

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

**UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA -1-**

**Faculté de technologie**



## **MEMOIRE DE MASTER PROFESSIONNEL**

EN Génie des procédés

**Spécialité : Pharmacie Industrielle**

### **Etude d'un protocole de dosage et de contrôle de la vitamine D**

*Présenté par :*

*Mlle DRIOUECH Rania Mme C.ZEDDAM*

*Mlle TALEB Fatma*

*Encadré par :*

Promotion 2020/2021

# Dédicace



*Je dédie ce mémoire :*

*À celle qui m'a donné la vie ma très chère **MAMAN** pour tous ses sentiments d'affection et d'amour qui représentent pour moi le pilier de tous mes efforts...*

*À mon très cher **PAPA** l'école de mon enfance qui a été mon ombre durant toutes mes années d'études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager et à me protéger...*

*À mon petit frère **YOUCEF** toute la joie et le bonheur qu'il me procurer et qui sans lui la vie aurait un gout amer ...*

*À la mémoire de ma grand-mère **ZOUBIDA** que Dieu l'accueille dans son vaste paradis, je n'oublierai jamais sa bonté ...*

*À mes très chères tantes **HAMIDA, HOURIA, FATIHA, Naïma** qui de moi je sais seront fiers...*

*À ma chère voisine **Kenza** que je considère comme un membre de ma famille ... je t'aime*

*À mon **Partenaire** qui a partagée tous les efforts avec moi pour terminer ce travail, je t'adore **FATMA***

*À mes nouveaux amies que j'ai rencontrée au labo **SOUMEYA** et **NASSIMA**, je suis heureuse de faire votre connaissance*

*Particulièrement à **HOUHIA** et **CHOUROUK** et **IMANE** et **Karima, Chahra, Wissem**, et mes copines adorées pour tout le soutien et l'amour dont elles font preuve à mon égard...*

*Enfin à tous **mes amies** sans aucune exception...*

*Et à tous ceux qui ma réussite leur tient à cœur*

*Drîouech Rania*



*Je dédie ce mémoire :*

*À celle qui m'a donné la vie ma très chère **MAMAN**  
pour tous ses sentiments d'affection et d'amour qui représentent pour moi  
le pilier de tous mes efforts...*

*À mon très cher **PAPA** l'école de mon enfance qui a été mon ombre  
durant toutes mes années d'études, et qui a veillé tout au long de ma vie à  
m'encourager et à me protéger...*

*À la mémoire de ma grand-mère **FATMA ZOÛRA** que Dieu l'accueille  
dans son vaste paradis, je n'oublierai jamais sa bonté ...**je t'aime MAMA  
AYEE***

*À mon cher grand-père **AHMED** qui de moi je sais est fier...*

*À ma chère tante **KARIMA**, la source de mes efforts pour son aide et ses  
encouragements, durant tous mes années d'études je t'aime **MIMA***

*À mon cher tonton **ISMAIL** pour tout son soutien, celui qui s'est toujours  
sacrifié pour me voir réussir, que Dieu te protège ...**je t'aime***

*À mon très cher frère **IDIR** pour toute la joie et le bonheur qu'il me  
procure et qui sans lui la vie aurai un gout amer ...*

*À mes très chères sœurs **SONIA** et **KENZA** pour leurs encouragements  
permanents, et leurs soutiens moraux qui de moi je sais seront fiers...*

*À ma chère tante **SAMIRA** et mes chères oncles **MOHAMED**, **KAMEL**  
et leurs petites familles que dieu leurs donne une longue et joyeuse vie ...*

*À ma grand-mère, mes tantes, mes oncles et spécialement à mon chère  
oncle **MORADE**....*

*À mes chères copines **AHLAM**, **NOUSSAÏBA**, **CHOUROUK**, **RANIA**,  
**NABILA** que j'aime trop ....*

*À mes chères amis **NASSIMA** et **SOUMEYA** très contente d'avoir  
rencontrée des personnes comme vous ...*

*Et à tous ceux qui ma réussite leurs tient à cœur ...*

*Taleb Fatma*

# REMERCIEMENTS

*Nos remerciements vont à Allah, le tout puissant qui nous a aidés et nous a donnés la patience et le courage durant ces longues années d'études.*

*Au terme du travail présenté dans ce mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme de **MASTER 2**, option **pharmacie industrielle**.*

*On tient à exprimer nos sincères remerciements à nos parents qui nous ont aidés beaucoup dans notre carrière.*

*Nos remerciements vont vers notre promotrice madame **C.ZEDDAM** qui a manifesté beaucoup d'intérêt et consacré énormément de temps pour ce travail. On la remercie vivement pour son guide précieux et ses judicieux conseils pratiques durant la préparation de ce mémoire. On lui exprime nos vives reconnaissances et nos profondes et respectueuses considérations.*

*Au président du jury, d'avoir accepté la charge de présider le jury et de porter à ce travail son intérêt, veuillez trouver ici l'expression de notre sincère reconnaissance.*

*A Monsieur l'examineur pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'examiner ce travail et d'apporter ses critiques enrichissantes, veuillez trouver ici l'expression de notre sincère reconnaissance.*

*Nous souhaitant adresser nos remerciements les plus sincères à Madame **NAFFISA** qui a apportée son aide et qui a contribué à l'élaboration de ce mémoire*

*On tient à remercier les responsables de laboratoire (opération unitaire) monsieur **ZOUBIR**, Madame **RACHIDA**, qui nous ont aidés et guidés pendant le stage et pour leurs gentillesse.*

*Nous souhaitant adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.*

*On remercie infiniment tous nos camarades de la promotion de pharmacie industrielle 2020/2021.*

*Grand merci à nos familles toutes entières pour tout ce qu'ils ont apportés avec leurs soutiens indéfectibles.*

## Résumé :

La vitamine D a des implications tant sur le plan osseux que sur le plan extra osseux.

L'insuffisance et la carence en vitamine D est un sujet attirant de plus en plus l'attention des médecins et des chercheurs .En Algérie, peu d'étude se sont intéressés à la prévalence de l'hypovitaminose D.

Pour cette raison, afin de découvrir la cause d'une carence en vitamine D chez une personne, malgré la disponibilité d'un environnement approprié et la prise de suppléments nutritionnels, nous avons mené un ensemble d'étude et d'expérience au laboratoire en utilisant les appareils suivants : ultraviolet, infrarouge ; chromatographie en phase liquide haute performance.

**Mot clé :** vitamine D ; carence prévalence ; hypovitaminose D.

## Abstract:

Vitamin D has bone and extra-bone implications.vitamin D deficiency and insufficiency is a subject that is attracting more and more attention from doctors and researchers in algeriafew studies have investigated the prevalence of hypovitazminose D.

For this reason , in order to find out the cause of vitamin D deficiency in a person , despite the availability of the appropriate environment and taking nutritional supplements , we have conducted a set of studies and laboratory experiments in each of the ultraviolet ;infra red ;high performance liquid chromatography .

**Key words :** vitamin D ;deficiency ; insufficiency ;prevalence ;hypovitaminosis D .

## ملخص

يلعب الفيتامين (د) دور مهم على مستوى العظام و خارجها ليشمل باقي وظائف الجسم الحيوية و النقص في الفيتامين (د) موضوع أصبح يشغل أكثر فأكثر اهتمام الأطباء و الباحثين . في الجزائر قليل من الدراسات أجريت لاحصاء مدى انتشار هذه الظاهرة

لهذا السبب من اجل معرفة سبب نقص نسبة الفيتامين (د) عند الشخص رغم توفر البيئة الملائمة و تناول المكملات الغذائية،قمنا بإجراء مجموعة من الدراسات و التجارب المخبرية في كل من جهاز الاشعة فوق البنفسجية، الأشعة تحت الحمراء،سائل عالي الضغط

**كلمات البحث:** فيتامين د، قصور، نقص،نقص حاد، معدل انتشار

## **Sommaire :**

*Liste des figures*

*Liste des tableaux*

*Liste des abréviations*

*Introduction.....11*

## **Chapitre I : Généralités sur la vitamine D**

### **I.1- la biochimie de la vitamine D**

*I.1.1 – définition : .....14*

*I.1.2-Origine de la vitamine D : .....14*

*I.1.3- Rôle physiologique : .....15*

*I.1.4- Métabolisme et régulation : .....16*

*I.1.4.1-Métabolisme:.....16*

*I.1.4.2 -Régulation : .....17*

*I.1.5- Mécanisme d'action : .....19*

*I.1.5.1- Effets génomiques : .....19*

*I.1.5.2-Effets non génomiques : .....20*

### **I.2. La chimie de la vitamine D**

*I.2.1.Nomenclature : .....21*

*I.2.2-Structure : .....21*

*I.2.3 -Propriétés chimiques : .....22*

*I.2.4 - Propriétés spectroscopique d'absorption UV-Visible de la vitamine D.....22*

## **ChapitreII : Matériels et méthodes :**

*II.1- Introduction .....24*

*II.2-produits utilisés.....24*

*II.2.1-vitamine D.....24*

*II.2.2-Réactifs utilisés .....25*

*II.3- Tests de dégradation .....25*

<i>II.3.1- Tests de dégradation appliqués aux solutions liquides</i> .....	25
<i>II.3.1.2- Préparation des mélanges kbr / vitamine D</i> .....	26
<i>II.3.2-Durée des tests de dégradation</i> .....	26
<i>II.4-Techiniques instrumentales d'analyses</i> .....	26
<i>II.4.1- La spectroscopie UV-visible</i> .....	26
<i>II.4.2- La spectroscopie dans l'Infrarouge</i> .....	27
<i>II.4.3- La chromatographie liquide a haute performance HPLC</i> .....	27

### **Chapitre III : Résultats et Discussions**

<i>III.1-Introduction</i> .....	30
<i>III.2- Caractérisation de la vitamine D par la spectroscopie dans l'uv –visible</i> .....	30
<i>III.3- Caractérisation de la vitamine D par la spectroscopie dans l'infrarouge</i> .....	31
<i>III.4- Caractérisation de la vitamine D (D<sub>3</sub> – B.O.N et D- Three) par la chromatographie en phase liquide HPLC</i> .....	35
<i>III.5- Etude de la dégradation de la vitamine exposé à la lumière blanche</i> .....	36
<i>III.5.1- Détermination des % de dégradation par la spectroscopie uv-visible</i> .....	36
<i>III.5.2- Détermination des % de dégradation par la spectroscopie IRTF</i> .....	38
<i>III.5.3- Détermination des % de dégradation de la vitamine D par la chromatographie HPLC</i> .....	40
<i>III.6- Application : dosage de la vitamine D dans une préparation pharmaceutique et la sang</i> .....	42
<i>III.6.1-Cas de la préparation pharmaceutique CALCIFOSE VITAMINE D</i> .....	42
<i>III.6.2- Cas des prélèvements sanguins</i> .....	43
<i>Conclusion Générale</i> .....	44
<i>Références bibliographique</i> .....	46
<i>Annexe</i> .....	48

Liste des figures :

Figure I.1: structure chimique des vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> d'après [1]

Figure I.2: Métabolisme de la vitamine D[25].

Figure I.3: L'activation et catabolisme de la vitamine D[4]

Figure I.4: Mécanisme d'action de la vitamine D, effet génomique [11]

Figure I.5: Effets génomiques et non génomiques de la vitamine D [14].

