



**HAL**  
open science

# Mise en place d'une méthode d'évaluation de l'insulinosécrétion chez les patients diabétiques de type 2 non insulines dans une perspective d'adaptation thérapeutique

Dorian Hulot

► **To cite this version:**

Dorian Hulot. Mise en place d'une méthode d'évaluation de l'insulinosécrétion chez les patients diabétiques de type 2 non insulines dans une perspective d'adaptation thérapeutique. Sciences pharmaceutiques. 2014. dumas-01110004

**HAL Id: dumas-01110004**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01110004v1>**

Submitted on 27 Jan 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

U.F.R DE MEDECINE ET DE PHARMACIE  
DE ROUEN

ANNEE : 2013/2014

N° :

THESE POUR LE  
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR  
EN PHARMACIE

HULOT Dorian

Né le 16 juillet 1986 à Chatenay-Malabry

Présentée et soutenue publiquement le 17 octobre 2014

**MISE EN PLACE D'UNE METHODE D'EVALUATION  
DE L'INSULINOSECRETION CHEZ LES PATIENTS  
DIABETIQUES DE TYPE 2 NON INSULINES DANS UNE  
PERSPECTIVE D'ADAPTATION THERAPEUTIQUE.**

PRESIDENT DU JURY :	<b>Professeur Hervé LEFEBVRE</b>	<b>PU-PH</b>
DIRECTEUR DE THESE :	<b>Docteur Gaëtan PREVOST</b>	<b>PH</b>
MEMBRES DU JURY :	<b>Docteur Abdeslam CHAGRAOUI</b>	<b>MCU-PH</b>
	<b>Docteur Sylvie DALIPHARD</b>	<b>PH</b>

**ANNEE UNIVERSITAIRE 2013 – 2014**  
**U.F.R. DE MEDECINE-PHARMACIE DE ROUEN**

-----

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**  
**Professeur Benoit VEBER**  
**Professeur Pascal JOLY**

DOYENS HONORAIRES : **Professeurs J. BORDE - Ph. LAURET - H. PIGUET – C. THUILLEZ**

PROFESSEURS HONORAIRES : **MM. M-P AUGUSTIN - J.ANDRIEU-GUITRANCOURT - M.BENOZIO-  
J.BORDE - Ph. BRASSEUR - R. COLIN - E. COMOY - J. DALION -.  
DESHAYES - C. FESSARD – J.P FILLASTRE - P.FRIGOT -J. GARNIER -  
J. HEMET - B. HILLEMAND - G. HUMBERT - J.M. JOUANY - R.  
LAUMONIER – Ph. LAURET - M. LE FUR – J.P. LEMERCIER - J.P  
LEMOINE - M<sup>le</sup> MAGARD - MM. B. MAITROT - M. MAISONNET - F.  
MATRAY - P.MITROFANOFF - Mme A. M. ORECCHIONI - P. PASQUIS -  
H.PIGUET - M.SAMSON – Mme SAMSON-DOLLFUS – J.C. SCHRUB -  
R.SOYER - B.TARDIF -.TESTART - J.M. THOMINE – C. THUILLEZ -  
P.TRON - C.WINCKLER - L.M.WOLF**

I - MEDECINE

**PROFESSEURS**

M. Frédéric <b>ANSELME</b>	HCN	Cardiologie
Mme Isabelle <b>AUQUIT AUCKBUR</b>	HCN	Chirurgie Plastique
M. Bruno <b>BACHY (Surnombre)</b>	HCN	Chirurgie pédiatrique
M. Fabrice <b>BAUER</b>	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya <b>BEKRI</b>	HCN	Biochimie et Biologie Moléculaire
M. Jacques <b>BENICHOU</b>	HCN	Biostatistiques et informatique médicale
M. Jean-Paul <b>BESSOU</b>	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise <b>BEURET-BLANQUART (Surnombre)</b>	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
M. Guy <b>BONMARCHAND</b>	HCN	Réanimation médicale
M. Olivier <b>BOYER</b>	UFR	Immunologie
M. Jean-François <b>CAILLARD (Surnombre)</b>	HCN	Médecine et santé au Travail
M. François <b>CARON</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
M. Philippe <b>CHASSAGNE</b>	HB	Médecine interne (Gériatrie)
M. Vincent <b>COMPERE</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
M. Antoine <b>CUVELIER</b>	HB	Pneumologie

M. Pierre <b>CZERNICHOW</b>	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
M. Jean - Nicolas <b>DACHER</b>	HCN	Radiologie et Imagerie Médicale
M. Stéfan <b>DARMONI</b> communication	HCN	Informatique Médicale/Techniques de
M. Pierre <b>DECHELOTTE</b>	HCN	Nutrition
Mme Danièle <b>DEHESDIN (Surnombre)</b>	HCN	Oto-Rhino-Laryngologie
M. Jean <b>DOUCET</b>	HB	Thérapeutique/Médecine – Interne - Gériatrie.
M. Bernard <b>DUBRAY</b>	CB	Radiothérapie
M. Philippe <b>DUCROTTE</b>	HCN	Hépatologie – Gastro - Entérologie
M. Frank <b>DUJARDIN</b>	HCN	Chirurgie Orthopédique - Traumatologique
M. Fabrice <b>DUPARC</b> Traumatologique	HCN	Anatomie - Chirurgie Orthopédique et
M. Bertrand <b>DUREUIL</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène <b>ELTCHANINOFF</b>	HCN	Cardiologie
M. Thierry <b>FREBOURG</b>	UFR	Génétique
M. Pierre <b>FREGER</b>	HCN	Anatomie/Neurochirurgie
M. Jean François <b>GEHANNO</b>	HCN	Médecine et Santé au Travail
M. Emmanuel <b>GERARDIN</b>	HCN	Imagerie Médicale
Mme Priscille <b>GERARDIN</b>	HCN	Pédopsychiatrie
M. Michel <b>GODIN</b>	HB	Néphrologie
M. Guillaume <b>GOURCEROL</b>	HCN	Physiologie
M. Philippe <b>GRISE</b>	HCN	Urologie
M. Didier <b>HANNEQUIN</b>	HCN	Neurologie
M. Fabrice <b>JARDIN</b>	CB	Hématologie
M. Luc-Marie <b>JOLY</b>	HCN	Médecine d'urgence
M. Pascal <b>JOLY</b>	HCN	Dermato - vénéréologie
M. Jean-Marc <b>KUHN</b>	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mme Annie <b>LAQUERRIERE</b>	HCN	Anatomie cytologie pathologiques
M. Vincent <b>LAUDENBACH</b>	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
M. Joël <b>LECHEVALLIER</b>	HCN	Chirurgie infantile
M. Hervé <b>LEFEBVRE</b>	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
M. Thierry <b>LEQUERRE</b>	HB	Rhumatologie
M. Eric <b>LEREBOURS</b>	HCN	Nutrition
Mme Anne-Marie <b>LEROI</b>	HCN	Physiologie
M. Hervé <b>LEVESQUE</b>	HB	Médecine interne
Mme Agnès <b>LIARD-ZMUDA</b>	HCN	Chirurgie Infantile
M. Pierre Yves <b>LITZLER</b>	HCN	Chirurgie Cardiaque
M. Bertrand <b>MACE</b>	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David <b>MALTETE</b>	HCN	Neurologie
M. Christophe <b>MARGUET</b>	HCN	Pédiatrie

Mme Isabelle <b>MARIE</b>	HB	Médecine Interne
M. Jean-Paul <b>MARIE</b>	HCN	ORL
M. Loïc <b>MARPEAU</b>	HCN	Gynécologie - obstétrique
M. Stéphane <b>MARRET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique <b>MERLE</b>	HCN	Epidémiologie
M. Pierre <b>MICHEL</b>	HCN	Hépatologie - Gastro - Entérologie
M. Francis <b>MICHOT</b>	HCN	Chirurgie digestive
M. Bruno <b>MIHOUT</b> ( <i>Surnombre</i> )	HCN	Neurologie
M. Jean-François <b>MUIR</b>	HB	Pneumologie
M. Marc <b>MURAINÉ</b>	HCN	Ophthalmologie
M. Philippe <b>MUSETTE</b>	HCN	Dermatologie - Vénérologie
M. Christophe <b>PEILLON</b>	HCN	Chirurgie générale
M. Jean-Marc <b>PERON</b>	HCN	Stomatologie et chirurgie maxillo-faciale
M. Christian <b>PFISTER</b>	HCN	Urologie
M. Jean-Christophe <b>PLANTIER</b>	HCN	Bactériologie - Virologie
M. Didier <b>PLISSONNIER</b>	HCN	Chirurgie vasculaire
M. Bernard <b>PROUST</b>	HCN	Médecine légale
M. François <b>PROUST</b>	HCN	Neurochirurgie
Mme Nathalie <b>RIVES</b>	HCN	Biologie et méd. du dévelop. et de la reprod.
M. Jean-Christophe <b>RICHARD</b> ( <i>Mise en dispo</i> )	HCN	Réanimation Médicale, Médecine d'urgence
M. Horace <b>ROMAN</b>	HCN	Gynécologie Obstétrique
M. Jean-Christophe <b>SABOURIN</b>	HCN	Anatomie – Pathologie
M. Guillaume <b>SAVOYE</b>	HCN	Hépatologie – Gastro
Mme Céline <b>SAVOYE – COLLET</b>	HCN	Imagerie Médicale
Mme Pascale <b>SCHNEIDER</b>	HCN	Pédiatrie
M. Michel <b>SCOTTE</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne <b>TAMION</b>	HCN	Thérapeutique
Mme Florence <b>THIBAUT</b>	HCN	Psychiatrie d'adultes
M. Luc <b>THIBERVILLE</b>	HCN	Pneumologie
M. Christian <b>THUILLEZ</b>	HB	Pharmacologie
M. Hervé <b>TILLY</b>	CB	Hématologie et transfusion
M. François <b>TRON</b> ( <i>Surnombre</i> )	UFR	Immunologie
M. Jean-Jacques <b>TUECH</b>	HCN	Chirurgie digestive
M. Jean-Pierre <b>VANNIER</b>	HCN	Pédiatrie génétique
M. Benoît <b>VEBER</b>	HCN	Anesthésiologie Réanimation chirurgicale
M. Pierre <b>VERA</b>	C.B	Biophysique et traitement de l'image
M. Eric <b>VERIN</b>	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
M. Eric <b>VERSPYCK</b>	HCN	Gynécologie obstétrique
M. Olivier <b>VITTECOQ</b>	HB	Rhumatologie
M. Jacques <b>WEBER</b>	HCN	Physiologie

