

SL Dr. Liviu Tămaş tamas.liviu@umft.ro et tliviu33@yahoo.com

Toutes les questions seront envoyées à SL Dr. Liviu Tămaş aux les adresses de email fournis (**IMPORTANT** – les questions seront envoyées simultanément aux les deux adresses de email fournis et pas seulement a une !!!)

Détermination d'hémoglobine glyquée (HbA1c)

Introduction

Pour avoir une surveillance plus efficace de l'équilibre du métabolisme du glucose avec la possibilité d'évaluation plus précise de la diminution de la tolérance au glucose, la détermination d'hémoglobine glyquée a un rôle important. HbA1c est formée par une réaction de glycation lente, non-enzymatique du glucose qui pénètre facilement dans les érythrocytes, au niveau de l'acide aminée valine à l'extrémité N-terminale de la chaîne β de l'hémoglobine. La valeur de la glycation est directement proportionnelle à la glycémie. Depuis que les érythrocytes sont exposés à des niveaux de glucose au long de leur durée de vie (environ 120 jours), l'HbA1c reflète le niveau moyen de glucose dans le sang dans les 6-8 semaines dernières, avec une valeur de suivi à long terme des patients atteints de diabète.

HbA1c représente normalement 2,9 – 4,6% de l'Hb totale (les valeurs varient en fonction du procédé), et en cas diabète il peut atteindre 15-20%.

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer l'hémoglobine glyquée: chromatographie sur colonne avec des résines échangeuses d'ions, chromatographie liquide à haute pression (HPLC), chromatographie d'affinité, méthodes électrophorétiques, méthodes photométriques basées sur la réaction de couleur avec l'acide thiobarbiturique et méthodes immunologiques.

Partie expérimentale

Détermination de l'hémoglobine glyquée (HbA1c) par la méthode échangeuse d'ions

Principe

Le sang entier est mélangé avec un réactif de lyse, contenant un détergent et une concentration élevée d'ions borate. Le mélange subséquent de l'hémolysat, préparé à partir du sang entier, avec une résine échangeuse de cations, détermine la liaison de la résine à l'HbA₀ (hémoglobine non-glyquée). Avec un tube de séparation, on réalise la séparation de la résine de la solution tampon contenant la HbA_{1c} (hémoglobine glyquée). Le pourcentage de la fraction d'HbA_{1c} est ensuite déterminé en mesurant l'absorbance de la fraction HbA_{1c} et d'hémoglobine totale à 415 nm. Le rapport d'absorbances est ensuite comparé à celle d'un étalon.

Réactifs

R1: résine échangeuse d'ions, tamponnée à pH 7,0

R2: Réactif de lyse

R3: Etalon d'érythrocytes lyophilisés, avec un pourcentage d'HbA_{1c} de 10%

Matériel biologique

Sang prélevé sur EDTA, stable 1 semaine dans un réfrigérateur.

Mode opératoire

1. Préparation d'hémolysat: Dans un tube à hémolyse, pipetez 500 μ L R2 et 100 μ L de sang. Mélangez soigneusement et reposez pendant 5 minutes.
2. Séparation de l'hémoglobine glycosylée:

- Dans un tube à essai, contenant 2,5 ml de résine prépipetée (tube à bouchon noir) ajoutez 100 µL hémolysat (obtenu dans l'étape 1).
 - Placez dans le tube d'essai le tube séparateur à bouchon vert vers en bas, jusqu'au signe situé à environ 1 cm au-dessus de la résine.
 - Mélangez bien continuellement pendant 5 minutes.
 - Appuyez sur le tube séparateur jusqu'à ce qu'il comprime bien la résine et le surnageant passe entièrement dans le tube séparateur.
 - Versez le surnageant dans une cuvette spectrophotométrique et lisez l'absorbance (A_1) à 415 nm en utilisant de l'eau distillée comme témoin.
3. L'hémoglobine totale: dans un tube à hémolyse, pipetez 20 µL hémolysat (obtenu dans l'étape 1) et 5 mL d'eau distillée. Mélangez et lisez l'absorbance (A_t) à 415 nm en utilisant de l'eau distillée comme témoin.

Calcul:

$$\%HbA_1 = \frac{A_{\text{Probe}}}{A_t} \times F$$

ou $F = 6,3$ (F est calculée en utilisant l'étalon et est déterminée une seule fois pour chaque kit).

Valeurs normales

Non diabétique: 4 - 6%

Le statut diabétique: plus de 7,5%

Attention! : Le réactif de lyse (R2) contient de l'azoture de sodium. Éviter tout contact avec la peau et les muqueuses!

Détermination de l'insuline sérique

Il est effectué par des techniques radio-immunologique (RIA) et immunoenzymatique (ELISA).

Détermination de l'insuline sérique par ELISA

Principe

C'est une méthode immunologique avec deux sites qui utilisent deux types d'anticorps monoclonaux dirigés contre des déterminants antigéniques différents de la molécule d'insuline (technique sandwich). L'insuline dans l'échantillon se lie d'une part aux anticorps anti-insuline fixés sur les parois des tubes et d'autre part, aux anticorps anti-insuline marqués à la peroxydase, trouvés en solution. Dans la prochaine étape, l'excès d'anticorps d'insuline marqué à la peroxydase est éliminé par lavage. La fraction liée est ensuite mise en évidence par une réaction de couleur avec le 3,3',5,5'-tétraméthyl-benzidine.

Valeurs normales: 1,9 - 23 mU/l

Valeurs pathologiques

Valeurs élevées : diabète insulinoindépendant, obésité, insulinome, syndrome de Cushing, acromégalie.

Valeurs diminuées : diabète insulino dépendant (l'insulinémie peut-être même zéro), insuffisance hypophysaire.

Plus important que le comportement d'insulinémie à jeûne est le comportement dynamique de la sécrétion d'insuline pendant le charge de glucose (le courbe d'insulinémie provoquée), quand les différences entre normal et pathologique se creusent.