Figure I.6 :a- Le spectre UV de la provitamine D et la vitamine D

b- Le spectre caractéristique de la vitamine D

Figure III.1- Spectre UV de la vitamine D-Three

Figure III.2- spectre UV de la vitamine D<sub>3</sub> B.O.N

Figure III.3- Spectre global IRTF de la vitamine D de marque D<sub>3</sub> B.O.N

Figure III.4- Spectre global IRTF de la vitamine D de marque D-Three

Figure III.5- Spectre IRTF de la vitamine D de marque D<sub>3</sub> B.O.N et D\_Three dans la zone d'absorption [600 ;1800 ] Cm<sup>-1</sup>

FigureIII.6- chromatogramme de la vitamine D-Tree

FigureIII.7- chromatogramme de la vitamine D<sub>3</sub> B.O.N

Figure III.8- Courbe d'étalonnage

Figure III.9- Spectres IRTF de D-Three et D<sub>3</sub> B.O.N dans la zone d'absorbance des carbonyles [1700 ;11800] Cm<sup>-1</sup>

Figure III.10- courbe d'étalonnage de la vitamine D<sub>3</sub> B.O.N obtenu par HPLC

Figure III.11- chromatogramme de la poudre calsidose /vitamine D en solution dans le méthanol

Figure III.12– Chromatogramme de sérum sanguin( a- Driouech –b- Taleb)



Listes des tableaux :

*Tableau II.1 – Concentration des solutions d'étalonnage.*

*Tableau III.1- Comparaison des bandes d'absorption caractéristiques de D -  
Thre et D<sub>3</sub> B.O.N*

*Tableau III.2- Concentration et % de détectés à 265 nm*

*Tableau III. 3- Concentration et % de dégradation de la vitamine D (D-Thre  
) détectés à 265 nm*

*Tableau III.4- % de dégradation de la vitamine D<sub>3</sub> B.O.N*

**Liste des abréviations :**

<b>1,25 (OH)<sub>2</sub> D</b>	1,25 dihydroxy - vitamine D
<b>1,24,25(OH)<sub>3</sub> D</b>	1,24,25 trihydroxy- vitamine
<b>D 7- DHC</b>	7-déhydrocholestérol
<b>24,25(OH)<sub>2</sub> D</b>	24,25 dihydroxy- vitamine D
<b>25(OH) D</b>	25- hydroxy- vitamine D
<b>AFSSPS</b>	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
<b>ANC</b>	Apports Nutritionnels Conseillés
<b>DBP</b>	VitaminD- BindingProtein
<b>DMO</b>	Densité Minérale Osseuse
<b>MS</b>	Spectrophotométrie de Masse
<b>UI/j</b>	unité internationale par jour
<b>UVA</b>	Rayon Ultra-Violet type A
<b>UVB</b>	Rayons Ultra- Violet type B
<b>VDR</b>	Vitamin D Receptor
<b>VDRE</b>	Eléments de Réponse à la Vitamine D
<b>Vit.D</b>	Vitamine D
<b>Vit. D2</b>	Vitamine D2 (Ergocalciférol)
<b>Vit.D3</b>	Vitamine D3 (cholécalfiérol)

# Introduction

Les vitamines sont des substances organiques indispensables, sans valeurs énergétique propre que l'homme ne synthétise pas ou en quantité insuffisante. 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) []

La vitamine D<sub>3</sub> ou cholécalciférol est présente dans les produits d'origine animale. Parallèlement, 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<sub>3</sub> contrôle le développement des os dès les premières étapes de la différenciation et la prolifération cellulaire. Une carence en vitamine D entraîne un rachitisme chez les jeunes, elle est un immuno-modulateur naturel. La vitamine D régulerait un certain nombre de gènes contrôlant la prolifération et la différenciation des cellules malignes. ***Elle agit également sur le système neurologique***, où le récepteur de la vitamine D est largement retrouvé au niveau des tissus cérébraux. Un taux inadéquat de vitamine D serait à l'origine de certaines pathologies (de dépression, schizophrénie, la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson, douleurs musculaires).

Ces dernières années une carence à l'échelle mondiale a été notée au niveau de la population touchant ainsi toutes les tranches d'âge. A cet effet, un apport en vitamine D est alors prescrit par des praticiens après avoir recommandé aux patients un bilan vitaminique, qui s'avère lourd sur le plan pécuniaire.

Les bilans effectués dans les laboratoires sur les prélèvements sanguins des patients font appel à **La chimiluminescence, ou chimioluminescence, qui est basée sur la production de lumière à la suite d'une réaction chimique.** C'est des automates qui se chargent de l'analyse dont les résultats montrent souvent une carence même chez

personnes vivant dans des zones ensoleillées. Aussi, un nombre de praticiens souhaiterait connaître la relation de cause à effet dans ce cas.

Certains pensent que c'est le réactif ou marqueur qui serait impliqué. D'autres attribuent cette carence au mode de vie. La question gênerait énormément les propriétaires des laboratoires d'analyses qui ont investi de grande somme d'argent pour l'acquisition des appareils.

C'est dans cette optique que nous avons essayé de contribuer par ce thème dans l'espoir d'apporter une modeste réponse et que nous avons intitulé " Etude d'un protocole de dosage et de contrôle de la vitamine D", en nous inspirant des données de la littératures. Pour cela nous avons utilisé trois techniques instrumentales (spectroscopie IRTF, UV-Visible et la chromatographie liquide HPLC).

**Le présent manuscrit est reparti en trois chapitres dont le premier** traitera les généralité de la vitamine D (biochimie et propriétés). Dans **le deuxième chapitre**, nous développerons tout le parcours expérimental (quantification, dégradation). Quant aux résultats obtenus, c'est dans le troisième chapitre qu'ils seront détaillés et discutés et suivis d'une conclusion générale.

# *Chapitre 1*

## *Généralité sur la vitamine D*

## **I-Biochimie de la vitamine D :**

### **I.1 - définition :**

La vitamine D, appelée aussi calciférol ou cholécalciférol est liposoluble. Les matières grasses de la ration assurent son transfert et son absorption, selon les mêmes mécanismes que les lipides. Elle est ensuite stockée en quantité relativement importante (variable en fonction de l'apport alimentaire) dans le tissu adipeux et le foie. Cette capacité de stockage présente à la fois l'avantage de fournir régulièrement à l'organisme les quantités nécessaires à ses besoins [1]

La vitamine D a été isolée puis synthétisée en 1931 [1]. C'est une substance indispensable qui se comporte comme une hormone et possède de multiples effets physiologiques [2,3]

### **I.2-Origine de la vitamine D :**

La vitamine D a une double origine : Alimentaire et endogène [4].

On distingue :

- Vitamine D2 ou l'ergocalciférol d'origine fongique { 3-{2-[1-(1,5-dimethyl-hexyl)-7a-methyl-octahydro-inden-5-ylidene]-ethylidene}-4-methylene-cyclohexanol } (figure I.1) :

Elle est présente dans l'alimentation d'origine végétale (céréales mais également champignons, levures) [2,5]. Elle est également produite grâce à l'irradiation par les rayons ultra-violet d'un précurseur, l'ergostérol, présent dans les levures. On peut la retrouver dans le corps humain par le biais de l'alimentation ou d'une supplémentation médicamenteuse [6,5]

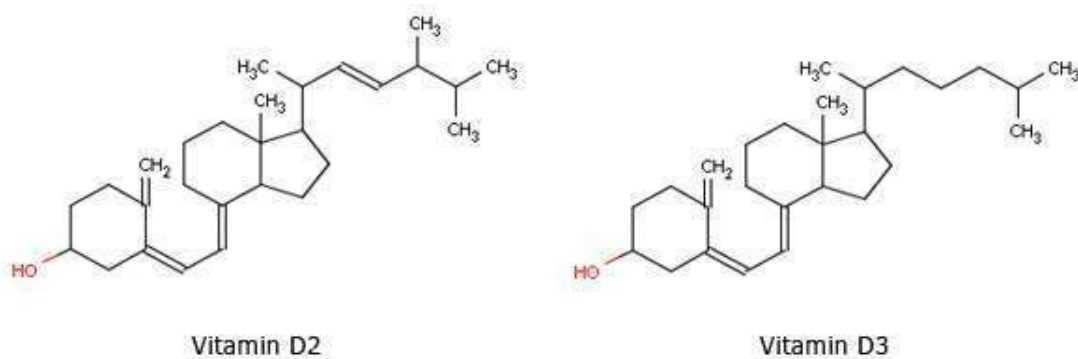
- Vitamine D3 ou le Cholécalciférol 4-methylene-3-2-[7a-methyl-1-(1,4,5-trimethyl-hex-2enyl)-octahydro-inden-5ylidende]-ethylidene}-cyclohexanol (figure I.1) :

est la vitamine d'origine animale ou humaine [5]. Elle est synthétisée dans l'épiderme à partir d'un précurseur, le 7-déhydrocholéstérol ou vitamine D3 sous l'influence de rayons ultra-violet de basse longueur d'onde (UVB), des UVB de 290 à 315 nm [7]. Isolée initialement à partir d'huile de poisson [1]. 90% environ de la vitamine D total sont synthétisée dans la peau sous l'effet des rayons du soleil, 10% des vitamines D2 et D3 sont absorbés avec la nourriture [6,8].

Durant cette exposition, les rayonnements UVB (290-315 nm) photolysent le déhydrocholestérol (7-DHC) de l'épiderme en prévitamine D3. Une fois formé, celle-ci subit une isomérisation thermique pour former la D3.

initialement à partir d'huile de poisson [1]. 90% environ de la vitamine D totale sont synthétisée dans la peau sous l'effet des rayons du soleil, 10% des vitamines D2 et D3 sont absorbés avec la nourriture [6,8].

Durant cette exposition, les rayonnements UVB (290-315 nm) photolysent le déhydrocholestérol (7-DHC) de l'épiderme en prévitamine D3. Une fois formé, celle-ci subit une isomérisation thermique pour former la D3.



**Figure I.1:** structure chimique des vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> d'après [1]

#### **I.4- Role physiologique et biologique :**

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, 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.

Toutefois, de nombreux autres tissus de l'organisme sont équipés de récepteurs à la vitamine D [9] et de l'enzyme (1 $\alpha$ -hydroxylase) capable de transformer la 25(OH)D en 1,25(OH)<sub>2</sub>D, 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 l'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....)

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 ,10].

#### **I.4- Métabolisme et régulation :**

##### **I.4.1-Métabolisme:**

Les vitamines D2 et D3 ont un métabolisme sensiblement identique et dépendent des mêmes complexes enzymatiques chez l'homme, [10,11]. Elles doivent subir une double hydroxylation au niveau du foie puis au niveau du rein, pour être transformée en sa forme active et hormonale [4].

**Dans un premier temps**, après transport dans la circulation sanguine, liée aux lipoprotéines (chylomicrons) ou à la VDBP, la vitamine D est captée au niveau hépatique et hydroxylée sur le carbone 25 pour former la 25 - hydroxy-vitamine D (25(OH) D ou calcidiol), dont la concentration sérique représente le statut vitaminique d'un individu [10,11].

Cette hydroxylation se fait sous l'action d'enzymes à cytochromes P450 (plusieurs 25-hydroxylases). Actuellement, 2 enzymes semblent être mises en jeu dans l'hydroxylation de la vitamine D en 25(OH) D: CYP27A1 et CYP2R1, [12]. Cette dernière apparaît comme la principale enzyme responsable de l'hydroxylation de la vitamine D sur le carbone 25. Cette hydroxylation hépatique est très peu régulée: plus on ingère ou on synthétise de la vitamine D, plus on fabrique de la 25(OH) D, [4].

**Dans une deuxième étape**, la 25 (OH) D est hydroxylée sur le carbone 1 en 1,25 (OH)<sub>2</sub> D (ou calcitriol, métabolite actif de la vitamine D) sous l'action d'une enzyme, la 1 $\alpha$ -hydroxylase mitochondriale (CYP27B1), dans les cellules épithéliales du tubule proximal rénal, mais aussi dans d'autres types cellulaires (hors du rein) qui possèdent une 1 $\alpha$ -hydroxylase (CYP27B1) telles que la prostate, le sein, le colon, le poumon, les kératinocytes, les ostéoblastes, les cellules pancréatiques  $\beta$ , les monocytes et les cellules parathyroïdiennes, [4]. De plus, ce 1,25 (OH)<sub>2</sub> D produit localement ne pénètre pas dans la circulation et n'a donc pas d'influence sur le métabolisme du calcium, [13].



L'hydroxylation rénale, est très étroitement régulée par des hormones du métabolisme phosphocalcique afin d'adapter la concentration circulante de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  aux besoins de l'organisme en calcium et en phosphore, [6]. Lors que l'hydroxylation indépendante de la régulation phosphocalcique et produit de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  qui agit localement (de manière « intracrine») et ne participe pas au métabolisme phosphocalcique, [14].

Les métabolites hydroxylés de la vitamine D sont inactivés par la 24-hydroxylase (CYP24A1). Cette enzyme catalyse la conversion de  $25(\text{OH})\text{D}$  en  $24,25(\text{OH})_2\text{D}$  et de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  en  $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}$ , transformés ensuite en acide calcitroïque inactif, [4,15].

D'autres enzymes de la famille des cytochromes P450 comme le CYP3A<sub>4</sub> peuvent également dégrader le calcitriol dans le foie et l'intestin [16].