## MAITRES DE CONFERENCES

Mme Noëlle <b>BARBIER-FREBOURG</b>	HCN	Bactériologie – Virologie
M. Jeremy <b>BELLIEN</b>	HCN	Pharmacologie
Mme Carole <b>BRASSE LAGNEL</b>	HCN	Biochimie
M. Gérard <b>BUCHONNET</b>	HCN	Hématologie
Mme Mireille <b>CASTANET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie <b>CHASTAN</b>	HCN	Physiologie
Mme Sophie <b>CLAEYSSSENS</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
M. Moïse <b>COEFFIER</b>	HCN	Nutrition
M. Stéphane <b>DERREY</b>	HCN	Neurochirurgie
M. Eric <b>DURAND</b>	HCN	Cardiologie
M. Manuel <b>ETIENNE</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
M. Serge <b>JACQUOT</b>	UFR	Immunologie
M. Joël <b>LADNER</b>	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
M. Jean-Baptiste <b>LATOUCHE</b>	UFR	Biologie Cellulaire
M. Thomas <b>MOUREZ</b>	HCN	Bactériologie
M. Jean-François <b>MENARD</b>	HCN	Biophysique
Mme Muriel <b>QUILLARD</b>	HCN	Biochimie et Biologie moléculaire
M. Vincent <b>RICHARD</b>	UFR	Pharmacologie
M. Francis <b>ROUSSEL</b>	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
Mme Pascale <b>SAUGIER-VEBER</b>	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire <b>TOBENAS-DUJARDIN</b>	HCN	Anatomie
M. Pierre Hugues <b>VIVIER</b>	HCN	Imagerie Médicale

## PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mme Dominique <b>LANIEZ</b>	UFR	Anglais
Mme Cristina <b>BADULESCU</b>	UFR	Communication

## II - PHARMACIE

## PROFESSEURS

M. Thierry <b>BESSON</b>	Chimie Thérapeutique
M. Jean-Jacques <b>BONNET</b>	Pharmacologie
M. Roland <b>CAPRON</b> (PU-PH)	Biophysique
M. Jean <b>COSTENTIN</b> (Professeur émérite)	Pharmacologie

Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
M. Loïc <b>FAVENNEC</b> (PU-PH)	Parasitologie
M. Jean Pierre <b>GOULLE</b>	Toxicologie
M. Michel <b>GUERBET</b>	Toxicologie
M. Olivier <b>LAFONT</b>	Chimie organique
Mme Isabelle <b>LEROUX</b>	Physiologie
M. Paul <b>MULDER</b>	Sciences du médicament
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b> (PU-PH)	Microbiologie
Mme Elisabeth <b>SEGUIN</b>	Pharmacognosie
M. Rémi <b>VARIN</b> (PU-PH)	Pharmacie Hospitalière
M Jean-Marie <b>VAUGEOIS</b>	Pharmacologie
M. Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

### MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et Minérale
Mme Dominique <b>BOUCHER</b>	Pharmacologie
M. Frédéric <b>BOUNOURE</b>	Pharmacie Galénique
M. Abdeslam <b>CHAGRAOUI</b>	Physiologie
M. Jean <b>CHASTANG</b>	Biomathématiques
Mme Marie Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Elizabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mme Cécile <b>CORBIERE</b>	Biochimie
M. Eric <b>DITTMAR</b>	Biophysique
Mme Nathalie <b>DOURMAP</b>	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUC</b>	Pharmacologie
M. Abdelhakim <b>ELOMRI</b>	Pharmacognosie
M. François <b>ESTOUR</b>	Chimie Organique
M. Gilles <b>GARGALA</b> (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla <b>GHARBI</b>	Chimie analytique
Mme Marie-Laure <b>GROULT</b>	Botanique
M. Hervé <b>HUE</b>	Biophysique et Mathématiques
Mme Laetitia <b>LE GOFF</b>	Parasitologie Immunologie
Mme Hong <b>LU</b>	Biologie
Mme Sabine <b>MENAGER</b>	Chimie organique
Mme Christelle <b>MONTEIL</b>	Toxicologie
M. Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie Galénique
Mme Malika <b>SKIBA</b>	Pharmacie Galénique
Mme Christine <b>THARASSE</b>	Chimie thérapeutique
M. Frédéric <b>ZIEGLER</b>	Biochimie

### PROFESSEUR CONTRACTUEL

Mme Elizabeth **DE PAOLIS**

Anglais

### ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

M. Imane **EL MEOUCHE**

Bactériologie

Mme Juliette **GAUTIER**

Galénique

M. Romy **RAZAKANDRAINIBE**

Parasitologie

<b>III – MEDECINE GENERALE</b>
--------------------------------

### PROFESSEURS

M. Jean-Loup **HERMIL**

UFR

Médecine générale

### PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS :

M. Pierre **FAINSILBER**

UFR

Médecine générale

M. Alain **MERCIER**

UFR

Médecine générale

M. Philippe **NGUYEN THANH**

UFR

Médecine générale

### MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS :

M Emmanuel **LEFEBVRE**

UFR

Médecine générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD**

UFR

Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX**

UFR

Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN-TARTARIN**

UFR

Médecine Générale



**CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS** : Mme Véronique DELAFONTAINE

**HCN - Hôpital Charles Nicolle**

**CB - Centre HENRI BECQUEREL**

**Rouvray**

**CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation**

**HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME**

**CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du**

**LISTE DES RESPONSABLES DE DISCIPLINE**

Mme Cécile **BARBOT**

Chimie Générale et Minérale

M. Thierry **BESSON**

Chimie thérapeutique

M. Roland **CAPRON**

Biophysique

M Jean **CHASTANG**

Mathématiques

Mme Marie-Catherine **CONCE-CHEMTOB**

Législation, Economie de la Santé

Mme Elisabeth **CHOSSON**

Botanique

M. Jean-Jacques **BONNET**

Pharmacodynamie

Mme Isabelle **DUBUS**

Biochimie

M. Loïc **FAVENNEC**

Parasitologie

M. Michel **GUERBET**

Toxicologie

M. Olivier **LAFONT**

Chimie organique

Mme Isabelle **LEROUX-NICOLLET**

Physiologie

Mme Martine **PESTEL-CARON**

Microbiologie

Mme Elisabeth **SEGUIN**

Pharmacognosie

M. Mohamed **SKIBA**

Pharmacie Galénique

M. Philippe **VERITE**

Chimie analytique

## **ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS**

### **MAITRES DE CONFERENCES**

M. Sahil **ADRIOUCH**

Biochimie et biologie moléculaire  
(Unité Inserm 905)

Mme Gaëlle **BOUGEARD-DENOYELLE**

Biochimie et biologie moléculaire  
(UMR 1079)

Mme Carine **CLEREN**

Neurosciences (Néovasc)

Mme Pascaline **GAILDRAT**

Génétique moléculaire humaine  
(UMR 1079)

M. Antoine **OUVRARD-PASCAUD**

Physiologie (Unité Inserm 1076)

Mme Isabelle **TOURNIER**

Biochimie (UMR 1079)

### **PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

M. Serguei **FETISSOV**

Physiologie (Groupe ADEN)

Mme Su **RUAN**

Génie Informatique

# Remerciements

Merci à tous les membres du Jury:

Merci au Professeur Lefebvre de m'avoir accueilli dans son service, de m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse et d'avoir accepté de juger ce travail.

Merci au Docteur Prevost pour son soutien, ses conseils avisés, sa disponibilité et sa gentillesse constante. Merci de m'avoir si bien encadré durant tout ce travail tout en me laissant une certaine autonomie. Merci enfin de faire partie de ce jury.

Merci au Docteur Chagraoui pour son amitié, sa gentillesse, sa disponibilité, pour les discussions passionnantes que nous avons eu ensemble, pour ses sages conseils et pour m'avoir aidé durant toute cette année de préparation. Merci aussi d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Merci au Docteur Daliphard pour avoir accepté de juger ce travail, pour m'avoir apporté son expertise de qualicienne, pour partager avec fougue sa passion dévorante pour l'hématologie, et pour sa relecture rigoureuse de mon travail.

