

Nouveaux biomarqueurs : Identification et application cliniques

A. Abed^{1,2,*}, M. Nachi¹, R. Serhane¹, N. Selka^{1,2}, C. Belhadjin^{1,2}, R. Moussaoui^{1,2}.

¹Etablissement Hospitalier et Universitaire 1 Novembre 1954 - Oran (Algérie),

²Laboratoire de Chimie Analytique. Université Oran 1 Ahmed Ben Bella - Oran (Algérie)

INTRODUCTION

En Médecine légale, la détermination de la date de mort est primordiale. Et de ce fait beaucoup d'études ont été réalisées dans le but de solutionner le problème du délai post mortem.

L'étude de la biochimie de l'humeur vitrée a permis de mettre en valeur certains bio marqueurs, tels que l'hypoxanthine et le potassium, quoique ce dernier présente l'inconvénient d'être instable dans le temps et variable selon les modalités de prélèvement.

Notre travail a consisté à mettre au point et valider une technique de dosage de l'hypoxanthin par chromatographie liquide.

MATERIELS ET METHODES

• Réactifs :

- Méthanol grade HPLC. Sigma Aldrich®.
- Eau purifiée. station Elga-labwater®.
- Hypoxanthine (standard étalon). Interchim®.
- 5-bromouracile. Interchim®
- NaH₂PO₄. Interchim®.
- HCl.
- Acide phosphorique.
- Sulfate d'ammonium.

• Traitement d'échantillon :

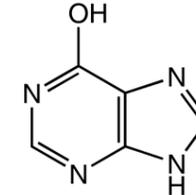
La précipitation des protéines de l'humeur vitrée est basée sur le traitement de l'échantillon par une solution saturée de sulfate d'ammonium.

Après la centrifugation (2830 tr/min pendant 10 minutes), le surnageant est injecté dans l'HPLC (C18, Phase inversée) avec phase mobile tampon pH3 –méthanol (90 :10) pour la séparation.

La détermination quantitative de l'hypoxanthine s'effectue par la spectrophotométrie UV à 254 nm.

• Conditions chromatographiques :

- HPLC (Perkin Elmer 200) :
- Volume d'injection: 20 µl
- Débit : 1 ml/min.
- Détection UV : 254 nm.
- T° colonne : ambiante (25 ± 1) °C.
- Phase mobile : tampon pH3- méthanol (90 :10).
- Colonne utilisée, C₁₈ : (150 x 4,6 mm, 5 µm).
- Durée de l'analyse chromatographique : 8 min.



RESULTATS

Spécificité

Le temps de rétention de l'hypoxanthine dans les conditions chromatographiques de la méthode est d'environ 4,25 min.

Les figures (01 et 02) représentent les chromatogrammes obtenus pour : standard et humeur vitrée surchargée d'un standard.

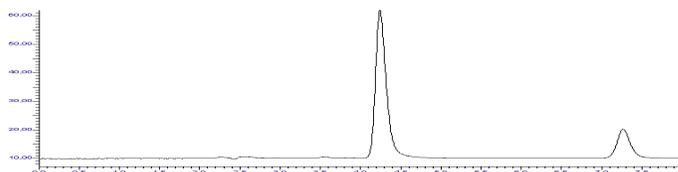


Fig 01: Solution étalon de l'hypoxanthine.(SE)

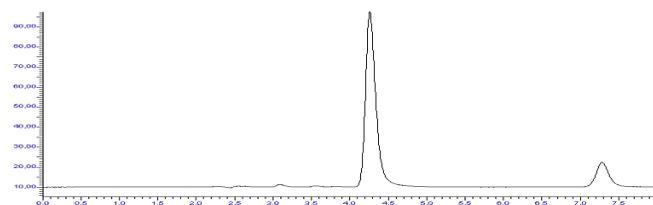


Fig 02: Solution de l'humeur vitrée surchargée par SE.

Linéarité

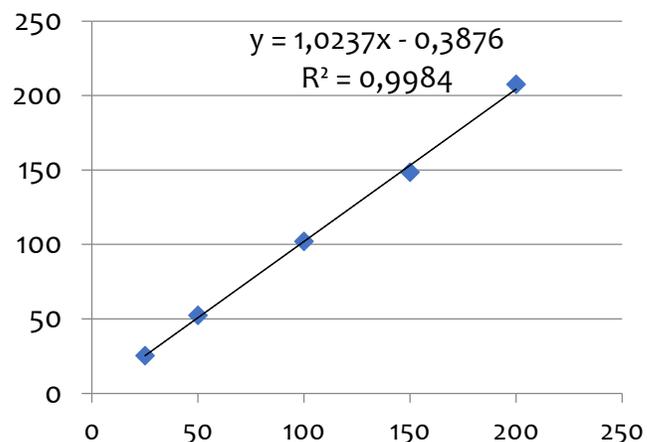
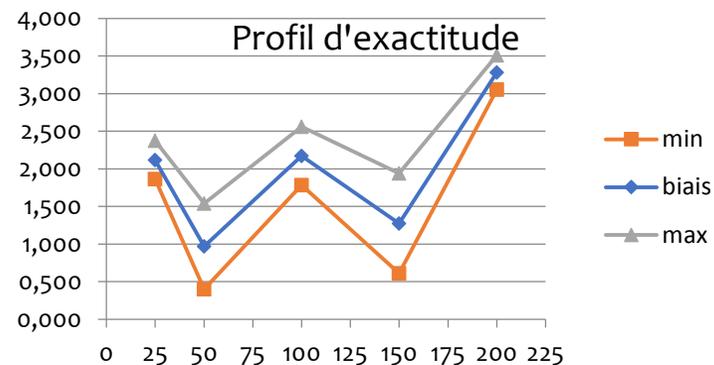


Fig 03 : [C]calculée = f ([C]théorique) pour la linéarité

Exactitude



DISCUSSION

Les intervalles de tolérances de tous les Standards de validation sont inclus dans les limites $\pm 20\%$, la méthode peut être considérée comme exacte, à un niveau de confiance 95%, pour un intervalle de concentration allant de 25 à 200 $\mu\text{mol/l}$.

En d'autre terme, lorsque l'on utilisera cette méthode dans le futur (en routine), 95% des résultats seront assez proches de la valeur vraie (erreur relative $< 20\%$).

CONCLUSION

La méthode proposée est simple, rapide. La durée d'analyse chromatographique de 8 minutes permet l'analyse d'un grand nombre d'échantillons dans un court laps de temps.

Le dosage de ce biomarqueur par HPLC contribuera à la validité des termes de datation de mort en confrontation avec d'autres bio marqueurs tels que le potassium.