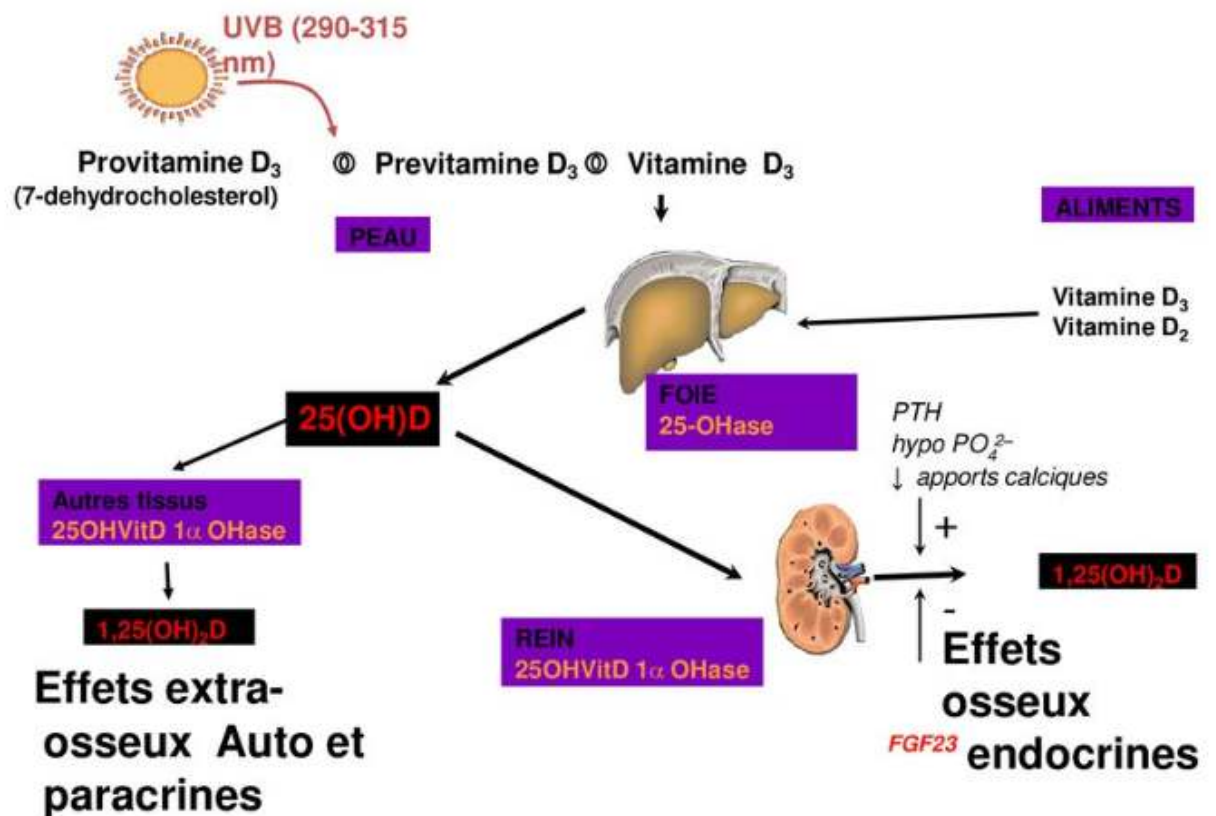


Figure I.2. Métabolisme de la vitamine D [25].

#### **I.4.2 .Régulation:**

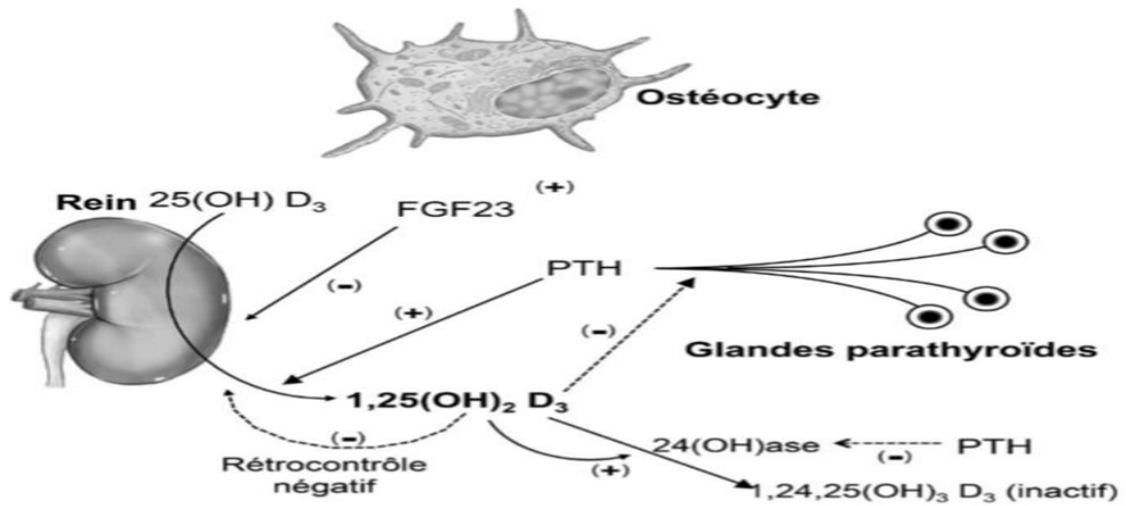
Divers facteurs régulent l'hydroxylation rénale de la vitamine D: la parathormone (PTH), le calcitriol lui-même, la calcémie ionisée, les phosphates et le fibroblastgrowth factor 23(FGF23) sont les principaux [17,18], dont l'activité du CYP27B1 est très étroitement régulée par différents paramètres du métabolisme phosphocalcique, [6]. Elle est principalement stimulée par la PTH et une calcémie basse, tandis qu'elle est inhibée par le fibroblastgrowth factor 23 (FGF23) et la concentration circulante de 1, 25 (OH)<sub>2</sub> D, selon un mécanisme classique de rétrocontrôle négatif, [11].

➤ **L'hormone parathyroïdienne ou parathormone (PTH) :** La sécrétion de PTH est régulée à court terme par la calcémie ionisée via le calcium sensingreceptor (Csr): toute diminution du calcium ionisé stimule quasi immédiatement la sécrétion de PTH[19]. Cette dernière fait augmenter l'activité de la 1 $\alpha$ -hydroxylase (CYP27B1), [4]. La régulation transcriptionnelle de la PTH est assurée par le calcitriol, avec une diminution de l'expression de l'ARNm de la PTH, [20].

➤ **La calcémie et la phosphorémie:** l'hypocalcémie et l'hypophosphatémie induisent une augmentation de l'activité de la 1 $\alpha$ -hydroxylase et inhibent l'activité de la 24 hydroxylase (CYP24A1). Alors que l'hypercalcémie et l'hyperphosphatémie inhibent l'activité de la 1 $\alpha$ -hydroxylase et augmente l'activité de la CYP24A1 [4].

➤ **La 1, 25 (OH)<sub>2</sub> D (calcitriol) :** Elle contrôle sa propre synthèse par un mécanisme de rétrocontrôle négatif. Elle-même inhibe l'activité de la CYP27B1 et stimule celle de la CYP24A1 rénale, responsable de l'inactivation de 25 (OH) D et 1,25 (OH)<sub>2</sub> D, aussi inhibe la sécrétion de la PTH, [4].

➤ **FGF-23 (fibroblastgrowth factor 23) :** facteur hypo-phosphatémiant synthétisé par les ostéocytes inhibe l'activité de la 1 $\alpha$ -hydroxylase et augmente l'activité de la CYP24A1, [4]



**Figure I.3:** l'activation et catabolisme de la vitamine D, [4].

### **I.5-Mécanisme d'action:**

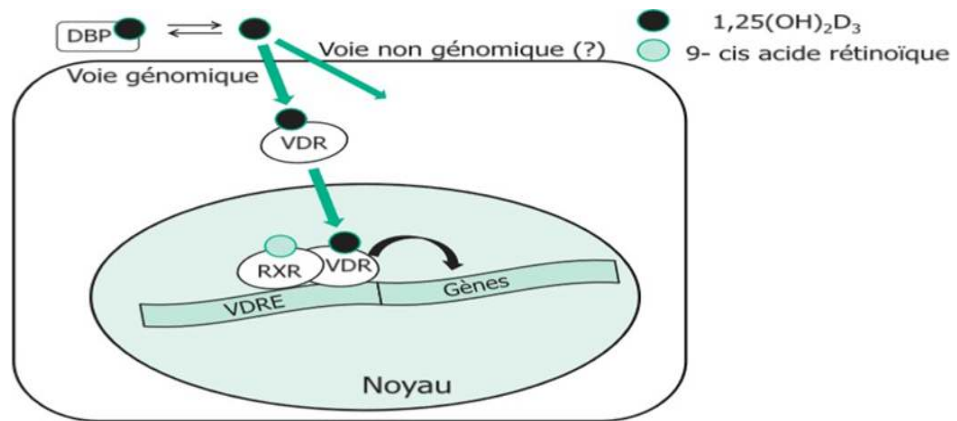
Les complexes VDBP-métabolites de vitamine D seraient internalisées dans les cellules utilisatrices par endocytose, [21].

La  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  peut exercer des effets endocrines lorsqu'elle est produite par le rein puis transportée via la circulation jusqu'à ses tissus cibles. Cette  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  peut également avoir des effets autocrines, paracrines et intracrines. En effet, de nombreux tissus et types cellulaires expriment la CYP27B1. C'est notamment le cas des lymphocytes, des macrophages, des adipocytes ou encore des kératinocytes, [11]. Dans ce cas, la  $25(\text{OH})\text{D}$  internalisée dans ces types cellulaires peut y être hydroxylée en  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  qui y agit localement, [17].

Le métabolite actif de la vitamine D, le  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  présente à la fois des effets génomiques et non génomiques, [11].

### **I.7.1-Effets génomiques:**

Dans la cellule, la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  se lie au VDR [17]. Le complexe VDR- $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  est transloqué au noyau de la cellule où il s'associe au récepteur de l'acide rétinoïque, le retinoid X receptor (RXR). L'hétérodimère RXR-VDR en présence de ligand se lie à l'ADN en des sites appelés éléments de réponse à la vitamine D (VDRE), dans les régions promotrices des gènes dont l'expression est ainsi activée ou réprimée, [11].



**Figure I.4.** Mécanisme d'action de la vitamine D, effet génomique, [11].

#### **1.7.2-Effets non génomiques :**

La vitamine D et ses métabolites sont également responsables d'effets non génomiques. Ces effets du calcitriol dépendent d'un récepteur membranaire, la proteindisulfideisomerasefamily A member 3 (Pdia3) [22]. Le rôle de ce récepteur a été bien décrit dans l'entérocyte, où il participe au captage rapide du calcium [23]. Ce phénomène a également été décrit dans d'autres types cellulaires tels que les ostéoblastes, les hépatocytes ou les cellules  $\beta$  du pancréas, [11].