Un immense merci à toute ma petite famille, mon père, ma mère pour m'avoir donné la chance d'être là, pour m'avoir soutenu de tout leur cœur, pour m'avoir protéger du mieux qu'il pouvait en m'orientant vers la voie qui est mienne, et pour m'avoir offert une enfance au goût de "reviens-y".

Merci à Tantine, ma deuxième maman qui a compté et compte autant que la première, à mon frère et ma sœur pour leurs futures prescriptions, à Tatie et Tonton Old Angel pour tous les beaux moments partagés passés et à venir et enfin, à Mémée et Pépé qui me manque, et grâce à qui les mercredis resteront toujours les plus beaux jours de la semaine.

Merci à Beau-Papa et Belle-Maman d'être les beaux-parents idéaux et pour leur soutien sans faille.

Merci à mes amis de toujours, Snouss, Grand Ju, Bouba, Jules, Nanou, Cécile, Julie, Aurélie, Gégé... avec qui j'ai partagé les plus grandes joies comme les plus grandes peines et qui ont toujours été là pour moi.

Un grand merci tout spécial à Justine pour son aide précieuse, pour ses avis pertinents et pour son amitié durant toute cette aventure.

Merci à mes amis de Rouen, Marco, JS, Jacquot, Marion, Ghani, Latif ... et merci à tous mes cointernes Xavier alias Marado, Françou, Vialo, Jiovani, les internes d'hémato, les internes du service d'endocrino. Dédé, Caro Alex, pour ces moments de tranquillité absolue ou de folie démesurée partagés ensemble durant ces quatre années rouennaises..

Merci enfin, au meilleur de tous, Le Mani qui se reconnaitra sans difficultés, sans qui ces quatre années m'auraient paru beaucoup trop longues et monotones. Merci pour ta vision de la vie, pour ta folie, ta joie de vivre et ton soutien. Et rendez-vous dans 10 ans.

Merci à l'ensemble de mes professeurs d'Amiens et de Rouen qui ont su m'encourager à leur manière à poursuivre la voie de la pharmacie et de la biologie médicale. Merci pour leurs enseignements.

Merci à tous les biologistes de chaque service pour leur temps passé et leurs enseignements. Un grand merci tout particulier à :

Gilles Berthelot, pour son humour décapant, sa gentillesse, son ouverture d'esprit, sa disponibilité envers ses internes, nos discussions sur la vie et pour m'avoir redonné goût à ce que je faisais dans une période de profond doute.

Gérard, pour sa patience, son respect naturel des gens, sa rigueur, sa pédagogie, sa vocation d'humoriste inassouvie (le Gérard Show restera dans les annales...), et nos discussions « vraies ».

Sylvie, pour sa folie douce qui fait du bien dans un monde cartésien, pour ses quizz, pour son sens de l'humour malgré elle, pour se rendre indispensable aux yeux de tous en si peu de temps, pour avoir supporté plus ou moins dignement mes blagues de potache.

Guy, pour sa bonne humeur et sa joie de vivre légendaire, inébranlable et rémanente, pour m'avoir transmis le maximum de savoir avec le maximum de légèreté, pour sa sagesse et pour sa barbe de papa Noël.

Un merci tout particulier à mes techniciens du cœur, Floflo en premier pour avoir été une épaule et une maman à l'interne ignorant que j'étais, à Matthieu, Dany, Jéjé, Hard Manu, Dirty Fab', Soso, Riri, Fifi et Loulou de Dieppe...

Un grand merci à mes Drôles de Dames qui se reconnaîtront mais dont je dois taire la véritable identité sous peine de les compromettre mais sans qui mon passage dans le service d'endocrinologie n'aurait pas été aussi empreint de bonne humeur. Merci pour m'avoir aidé à organiser ma soutenance de thèse.

Enfin,

Merci à toi, ma fée du quotidien,

Qui avec rien, fait de moi un homme heureux

Qui ne me lâche jamais la main

Surtout quand ma vague dessine un creux

Merci à toi, qui ne triche jamais

Qui écoute quand il n'y a plus rien à entendre

Qui laisse transpirer La Vérité

Et me la dépose dans un geste tendre

Je t'aime

A la Vie,

« L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs. »



# Sommaire

Sommaire .....	1
INTRODUCTION.....	8
1 Problématique .....	9
1.1 Répartition du diabète au niveau national.....	10
1.2 Prévalence du diabète au niveau national .....	11
1.3 L'incidence du diabète au niveau national.....	13
1.4 Mortalité liée au diabète en France :.....	14
2 Physiopathologie du diabète de type 2 .....	16
2.1 ATTEINTE DE LA FONCTION ET DE LA CAPACITE SECRETOIRE INSULINIQUE DU PANCREAS .....	16
2.1.1 Anomalies fonctionnelles .....	17
2.1.2 Perte de masse cellulaire bêta .....	17
2.2 INSULINO-RESISTANCE MUSCULAIRE ET ADIPOCYTAIRE.....	18
2.2.1 Anomalie des voies de signalisation de l'insuline.....	18
2.2.2 Anomalie d'origine hormonale .....	19
2.2.3 Anomalie vasculaire .....	19
2.2.4 Rôle des acides gras libres et des acides gras intramusculaires.....	19
2.2.5 Rôle des autres produits de sécrétion adipocytaire.....	20
2.3 MECANISMES D'AUTO-AGGRAVATION (LA GLYCEMIE, LA GLYCOSYLATION... ).....	20
3 Etat d'exploration biologique actuelle du diabète de type 2 .....	22
3.1 Dépistage du diabète.....	22
3.2 Exploration de l'homéostasie du glucose .....	24
3.2.1 Evaluation de l'insulino-résistance .....	24
3.2.2 Index obtenus à l'aide de prélèvement à jeun (état basal) .....	26
3.2.3 Evaluation de l'insulino-sécrétion : .....	28
4 TECHNIQUES BIOLOGIQUES DE DEPISTAGE DU DIABETE ET RECOMMANDATIONS .....	33

4.1	Dosage biologique de la glycémie :(43)	33
4.2	Dosage biologique de l'insulinémie.....	35
4.3	Dosage biologique du peptide C.....	37
5	OBJECTIFS .....	39
MATERIELS ET METHODES .....		40
1	Techniques biologiques de dosage utilisées.....	41
1.1	Dosage du glucose sur système Roche/hitachi cobas c® .....	41
1.1.1	Principe.....	41
1.1.2	Domaine d'utilisation et échantillons.....	42
1.1.3	Limites de mesure – Interférences .....	43
1.1.4	Performances analytiques – Valeurs de références .....	44
1.2	Dosage de l'insuline sur système Roche/hitachi cobas e® et module d'immunoanalyse Elecsys® .....	44
1.2.1	Principe.....	44
1.2.2	Domaine d'utilisation et échantillons.....	46
1.2.3	Limites de mesure – Interférences .....	46
1.2.4	Performances analytiques – Valeurs de références .....	47
1.3	Dosage du peptide C sur système Roche/hitachi cobas e® et module d'immunoanalyse Elecsys® .....	49
1.3.1	Principe.....	49
1.3.2	Domaine d'utilisation et échantillons.....	49
1.3.3	Limites de mesure – Interférences .....	50
1.3.4	Performances analytiques – Valeurs de références .....	50
2	Protocole de prélèvement .....	53
2.1	Type d'étude :.....	53
2.2	Objectif de l'étude : .....	53
2.2.1	Données recueillies : .....	54
2.2.2	Repas standardisé ou repas « test » : .....	54
2.2.3	Analyse statistique : .....	55
3	Système d'assurance qualité.....	56

RESULTATS .....	63
DISCUSSION .....	76
Liste des Abréviations .....	87
Bibliographie.....	98

## Tables des figures

Figure 1. Prévalences du diabète et de l'intolérance au glucose dans le monde selon l'OMS en 2011 et estimations pour 2030.(1) .....	9
Figure 2. Nombres de personnes atteintes de diabète par région de la Fédération Internationale du Diabète (1) .....	10
Figure 3 Distribution des différents types de diabète, selon l'étude Entred 2007-2010 et <i>al</i> (American Diabetes Association 2013) .....	10
Figure 4. Taux standardisé de prévalence du diabète traité, par département, en 2009 selon le Régime général de l'assurance maladie, France.....	11
Figure 5. Prévalence du diabète traité, selon l'âge et le sexe, en 2009 selon le Régime général de l'assurance maladie, France.(2) .....	12
Figure 6. Taux standardisés annuels d'incidence de prise en charge pour affection de longue durée diabète sur la période 2000-2006, par région en métropole, et dans les départements d'outre-mer selon l'Institut de Veille Sanitaire (InVS)(2) .....	14
Figure 7. Taux standardisés de mortalité liée au diabète en causes multiples, par sexe et département, calculés globalement sur la période 2004-2006 selon l'InVS.(2) .....	15
Figure 8. Evolution de la part du diabète dans la mortalité générale et des taux standardisés de mortalité liée au diabète en causes multiples, France de 2001 à 2006 selon l'InVS.(2).....	15
Figure 9. Les principales voies de transduction du signal insuline selon Catherine Postic et al (8).....	18
Figure 10. Site d'entrée du glucose, des glucosamines et de l'uridine dans la voie de synthèse des hexosamines et rôle des acides gras libres.(21) .....	22
Figure 11. Clamp euglycémique hyperinsulinique .....	24
Figure 12. Synthèse de l'insuline .....	30
Figure 13. Différence de dosage entre une mesure simple pour chaque sérum individuel et la mesure par la méthode de référence (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse) comparé au dosage par la méthode de référence sur ce même échantillon selon Miller et <i>al</i> .(52). Les lignes représentent les bornes supérieures et inférieures de l'erreur totale de 32% basée sur des critères de variabilité biologique. •, Abbott; ▲, Alpcó; ■, Beckman-Coulter; □, Invitron; *, Mercodia; +, Millipore RIA; ◇, Roche; ▲, Siemens Advia Centaur; ○, Siemens Immulite; ◆, Tosoh. ....	35
Figure 14. Différence entre la moyenne de tous les résultats pour chaque échantillon individuel de sérum et les résultats de la méthode de référence pour ces mêmes échantillons comparée aux résultats de dosage par la méthode de référence pour ces échantillons selon Miller et <i>al</i> .(52) Les lignes représentent les bornes supérieures et inférieures du biais de 15.5% estimé et basé sur des critères de variabilité biologique.....	36
Figure 15. Représentation des CV intra- et inter-journaliers pour chaque combinaison laboratoire/méthode de dosage utilisée selon Wiedmeyer et <i>al</i> (53). (Chaque symbole représente une	

