieu, elle est défini comme suit :

$$T = \frac{I_T}{I_0}$$

L'absorbance A d'une solution est défini par l'équation :

$$A = -\text{Log}T = \text{Log} \frac{I_0}{I_T}$$

On remarque que, au contraire de la transmittance, l'absorbance augmente avec l'augmentation de l'atténuation. L'absorbance d'un rayonnement monochromatique est proportionnelle au trajet optique dans le milieu et à la concentration de l'espèce absorbante selon la loi de Beer-Lambert :



$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

c : Concentration de l'espèce absorbante (mol/l)

l : Trajet optique (cm).

ε : Coefficient d'absorption molaire ($L \cdot cm^{-1} \cdot mol^{-1}$)

Cette loi, peu être appliquée aussi dans le cas des mélanges contenant plus d'une substance absorbante, à condition qu'il n'y ait aucune interaction entre les diverses espèces. L'absorbance est additive dans ce cas selon l'équation :

$$A_T = \varepsilon_1 c_1 l + \varepsilon_2 c_2 l + \varepsilon_3 c_3 l + \dots \varepsilon_n c_n l$$

$$A_T = l \times \sum_{i=1}^n \varepsilon_i c_i$$

3.4.4. Limite de la loi de Beer Lambert

La loi de Beer-Lambert ne décrit correctement les propriétés d'absorption que les solutions diluées ; en ce sens c'est une loi limite [20]. Ainsi, aux concentrations supérieures à 0.01 mol/l, les interactions électrostatiques modifient le coefficient d'absorption molaire [17]. D'autres facteurs contribuent à cette limitation, comme la présence de lumière parasite, ou la présence de particules qui dispersent la lumière. Aussi cette loi ne s'applique pas aux rayonnements polychromatiques.



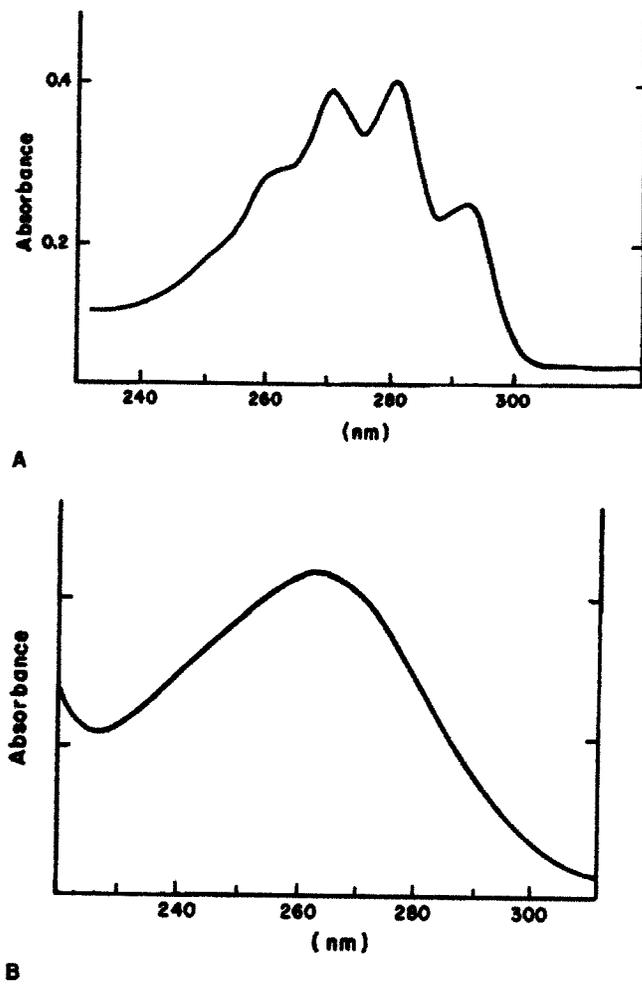


Figure 1.8 : A. Le spectre UV de la provitamine D et la vitamine D

B. Le spectre caractéristique de la vitamine D.

La longueur d'onde correspondante à l'absorbance maximale est de $\lambda_{\text{max}} = 265 \text{ nm}$ prise pour des dosages de la **vitamine D** en **RP-HPLC** et son coefficient d'extinction molaire est de $\epsilon = 18300 \text{ cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{L}$.



Chapitre 2

Méthodes de dosage de la vitamine D



1. Dosage de la vitamine D par RP-HPLC

1.1. Principe de la méthode

Pour réaliser une séparation d'un mélange on le fait diluer dans un solvant approprié, puis on injecte un volume connu dans le système chromatographique à travers la boucle d'injection. Les composés du mélange sont transportés par la phase mobile dont laquelle ils sont solubles vers la colonne siège de la phase stationnaire. Sous l'influence des deux effets antagonistes : effet d'entraînement exercé par la phase mobile, effet de rétention exercé par la phase stationnaire, les constituants du mélange se déplacent à des vitesses différentes et sont séparés. Cette séparation est basée sur la différente d'affinité des composés du mélange vis à vis de la phase stationnaire, le constituant qui a plus d'affinité sera le plus retenu.

Au niveau de détecteur, chaque composé du mélange sortant de la colonne est détecté donnant un signal, ce dernier est enregistré par le système de traitement des données sous forme d'un pic. L'ensemble des pics forme un chromatogramme [19].

1.2. Description du système RP-HPLC utilisé

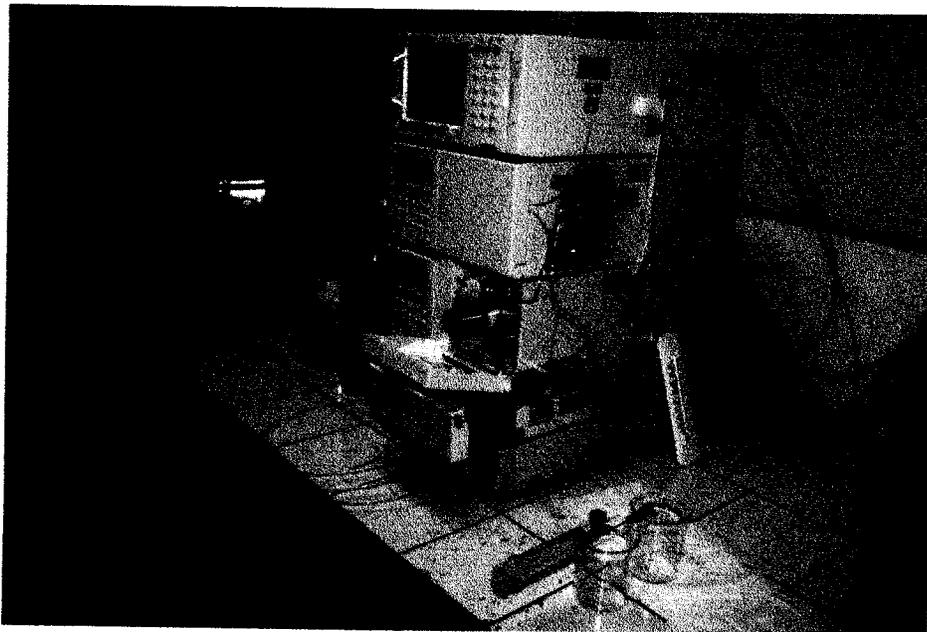


Figure 2.1: Système RP-HPLC du laboratoire de recherche « Spectrochimie et Pharmacologie Structurale ».



Le système se compose de :

➤ **Réservoirs de la phase mobile**

Les solvants utilisés comme phase mobile en chromatographie de partage sur phase stationnaire apolaire, doivent répondre aux certaines exigences qui sont comme suit :

❖ Pureté

La phase mobile est un solvant ou mélange de solvants qui doit être de pureté analytique et filtré pour éliminer les particules solides qui risqueraient d'endommager la pompe ou de bloquer la colonne. Le filtre, en acier inoxydable d'une porosité de 2 μm , est placé à l'extrémité dans le réservoir à solvant.

❖ Compatibilité avec le système de détection

Il faut utiliser des solvants qui n'absorbent pas à la même longueur d'onde que l'analyte. Les limites de détection des solvants utilisés comme phase mobile dans l'étude de la vitamine D, sont très inférieures à 265 nm qui est la longueur d'onde maximale d'absorption de la vitamine D.

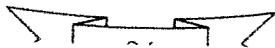
❖ Miscibilité des solvants

Si la phase mobile est constituée d'un mélange de solvants, ceux-ci doivent être complètement miscibles. En plus le soluté à séparer doit y être soluble.

➤ **Dégazeur DGU-14A, N°228-35359-9, Shimadzu**

Afin d'assurer une analyse stable à tout moment, la phase mobile devra être dégazée. La phase mobile passe à travers une tuyauterie spéciale faite de filme de résine.

Le dégazage est très réalisé par réduction de la pression entourant cette tuyauterie. Cet élément peut dégazer séparément, jusqu'à 4 lignes.



➤ **Unité de gradient FCV-10ALvp, Shimadzu, N°228-39500-91**

Elle permet de réduire au minimum le volume mort et le délai de gradient. Autant que possible, l'unité devrait être installée avant la pompe. L'unité de gradient basse pression peut commuter jusqu'à 4 phases mobiles.

➤ **Pompe LC-10ADvp, Shimadzu**

C'est une pompe d'échange à deux têtes ayant de petites chambres (10µL par course). Cette pompe permet de déplacer la phase mobile avec deux pistons qui fonctionnent en alternance, et des clapets anti retour, qui sont synchronisés avec la commande de piston pour remplir et vider la phase mobile de chaque chambre. Elle doit être inerte à la corrosion des solvants utilisés, offrir un bon choix de débits et être conçue pour réduire les pulsations au minimum. Cette pompe peut livrer un débit constant de 0.001 à 9.999 mL par minute, avec des pressions allant de 10 à 392 bars. La gamme de température de fonctionnement est de 4 à 35°C.