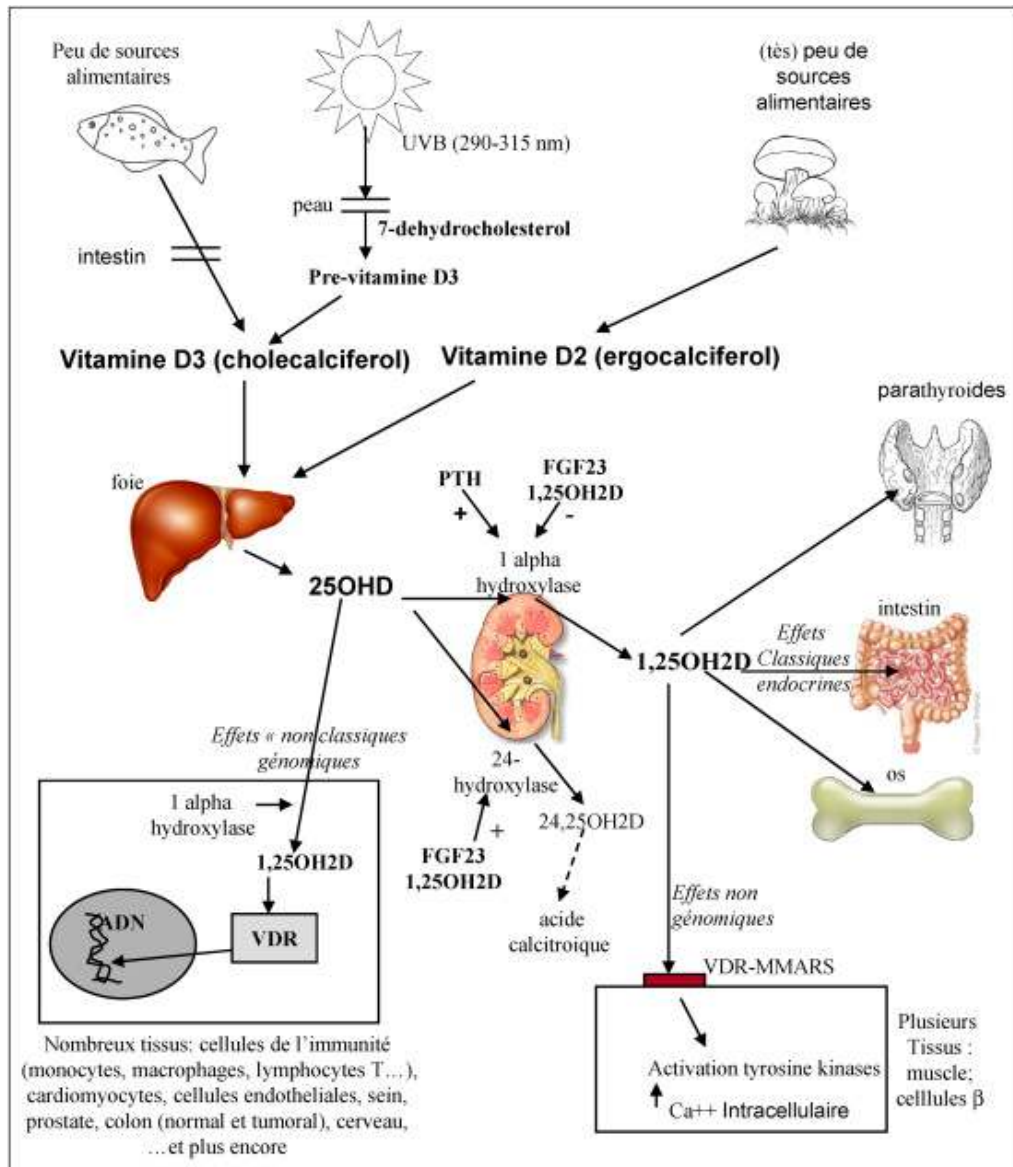


Figure I.5: Effets génomiques et non génomiques de la vitamine D,[14].

## II. La chimie de la vitamine D :

### II.1- Nomenclature :

Selon la littérature la nomenclature des séquences intervenant dans la vitamine D on été regroupés dans le tableau I.1 . 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 cissoïde et planaire et la double liaison C10-C19 est tordu hors de plan par un angle de 60°

## **II.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 cyclopentanoperhydrophenanthrane, 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 doublés figurant dans toutes les vitamines D.

## **II.3. Propriétés chimiques :**

- ✓ Vitamine D3 ( $C_{27}H_{44}O$ )
- ✓ 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 et méthanol .
- ✓ Instable à la lumière.
- ✓ Oxydable en cas d'exposition à l'air et à 24°C pendant 72h [24].

## **II.4- Propriétés spectroscopique d'absorption UV-Visible de la vitamine D :**

Le spectre d'absorption de la vitamine D dans le domaine des longueurs d'onde compris entre 200 et 300 nm, met en évidence une série de bandes pour la provitamine D (**figure 6-a**) et une seule bande à 265 nm pour caractéristique de la vitamine D (**figure (6-b)**)

Par ailleurs, son coefficient d'extinction molaire et de  $\epsilon = 18300\text{cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{L}$

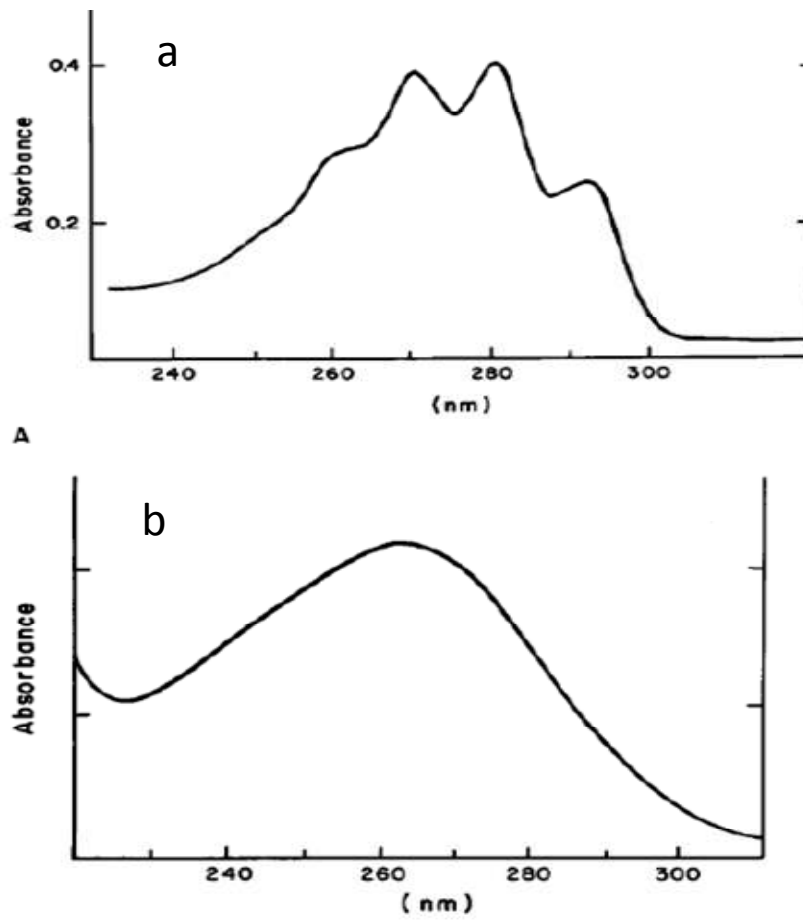


Figure I.6 . a. Le spectre UV de la provitamine D et la vitamine D  
 b. Le spectre caractéristique de la vitamine D.

# *Chapitre 2*

## *Matériel et méthode*

### **II.1- Introduction :**

L'objectif de l'étude effectuée consiste dans un premier lieu à tester un protocole d'analyse de la vitamine D par HPLC.



Les conditions opératoires ainsi définies vont être adoptées pour la quantification de la vitamine dans le plasma sanguin ainsi que dans un produit pharmaceutique sous forme sèche (pour une suspension buvable) destinée aux personnes souffrant d'une ostéoporose et une carence en vitamine D

Un second point a été développé portant sur l'éventuelle dégradation de cette vitamine sous l'effet de la lumière solaire.

Le dernier point concerne la caractérisation de deux marques de vitamine D par **la spectroscopie dans l'UV-visible, l'infrarouge** et la HPLC.

## **II.2-Produits utilisés :**

### **II.2.1- Vitamine D :**

Le produit étudié (**vitamine D3 commerciale**) a été achetée au près des officines pharmaceutiques. Il s'agit de **deux marques** :

**a) D-Three** : fabriquée par les laboratoires BIOTHERA domicilié à El Taref.

Elle est présentée dans **une** ampoule de **2ml** contenant 1ml de produit dont la composition est :

- **Principe actif : cholécalciférol (vitamine D3) à 200000 UI/ml.**
- **Excipient** : Ethyle oléate, qsp : 1ml

**b) Vitamine D3 B.O.N** composé d'un :

- **principe actif : cholécalciférol (vitamineD3) à 200000 UI**
- **Excipient** : triglycérides à chaîne moyenne q.s. pour une ampoule de 1ml.

Le produit en question est fabriqué en France par **HAUPT PHARMA** dont le titulaire de la décision de l'enregistrement est **Bouchara-RECORDATI**.

**c)Forme solide (cholécalciférol /Calcium)** en sachet de 500mg sous le **CALCIDOSE VITAMINE D**:

- une poudre contenant le concentré de **cholécalciférol** (4 mg ou 400 UI), 1250 mg de **CaCO<sub>3</sub>**.
- Excipient à effet notoire : sorbitol

Le produit est fabriqué par le laboratoire de Merinal (Oued Smar ) sous licence du laboratoire Français MAYOLY SPINGLER.

**d) Sérum sanguin** : récupéré à partir d'un prélèvement sanguin des étudiantes (Driouech Rania et Taleb Fatma)

Les échantillons de sérum ont subi un traitement avant l'analyse. Il s'agit de l'élimination des protéines en adoptant les procédés donnés [26] en annexe A1 .

### **II.2.2 : Réactifs utilisés :**

- ✓ Méthanol grade HPLC
- ✓ Ethanol
- ✓ Acétonitrile  $C_2H_3N$
- ✓ Eau bidistillée
- ✓ KBr spectroscopique
- ✓ Hexane
- ✓ Chloroforme

### **II.3. Tests de dégradation :**

Les tests de dégradation de la vitamine D ont été effectués en exposant à la lumière solaire des solutions contenant de la vitamine D/solvant :

- ✓ Ethanol / vitamine D Three
- ✓ Méthanol / vitamine D3 B.O.N

Par ailleurs, nous avons préparés des pastilles en KBr imbibé de vitamine D qui ont été exposées à la lumière solaire à des durées différentes (1h, 24h, 48h et 72h).

### **II.3.1 Tests de dégradation appliqués aux solutions liquides :**

#### **II.3.1.1. Préparation des solutions liquides**

a) Dans **une première étape**, nous avons préparés une solution mère  $S_M$  contenant

**0,25 ml** de vitamine D dissoute dans 25 ml d'éthanol ce qui correspond à une concentration en vitamine D exprimée en UI et en mg/ml de l'ordre de :

$$C_M = 2.10^3 \text{ UI/ml} = 2.10^3 \times 0,025 \text{ mg/ml}$$

$$C_M = 50 \text{ mg/ml}$$

-Sachant que 1UI de vitamine D est l'équivalent biologique de **0,025  $\mu\text{g}$**  de cholécalférol [27]

b) Dans **une seconde étape**, nous avons préparé une série de **4** solutions de même

concentration en introduisant **1.5 ml** de  $S_M$  dans une fiole jaugée de **10 ml**. Les quatre mélanges finaux (10 ml chacun) sont obtenus en ajoutant de l'éthanol de telle sorte que la concentration de chaque solution soit de **7.5 mg/ml**

Par la suite les quatre solutions sont transvasées dans 4 flacons en verre non teinté qui seront exposés à la lumière solaire. Les solutions seront analysées par la spectroscopie dans l'UV-visible.

c) Dans **une troisième étape**, nous avons préparé une seconde série de **8 solutions** (vitamine D/méthanol) en utilisant **15 µl** de vitamine D3 B.O.N et **2 ml** de méthanol grade **HPLC**. Les solutions seront analysées par **HPLC**

### **II.3.1.2. Préparation des mélanges KBr/vitamine D :**

Des pastilles en KBr spectroscopique ont été préparées par broyage de **15 µl** de vitamine D (D-Three et D3 B.O.N). Les pastilles ainsi obtenues ont été placées dans des boîtes de pétri en verre contenant du silicagel afin d'éliminer toute trace d'humidité

### **II.3.2. Durée des tests de dégradation :**

Les flacons contenant les préparations liquides (vitamine D/éthanol) ; (vitamine D/méthanol) et solide (pastilles KBr / vitamine D) ont été exposés à la lumière blanche (solaire) pendant : **1h, 24h, 48h, 72h**.

### **III.4. Technique instrumentales d'analyses :**

Pour cette étude nous avons utilisée trois techniques analytiques instrumentales. Il s'agit de la **HPLC**, la spectroscopie dans l'infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) et **l'UV-visible**. Les appareils utilisés sont de marque Shimadzu. Les conditions analytiques sont détaillées dans ce qui suit.

#### **III.4.1. La spectroscopie UV- visible :**

Les échantillons liquides ont été analysés par un balayage de la zone spectrale comprise entre **(200 ; 800 nm)** afin :

- d'identifier les bandes d'absorption caractéristique du produit étudié (**vitamine D3**),
- de noter les modifications spectrales dues à la dégradation et à l'évolution des concentrations de la gamme de solutions d'étalonnage.

Nous rappelons que la gamme d'étalonnage va servir à la quantification de la vitamine D dans les différents mélanges réalisés. Le tableau **II.1** regroupe les concentrations utilisées

**Tableau II.1.** Concentration des solutions d'étalonnage

<b>Solutions</b>	<b>C<sub>f1</sub></b>	<b>C<sub>f2</sub></b>	<b>C<sub>f3</sub></b>	<b>C<sub>f4</sub></b>	<b>C<sub>f5</sub></b>
<b>Concentrations mg/ml</b>	5	7.5	10	12.5	15
<b>Volume VMS (solution mère) ml</b>	1	1.5	2	2.5	3
<b>Volume Vfi ml</b>	10	10	10	10	10

#### **III.4.2.La spectroscopie dans l'infrarouge :**

Les pastilles de KBr contenant la vitamine D<sub>3</sub> ont été analysés à l'aide d'un appareil de marque shimadzu .

les conditions analytiques sont :

- ✓ Zone spectrale **400-4000 cm<sup>-1</sup>**
- ✓ Résolution : **4 cm<sup>-1</sup>**
- ✓ Nombre de scan : **20.**

#### **III.4.3. La chromatographie liquide a haute performance HPLC :**

La technique a été utilisée pour suivre la photodégradation (observer l'évolution de la concentration au cours du temps des solutions liquides), la quantification du produit dans une préparation pharmaceutique Calcidose vitamine D et dans les prélèvements sanguins.