méthode différente de dosage du peptide C. CLEIA, immuno-enzymo dosage par chemiluminescence ; FIA, fluoro-immunodosage).....	38
Figure 16. Comparaison des résultats de dosage du peptide C en fonction des méthodes utilisées. Les résultats A correspondent à l'expression des moyennes des méthodes utilisées en routine et les résultats B sont donnés après normalisation par des sérums calibrés selon Wiedmeyer et <i>al.</i> (53).....	38
Figure 17. Voie de synthèse du Glucose 6-phosphate par l'Héxokinase .....	41
Figure 18. Synthèse du 6-phosphogluconolactone par la Glucose-6-phosphate déshydrogénase .....	42
Figure 19. Domaine d'absorption spectrophotométrique du NAD <sup>+</sup> et du NADH .....	42
Figure 20. Principe de l'electrochimiluminescence « ECLIA » .....	45
Figure 21. Schématisation des examens biologiques et cliniques effectués en fonction du déroulement du protocole.....	55
Figure 22. Moyenne des glycémies des témoins et des cas à jeun (t0), une heure après prise du repas test (t1) et deux heures après (t2). La barre d'erreur correspond à l'Erreur Standard à la Moyenne. *** p < 0.001 (dans le groupe diabétique vs t0), # p < 0.05 (dans le groupe diabétique vs t1) .....	66
Figure 23. Moyenne des insulinémies des témoins et des cas à jeun (t0), une heure après prise du repas test (t1) et deux heures après (t2). La barre d'erreur correspond à l'Erreur Standard à la Moyenne. *** p < 0.001 (dans le groupe diabétique vs t0), *** p < 0.001 (dans le groupe témoin vs t0), ## p < 0.01 (dans le groupe témoin vs t1).....	67
Figure 24. Moyenne des c-peptidémies des témoins et des cas à jeun (t0), une heure après prise du repas test (t1) et deux heures après (t2). La barre d'erreur correspond à l'Erreur Standard à la Moyenne. *** p < 0.001 (dans le groupe diabétique vs t0), ## p < 0.01 (dans le groupe diabétique vs t1), *** p < 0.001 et ** p < 0.01 (dans le groupe témoin vs t0), ## p < 0.01 (dans le groupe témoin vs t1).....	68
Figure 25. Moyenne des c-peptidémies divisées par les glycémies respectives des témoins et des cas à jeun (t0), une heure après prise du repas test (t1) et deux heures après (t2). La barre d'erreur correspond à l'Erreur Standard à la Moyenne. ** p < 0.01 (dans le groupe témoin vs t0).....	70
Figure 26. Répartition en nuage de points des valeurs C-peptidémie/Glycémie à t1 pour le groupe des cas/patients et le groupe des témoins. (n=30) .....	71
Figure 27. Répartition en bloc des valeurs C-peptidémie/Glycémie à t1 pour le groupe des cas/patients et le groupe des témoins. (n=30) .....	72
Figure 28. Répartition en nuage de points des valeurs C-peptidémie/Glycémie à t1 pour le groupe des cas/patients et le groupe des témoins. (n=29) .....	72
Figure 29. Répartition en bloc des valeurs C-peptidémie/Glycémie à t1 pour le groupe des cas/patients et le groupe des témoins. (n=29) .....	73
Figure 30. Fréquence de distribution pour les valeurs les c-peptide à jeun (FCPR), le ratio C-peptide/glucose (CPI), le c-peptide post glucagon (CPR6) et l'augmentation du c-peptide après	

l'injection de glucagon. gI (groupe avec insuline) ; gOHA (groupe avec antidiabétiques oraux)  
selon Miyamoto M. et *al* (56).....80

## Tables des tableaux

Tableau 1. Valeurs diagnostiques définies pour le diabète, l'IGT et l'IFG, suivant le test et le prélèvement d'après la World Health Organization, 1999 .....	23
Tableau 2. Principales équations et références des index évaluant la sensibilité à l'insuline à partir des insulinémies en (pmol/l ou U/ml) et des glycémies (mmol/l ou mg/dl) obtenues à jeun.....	27
Tableau 3. Récapitulatif des moyennes données cliniques cas versus témoins .....	65
Tableau 4. Moyenne des glycémies pour le groupe des cas et des témoins à chaque temps associé à leur erreur standard (SEM).....	66
Tableau 5. Moyenne des insulinémies pour le groupe des cas et des témoins à chaque temps associé à leur erreur standard (SEM).....	67
Tableau 6. Moyenne des C-peptidémie pour le groupe des cas et des témoins à chaque temps associé à leur erreur standard (SEM).....	68
Tableau 7. Rapport des moyennes des insulinémies sur les moyennes des glycémies respectives à chaque temps associé à leur erreur standard (SEM) .....	69
Tableau 8. Rapport des moyennes des C-peptidémie sur les moyennes des glycémies respectives à chaque temps associé à leur erreur standard (SEM) .....	70
Tableau 9. Récapitulatif des données cliniques et thérapeutiques des diabétiques/cas inclus dans l'étude avant et après la mise en place du protocole.....	75

# **INTRODUCTION**



# 1 Problématique

Actuellement le diabète est une pandémie touchant 382 millions de personnes à travers le monde. D'ici 2030 elles seront 552 millions. En effet, le nombre de personnes atteintes de diabète de type 2 est en hausse dans tous les pays, en particulier dans les pays à faible et moyen revenu qui regroupent 80% des diabétiques.

L'âge médian est compris entre 40 et 59 ans.

Le diabète provoque la mort de 4.6 millions de personnes chaque année tandis que 183 millions de personnes (50%) ne sont pas diagnostiquées.

Il est responsable d'au moins 465 milliards de dollars US de dépenses en soins de santé soit 11 % des dépenses totales en soins de santé des adultes (20-79 ans).

Outre le diabète, l'intolérance au glucose (IG) se caractérise par un taux de glycémie supérieur à la normale mais moins élevé que dans le cas du diabète, constitue avec ce dernier un problème de santé publique majeur.

Voici dans la figure 1, un résumé des prévalences actuelles du diabète et de l'IG:(1)

<b>EN BREF</b>	<b>2011</b>	<b>2030</b>
Population mondiale totale (milliards)	7,0	8,3
Population adulte (20-79 ans, milliards)	4,4	5,6
<b>DIABÈTE ET IG (20-79 ANS)</b>		
<b>Diabète</b>		
Prévalence mondiale (%)	8,3	9,9
Prévalence comparative (%)	8,5	8,9
Nombre de personnes atteintes du diabète (millions)	3,6	5,2
<b>IG</b>		
Prévalence mondiale (%)	6,4	7,1
Prévalence comparative (%)	6,5	6,7
Nombre de personnes souffrant d'IG (millions)	2,0	3,8

**Figure 1. Prévalences du diabète et de l'intolérance au glucose dans le monde selon l'OMS en 2011 et estimations pour 2030.(1)**