➤ **Mixeur, N°228-28000-91**

Il s'agit d'un accessoire qui permet de mélanger efficacement la phase mobile dans la cas d'élution en mode gradient.

➤ **Injecteur**

Comme la pression dans le circuit pompe-colonne est très élevée, on utilise un moyen indirect pour introduire l'échantillon à l'entrée de la colonne. Celui-ci est d'abord introduit à l'aide d'une seringue dans un injecteur à boucle externe, cette boucle contient deux positions :

❖ **Load (charger) :**

On injecte toujours un volume supérieur à celui de la boucle, en prenant soin de ne pas introduire de bulles d'air dans la boucle. L'excès du liquide injecté est évacué par l'ouverture de vidange.

❖ **Inject (injecter)**

En tournant la valve vers cette position, seul le contenu de la boucle est dirigé en tête de colonne à travers la phase mobile. Dans cette position, on peut rincer les canaux des déviations de la vanne ; le solvant du lavage est évacué par une autre ouverture de vidange.



Cette méthode d'injection a l'avantage de donner des résultats très reproductibles d'une injection à l'autre.

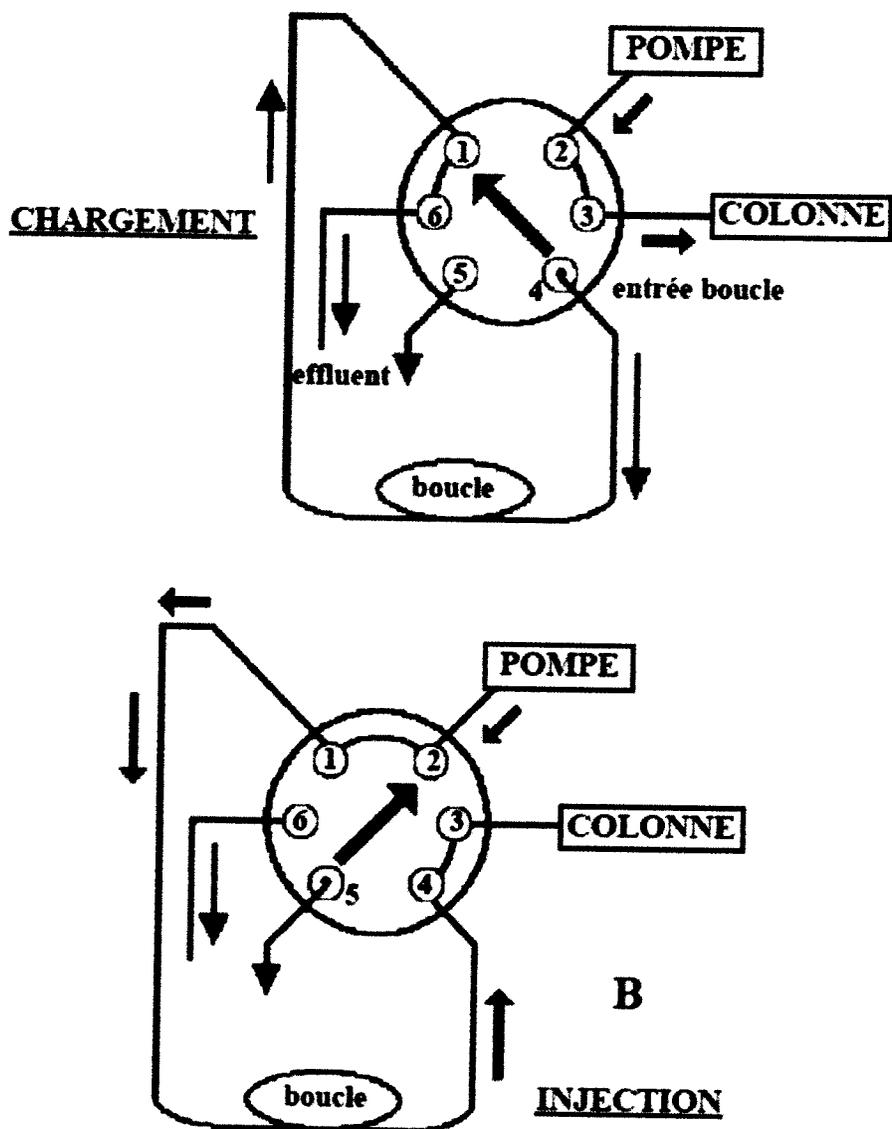
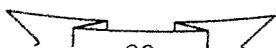


Figure 2.2 : Schéma simplifié d'une vanne à boucle externe et de son fonctionnement [21].

➤ **Colonne de garde**

Une colonne de garde peut être placée entre le dispositif d'injection et la colonne analytique. Comme son nom l'indique, cette dernière est utilisée pour protéger la colonne analytique contre la perte d'efficacité, qui peut être provoquée par la présence de matière particulaire. Elle doit être remplie avec la même phase stationnaire que celle de la colonne analytique.



➤ Colonne analytique RP-HPLC

Elle est constituée par un tube en acier inoxydable rempli par une phase stationnaire, qui se compose de greffons organiques apolaire (octadécyle C18), fixés sur particules de silice. C'est une phase inverse, RP-HPLC (Reversed Phase – High performance Liquid Chromatography). La qualité de la séparation dépend de la géométrie de la colonne, de la granulométrie des particules qui constituent la phase stationnaire et de la quantité du remplissage. Cet élément représente le noyau du système chromatographique. Les caractéristiques de la colonne utilisée sont les suivants :

Longueur = 25 cm.

Diamètre interne = 4.6 mm.

Diamètre des particules = 5 μ m.

➤ Détecteur SPD-10Avp, Shimadzu

C'est un détecteur UV-Visible, dispersif à longueur d'onde variable, Il mesure l'absorbance pendant l'élution de l'échantillon de la colonne. Il offre deux modes de détection, détection à longueur d'onde fixe ou détection en mode duel, la source utilisée est une lampe de Deutérium, elle fournit la gamme de longueur d'onde 190 à 600 nm. La longueur de chemin optique de la cellule est 10 mm, et son volume est 8 μ L. La température de fonctionnement est 4 à 35°C.

➤ Système de traitement des données

C'est un ordinateur menu du logiciel LC Solution. Celui-ci permet d'enregistrer et de visualiser le signal de sortie du détecteur du système HPLC. Les données traitées peuvent être imprimées. Le logiciel LC Solution offre deux types d'applications qui intègrent la plupart des fonctions pour l'analyse : analyse en temps réel et analyse en différé :

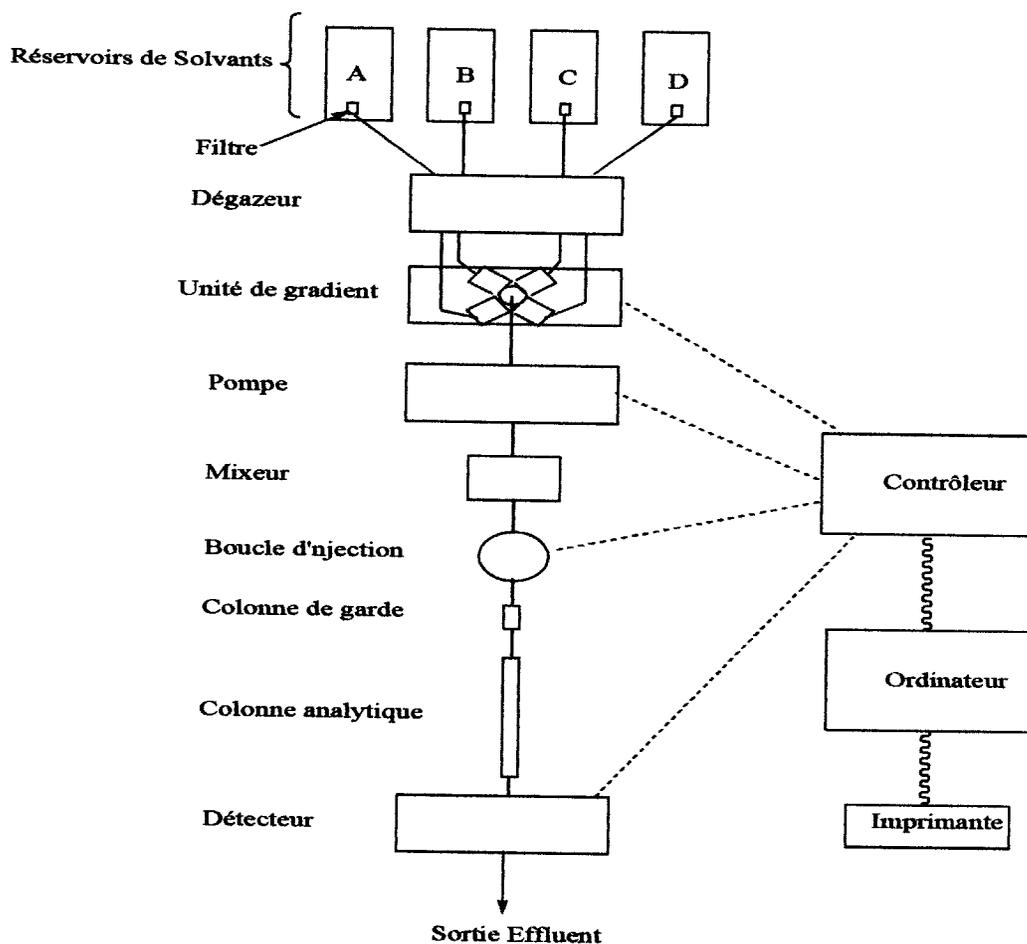
❖ Analyse en temps réel (LC Real time analysis) :

Elle nécessite la mise en marche du système, et le contrôle en mode software grâce au logiciel LC Solution.