Les conditions opératoires adoptées sont ci-dessous:

- ✓ Phase mobile : méthanol /eau : **99/1 ml.**
- ✓ Colonne **C<sub>18</sub>**
- ✓ Débit **0.8 ml / min.**
- ✓ Pression **07 Pascal.**
- ✓ Volume injecté **20 µl.**
- ✓ Détecteur UV à **212 nm et à 265 nm.**



# *Chapitre III*

## *Résultats et discussions*

### **III.1.Introduction.**

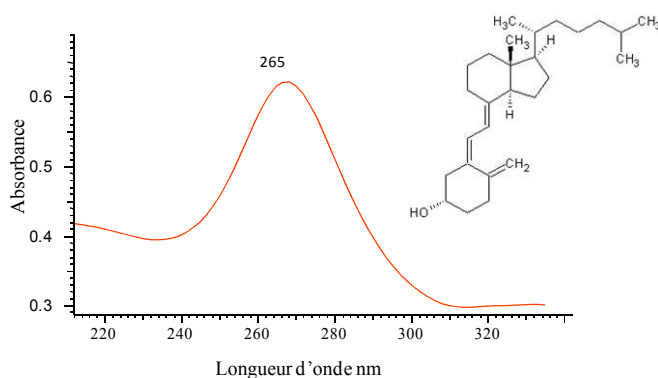
L'étude réalisée sur le dosage et la stabilité de la vitamine D a pour objet :

- ✓ l'identification dans les spectres IRTF des groupements fonctionnels présents dans la structure chimique de la vitamine D ainsi que le suivi de sa dégradation

- ✓ l'identification des bandes d'absorption caractéristique dans le domaine de l'ultraviolet;
- ✓ l'identification des pics caractéristiques dans les chromatogrammes HPLC;
- ✓ une quantification de la vitamine D dans un produit pharmaceutique prescrit dans la prévention contre l'ostéoporose,
- ✓ une application de la HPLC au dosage de la vitamine D dans le sang.

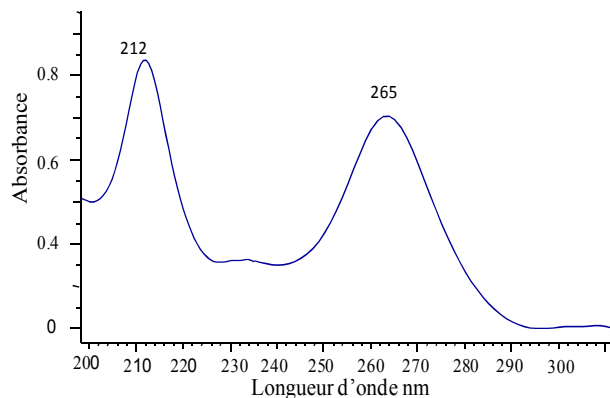
### III.2. Caractérisation de la vitamine D par la spectroscopie dans l'UV-Visible

Les échantillons liquides vitamine D/ éthanol (D-Three/ ethanol et D<sub>3</sub> B.O.N/éthanol) ont été analysés par la spectroscopie dans l'UV-Visible par un balayage de la zone spectrale entre 200 et 800 nm. Les spectres relatifs aux deux échantillons de vitamine D-Three (produite en Algérie) et D<sub>3</sub> B.O.N (produite en France) sont illustrés par les figures III.1 et III.2, respectivement. Ainsi, nous observons une bande caractéristique commune aux deux marques apparaissant à 265 nm et cela conformément aux données de la littérature [26] Ce maximum d'absorption est attribué aux doubles liaisons C=C présentes dans la structure chimique du **cholécalférol** ci-dessous.



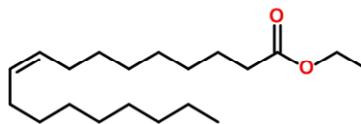
**Figure III.1.** Spectre UV de la vitamine **D-Three**

Par ailleurs, nous avons remarqué que l'échantillon **D<sub>3</sub> B.O.N** présente une seconde bande d'adsorption à 212 nm qui serait attribuée à l'excipient ajouté sous forme de triglycérides à chaîne moyenne qui confère au produit en question une viscosité assez marquée par rapport l'échantillon **D-Three** .



**Figure III.2.** Spectre UV de la vitamine **D<sub>3</sub> B.O.N**

Nous tenons à rappeler que la vitamine D de marque **D-Three** contient comme excipient de l'éthyle oléate de structure chimiques est ci-dessous:



### III.3. Caractérisation de la vitamine D par la spectroscopie dans l'infrarouge

Un échantillon de chaque marques de vitamine D (**D<sub>3</sub> B.O.N** et **D-Three**) a été analysé par l'IRTF. Les deux spectres globaux enregistrés sont illustrés par les **figures III.3 et III.4**. Ils mettent en évidence une série de bandes d'absorption attribuées aux groupements fonctionnels du principe actif et de l'excipient.

Aussi, nous observons la bande relative à la fonction OH (alcool) du principe actif à  $3456\text{ cm}^{-1}$ . Les deux excipients (triglycérides et éthyle d'oléate) sont bien marqués par les bandes d'absorption à  $1739$  et  $1745\text{ cm}^{-1}$ , attribuées au groupement carbonyle (C=O). La liaison C-O est identifiée par la bandes  $1159$  et  $1180\text{ cm}^{-1}$  dans les spectres des échantillons **D-Three** et **D<sub>3</sub>B.O.N**, respectivement. Ce léger écart est souvent du à des liaisons hydrogènes qui pourraient apparaître entre le principe actif et l'excipient qui diffère dans les deux marques et dont l'effet se traduirait par un déplacement du maximum d'absorption vers les longueurs d'ondes les plus élevées (en d'autres termes vers le nombre d'onde le plus faible).

La liaison C=C semblerait plus prononcée à  $1652\text{ cm}^{-1}$  dans le cas de l'échantillon **D<sub>3</sub>B.O.N** par rapport à l'échantillon **D-Three**. Ceci serait éventuellement à une insaturation dans les radicaux R, R' et R'' des triglycérides.



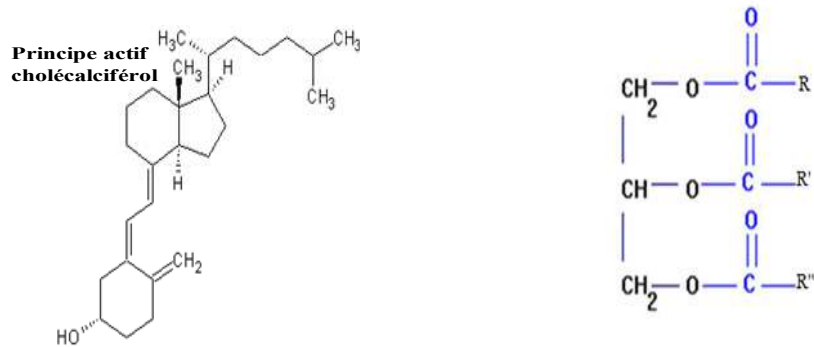
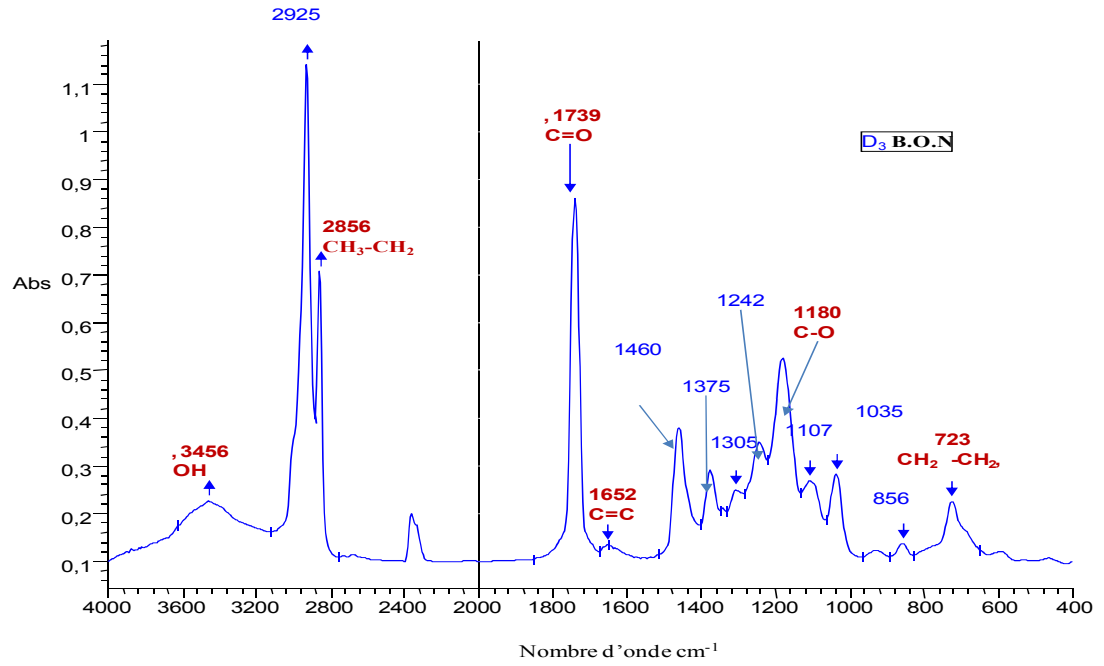
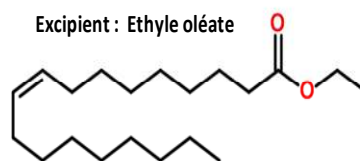
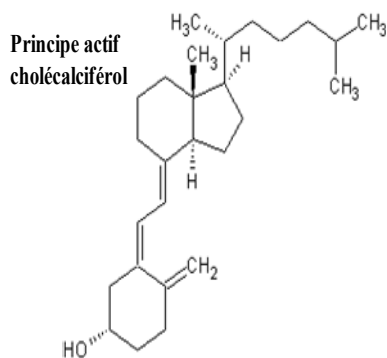
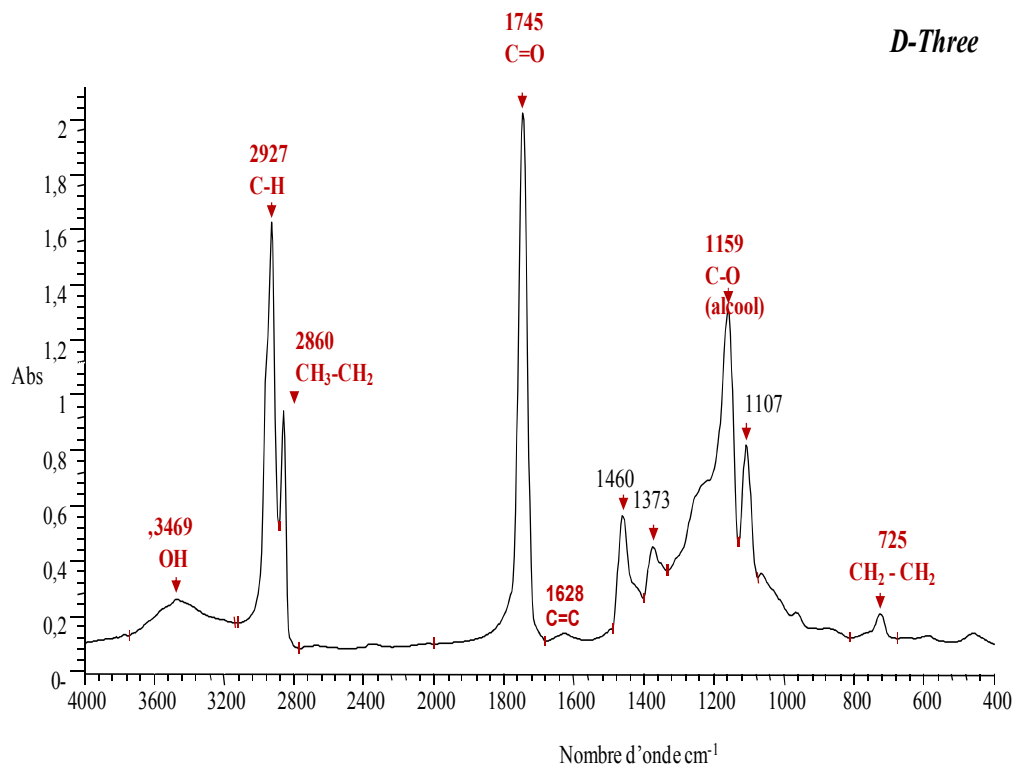


Figure III.3. Spectre global IRTF de la vitamine D de marque D<sub>3</sub>-B.O.N.