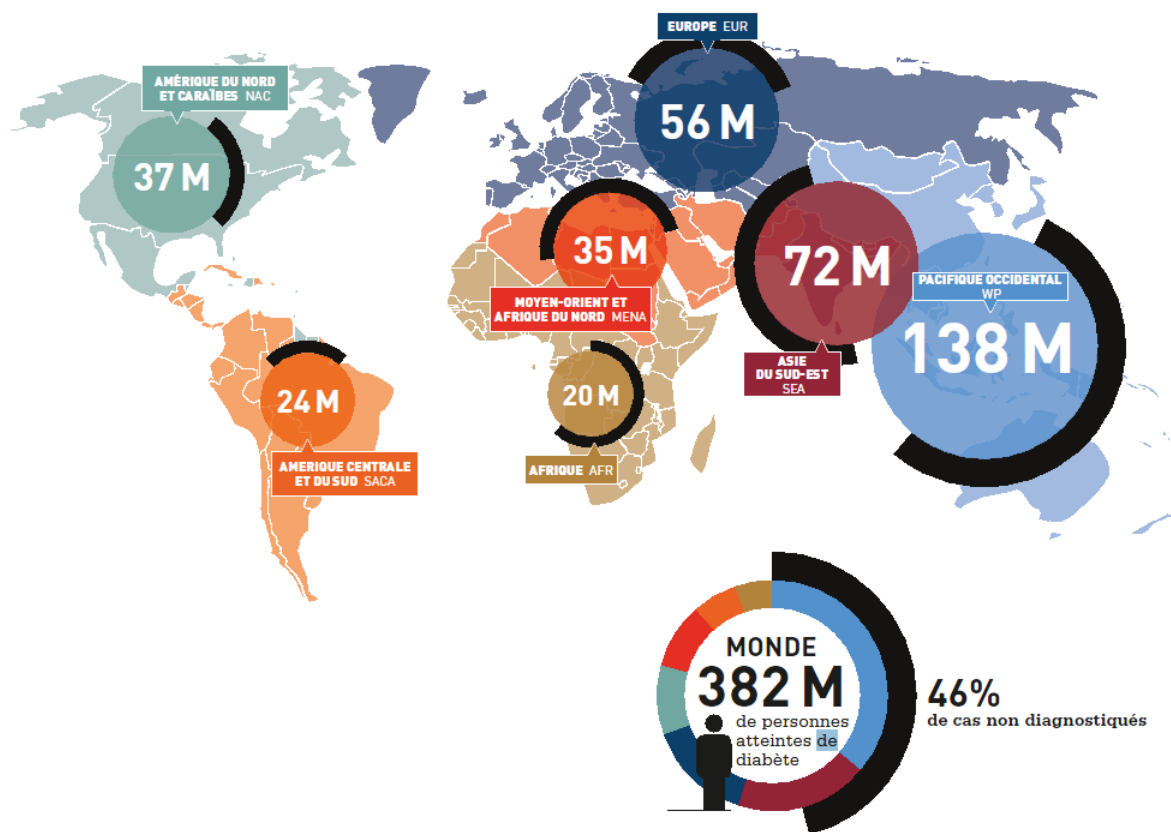


Figure 2. Nombres de personnes atteintes de diabète par région de la Fédération Internationale du Diabète (1)

### 1.1 Répartition du diabète au niveau national

Concernant la France, l'étude Entred (2007-2010) a tiré au sort environ 10000 patients diabétiques parmi les bénéficiaires du Régime général de l'assurance maladie afin de caractériser leur diabète par l'intermédiaire de questionnaire téléphonique ou autoquestionnaire portant sur les données de consommation médicale et des enquêtes complémentaires. Les personnes diabétiques diagnostiquées avant l'âge de 45 ans et dont l'insulinothérapie a été mise en place dans un délai de moins de deux ans ont

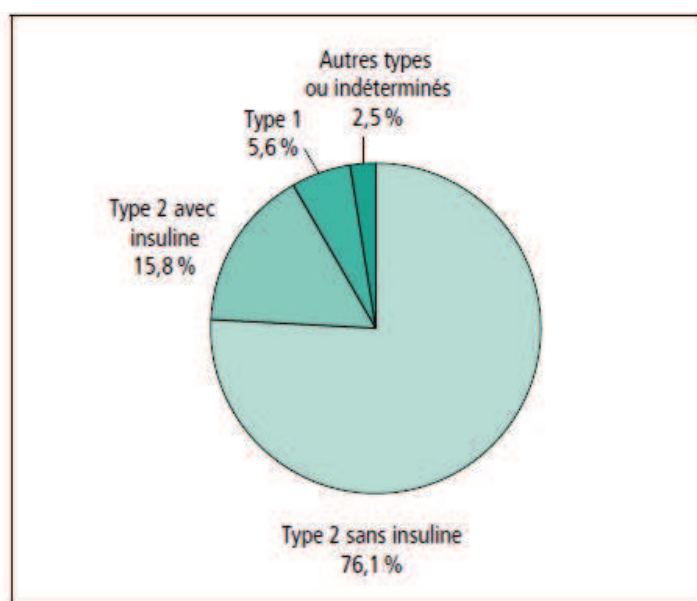


Figure 3 Distribution des différents types de diabète, selon l'étude Entred 2007-2010 et al (American Diabetes Association 2013)

été considérées comme diabétique de type 1 ; les autres personnes ont été considérées comme diabétiques de type 2 ou autres diabètes.

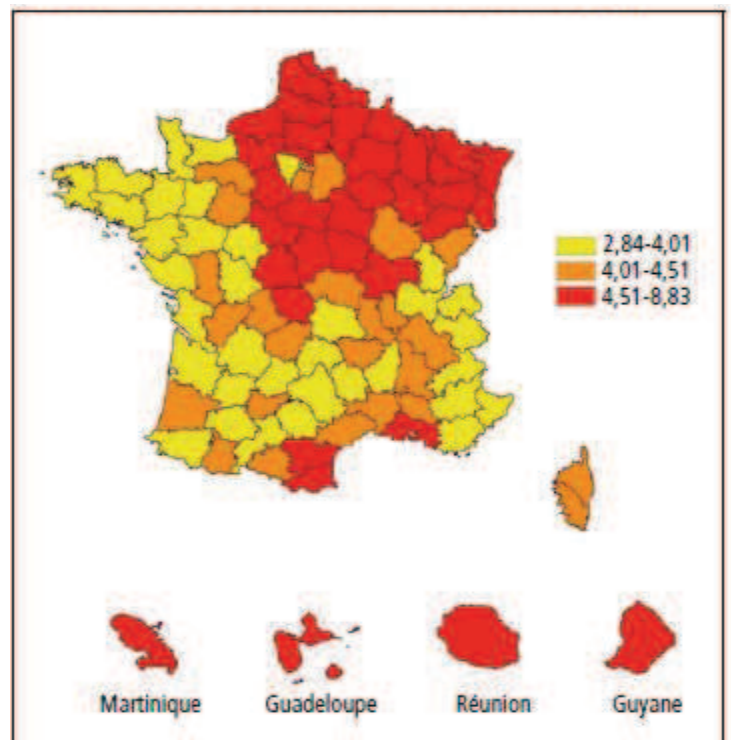
Il en ressort les données suivantes :

- 5.6 % de diabète de type 1
- 15.8 % de diabète de type 2 sous insuline
- 2.5 % de diabète autre (MODY, Mitochondrial...) ou indéterminé
- **76.1 % de diabète de type 2 sans insuline** (2)

## 1.2 Prévalence du diabète au niveau national

La prévalence correspond au nombre de personnes atteintes par une maladie rapporté à la population. La prévalence du diabète peut être estimée de plusieurs façons : à partir des cas de diabète traité pharmacologiquement ; de diabète diagnostiqué (traité pharmacologiquement, par régime seul ou non traité) ; de diabète non diagnostiqué (ou méconnu) des personnes ; ou l'ensemble de ces cas.

- La prévalence du diabète **traité pharmacologiquement** a été estimé en 2009 à **4.4 %** de la population résidant en France soit **2.9 millions de personnes**
- La prévalence du diabète **traité pharmacologiquement** était **plus élevée chez les hommes (6.4%)** que chez les femmes (4.5%), à âge égal, sauf dans les départements d'outre-mer.
- La prévalence du diabète **traité pharmacologiquement** augmentait fortement avec l'âge, jusqu'à un maximum de 19.7% des hommes âgés de 75-79 ans et de 14.2% des femmes de même âge. L'âge moyen était de 65,1 ans.



- La prévalence du diabète diagnostiqué traité ou non était respectivement 2.5 fois et 3 fois plus élevée chez les hommes et les femmes **en surpoids (obésité exclue)**, et 5.5 à 6 fois plus élevée chez les hommes et les femmes **obèses** par rapport à ceux et celles de corpulence normale, après prise en compte des autres facteurs de risque de diabète disponibles, chez les personnes âgées de 45 ans et plus en France métropolitaine.
- Par rapport à ses voisins européens, la France aurait une prévalence du diabète diagnostiqué, à âge et sexe égaux, qui se situerait dans la moyenne. Toutefois, ces estimations reposent sur des définitions du diabète qui varient d'un pays à l'autre. En 2005, les prévalences pour chaque pays étaient : (2)

- **France : 3,2%**
- Pays-Bas : 3,0%
- Danemark : 3,0 %
- Angleterre : 3,3%
- Autriche : 3.8 %
- Luxembourg : 3.5 %
- Finlande : 2.6%
- Ecosse : 2.7 %
- Belgique 2.9 %
- Suède : 2.8 %