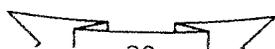
❖ Analyse en différé (Post-run analysis) :

L'analyse est effectuée sans que le système soit relié. Cette option permet d'éditer des dossiers de méthodes ou des fichiers séquentiels pendant l'acquisition des données.



- Cheminement de la Phase mobile
- - - - - Contrôle du système
- ~~~~~ Aquisition et Traitement des données

Figure 2.3 : Diagramme du système HPLC utilisé [21].



1.3. Mise en marche du système HPLC

- Vérifier les solvants
- Mettre sous tension les compartiments du système dans l'ordre suivant :
 - ✓ Dégazeur.
 - ✓ Pompe.
 - ✓ Détecteur.
 - ✓ Contrôleur.
- Mettre en marche le PC pour connecter le système et passer au contrôle software à l'aide du logiciel LC Solution.
- Ouvrir la méthode d'analyse ou en crée une, en entrant les paramètres suivants :
 - ✓ Mode d'élution et débit.
 - ✓ Proportion des solvants dans le cas du mode gradient.
 - ✓ Temps d'analyse (temps d'acquisition).
 - ✓ Longueur d'onde et atténuation.
 - ✓ Enregistrement de la méthode.
- Mettre en marche la pompe.
- Purger le circuit si nécessaire.
- Vérifier la stabilité de la ligne de base.
- Analyse par simple injection (Utilisée dans les tests préliminaires et d'optimisation).
 - ✓ Charger l'échantillon dans la boucle d'injection.
 - ✓ Ouvrir la fenêtre de dialogue « single run » en introduisant les données sur la nature de l'échantillon (inconnue ou étalon...).
 - ✓ Injecter l'échantillon.
- Analyse par lot (utilisée dans le cas des injections répétées, permet de commander les injections automatiquement).
 - ✓ Utiliser l'option « batch processing » (traitement par lot) et la fenêtre du dialogue Wizard pour commander les étapes suivantes.
 - ✓ Entrer les données nécessaires (nature de l'échantillon...).
 - ✓ Fermer la fenêtre de dialogue et exécuter le lot.



2. Analyse quantitative par Chromatographie Liquide Haute Performance RP-HPLC

2.1. Principe

L'analyse quantitative en chromatographie à phase liquide est essentiellement une méthode comparative, elle est basée sur la relation reliant l'aire (A_i) ou la hauteur (H_i) du pic de l'analyse à sa concentration. Cette relation est établie par le détecteur qui mesure les variations des signaux selon les équations suivantes :

$$C_i = K_i \cdot A_i$$

$$C_i = K_i \cdot H_i$$

Avec

K_i : coefficient de réponse du détecteur.

La stabilité des conditions d'analyse laisse le coefficient constant, ce qui donne linéarité entre la variation des paramètres et les différentes concentrations de l'analyte. Cette linéarité est la base des différentes méthodes qui permettent la détermination de la concentration d'un échantillon inconnu. Parmi ces méthodes, la méthode d'étalonnage qui est la plus utilisée en CPL. Son principe est de tracer une courbe représentant la variation de signal (aire ou hauteur) en fonction de la quantité d'analyte.

Cette courbe est traduite par l'équation :

$$y = a \cdot x + b$$

a : pente de la droite.

b : ordonné à l'origine.

2.2. L'étalonnage externe

Consiste à réaliser l'injection d'un volume reproductible et identique des solutions étalons, préparées avec des concentrations bien précises à partir du l'étalon de pureté connu. Les valeurs des aires des pics correspondants à chaque concentration sont représentées sur une droite d'étalonnage d'équation de type :



$$A_r = f(C_r)$$

Si cette droite est linéaire, son équation peut être écrite comme suit :

$$A_{\text{ét}} = a \cdot C_{\text{ét}} + b$$

Où :

$A_{\text{ét}}$: Aire du pic de l'étalon pur.

$C_{\text{ét}}$: Concentration de l'étalon pur.

a : pente de la droite.

b : ordonnée à l'origine.

Pour déterminer la concentration de l'analyte dans un échantillon inconnu, il suffit d'injecter le même volume de celui-ci après traitement, et dans les mêmes conditions. La concentration $C_{\text{éch}}$ est calculée à partir de l'aire de pic obtenu ($A_{\text{éch}}$) par deux manières :

- ✓ Soit par l'équation de la droite suivante la relation :
$$C_{\text{éch}} = \frac{A_{\text{éch}} - b}{a}$$
- ✓ Soit par projection de la valeur d'aire sur la droite en utilisant un logiciel approprié.

La précision des résultats dépend :

- ✓ Des pesées de la substance de référence et de l'échantillon.
- ✓ Des dilutions
- ✓ De la reproductibilité du volume de l'injection.

L'avantage de la méthode est que le volume de l'injection n'a pas une grande importance à condition qu'il demeure constant lors de l'étalonnage et l'analyse dans des conditions chromatographiques strictement invariantes.



2.3. L'étalonnage interne

Consiste à ajouter une espèce appelée étalon interne aux solutions étalons et à l'échantillon. Ces solutions sont préparées à partir de la substance de référence, auxquelles on a ajouté une quantité connue constante de l'étalon interne. On injecte ces mélanges dans le système chromatographique, on construit la courbe d'étalonnage en portant en ordonnée le rapport d'aire de l'analyte $A_{ét}$ sur celui de l'étalon interne A_{int} , et en abscisse le rapport des concentrations de l'analyte $C_{ét}$ et l'étalon interne C_{int} . Cette courbe est introduite par l'équation :

$$\frac{A_{ét}}{A_{int}} = f\left(\frac{C_{ét}}{C_{int}}\right)$$

Si cette droite est linéaire, son équation peut être comme suit :

$$\frac{A_{ét}}{A_{int}} = a \cdot \frac{C_{ét}}{C_{int}} + b$$

Où :

A_{int} : Aire du pic de l'étalon interne.

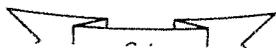
C_{int} : Concentration de l'étalon interne.

a : pente de la droite

b : ordonnée à l'origine.

Pour avoir la concentration de l'analyte dans l'échantillon inconnu, on ajoute une quantité connue de l'étalon interne lors de traitement de cet échantillon, puis on réalise une injection d'un volume reproductible dans les mêmes conditions de l'étalonnage. La concentration $C_{éch}$ est déterminée à partir des deux aires obtenues ($A_{éch}$ et $A_{int(éch)}$) suivant la relation :

$$C_{éch} = \frac{\left(\frac{A_{éch}}{A_{int(éch)}}\right) - b}{a} \times C_{int(éch)}$$



Où :