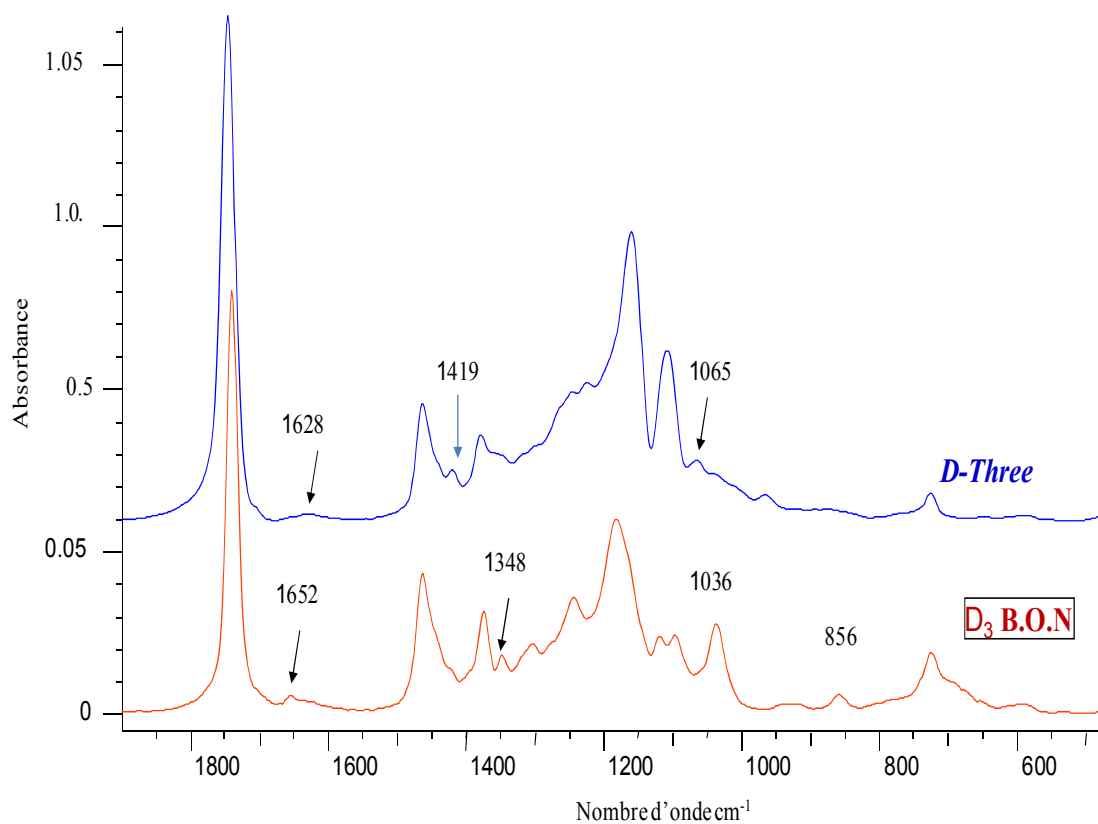


**Figure III.4.** Spectre global IRTF de la vitamine D de marque D-Three

Par ailleurs, une comparaison des deux spectres dans la zone d'absorption entre [1800; 600] cm<sup>-1</sup> considérée comme empreinte des composés organiques a été effectuée, ce qui nous a permis de noter les différences se traduisant par l'existence ou l'absence de certaines bandes d'absorption dues à la nature de l'excipient (**tableau III.1 et figure III.5**).

**Tableau III .1.** Comparaison des bandes d'absorption caractéristiques de D-Three et D3-B.O.N.

Maxima d'absorption cm <sup>-1</sup>	D-Three	D <sub>3</sub> -B.O.N.
856	----	C-O existe
1036	---	Existe
1065	Existe	---
1348	Epaulement discret	Existe
1419	Existe	Epaulement discret
1628	Bande (large de très faible intensité)	---
1652	---	Existe (faible intensité)



**Figure III.5.** Spectres IRTF de la vitamine D de marque D<sub>3</sub>-B.O.N et D-Three dans la zone d'absorption [600; 1800] cm<sup>1</sup>.

### III.4. Caractérisation de la vitamine D (D<sub>3</sub>-B.O.N et D-Three) par la chromatographie en phase liquide HPLC

Les deux marque de vitamine D (D<sub>3</sub>-B.O.N et D-Three) ont été analysés par la HPLC dans du méthanol. Les chromatogrammes enregistrés (figures III.6 et III.7) mettent en évidence une série de pics à différents temps de rétention détectés à 212 nm et 265 nm. L'exploitation des chromatogrammes nous a permis d'affirmer que les deux marques de vitamine D sont constituées de plusieurs composés que nous n'avons pas pu observer par la spectroscopie UV-Visible.

En effet, les chromatogrammes correspondant au deux marques D-Three et D<sub>3</sub>-B.O.N regroupent chacun 11 composés absorbants à 212 nm. Par contre à 265 nm les deux marques D-Three et D<sub>3</sub>-B.O.N renfermeraient 8 et 6 composés, respectivement. Le pic du principe actif le **cholécalférol** (majoritaire) commun aux deux marques correspondrait au temps de rétention tR (7,5 mn).

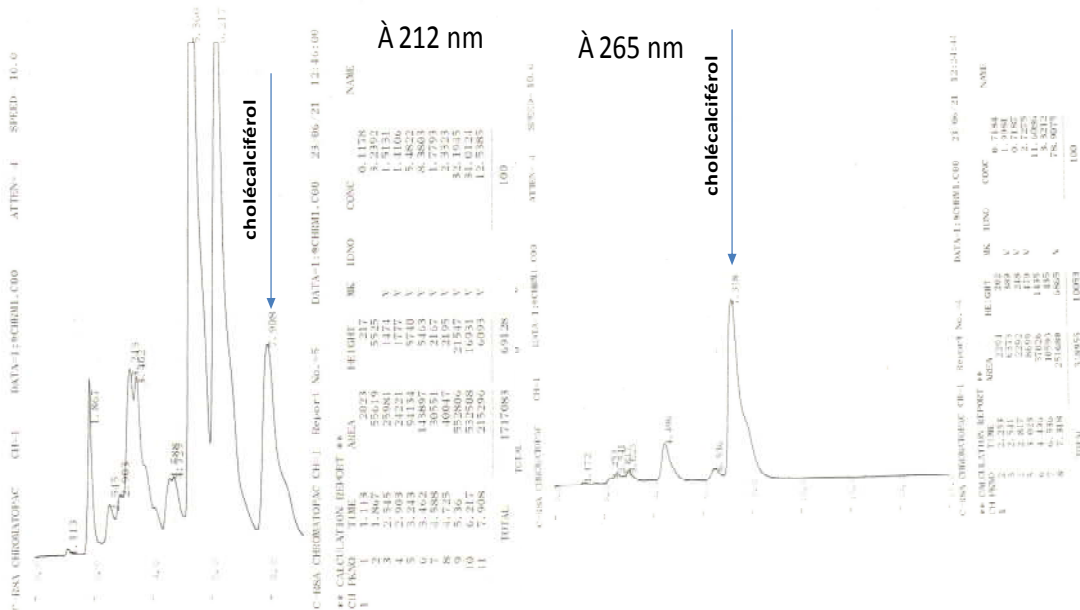
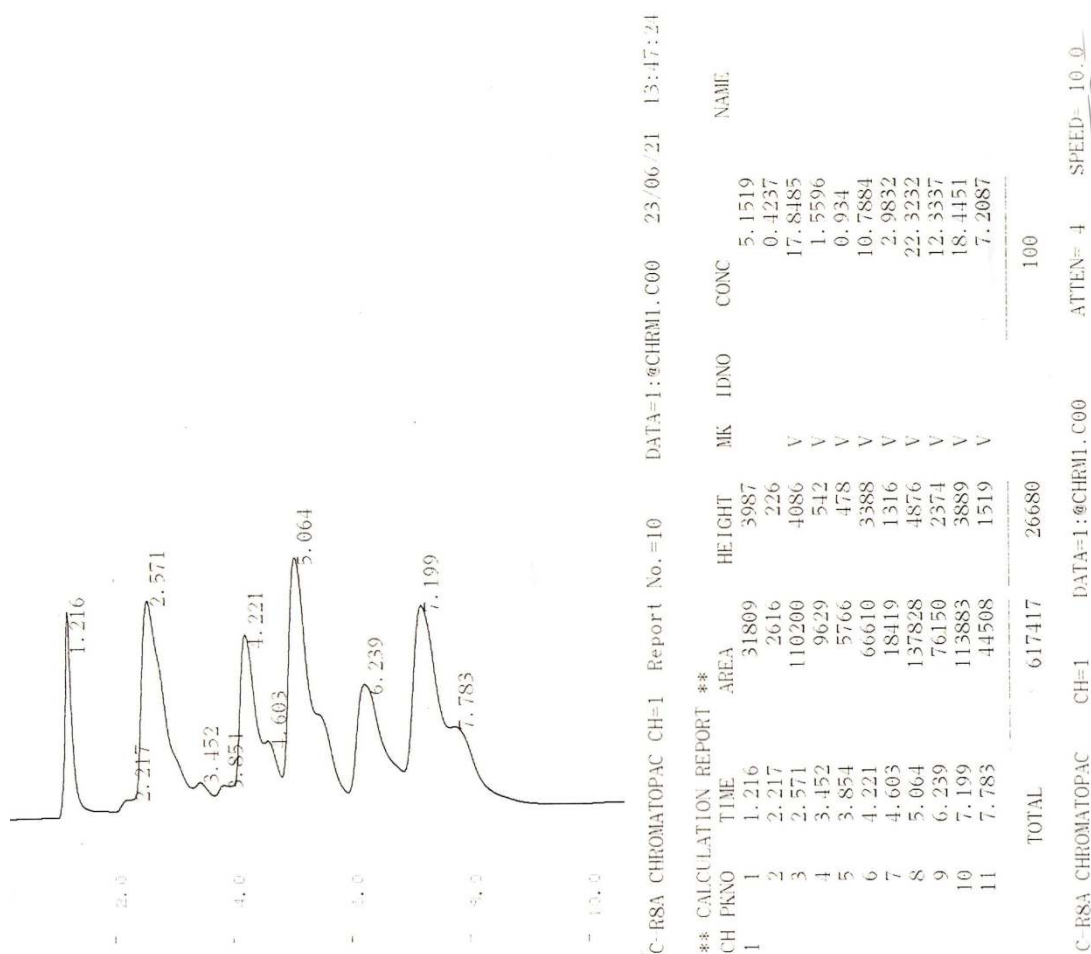


Figure III.6. Chromatogramme de la vitamine D-Three



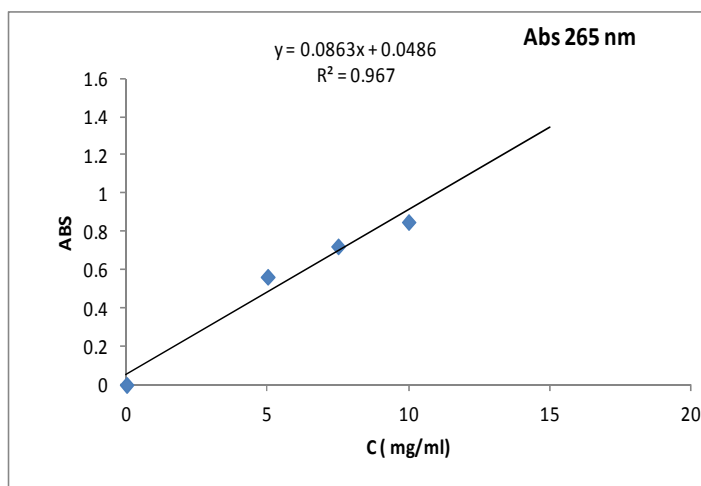
**Figure III.7.** Chromatogramme de la vitamine D<sub>3</sub>-B.O.N

### III.5. Etude de la dégradation de la vitamine exposée à la lumière blanche.

#### III.5.1. Détermination des % de dégradation par la spectroscopie UV-Visible

Des tests de dégradation ont été réalisés en exposant à la lumière solaire 4 solutions (vitamine D/éthanol) ayant une concentration de 7,5 mg/ml. Les échantillons liquides ont été analysés par la spectroscopie UV-Visible entre [200; 400] nm.