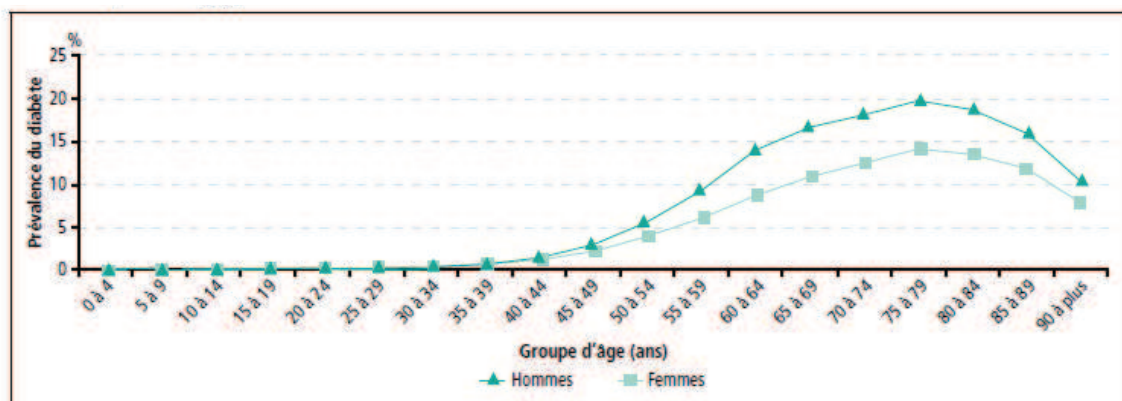


Figure 5. Prévalence du diabète traité, selon l'âge et le sexe, en 2009 selon le Régime général de l'assurance maladie, France.(2)

### ***1.3 L'incidence du diabète au niveau national***

L'incidence correspond au nombre de personnes nouvellement atteintes par une maladie au cours d'une période donnée, généralement une année, rapporté à la population. Très peu de données d'incidence du diabète sont disponibles, en France comme ailleurs, puisqu'elles nécessitent des études de cohorte (suivi de la population non atteinte par la maladie) ou un système de déclaration obligatoire. On peut donc approcher l'incidence du diabète à partir des admissions en affection de longue durée (ALD) pour diabète, avec cependant une probable surestimation. Ainsi en 2006:

- En métropole
  - le taux brut d'incidence des ALD pour diabète atteignait **289 pour 100 000 habitants** correspondant à environ 178 000 nouvelles admissions en ALD diabète
  - le taux standardisé (à âge égal) d'incidence était plus élevé chez les hommes que chez les femmes (**154 versus 121/100 000**)
  - le taux d'incidence augmentait avec l'âge jusqu'à 64-75 ans (**1011/100 000 hommes et 670/100 000 femmes**) et diminuait ensuite,
- Dans les DOM
  - les taux d'incidence d'ALD diabète, calculés globalement sur la période 2000-2006 **étaient très élevés**, à structure d'âge et sexe comparable : **517/100 000** à la Réunion ; **559/100 000** en Guadeloupe ; **366/100 000** en Martinique ; **307/100 000** en Guyane, *versus* **244/100 000** en métropole sur la même période
  - Contrairement à la situation en métropole, **les taux d'incidence étaient plus élevés chez les femmes que chez les hommes.** (2)

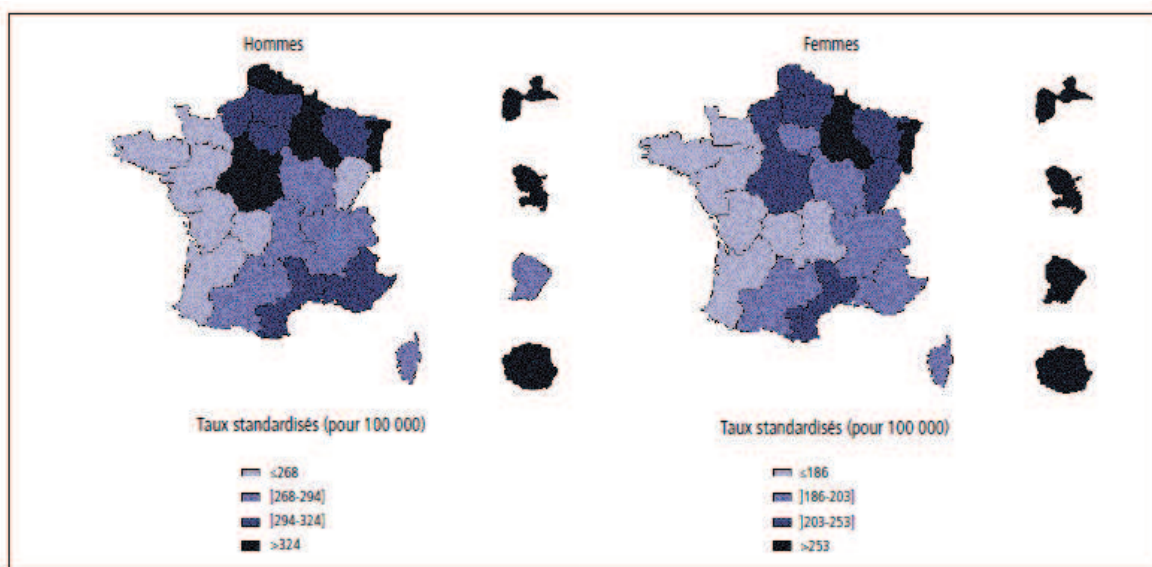


Figure 6. Taux standardisés annuels d'incidence de prise en charge pour affection de longue durée diabète sur la période 2000-2006, par région en métropole, et dans les départements d'outre-mer selon l'Institut de Veille Sanitaire (InVS)(2)

#### 1.4 Mortalité liée au diabète en France :

L'analyse des certificats de décès permet d'étudier la mortalité de la population en France et les maladies ou processus morbides qui ont directement contribué au décès. Le taux de mortalité correspond au nombre de personnes décédées rapporté à la population pendant une période donnée. Le diabète étant rarement la cause directe du décès, mais davantage une cause indirecte *via* une de ses complications, la mortalité est dite liée au diabète quand le médecin certificateur a reporté le diabète comme étant soit la cause initiale du décès, soit une des causes associées au décès (analyse dite en causes multiples). Ainsi en 2006 :

- Le diabète était mentionné dans **2.2% des certificats de décès comme cause initiale du décès** (soit 11498 décès) et dans **6.1% des certificats parmi les différentes maladies ayant contribué au décès** (causes multiples, initiale ou associées), (soit 32156 décès)
- Le **taux brut de mortalité** liée au diabète était estimé à **51/100 000**
- Le **taux standardisé** était **plus élevé chez les hommes que chez les femmes** (41/100 000 *versus* 23/100 000)
- **L'âge moyen du décès**, lorsque celui-ci était lié au diabète, était de **78 ans** et était plus élevé chez les femmes que chez les hommes (81 *versus* 75 ans)

- Hors données outre-mer, la France occuperait **la septième place** en termes de mortalité liée au diabète. (2)

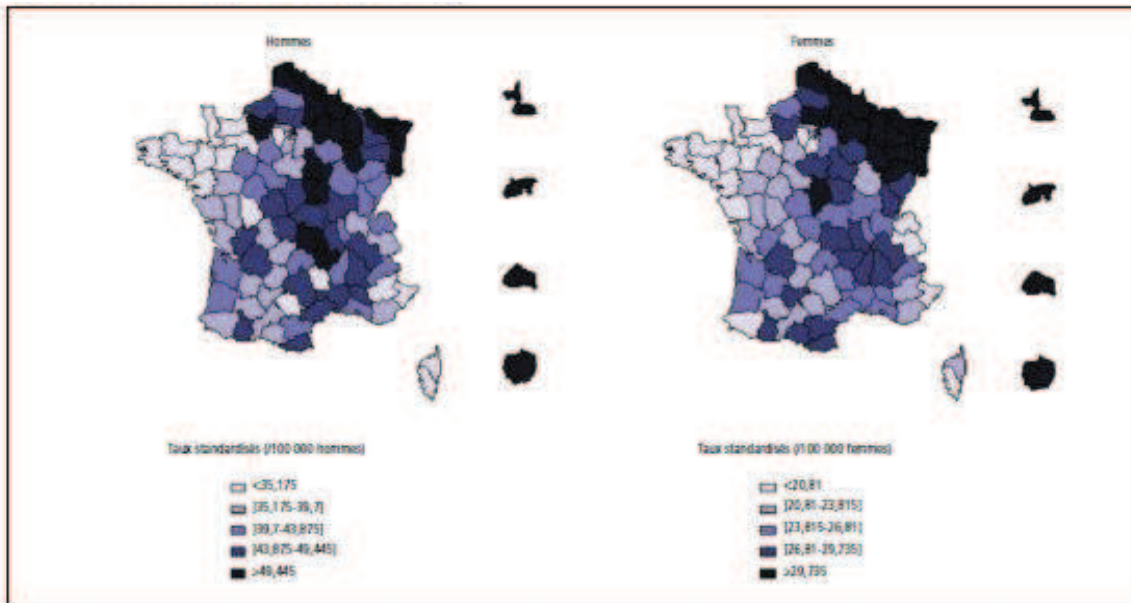


Figure 7. Taux standardisés de mortalité liée au diabète en causes multiples, par sexe et département, calculés globalement sur la période 2004-2006 selon l'InVS.(2)

	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Nombre de décès liés au diabète	29 590	30 541	32 385	30 882	32 588	32 156
Part du diabète dans la mortalité générale (%)	5,5	5,6	5,8	6,0	6,1	6,1
Taux de mortalité standardisés liés au diabète (pour 100 000 habitants)						
Hommes	41,2	41,6	43,4	41,3	43,1	41,1
Femmes	25,1	25,4	26,3	24,3	24,1	23,2
<b>Total</b>	<b>32,0</b>	<b>32,4</b>	<b>33,7</b>	<b>31,5</b>	<b>32,2</b>	<b>30,8</b>

Figure 8. Evolution de la part du diabète dans la mortalité générale et des taux standardisés de mortalité liée au diabète en causes multiples, France de 2001 à 2006 selon l'InVS.(2)

## 2 Physiopathologie du diabète de type 2

Longtemps, le diabète de type 2 fut considéré comme une maladie de l'insulinorésistance avec deux stades évoqués : celui de l'insulinorésistance compensée et celui de l'insulinorésistance décompensée. Ainsi, une sécrétion insulinaire insuffisante succédait à un hypersulinisme compensatoire.