$A_{\text{int(éch)}}$: Aire du pic de l'étalon interne ajouté à l'échantillon.

$C_{\text{int(éch)}}$: Concentration de l'étalon interne ajouté à l'échantillon.

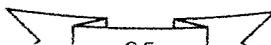
Cette méthode est dépend uniquement de la précision des pesées. Contrairement à la méthode par étalonnage externe ; elle ne dépend pas ni de précision des dilutions ni de volume injecté, elle permet de s'affranchir de l'erreur commise sur ce volume.

En revanche, c'est une méthode laborieuse qui oblige à rechercher un étalon interne dont l'élution est compatible avec l'analyse envisagée, ce qui exige :

- Qu'il soit d'une pureté connue et chimiquement inerte avec les solutés et la phase mobile.
- Qu'il ait un temps de rétention différent de tous les constituants de l'échantillon, mais le plus proche possible de la substance à déterminer.
- Que son coefficient de réponse pour le détecteur soit du même ordre de grandeur que celui du produit à déterminer.
- Qu'il ne soit pas présent comme impureté dans l'échantillon.
- Qu'il soit ajouté à une concentration qui donne une aire de pic sensiblement équivalent à celle du produit à déterminer

2.4. Détermination du degré de pureté de cholécalciférol (D3)

L'analyse quantitative d'une substance repose sur l'utilisation de cette dernière en grande pureté comme étalon, elle est fournie par des laboratoires spécialisés avec un degré de pureté de l'ordre $\geq 97\%$, mais ce degré est influencé par les conditions de commercialisation et de stockage donc il est nécessaire de vérifier. Le test est effectué par la chromatographie à phase liquide. Le degré de pureté de chaque substance sera utilisé dans le calcul des concentrations de leurs solutions. Ce facteur est déterminé selon l'équation suivante :



$$d = \frac{A_x}{\sum_i^n A_i}$$

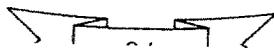
Où :

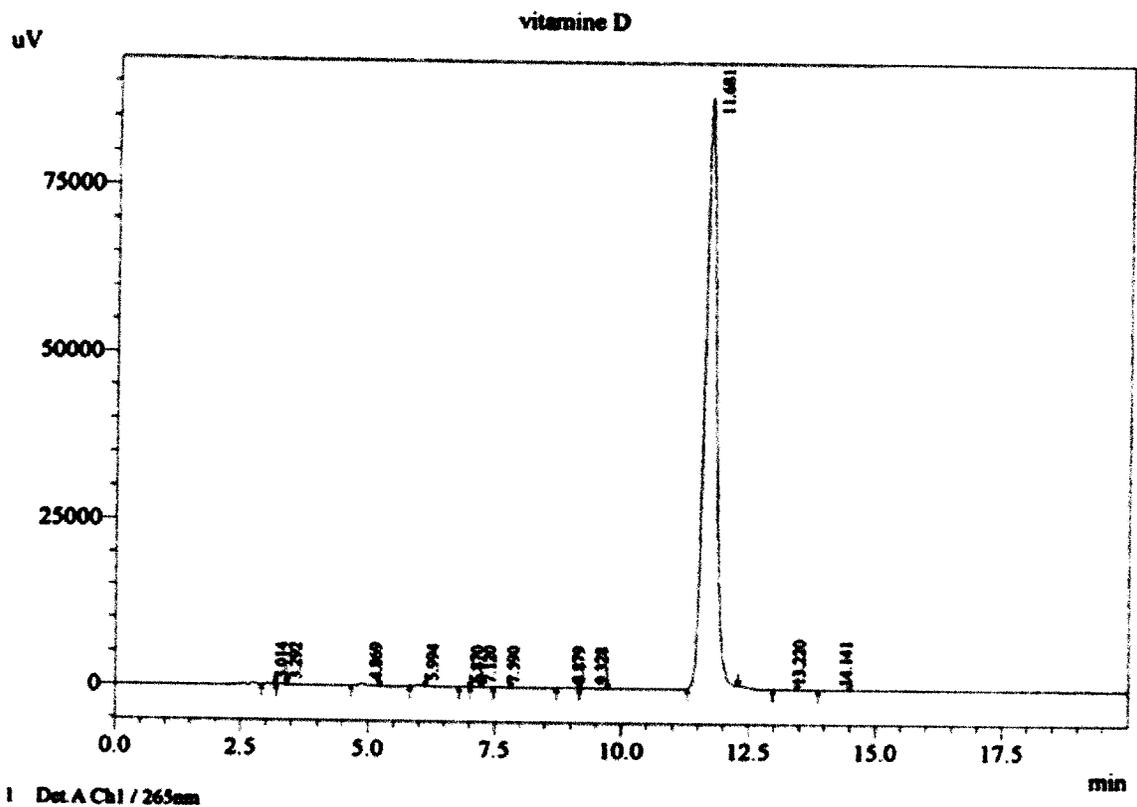
d : Degré de pureté.

A_x : Air du pic de la substance à analyser.

A_i : Air des pics de i substances détectés.

Le cholécalciférol (D3) est obtenu de la pharmacie, fabriquée par le laboratoire HauptPharma Livron. Le produit est commercialisé sous forme des ampoules injectable de 200000 UI. Pour préparer des solutions stocks on fait diluer le contenu dans 10 ml d'éthanol pur puis prélever 0.2ml et compléter à 10 ml d'éthanol. On mesure l'absorbance de cette solution par le spectrophotomètre UV-Visible. Le degré de pureté est déterminé par l'injection d'une solution concentrée. Le chromatogramme de l'étalon obtenu est comme suit :



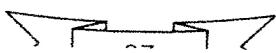


PeakTable

SPD-10Avp Ch1 265nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	3.014	1450	180	0.104	0.201
2	3.292	1007	189	0.072	0.211
3	4.869	4464	327	0.320	0.365
4	5.994	1655	221	0.119	0.246
5	6.870	296	44	0.021	0.049
6	7.120	347	49	0.025	0.055
7	7.590	532	58	0.038	0.065
8	8.879	1614	119	0.116	0.133
9	9.328	652	42	0.047	0.047
10	11.681	1381682	88212	99.016	98.508
11	13.220	1441	89	0.103	0.099
12	14.141	278	18	0.020	0.021
Total		1395419	89548	100.000	100.000

Figure 2.4: Chromatogramme obtenu par injection d'une solution de cholécalférol (D3).



2.5. Identification du pic de cholécalférol dans l'échantillon de plasma

L'identification est réalisée par HPLC, le principe est basé sur la comparaison de temps de rétention du pic de l'analyte dans l'échantillon de plasma avec celui de l'étalon pur.

➤ Procédure

- Traiter 50µl d'un plasma, avec 200 µl de mélange C₂H₅OH/CH₃COOC₂H₅ (1 : 1), puis on injecte un volume de 100µl dans le système chromatographique dans les conditions suivantes :
- Mode d'élution : gradient linéaire.
- Phase mobile : (70%CH₃OH ; 30%CH₃CN).
- Débit 1.5 ml/mn
- Détection : à λ = 265 nm, atténuation à 0.005 AUFS.
- Temps d'acquisition : 10 mn.
- La température de la salle est de 29°C.

Le chromatogramme suivant représente la comparaison des pics obtenus :

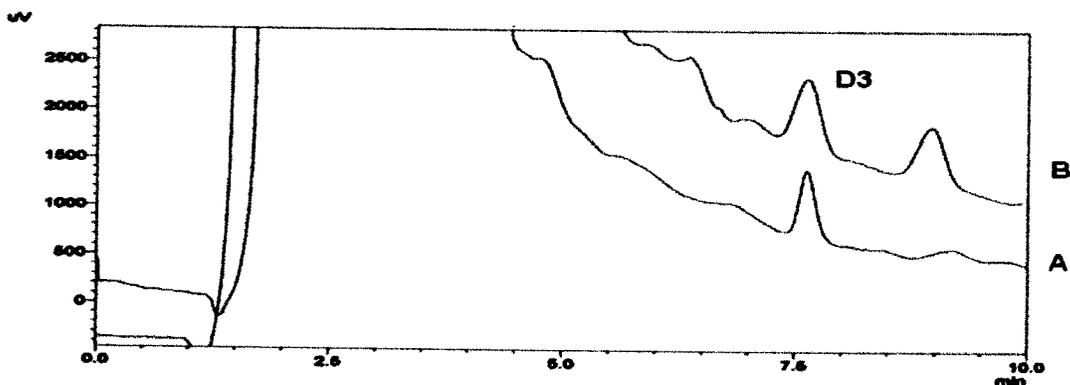


Figure 2.5 : Identification du pic de cholécalférol (D3).

A : étalon pur. **B** : Echantillon de plasma traité.



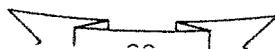
2.6. Préparation de la droite d'étalonnage externe

2.6.1. Matériels et réactifs

- 1 Flacon ambré (pour la solution stock).
- 2 Flacon jaugées de 10 ml (pour les solutions primaires et secondaires).
- 1 Fiole jaugée de 50 ml (pour le mélange C₂H₅OH/CH₃COOC₂H₅).
- Micropipette de 50-200 µl.
- Micropipette de 100-1000 µl.
- Tube Eppendorf.
- Papier d'aluminium.
- Spectrophotomètre UV-Visible.
- Cuvette en quartz.
- Ethanol qualité HPLC.
- Solution stock (Cholécalciférol, C= 6.495 exp-5 mol/l).
- Solution stock (C₂H₅OH/CH₃COOC₂H₅).

2.6.2. Préparation des solutions primaires

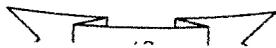
- Préparer une solution stock de cholécalciférol (D3) comme suit :
 - ✓ Transférer le contenu de 5 ampoules de cholécalciférol dans un flacon ambré.
 - ✓ Compléter le volume avec 100 ml de l'éthanol qualité HPLC.
- Prélever avec la micropipette 50 µl de la solution stock de cholécalciférol et compléter le volume de la fiole jaugée de 10 ml avec l'éthanol qualité HPLC.
- Refaire la même préparation 2 fois en plus, pour confirmer les concentrations par test UV-Visible [26] qui est comme suit :
 - ✓ A partir de menu en charger l'option « fixed ».
 - ✓ Commander la lecture de l'absorbance à une seule longueur d'onde.
 - ✓ Entrer la valeur de l'absorbance maximal pour le cholécalciférol ($\lambda = 265$ nm).
 - ✓ Sauvegarder la méthode dans la librairie.
 - ✓ Remplir le $\frac{3}{4}$ de volume de la cuvette de quartz par l'éthanol absolu.
 - ✓ Placer la cuvette dans le spectrophotomètre et appuyer sur le bouton « Zéro base ».



- ✓ Rincer la cuvette avec une petite quantité de la solution à analyser et remplir en suite $\frac{3}{4}$ de son volume par la même solution.
- ✓ Essuyer avec un papier doux les parois externes de la cuvette, si nécessaire imbiber le papier avec une goutte d'éthanol.
- ✓ Lancer test en appuy sur le bouton « Run », la valeur de l'absorbance s'affichera sur l'écran.
- ✓ Répéter l'opération 3 fois pour avoir 3 lectures d'absorbance.