Nous tenons à signaler que la quantification de la vitamine D (D<sub>3</sub>-B.O.N et D-Three) après les tests de dégradation a été effectuée à partir d'une gamme de solutions d'étalonnage préparées en utilisant de la vitamine D-Three qui possède une seule bande d'absorption à 265 nm. La représentation graphique de la courbe d'étalonnage est décrite par **la figure III.8.**



**Figure III.8** Courbe d'étalonnage.

Les quantités de vitamine D (D<sub>3</sub>-B.O.N et D-Three) dégradées ont été exprimées en % dont les valeurs sont regroupées dans **les tableaux III.2 et III.3**.

Ainsi, nous remarquons que la dégradation est de 5,13% au bout d'une heure pour la marque D-Three et atteint les 72% après 72 heures d'exposition à la lumière. Quant à la marque D<sub>3</sub>-B.O.N la dégradation semble commencer bien après 1 heure car le % de dégradation est de 0%. Cependant, nous avons noté un % de dégradation de l'ordre de 65 % au bout de 24 heures pour atteindre les 72 % après 72 heures d'exposition à la lumière, cette valeur est identique à celle de la D-Three .

**Tableau III. 2.** Concentration et % de dégradation de la vitamine D (D<sub>3</sub>-B.O.N) détectés à 265 nm

Temps	C (mg/ml)	% degradation
0	8,14	0
1	8,14	0
24	2,84	65,06
72	23	72

**Tableau III.3** Concentrations et % de dégradation de la vitamine D (D-Three) détectés à 265 nm

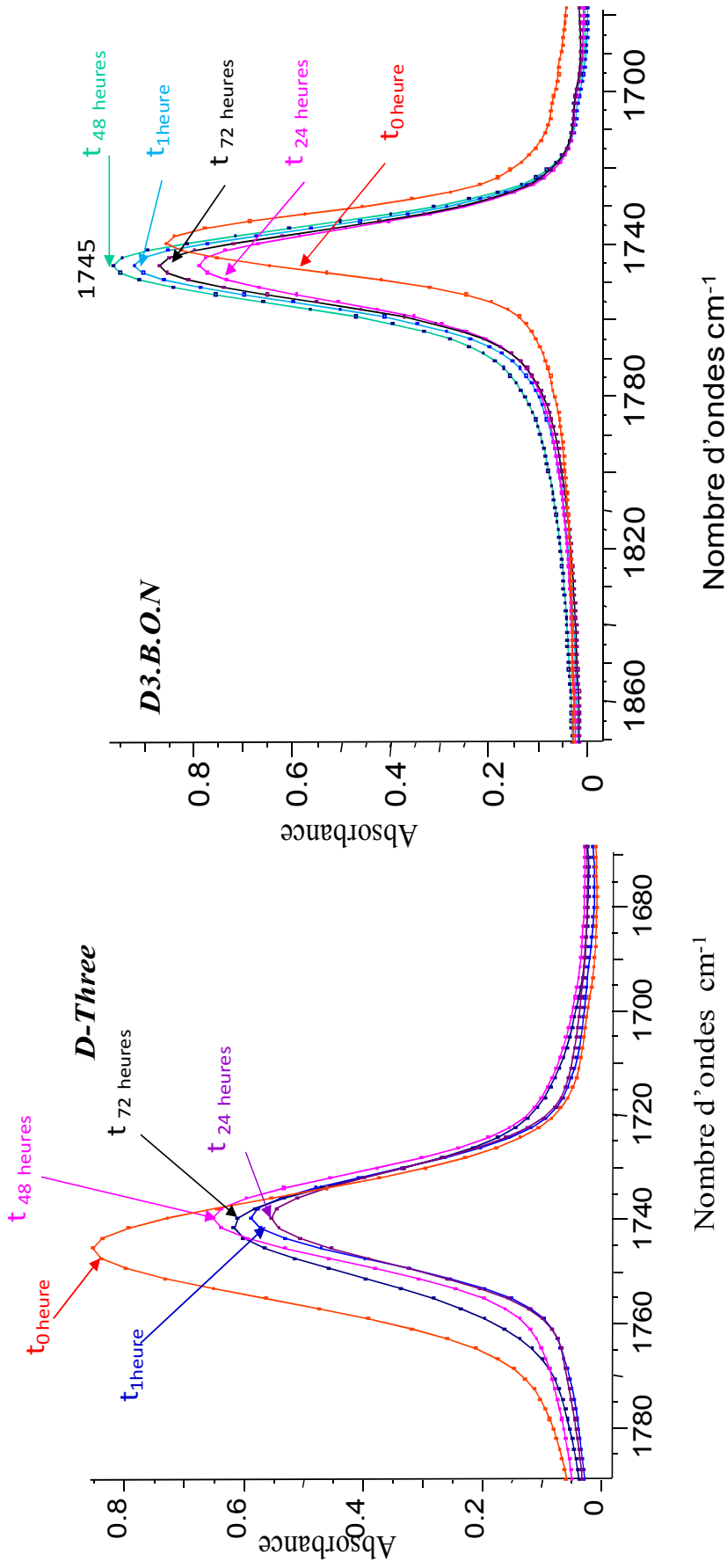
Temps (here)	C (mg/ml)	% dégradation
0	8,6	0
1	8.14	5.13
24	7.2	16.20
48	6.05	29.44
72	2.43	72

En conclusion, le **cholécalférol** semble se dégrade à plus de 70% au bout de 72 heures sous l'effet de la lumière

### III.5.2. Détermination des % de dégradation par la spectroscopie IRTF

Des pastilles de KBr contenant chacune une marque de vitamine D ont été placées dans des boîtes de pétri en verre en présence de silicagel afin d'éliminer l'humidité qui pourrait être absorbée par le KBr. l'ensemble a été exposé également à la lumière solaire pendant des durées bien définies (1 heure, 24 heures, 48 heures et 72 heures). Les pastilles ont été analysées par l'IRTF avant et après l'exposition à la lumière afin d'observer les modifications spectrales qui seraient dues à la dégradation. Les résultats obtenus sont illustrés par **la figure III.9**.

L'étude des spectres montre des modifications qui se traduisent par la disparition ou l'apparition de quelques bandes d'absorption, ce qui expliquerait l'existence de réactions chimiques d'oxydation donnant lieu à la formation de produits secondaires de natures inconnues et instables pour le moment. En effet, nous avons observé l'évolution de la bande carbonyle C=O dont l'augmentation traduirait l'oxydation de la liaison C=C et la diminution serait attribuée à une disparition de la fonction organique suite à une réaction chimique.



**Figure III.9.** Spectres IRTF de D-Three et D3 B.O.N dans la zone d'absorbance des carbonyles [1700 ; 11800] cm<sup>-1</sup>

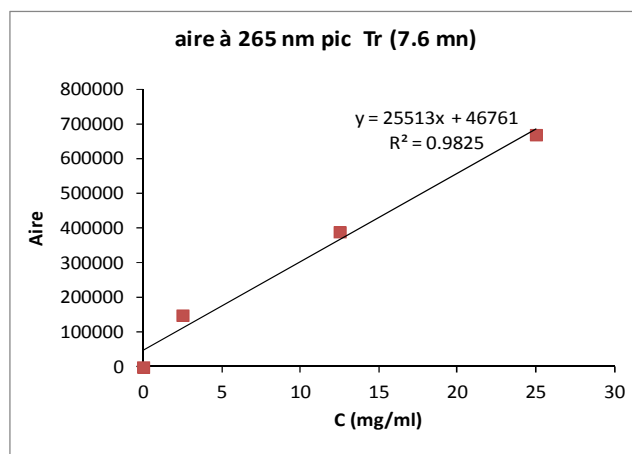


Les résultats obtenus montrent une évolution aléatoire de la bande apparaissant initialement à  $1740\text{ cm}^{-1}$ ; en fait nous avons noté une augmentation de celle-ci après 1 heure d'exposition à la lumière, ce qui expliquerait une oxydation de la liaison C=C existant initialement à  $1652\text{ cm}^{-1}$  et qui est devenue discrète au bout de cette durée (1heure) aboutissant à **la formation d'un produit secondaire** de nature carbonyle. Par la suite nous avons noté une régression de cette bande  $1740\text{ cm}^{-1}$  après 24 heures d'exposition à la lumière; elle serait justifiée par une nouvelle réaction chimique **du produit secondaire** formé précédemment. Après 48 heures d'exposition à la lumière une nouvelle augmentation est recensée qui serait équivalente à une oxydation suivie d'une nouvelle régression après 72 heures de photodégradation. Ces constatations nous permettent de se prononcer sur l'instabilité des produits secondaires des réactions d'oxydation qui sont à l'origine de la dégradation du principe actif le **cholécalférol**.

Quant à la marque D- Three, nous avons constaté également une diminution continue de la bande des carbonyles après 1heure et 24 heures d'exposition à la lumière. L'augmentation semble débiter après 48 heures et serait suivie d'une nouvelle régression après 72 heures. Ce résultat (**figure III.9**) nous laisse penser que les ou le produit (s) secondaire(s) d'oxydation seraient relativement plus stables que ceux

### **III.5.3. Détermination des % de dégradation de la vitamine D par la chromatographie HPLC**

Afin de confirmer les résultats obtenus précédemment (avec l'IRTF) quant à la formation de produits secondaires d'oxydation du principe actif **le cholécalférol**, nous avons effectué les mêmes tests de photodégradation de la vitamine dissoute dans du méthanol grade HPLC. Le choix du solvant a été fait pour réduire au maximum les impuretés qui seraient à l'origine des confusions d'ordre analytiques. Ainsi, nous avons analysé une gamme de solutions étalons avec la vitamine D (D3 B.O.N.) pour quantifier les quantités de vitamine D non dégradées dans les échantillons liquides (D3 B.O.N./méthanol.) soumis à la lumière solaire. Les résultats obtenus sont représentés par **la figure III.10** et **le tableau III.4**. En premier lieu nous avons obtenu une bonne linéarité de la variation de la concentration et l'aire des pics de la vitamine (D3 B.O.N.)



**Figure III.10.** Courbe d'étalonnage de D3 B.O.N obtenu par HPLC

**Tableau III.4.** % de dégradation de la vitamine D3 B.O.N

temps (h)	C (mg/ml) de D3 B.O.N	C <sub>0</sub> (mg/ml) de D3 B.O.N	% de dégradation
1	18	37.5	51.97
24	26.99	37.5	28.01
96	16.62	37.5	55.67

Aussi, selon **le tableau III.4** nous remarquons que le principe actif cholécalciférol se dégraderait au cours du temps sous l'effet de la lumière.

Cependant, les valeurs obtenues ont montré des fluctuations qui n'ont pas permis d'obtenir une cinétique de dégradation claire et qui serait décrite par une loi mathématique. Par hypothèse ces anomalies recensées (**tableau III.4.**) seraient attribuées aux conditions de manipulations suivantes :

- les flacons Vial utilisés pour la photodégradation ont un volume de 2ml, ce qui supposerait que la surface exposée à la lumière serait faible pour que la dégradation soit assez marquée,
- erreurs de manipulation évaporation du solvant suite à une mauvaise étanchéité des bouchons,

- Les volumes des échantillons injectés dans la boucle de l'appareil n'auraient pas été respectés.