Certaines études cependant ont démontré une perte importante et précoce de la fonction cellulaire bêta en réponse au glucose intraveineux, avec parallèlement une faible aggravation de l'insulinorésistance dans le temps faisant de la perte de la fonction cellulaire bêta un acteur majeur de la physiopathologie du diabète de type 2. (3)

Si la conjonction de ces deux mécanismes est nécessaire et probablement obligatoire pour assurer l'installation d'un vrai diabète de type 2, il semblerait que seule la diminution de la capacité endocrine des cellules bêta de Langherans constitue l'anomalie physiopathologique principale évoluant tout au long de la vie du patient. La situation métabolique n'étant jamais stable, elle entraîne une course constante à l'escalade de la prise en charge thérapeutique avec les échecs que l'on connaît.

Voyons plus en détails les trois principaux processus à l'origine de l'apparition du diabète de type 2.

### ***2.1 ATTEINTE DE LA FONCTION ET DE LA CAPACITE SECRETOIRE INSULINIQUE DU PANCREAS***

Trois processus majeurs concourent à la régulation glycémique normale :

- La production hépatique de glucose
- La consommation par les tissus périphériques (tissus adipeux et muscles)
- La production d'insuline par la cellule bêta des îlots de langherans pancréatiques

Chez un sujet normal, l'insulinosécrétion est proportionnelle à la sensibilité périphérique au glucose et maintient l'homéostasie du glucose à jeun ou en post prandial à des valeurs dites normales. Un déficit de l'insulinosécrétion est à l'origine d'une hyperglycémie chronique définissant le diabète de type 2. L'origine de ce déficit est multiple : soit une dysfonction des îlots soit une diminution de leur nombre soit la conjonction des deux.



### **2.1.1 Anomalies fonctionnelles des cellules bêta**

Deux principaux mécanismes sont à l'origine d'une altération de la pulsabilité insulino-sécrétrice de l'îlot et d'une diminution de la capacité sécrétoire avec perte du pic précoce : la glucotoxicité et la lipotoxicité.

Concernant la glucotoxicité, certaines études ont démontré qu'une hyperglycémie prolongée était à l'origine d'une détérioration de la capacité sécrétoire d'insuline gluco-induite dont le mécanisme physiologique principal serait le suivant : la cellule bêta possède des transporteurs de glucose de type GLUT-2 dont le nombre et l'affinité pour le glucose apparaissent régulés par le niveau glycémique. Une hyperglycémie chronique diminuerait le nombre et l'affinité de ces récepteurs donc diminuerait la glycolyse intra-îlot, signal capable d'induire l'insulino-sécrétion ; de même le glucose est capable d'interférer avec plusieurs phosphorylases bêta cellulaires, elles-mêmes actrices dans l'exocytose.(4)

Concernant la lipotoxicité, des tests ont démontré qu'une diffusion prolongée d'acide gras désensibilise l'îlot au stimulus glucose chez l'animal et chez le sujet obèse. (5)

### **2.1.2 Perte de masse cellulaire bêta**

L'étude UKPDS a démontré qu'à la découverte du diabète, 50% de la sécrétion d'insuline était déjà diminuée. Deux mécanismes physiologiques seraient potentiellement à l'origine de cette perte cellulaire :

#### **2.1.2.1 Apoptose**

L'apoptose excessive serait un élément majeur dans la physiopathologie du diabète de type 2 avec une surexpression des gènes de la balance pro-apoptotique. Le mécanisme d'apoptose fait intervenir le facteur de transcription NF- $\kappa$ B et une surproduction de NOS, le tout associé à une hyperproduction de céramides modulant l'expression de Bcl-2, gènes régulateurs de l'apoptose. Ce mécanisme peut être présent à l'état basal mais peut être aussi majoré par la glucotoxicité et la lipotoxicité. (6)

### 2.1.2.2 Dépôts amyloïdes

On trouve à l'origine de ce mécanisme, le **polypeptide amyloïde** de l'îlot produit en parallèle de l'insuline puisque leur gène respectif partage le même promoteur. L'hyperinsulinisme lié au diabète entraîne une surproduction de ce polypeptide conduisant à leur précipitation et à la formation de fibrilles à l'origine de la dégénérescence de l'îlot. Il existe aussi un phénomène de glycation associé. Les fibrilles augmentent l'expression des gènes pro-apoptotiques P53 et P 21, participent au stress oxydatif et active les canaux ioniques trans-membranaires prolongeant l'augmentation du calcium intracellulaire, lui-même, facteur d'apoptose. (7)

## 2.2 INSULINORÉSISTANCE MUSCULAIRE ET ADIPOCYTAIRE

Plusieurs mécanismes sont à l'origine de l'insulinorésistance périphérique inhérente à l'apparition du diabète. Nous allons détailler les principaux.

### 2.2.1 Anomalie des voies de signalisation de l'insuline

Le schéma suivant résume l'action physiologique de l'insuline au niveau des tissus cibles chez le sujet dit « normal » (8):

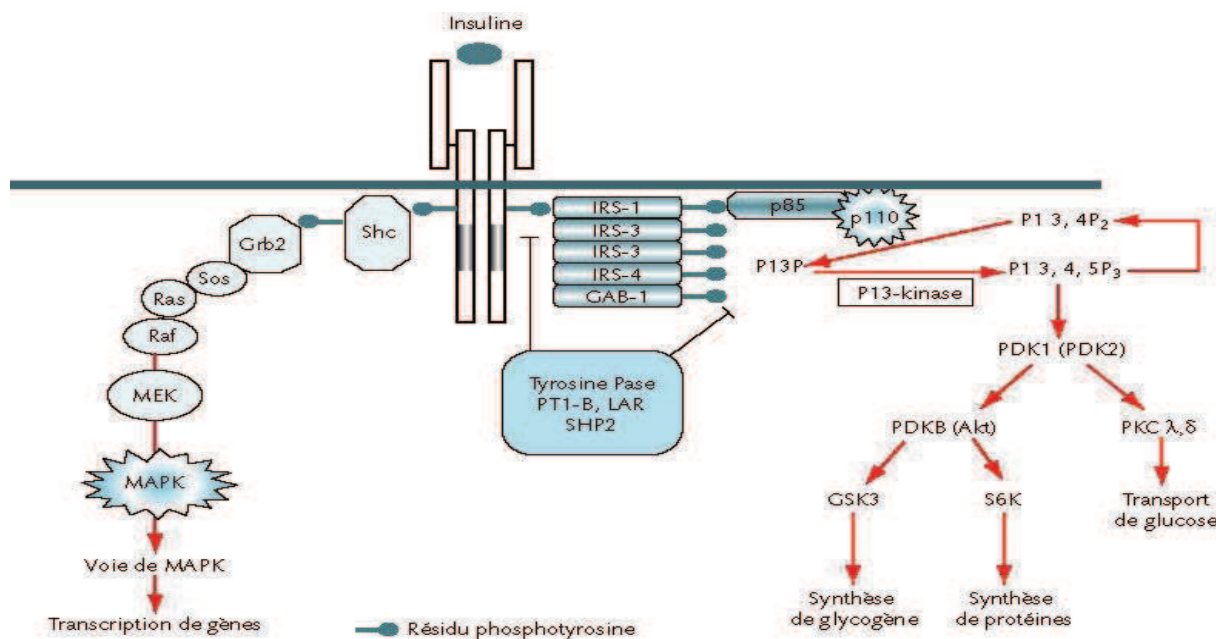


Figure 9. Les principales voies de transduction du signal insuline selon Catherine Postic et al (8)

Un des premiers mécanismes et des plus importants à l'origine de l'insulinorésistance serait une entrave à l'activation de la glycogène synthase (GSK3). En effet, on le retrouve chez les sujets apparentés à des sujets diabétiques ou chez des intolérants au glucose. L'origine de cette entrave, soit innée soit acquise par les facteurs environnementaux, reste encore à déterminer malgré de nombreuses études.

La protéine kinase C ainsi que la tyrosine phosphatase 1B représentent aussi des acteurs dans l'insulino-résistance de par leur action inhibitrice dans la chaîne de signalisation.