- ✓ Sauvegarder les valeurs de l'absorbance : Abs₁, Abs₂, Abs₃, affichées sur l'écran pour calculer les concentrations.

2.6.3. Préparation des solutions secondaires

- Rincer les fioles jaugées plusieurs fois avec l'éthanol absolu.
- Prélever 50 μ l de la solution primaire de cholécalciférol avec la micropipette et compléter le volume de la fiole jaugée de 10 ml avec l'éthanol qualité HPLC.



2.6.4. Préparation des solutions étalon pour tracer la droite d'étalonnage

- Préparer les solutions étalons dans 5 tubes eppendorf différent en combinant les solutions secondaires comme suit :
 - ✓ 0 ; 100 ; 200 ; 300 ; 400 ; 500 μ l de solution de cholécalciférol.
 - ✓ Compléter le volume à 600 μ l avec la solution (1v : 1v) (C2H5OH/CH3COOC2H5).
 - ✓ Fermer les tubes, emballer dans le papier aluminium, étiqueter et stocker au frais.
- Mettre en marche le système HPLC selon les conditions suivantes :
 - ✓ Mode d'éluion gradient.
 - ✓ Phase mobile CH3/CH3CN (70%, 30%).
 - ✓ Débit 1.5 ml/mn.
 - ✓ Volume d'injection 100 μ l.
 - ✓ Longueur d'onde 265 nm.
 - ✓ Atténuation 0.005 AHFS.
 - ✓ Injecter les solutions étalons.

2.7. Résultats

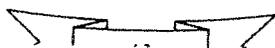
Les concentrations finales des solutions primaires sont calculées d'après la loi de Beer-Lambert et après détermination du degré de pureté de cholécalciférol par RP-HPLC comme suit :

- ❖ Calcule de l'absorbance moyenne de la solution primaire diluée dans l'éthanol :

$$\overline{Abs} = \frac{Abs_1 + Abs_2 + Abs_3}{3}$$

- ❖ Détermination de la concentration finale :

$$C_{pré} = \frac{\overline{Abs}}{\epsilon \cdot l} \times d$$



Avec :

C_{pr} : Concentration de la solution primaire.

\overline{Abs} : Absorbance moyenne.

ϵ : Coefficient d'absorption molaire en $(L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1})$, $\epsilon = 18300$ pour les solutions de cholécalférol.

l : Epaisseur de la cuvette en cm.

d : Degré de pureté.

Tableau 2.1 : Résultats de l'analyse UV des solutions primaires :

	Absorbances			d en (%)	Concentration en ($\mu mol/L$)
	Abs ₁	Abs ₂	Abs ₃		
Cholécalférol	1.76	1.76	1.77	99.016	96.392

La concentration de la solution secondaire est déduite de celle de la solution primaire selon l'équation de dilution suivante :

$$C_{pr} \times V = C_{sec} \times V_T$$

$$C_{pr} = \frac{C_{sec} \times V_T}{V}$$

Avec

C_{pr} : Concentration de la solution primaire.

V : Volume de la prise diluée de la solution primaire.

C_{sec} : Concentration de la solution secondaire.

V_T : Volume total de la solution secondaire préparée.



$$C_{\text{pré}} = (96.392 \times 0.05)/10$$

$$= 0.482 \mu\text{mol/L}$$

Les concentrations des solutions étalons sont calculées selon l'équation de dilution suivante :

$$C_{(\text{étalon})} \times V_T = C_{\text{Sec}} \times V$$

$$C_{(\text{étalon})} = \frac{C_{\text{Sec}} \times V}{V_T}$$

Avec :

$C_{(\text{étalon})}$: Concentration de la solution étalon.

C_{Sec} : Concentration de la solution secondaire.

V_T : Volume total de la solution étalon préparer ($V_T = 400 \mu\text{l}$).

V : Volume de la prise diluée de la solution secondaire.

Tableau 2.2 : Résultats de l'analyse HPLC des solutions étalons.

Etalon	Concentrations (nmol/L)		Hauteur
	Cholécalciférol	Aires A Cholécalciférol	
Blanc	0	0	0
1	80.327	8983	321
2	160.65	18064	651
3	240.98	26982	958
4	321.31	36243	1291
5	401.63	44931	1598



Les résultats cités dans le tableau précédant nous permettent de tracer la droite d'étalonnage externe en utilisant le logiciel « Origin ». Cette courbe est représentée comme suit :

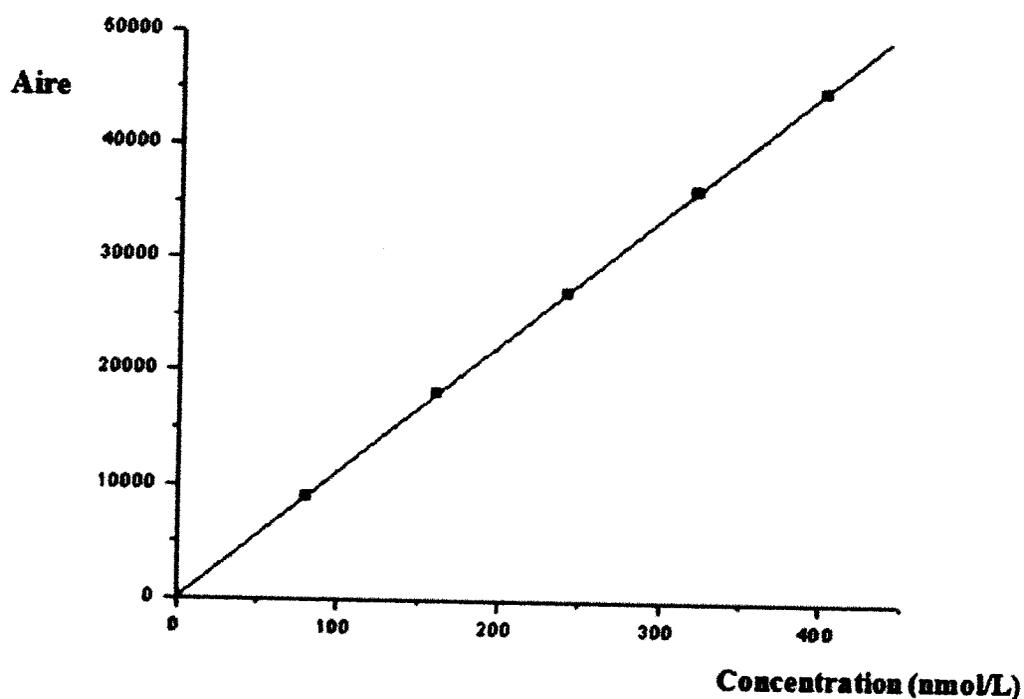
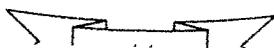


Figure 2.6 : Droite d'étalonnage externe.

Tableau 2.3 : Paramètres de la droite d'étalonnage externe.

Equation de la droite	Coefficients	
	r	r^2
$y = 112.16 x + 8.63$	0.9999	0.9998



2.9. Evaluation de la méthode

2.9.1. Linéarité

L'étalonnage a été effectué avec des solutions étalons de cholécalciférol dont les concentrations variaient de 80.327 nmol/L à 401.63 nmol/L. La courbe d'étalonnage (aire du pic chromatographique en fonction de la concentration de cholécalciférol) obtenue après régression linéaire des points expérimentaux, elle a présenté une bonne linéarité (coefficient de régression est de 0.9998).

Les paramètres (r et r^2) obtenus, montrent une forte corrélation entre les valeurs des rapports des aires et les rapports des concentrations utilisés pour tracer la droite d'étalonnage externe. Puisque ces paramètres sont des mesures de corrélation et ne pas de linéarité [22] ; il faut inspecter des points de la droite et chercher d'éventuelles courbures. L'outil de diagnostique puissant à cet effet de tracer les résidus.

Représentation des résidus de régression

Une représentation des résidus de régression peut être facilement faite en reportant sur un graphique les valeurs établies selon la formule :

$$y_i - \hat{y}_i$$

En cas de linéarité, les points obtenus doivent se répartir de façon aléatoire autour de la droite de fonction : $X = 0$



Tableau 2.4 : Calcul des résidus de la droite d'étalonnage externe.

Etalon	Cholécalciférol	$Y_i = A_{\text{Cholécalciférol}}$	$\hat{y} = ax_i + b$	Résidus $y_i - \hat{y}_i$
blanc	0	0	-8.638	8.638
2	80.327	8983	9001.48	-18.48
3	160.65	18064	15011.15	52.85
4	240.98	26982	27021.60	31.6
5	321.31	36243	36032.06	210.94
6	401.63	44931	45041.39	-110.39

On obtient une représentation des résidus de régression donnée par le graphique suivant :

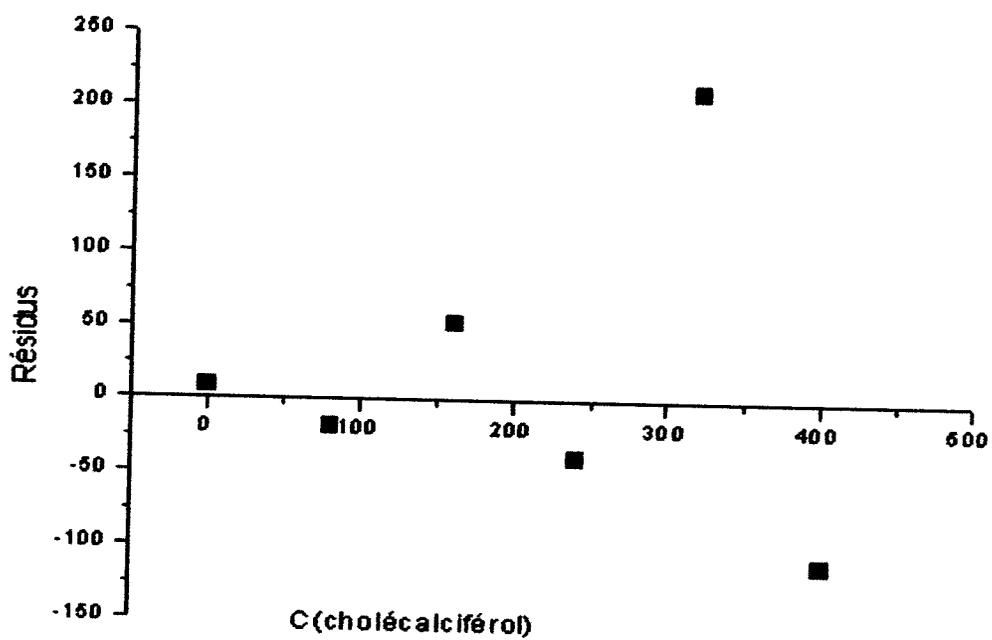
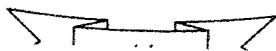


Figure 2.7 : Distribution des résidus en fonction des rapports des concentrations.



2.9.2. Limite de détection et de quantification

- La limite de détection (LOD) d'une procédure d'analyse est la plus petite de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte, dans les conditions expérimentales décrites de la procédure.
- La limite de quantification (LOQ) est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie.