### III.6. Application : Dosage de vitamine D dans une préparation pharmaceutique et le sang

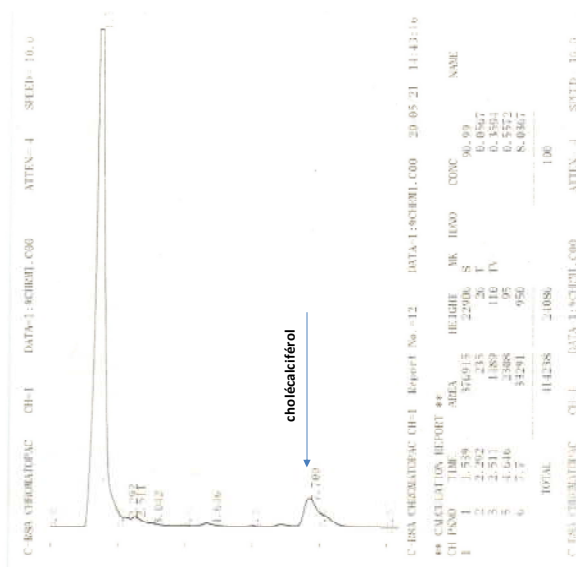
#### III.6.1. Cas de la préparation pharmaceutique CALCIDOSE VITAMINE D

Nous avons essayé de quantifier la vitamine D3 dans une forme sèche, il s'agit d'une poudre pour suspension buvable destinée aux personnes souffrant d'une carence en calcium et vitamine D; elle est présentée dans des sachets-dose de 500 mg à raison de 400 UI (4mg).

La poudre a été solubilisée dans le méthanol grade HPLC, la phase liquide filtrée a été analysée par la spectroscopie UV-Visible et la HPLC.

La spectroscopie UV-Visible a donné une quantité surestimée de cholécalférol, elle est de l'ordre de 34,12 mg. Alors que les informations imprimées sur la notice et la boîte montrent une valeur de 4mg par 500 mg de poudre. Cet énorme écart a été élucidé par la HPLC qui met en évidence un pic majoritaire ayant un temps de rétention de tR (1,649 mn) et un pic discret à tR (7,7mn). Ce dernier attribué au principe actif.

En conclusion, la spectroscopie UV-Visible a permis de faire une estimation globale de tous les constituants de produit pharmaceutique.

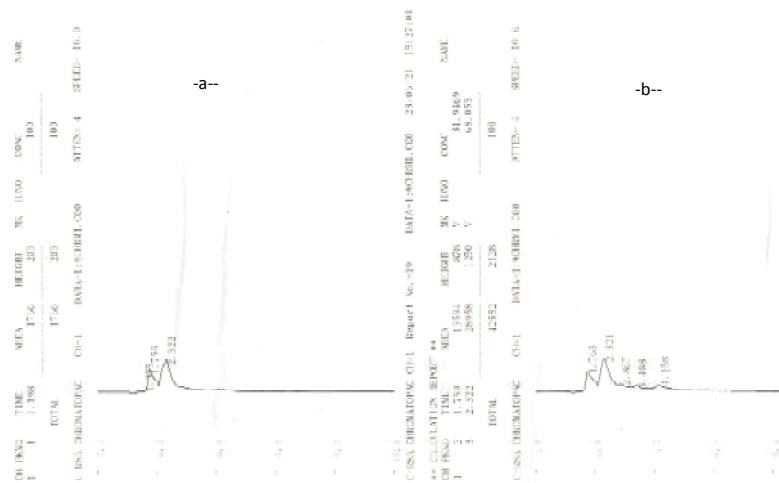


**Figure III.11.** Chromatogramme de la poudre Calcidose/ Vitamine D en solution dans le méthanol

### III.6.2. Cas des prélèvements sanguins

Les conditions analytiques adoptées pour la HPLC ont été mises en jeu pour la quantification de la vitamine D sur le sérum sanguin des deux étudiantes volontaires (DRIOUECHE Rania et TALEB Fatma). Les échantillons ont subi une élimination des protéines dont le protocole a été déduit de la littérature et cité dans l'annexe A.1.

Sur les chromatogrammes (**figure III.12**) obtenus nous n'avons noté malheureusement aucun pic caractéristique de la vitamine qui aurait eu un présumé temps de rétention tR de 7,7 mn.



**Figure III.12.** Chromatogramme du sérum sanguin (-a- : DRIOUECH, -b-: TALEB)

## **Conclusion générale :**

*L'étude que nous avons réalisée dans le cadre de ce projet de fin d'étude a porté sur le dosage de la vitamine D. Le travail expérimental à commencer par une caractérisation puis une quantification de trois marques de vitamine D<sub>3</sub> (deux formes liquides DThree et D<sub>3</sub> B.O.N et une forme sèche calcidose vitamine D: poudre) qui sont disponibles dans les officines.*

*Aussi, trois techniques instrumentales d'analyse ont été adoptées pour tous les essais expérimentaux réalisés. Il s'agit de la spectroscopie dans l'UV-Visible et l'IRTF et la chromatographie en phase liquide HPLC qui nous ont conduits à un certain nombre de résultats dont nous citerons les plus importants.*

*La spectroscopie UV-Visible à mis en évidence un maximum d'absorption à 265 nm commun aux trois marques de vitamine D et qui serait attribué au principe actif le **cholécalférol** selon les données de la littérature. Cependant la marque D<sub>3</sub> B.O.N possède un second maximum d'absorption à 212 nm .*

*Par ailleurs , la chromatographie liquide a haute performance HPLC a permis de noter que il existe une série de pics absorbant à 265 nm et à 212 nm et cela pour les 3 produits : D<sub>3</sub> B.O.N , D Three et la poudre calcidose vitamine D en plus du pics majoritaire correspondant au principe actif .*

*Ce qui nous a mener à conclure que la quantification de la vitamine D par la spectroscopie uv-visible n'est pas adéquate, car les maximum d'absorption englobent tous les constituants séparés par la HPLC.*

*Quant à la spectroscopie IRTF, les spectres enregistrés ont mit en évidence les groupements fonctionnels du PA (comme OH et C = C ) et ceux commune au principe actif et l'excipient tel que C = O, C - O, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>.*

*Cette technique nous a permis d'observer le déclenchement de la réaction d'oxydation du principe actif sous l'effet de la lumière. Elle se traduit par la disparition de la liaison C = C au profit de la liaison C = O au cours du temps. Ce qui nous a conduits a estimé les % de dégradation qui aurait atteint les 70%.*

*En ce qui concerne la quantification, de la vitamine D dans les solutions (éthanol/vitamine D) ( méthanol/vitamine D ) soumises à la photodégradation , nous n'avons pas pu avoir*

*une cinétique qui pourrait être décrite par une loi mathématique suite aux fluctuations des valeurs trouvées par HPLC.*

*Le dernier point a été étudié et qui était en fait, notre objectif majeur.*

*Il s'agit du dosage de la vitamine D par HPLC dans le sérum sanguin des 2 étudiantes volontaires et cela en adoptant les conditions chromatographiques optimisées.*

*Cependant, les résultats obtenus n'ont fait signe d'aucune détection de la vitamine D, ceci a été attribué à la méthode de déprotéinisation (élimination des protéines) du sérum sanguin qui s'avère une étape importante pour éviter toute confusion.*

## *Les Références bibliographiques*

[1] :Duchadeau J.C *vitaminothérapie chez les voilés , thèse de doctorat Toulouse 2001*

[2] :Tissandié E, Guéguen Y, Laboccaro J.M. *A Aigue perse , J soudim.vitamine D : métabolisme , régulation et maladies associées*

[3] :Souccar ,T *vitamine D , le nouveau scandale sanitaire 2007*

[4] :Guilland J.C Herberth B, *les vitamines cahier de formation biologie médicale N°38 , 2007 biofarma formation continue des biologistes*

[5] :Berthie – Pagliano, C *actualités sur la vitamines D et étude clinique prospective sur les modalités de correction rapide d'une carence profonde , thèse de doctorat en médecine ,université Paris descartes 2009*

[6] :Souberbielle J.C , prie .D Courbebaisse , M, Friedlander *Update on vitamine D and evaluation of vitamine D statu .Published in :annales d'endocrinologie 2008*

[7] :Rossy ,N, *Epidémie de carence en vitamine D, supplémentations en vitamine D3 et taux sanguin optimal de 25 (OH) D 2010*

[8] : Lautenschlager ,S ,*Dermatologie et vénéréologie : soleil , vitamine D et prévention du cancer ; quels sont les faits , dermatologues ambulatoireim , forum med suisse 2010*

[9] :Gabrian der Pluijm 2002 *mécanisme impliqués dans l'invasion de l'os par les cellules tumoralesmecanismesinvolved in bone invasion by tumourcells , revue du Rhumatisme , volume 69.1002.100*

[10] : Xavier Deprez (2003), *prévention non-pharmacologique des facteurs ostéoporotiques ,nonpharmacological prevention of osteoporotic facteurs .Revue du rhumatisme volume 70,818,828*

- [11] : Landrier J.F *vitamine D : sources métabolisme et mécanismes d'action OCL , Mai 2014*
- [12] : Schuster , *Cytochromes P450 are essential players in the vitamine D signaling system , biochimbiophysActa , Jan 2011*
- [13] : Mallet E *vitamine D journal de pédiatrie et de puériculture 2014*
- [14] : Raynaud-Simon A , Rolland Y, Souberbielle J C , *le groupe des experts en gériatrie et nutrition (GEGN) de la société française de gériatrie et gérontologie (SFGN), vitamine D chez la personne âgée ,2014*
- [15] : Holick MF , *vitamine D deficiency N juillet 2007*
- [16] : Zhu et Al , *A Randomized controlled trial of the Effects of vitamine D muscle strength and mobility in older women with vitamine D insufficiency , journal of the American geriatrics society 2010*
- [17] : Bouillon R, *vitamine D and human health , laboratory of experimental medicine and endocrinology , SAS janvier 2009*
- [18] : Duhamel, Zeghoud F, *prophylaxie de la carence en vitamine D ,étude internationale sur les effets biologiques d'un apport répété de 100.000UI de vitamine D*
- [19] : Lucas S, *before and after hip fracture , vitamine D deficiency may not be related sufficiently , osteoporos :2013*
- [20] : Bachetta et Al cochet P, *vitamine D : un acteur majeur en santé ! archives de pédiatrie 2010*
- [21] : Spechaert M , Huang G , *biological and chemical aspects of the vitamine D binding protein and its polymorphism chunacta 2006*
- [22] : Tonson la tour A , *le point sur la vitamine D paediatrica 2012*
- [23] : Routine biochemistry in suspected vitaminee D Med ,2004
- [24] : Robert B Rucker , John W , Donald B (2001) *handbook of vitamins 3<sup>ème</sup> édition*



[25] : *Société de pédiatrie de l'ouest Dr, M Djebbari , Oran 2017*

[26] : *article tunisien et article tlemcenien (protocole de dosage de la vitamine D dans le sérum sanguin par HPLC )*

[27] : <http://www.guide-vitamines.org/>

# Annexes A1:

## Traitement des échantillons de PLASMA :

- Le sang prélevé dans un tube héparine lithium protégé de la lumière (papier aluminium)
- Ces échantillons du sang sont transportés vers le laboratoire dans une glacière où ils sont centrifugés à 5000 tours/minute
- Le plasma obtenu et de 2 ml a été placé dans 2 tubes , 1 ml dans chaque un et congeler à 25 °C(à cette température le cholécalférol peut rester intact sans se dégrader pendant des années )

## **Préparation des échantillons de PLASMA par une 1<sup>er</sup> méthode :**

La première étape nécessaire pour le dosage plasmatique est une déprotéinisation.

### **-la déprotéinisation :**

consiste al 'addition de 500 ul d'acétonitrile à 500 ul de plasma , le mélange est par la suite agité , refroidi et centrifugé pendant 5 min à 2600 rpm .

- L'élution de la molécule est réalisé sur des colonnes d'extraction (dans notre cas nous avons utilisé des filtre d'HPLC
- L'activation de ce filtre ce fait par (4ml d'hexane, 4ml de chloroforme, 4 ml de méthanol, 5 ml d'eau )
- Ensuite nous avons jeté le surnageant obtenu de l'étape précédente et lavé la colone successivement avec 5ml d'eau , 3ml de méthanol/eau (70/30) et 0.5 ml d'acétonitrille (ce lavage se fait sous pression
- Après l'étape de déprotéinisation ,la d3 est récupéré dans des tubes avec 3.6 ml d'acetonitrille .
- Cet éluant est évaporé puis reconstitué dans 100 ul de la phase mobile lors de l'injection dans le circuit de la HPLC

**-Préparation des échantillons de plasma par une 2<sup>ème</sup> méthode :**

- Transférer une faible quantité de plasma liquide dans un tube
- Centrifuger à 12000 rpm , pendant 1 min pour éliminer les fibrines
- Prélever 100 ul de plasma et transférer le dans un tube placé dans un étui d'aluminium
- Ajouté 400 ul de mélange  $C_2H_5OH/CH_3COOC_2H_5$
- Fermer le tube et agiter rigoureusement avec la main , dans le sens vertical
- Centrifuger à 11000 rpm pendant 4 min .
- Mettre en marche le système HPLC
- Injecter les échantillons .