Les deux paramètres ont été calculés comme le signal équivalent à 3 fois et 10 fois le bruit de fond chromatographique en conditions de travail. Le logiciel « labsolution » de l'appareil a donné la valeur de ce bruit, les résultats des calculs sont regroupés dans le tableau suivant :

BF	LOD=3.BF (nmol/l)	LOQ=10.BF (nmol/l)
3	0.150	0.5

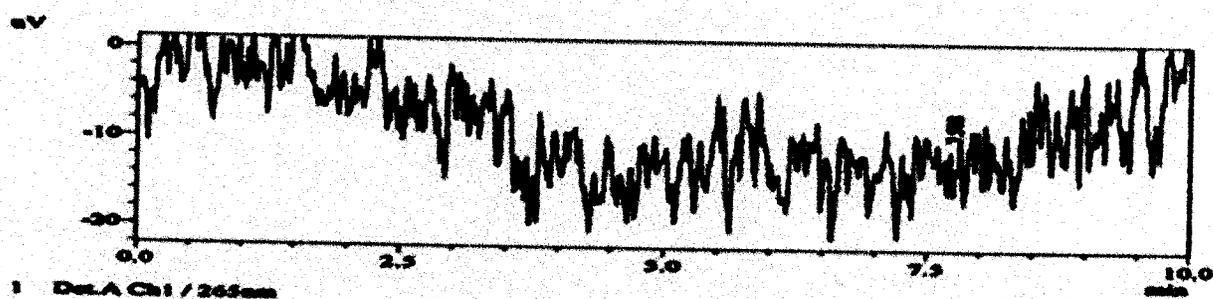
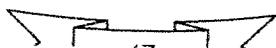


Figure 2.8 : Bruit de fond chromatographique en conditions de travail.



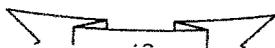
2.9.3. La répétabilité

Même jour

La répétabilité est testée en effectuant six analyses consécutives d'un échantillon de plasma dans le même jour. Les résultats sont comme suite

Tableau 2.4 : Résultats de répétabilité de même jour

Essais	Concentration en (nmol/L)
1	51.042
2	51.622
3	51.462
4	52.148
5	53.146
6	52.647
Moyenne	52.011
Ecart-type	0.787
CV (%)	1.514



Entre jours

La répétabilité est déterminée en faisant l'analyse d'un même plasma à six dates différentes. Les résultats sont les suivants :

Tableau 2.5 : Résultats de répétabilité entre jours.

Essais	Concentration en (nmol/L)
1	54.047
2	53.307
3	53.013
4	53.235
5	53.164
6	52.166
Moyenne	53.156
Ecart-type	0.604
CV (%)	1.136

Les résultats de la répétabilité dans les deux cas sont acceptables (< 5%) pour dire que la méthode est fiable.

2.9.4. La récupération

La récupération est déterminée en dopant un plasma de concentration connu à trois niveaux (70, 100 et 130 %), l'analyse de chaque niveau est répétée six fois. Les pourcentages de récupération sont calculés par la relation suivante :

$$\text{Récupération (\%)} = \frac{C_f - C}{C_a} \times 100$$



C_f : Concentration mesurée d'un échantillon fortifié.

C : Concentration mesurée d'un échantillon non fortifié.

C_a : Concentration de la substance ajoutée

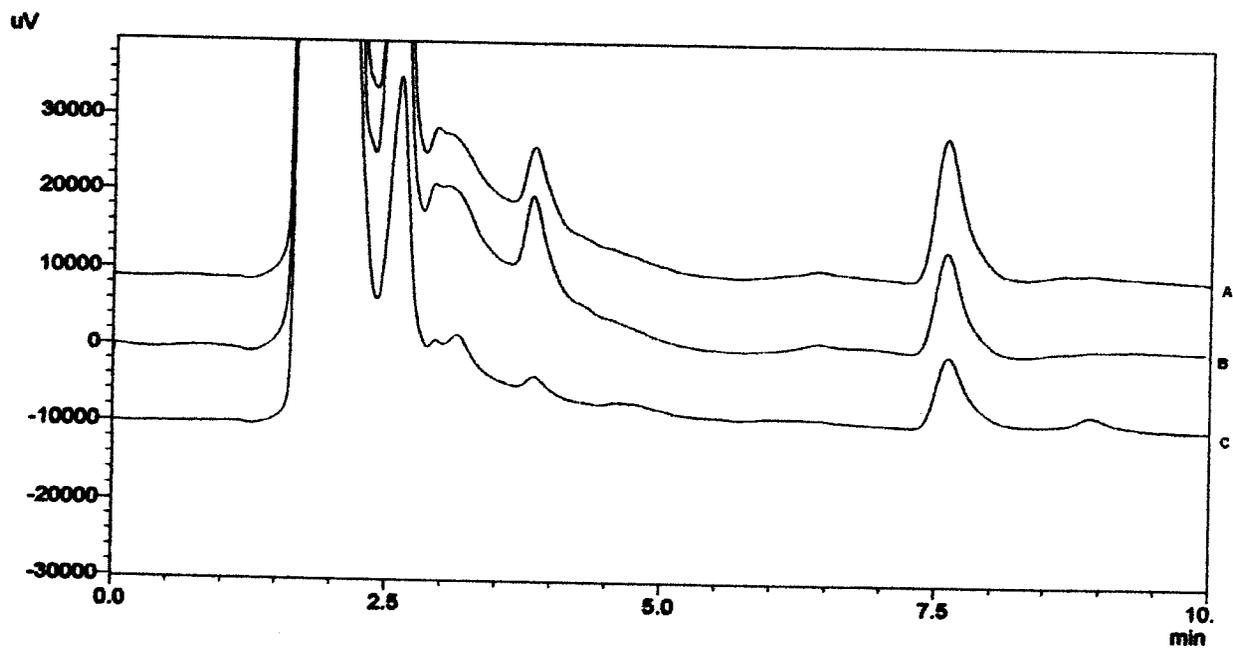


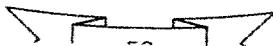
Figure 2.9 : A. Plasma dopé à 130 %

B. Plasma dopé à 100 %

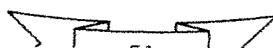
C. Plasma dopé à 70 %

Tableau 2.6 : Pourcentage de récupération pour un même plasma.

Niveau	Pourcentage (%)
1	82
2	108
3	122



Chapitre 3
Dosage des échantillons de plasma par
RP-HPLC



1. Dosage des échantillons de plasma

1.1. Nature des échantillons

Les échantillons sont des plasmas d'enfants d'âge préscolaire (12 à 59 mois). Leurs prélèvements sont réalisés dans la wilaya de Tlemcen par le service pédiatrie du CHU de Tlemcen en trois zones différentes : zone côtière au nord, zone montagneuse au centre et zone steppique au sud de la wilaya. Chaque échantillon est mené d'un questionnaire. Un volume de 2 ml de sang pour chaque enfant a été prélevé dans un tube héparine lithium protégé de la lumière par un étui en papier d'aluminium. Ces échantillons du sang sont transportés vers le laboratoire dans une glacière où ils sont centrifugés à 5000 tours/minute [23]. Le plasma obtenu d'une quantité de 1 ml a été pipeté dans le noir et placé dans 2 tubes aliquotes (a et b) de 0.5 ml pour chacun. Le tube « a » a été réservé au dosage de Cholécalférol plasmatique et le tube « b » utilisé en double comme sauvegarde ou pour une étude ultérieure sur d'autres micronutriments. Les tubes recouverts de papier aluminium ont été mis à congeler à -25 °C, à cette température le cholécalférol peut rester intact sans se dégrader pendant des années. Le nombre total des échantillons prélevés est de 1376.

1.2. Traitement des échantillons

A partir du nombre total des échantillons prélevés, on a choisi aléatoirement une somme de 101 échantillons comme première tranche à analyser. Cette somme est répartie en six séries, analysées indépendamment dans les mêmes conditions opératoires.

La première étape de processus analytique consiste en une préparation de l'échantillon avant l'analyse. La réalisation de cette étape dépend de deux performances :

- ✓ Le volume de la prise du plasma traité : dans les méthodes directes pour le dosage de la vitamine D plasmatique le volume est généralement entre 20 et 100 µl. Pour notre étude, le volume minimal qu'on a pu prélever avec la micropipette utilisée 50 µl.
- ✓ Le solvant ou le mélange de solvants pour l'extraction du cholécalférol : le bon choix est basé sur les conditions suivantes :
 - Doit dénaturer les protéines.



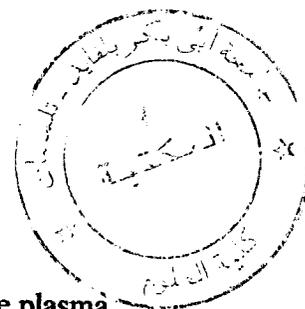
- Doit avoir une polarité convenable et une affinité pour l'analyte pour éliminer une éventuelle co-précipitation pendant la dénaturation des protéines.
- Doit être complètement miscible avec l'échantillon.
- Doit être compatible avec le système de détection et ne pas interférer avec l'analyte.

Parmi les différents solvants et mélange proposés dans la littérature pour ce type de méthode. Le mélange $C_2H_5OH/CH_3COOC_2H_5$ (1 : 1 ; v : v) proposé par Andrioli et Paola Manini [18] est le plus pratique et répond à notre but. Le volume de ce mélange ajouté est égal à 400 μ l. tout les étapes de ce processus sont réalisées sous la lumière rouge pour minimiser l'oxydation de cholécalférol, la concentration de cholécalférol dans les solutions étalons et dans les échantillons à analyser.

Procédure

Préparation des échantillons de plasma

- Classer les échantillons de la série à analyser sur la paillasse afin de dégeler le plasma.
- préparer en double les tubes Eppendorff, selon le nombre d'échantillons prévus.
- Etiqueter les tubes deux à deux.
- Enlever de la seringue l'aiguille avec son étui.
- Transférer une faible quantité de plasma liquide dans le premier tube.
- Refaire la même opération pour l'ensemble des échantillons de la série.
- Centrifuger à 12000 rpm, pendant 1 minute pour éliminer les fibrines.
- Prélever 100 μ l de plasma et transférer dans le deuxième tube placé dans un étui d'aluminium.
- Même opération pour l'ensemble des échantillons de la série, en changement l'embout chaque prélèvement.
- Ajouter 400 μ l de mélange ($C_2H_5OH/CH_3COOC_2H_5$).
- Fermer le tube et agiter violemment avec la main, dans le sens vertical. [24]



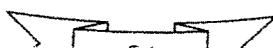
- Refaire la même opératoire pour l'ensemble des échantillons de la série.
- Centrifuger à 11000 rpm pendant 4 minutes [25]. Enlever les tubes de la centrifugeuse.
- Mettre en marche le système HPLC.
- Prélever soigneusement le surnageant (à l'aide de la seringue conçue pour l'injection), sans toucher les parois du tube ou le précipité et charger la boucle d'injection.
- Injecter les échantillons.

1.3. Résultats

Les concentrations des échantillons de la première série, sont quantifiées par une droite d'étalonnage externe.

Tableau 3.1 : Résultats de l'analyse RP-HPLC de la première série d'échantillons.

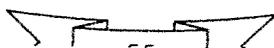
N°	Code	Aire de pic	Concentration (nmol/L)
01	3113	4496	40.005
02	4146	747	6.582
03	3090	2717	24.145
04	QC	6124	54.519
05	3085	1054	9.319
06	3010	6891	61.357
07	1050	3348	29.771
08	3145	1882	16.701
09	1031	1122	92.925
10	3117	983	8.686
11	3080	2418	21.480
12	QC	6071	54.047
13	1433	3236	28.772
14	986	961	8.490
15	160c	1499	13.286
	Moyenne	25.806	
	Ecart-type	18.631	
	CV (%)	72.195	



Les concentrations des échantillons de la deuxième série, sont quantifiées par une droite d'étalonnage externe.

Tableau 3.2 : Résultats de l'analyse RP-HPLC de la deuxième série d'échantillons.

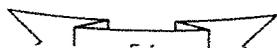
N°	Code	Aire de pic	Concentration (nmol/L)
01	3112	2221	19.723
02	987	3019	26.838
03	3116	2142	19.019
04	QC	5988	53.307
05	3120	3061	27.212
06	36022	3332	29.628
07	3008	219	1.875
08	994	2181	19.367
09	1023	2995	26.624
10	996	2560	22.745
11	1429	1887	16.746
12	3228	104	0.850
13	1536	/	/
14	1431	2643	23.485
15	3179	516	4.523
16	3174	3714	33.034
17	QC	5981	53.244
18	1537	2228	19.786
19	999	2903	25.803
	Moyenne	23.545	
	Ecart-type	14.129	
	CV (%)	60.008	



Les concentrations des échantillons de la troisième série, sont quantifiées par une droite d'étalonnage externe.

Tableau 3.3 : Résultats de l'analyse RP-HPLC de la troisième série d'échantillons.

N°	Code	Aire de pic	Concentration (nmol/L)
01	3149	/	/
02	3105	4451	39.604
03	3035	/	/
04	QC	5948	52.950
05	3199	3567	31.723
06	3152	/	/
07	3034	1573	13.946
08	3055	1948	17.289
09	3082	1656	14.686
10	3114	5984	53.271
11	3086	/	/
12	3121	2335	20.740
13	1415	7977	71.039
14	3266	2816	25.028
15	3253	3067	27.265
16	QC	5955	53.013
17	3013	1137	10.059
18	3048	1480	13.117
19	3051	2518	22.371
	Moyenne	31.073	
	Ecart-type	18.655	
	CV (%)	60.037	



1.4.1. Distribution des Hauteurs des pics de la quatrième série

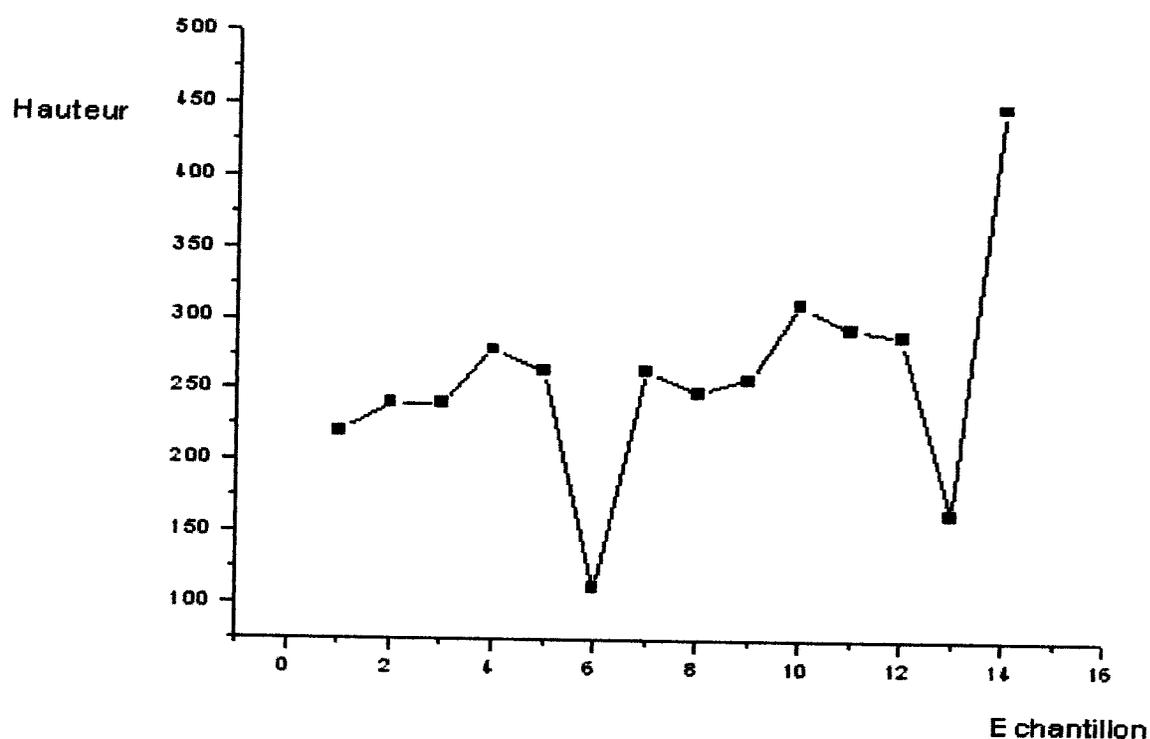


Figure 3.1 : Distribution des hauteurs des pics de la quatrième série.

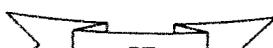
Discussion

Le diagramme ci-dessus représente la distribution des hauteurs des pics de la Quatrième série qui contient 15 échantillons, nous remarquons que la majorité des échantillons se situe dans l'intervalle [27.586 nmol/l – 53.235 nmol/l] par contre la concentration des échantillons 6 et 13 sont largement inférieure à cette gamme. Se qui nous laisse supposé que ces deux sujets présentent une carence en vitamine D, en revanche la concentration du 15 ème échantillon représente un excès en cette vitamine par rapport aux autres échantillons.

1.4.2. Variation de la température

La variation de la température a un effet important sur la solubilité dans l'éluant, la viscosité des solvants et surtout sur le temps de rétention. Le détecteur utilisé dans le système HPLC est de type UV, c'est un détecteur indifférent aux fluctuations de température [19].

L'inspection des temps de rétention recueillis au cours de l'analyse des échantillons de la cinquième série effectuée à température ambiante, montre que ce paramètre étant



incontrôlable et varie très faiblement. La représentation graphique sur la figure (3.2), des résultats obtenus montre par contre une légère traîne sur la distribution de ces temps.

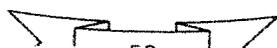
Cette traîne est probablement due à cette fluctuation. Donc l'augmentation de la température est traduite par une diminution du temps d'analyse.

Tableau 3.4 : Variation des temps de rétention en fonction de la température.

N°	Code	Temps de rétention	Température (°C)
01	3227	7.621	28
02	3235	7.620	28
03	3009	7.589	28
04	QC	7.584	28
05	3246	7.597	28
06	3236	7.577	28.5
07	1489	7.595	28.5
08	3026	7.586	28.5
09	3025	7.564	28.5
10	3177	7.565	29
11	3231	7.556	29
12	974	7.567	29
13	QC	7.565	29
14	1426	7.579	29
Moyenne		7.583	28.5
Ecart-type		0.0201	0.438
CV (%)		0.264	1.538

Tableau 3.5 : Variation des temps de rétention en fonction de la température.

N° d'échantillon	Température (°C)	Temps de rétention (mn)
1 - 5	28	7.602
6 - 9	28.5	7.590
10 - 14	29	7.566



Discussion

Au vue des résultats regroupés dans le tableau (3.5) on constate que l'augmentation de la température dans l'intervalle 28-29°C engendre une légère diminution des temps de rétention.

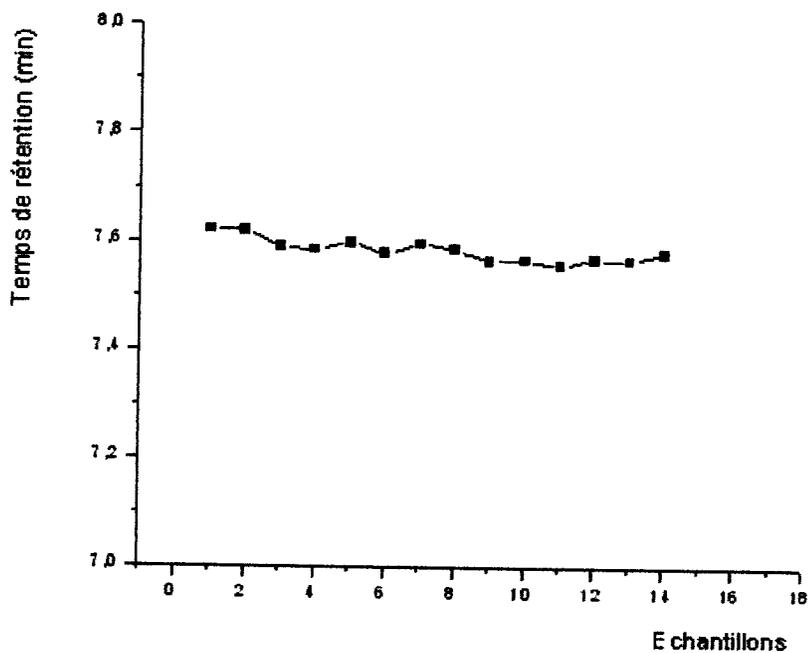


Figure 3.2 : Distribution des temps de rétention de la Quatrième série.

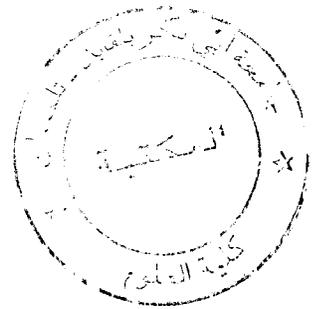
1.5. Evaluation de l'état de carence en vitamine D des échantillons analysés

L'évaluation de l'état de carence de l'ensemble des échantillons analysés et présentés dans cette étude, est déterminée par dénombrement des échantillons dont la concentration est inférieure à 1.3 nmol/l [12]. Les résultats obtenus sont donnés au tableau suivant :

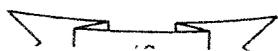


Tableau 3.6 : Taux en (%) de la carence en vitamine D des échantillons analysés.

	Nombre d'échantillons analysés	Nombre d'échantillons dont la concentration est < 1.3 nmol/L
1 ^{ère} Série	15	0
2 ^{ème} Série	17	2
3 ^{ème} Série	17	4
4 ^{ème} Série	17	5
5 ^{ème} Série	17	5
6 ^{ème} Série	18	9
Ensemble des échantillons	101	25
Etat de carence 24.75 %		



En se basant sur la concentration de 1.3 nmol/l comme seuil indicateur de carence, la valeur de taux de carence pour cette étude est 24.75 %.



Conclusion



La quantification de la vitamine D dans les échantillons biologiques est très importante de point de vue médical, épidémiologique et informationnel. Ce micronutriment est essentiel pour la santé humaine. C'est un antirachitique qui joue un rôle très important à l'absorbance du calcium.

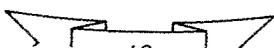
Le but de ce mémoire est d'étudier la carence de cette substance chez la population de la wilaya de Tlemcen sous le thème « **Dosage des vitamines plasmatiques (Vit. D) par RP-HPLC dans des échantillons du service pédiatrie au CHU de Tlemcen** ». C'est un sujet de magister, Post de Graduation en Spectrochimie et Méthodes d'Analyse. Ce travail de recherche a été réalisé au laboratoire de Recherche en Spectrochimie et Pharmacologie Structurale de l'université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, Faculté des Sciences.

L'objectif principal de ce travail était une étude analytique, qui nous a permis de déterminer la concentration du Cholécalférol plasmatique, par chromatographie liquide à haute performance (RP-HPLC). L'utilisation de cet appareil sophistiqué, s'avère sans aucun doute un instrument de choix qui a pu répondre aux objectifs de cette importante étude qui concerne notre santé publique.

La détermination de Cholécalférol dans le plasma semble être difficile en raison de la complexité de la matrice utilisée. L'extraction de cet élément dans un volume de 100 µl de plasma par le mélange C₂H₅OH/CH₃COOC₂H₅ (1 : 1 ; v : v) proposé par Andrioli et Paola Manini a répondu à notre but. La quantification est réalisée par étalonnage externe et la compensation des erreurs a été largement vérifiée tout au long de cette étude.

La méthode est appliquée avec un minimum d'étapes sous des conditions optimales et le bon choix des solvants a permis d'aboutir à une très bonne résolution chromatographique par injection direct d'un volume de 100 µl de surnagent dans le système.

L'analyse de 101 échantillons de plasma des enfants d'âge préscolaire par la méthode chromatographique (RP-HPLC) nous a conduit à un taux de carence de 24.75 %. Le résultat obtenu indique un problème de santé publique.



Références Bibliographiques

- 1- Limbach S., Guillard J.-C. (2007) Les Vitamines. *Revue Médical*, 127-143.
- 2- Cavalier E., Souberbielle J.-C. (2009) La vitamine D : effets « classiques », « non classiques » et évaluation du statut du patient. *Médecine nucléaire*. 33, 7-16.
- 3- Valdiguié P. (2000) *Biochimie clinique*, 2eme Edition, Editions médicales internationales,.
- 4- Mistretta V.I., Delanaye P., Chapelle J.-P., Souberbielle J.-C., Cavalier É. (2008) Vitamine D2 ou vitamine D3 ? Vitamin D2 or vitamin D3 ?. *La revue de médecine interne*, 29, 815-820
- 5- Emile C. (2008) Communication de JC Souberbielle. Journée Scientifique du laboratoire Marcel Mérieux (Biomnis) , Lyon.
- 6- Catherine C. (2006) Vitamine D et Calcium, *Revue du Rhumatisme*, Volume 73, Issue 8, 846-851.
- 7- Marie-Christine de Vernejoul. (2005) Métabolisme phosphocalcique lors de la grossesse et de la lactation. *Revue du Rhumatisme*, Volume 72, 695-697.
- 8- Gabri van der Pluijm. (2002) Mécanismes impliqués dans l'invasion de l'os par les cellules tumorales Mechanisms involved in bone invasion by tumour cells. *Revue du Rhumatisme*, Volume 69, 1002-100.
- 9- Xavier Deprez, (2003), Prévention non pharmacologique des fractures ostéoporotiques Non pharmacological prevention of osteoporotic fractures *Revue du Rhumatisme* Volume 70, 818-828.
- 10- John F. Aloia. (1990) Rôle of calcitriol in the treatment of postmenopausal osteoporosis *Metabolism*, Volume 39, 35-38.

- 11- Lei Fu, Francisco Yun. , (2009) Common genetic variants of the vitamin D binding protein (DBP) predict differences in response of serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] to vitamin D supplementation *Clinical Biochemistry, Volume 42, 1174-1177.*
- 12-David A. Bender. (2003) Nutritional biochemistry of the vitamins. 2eme edition.
- 13- Shils, Maurice E, Shik M, Catharine, Robert J. (2006) Modern Nutrition in Health and disease. diteur Shike M.D.
- 14- Dixon H. B. F., (1982) Nomenclature of vitamin D. UIPAC and International union of biochemistry. 1511-1516.
- 15- Robert B. Rucker , John W, Donald B, (2001), Handbook of vitamins, 3eme edition.
- 16- Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., (2002) Principe instrumental, editions de boeck Université.
- 17- Skoog D. A., West D. M, Holler F. J. (2002). chimie analytique, éditions de boeck Université.
- 18- Andrioli R., manini P. (2003) Development of a simplified method for the simultaneous determination of retinol, α -tocopherol, and β -carotene in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization, *Anal Bioanal Chem.* 378:987-994, Springer-Verlag.
- 19- Rosset R., Caude M., Jardy A. (1991). Chromatographie en phase liquide et supercritique, Masson.
- 20- Skoog D. A., West D. M., Holler F. J. (2002). Principe instrumental, editions de boeck Université.

- 21- Djellouli O. (2006) Recherche de la carence en vitamine A par Dosage du rétinol plasmatique par RP-HPLC chez les enfants de 12 à 59 mois dans la wilaya de Tlemcen, CHU Tlemcen, Université de Tlemcen, mémoire PG SMA.
- 22- Laouer R. (2009) Dosage de la vitamine E plasmatique par RP-HPLC chez les enfants de 12 à 59 mois dans la wilaya de Tlemcen, CHU Tlemcen, Université de Tlemcen, mémoire PG SMA.
- 23- Massen Z. (2007). Prévalence des troubles dus à la carence en vitamine A chez les enfants âgés de 12 à 59 mois dans l'ouest Algérien (Wilaya de Tlemcen). CHU Tlemcen, Université de Tlemcen, Thèse en sciences médicales, 7,102-107.
- 24- Ruperez F.J., Martin D., Herrera E., Barbas C. (2001) Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices. *J. Chromatogr. A*, 935, 45-69.
- 25- Nicoletti G., Crescibene L., Scornaienchi M., Bastone L., Bagala A., Napoli I.D., Caracciolo M., Quattrone A. (2001). Plasma levels of vitamin E in Parkinson's disease. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 33, 7-12.
- 26- Abidi S.L. (2000). Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. *J.Chromatogr. A*, 881, 197-216.