### **2.2.2 Anomalie d'origine hormonale**

L'hormone principalement concernée est la **11- $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase type 1** permettant la synthèse du cortisol actif à partir de la cortisone inactive dont l'expression intramusculaire est augmentée chez l'insulinorésistant. Un excès de corticostéroïdes au niveau d'un tissu cible comme le muscle est délétère pour le métabolisme glucidique puisqu'il inhibe localement l'action de l'insuline et donc, induit une insulinorésistance. (9)

### **2.2.3 Anomalie vasculaire**

Un défaut de vascularisation a plusieurs conséquences conduisant à l'insulinorésistance : tout d'abord, une diminution du flux sanguin entraîne une clairance modifiée des triglycérides et un apport diminué du glucose et d'insuline au muscle. Il apparaît donc un gradient insulinémique entre le secteur plasmatique et interstitiel dont l'importance est corrélée au degré d'insulinorésistance. De même, l'altération de la fonction endothéliale à l'origine du défaut de vascularisation aggrave le phénomène d'insulinorésistance en freinant le transport trans-capillaire. (10)

### **2.2.4 Rôle des acides gras libres et des acides gras intramusculaires**

Un facteur important de l'insulinorésistance est la relation qui lie les acides gras circulants, le tissu adipeux et le muscle. Un des éléments majeur est l'inhibition de l'hexokinase musculaire et donc du transport et de la phosphorylation du glucose, par les acides gras

libres.(11) Les acides gras libres possèdent d'autres effets délétères comme la diminution de la clairance métabolique de l'insuline ainsi que la diminution de l'insulinosécrétion (voir précédemment chapitre sur la lipotoxicité)

L'origine de cet excès d'acides gras circulants résulte de l'augmentation de la lipolyse elle-même résultant d'une part de l'augmentation de la masse grasse d'autre part de l'altération de l'effet de l'insuline sur les tissus adipeux avec une diminution de la captation des acides gras par le muscle. (12)

Cette diminution de la captation des acides gras est liée à un excès de lipides intramusculaires dont l'hypothèse d'une corrélation avec une surexpression de la lipoprotéine lipase musculaire a été évoquée chez les sujets présentant une glycémie élevée et une insulino-résistance. (13)

### **2.2.5 Rôle des autres produits de sécrétion adipocytaire**

Le premier produit de sécrétion adipocytaire ayant un effet sur l'insulino-sensibilité est l'adiponectine. En cas de diabète de type 2 avec surcharge pondérale, on la retrouve diminuée ; or l'adiponectine permet d'améliorer l'insulino-sensibilité en augmentant l'oxydation des acides gras et en diminuant le taux d'acyl-CoA intramyocytaire.

Haffner a démontré qu'un taux élevé de protéines de l'inflammation (PAI, CRP, fibrinogène) pouvait prédire un diabète dans les 5 années à venir. L'IL-6 et le TNF- $\alpha$  quant à eux, semblent impliqués dans l'insulino-résistance et la captation cellulaire du glucose. Ces médiateurs de l'inflammation étant synthétisés principalement par le tissu adipeux, cela appuie l'hypothèse d'une relation étroite entre des anomalies constitutionnelles ou induites du tissu adipeux et la survenue d'un diabète de type 2. (14)

## **2.3 MECANISMES D'AUTO-AGGRAVATION (LA GLYCEMIE, LA GLYCOSYLATION...)**

L'apparition d'une hyperglycémie chronique fait entrer le patient dans un véritable cercle vicieux où concourent une série d'évènements auto-aggravants. Ainsi, une étude a montré que l'insuline glyquée en proportion trop importante du fait de l'hyperglycémie chronique, entraînait une capacité de liaison moindre au récepteur et donc une activité moindre. (15)

Autre source d'insulinorésistance, les glucosamines dont la synthèse normalement extrêmement faible est régulée au niveau de la glutamine fructose 6-phosphate aminotransférase (figure 10). Cette enzyme produit de la glucosamine 6-phosphate qui affecte l'action de l'insuline sur trois niveaux :

- au niveau de la translocation du GLUT-4 (16)
- au niveau de l'activation de la glycogène synthase (17)
- au niveau de la PKC qui entrave la voie de signalisation de l'insuline (18)

Ainsi, si le flux intracellulaire du glucose vers le fructose 6-phosphate est augmenté, la production de glutamines augmente et avec elle, l'insulinorésistance.

Le foie quant à lui, est un organe majeur dans le circuit de régulation de la glycémie puisqu'il est le principal organe producteur de glucose à jeun. Il contribue aussi pour 25% à l'utilisation du glucose ingéré. En cas de dysrégulation du métabolisme hépatique comme chez le diabétique de type 2 obèse, on observe une résistance à l'effet supprimeur de l'insuline sur la production endogène de glucose. Ce maintien de la production endogène de glucose peut s'expliquer par une néoglucogénèse accélérée puisque ses précurseurs (acides aminés, lactate et glycérol) sont davantage disponibles et davantage captés par le foie. (19) Tout cela concourt au maintien de l'hyperglycémie à jeun observé chez le diabétique de type 2.

Enfin, les acides gras souvent présents en quantité excessive chez le diabétique de type 2 perturbent l'inhibition de la production endogène de glucose par l'insuline et l'hyperglycémie postprandiale. (20)

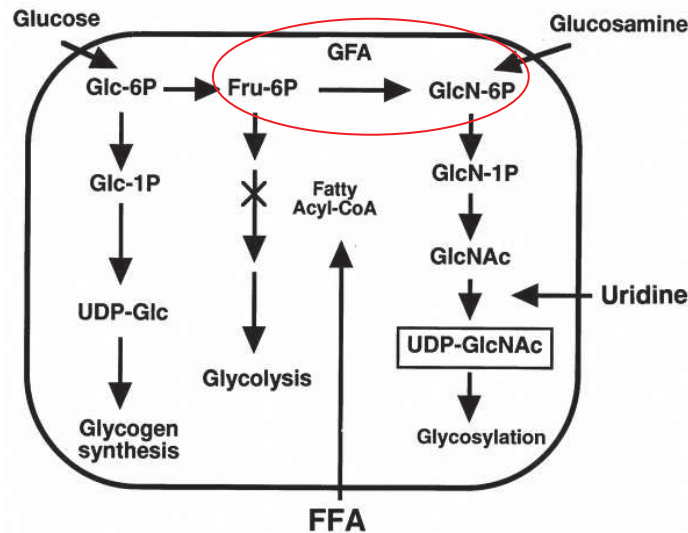


Figure 10. Site d'entrée du glucose, des glucosamines et de l'uridine dans la voie de synthèse des hexosamines et rôle des acides gras libres.(21)

GFA : glutamine fructose 6-phosphate amino-transférase

### 3 Etat d'exploration biologique actuelle du diabète de type 2

Le diabète quel que soit le type, est défini selon l'OMS 1999 et repris par l'ANAES en février 2003 « *comme un groupe d'affections métaboliques caractérisées par la présence d'une hyperglycémie chronique* » résultant « *d'une déficience de sécrétion d'insuline, d'anomalies de l'action de l'insuline sur les tissus cibles, ou de l'association des deux* »

#### 3.1 Dépistage du diabète

L'examen de référence est le **dosage de la glycémie à jeun** (le jeûne est défini par une absence de prise alimentaire pendant au moins 8 heures d'affilée). L'autre dosage possible est le dosage de la glycémie 2 heures après ingestion de 75 g de glucose (**test d'hyperglycémie provoquée orale (HGPO)**)(22). Suivant les critères de l'OMS de 1999, le **diagnostic** peut être établi de trois façons différentes :

- **présence de symptômes de diabète** (syndrome Cardinal, polyurie, polydipsie, polyphagie avec amaigrissement inexpliqué, somnolence voire coma) **et glycémie au hasard  $\geq 2$  g/L (11.1 mmol/L)**
- **glycémie à jeun  $\geq 1.26$  g/L (7.0 mmol/L)**
- **glycémie  $\geq 2$  g/L (11.1 mmol/L) 2 heures après HGPO.**

Si aucun des outils diagnostics évoqués précédemment ne permet d'observer une hyperglycémie évidente, le diagnostic doit être confirmé par une deuxième mesure (22).

Cependant, en pratique, le test d'HGPO a été abandonné au profit de la seule mesure de la glycémie à jeun. Il peut être utilisé mais n'est plus nécessaire pour confirmer le diagnostic. Cependant, il reste un outil diagnostic prédominant dans le dépistage du diabète gestationnel entre la 24 et 28<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée (critère OMS) (23).

Il existe 2 types d'anomalies de la glycorégulation constituant des situations à risque : **l'intolérance au glucose (IGT)**, définie à partir du test d'HGPO, et **l'hyperglycémie modérée à jeun (IFG)**, définie à partir de la seule glycémie à jeun. (Tableau 1)

Depuis 2009, l'HbA1c habituellement mesurée en routine pour évaluer le statut glycémique du patient voire son observance au traitement, peut être utilisée pour diagnostiquer le diabète en prouvant son augmentation dans le temps. Cela a été recommandé par l'*International Expert Committee* et approuvé par le WHO et l'ADA. La valeur seuil a été fixée à **6.5% de l'hémoglobine totale**.

Ainsi, si le patient présente sur deux prélèvements différents espacés dans le temps une  $HbA1c \geq 6.5\%$  ( $\geq 48$  mmol/moles) ou  $HbA1c \geq 6.5\%$  avec glycémie  $\geq 2g/L$  ou/et avec des symptômes typiques du diabète alors le diagnostic de diabète peut être posé.

Si la valeur de l'HbA1c  $\leq 6.5\%$ , un examen biologique de contrôle devra être fait dans les 6 mois suivants le premier examen, si des symptômes apparaissent.(24)

**Tableau 1. Valeurs diagnostiques définies pour le diabète, l'IGT et l'IFG, suivant le test et le prélèvement d'après la World Health Organization, 1999**

	Concentration de glucose g/L (mmol/L)			
	Sang total		Sang plasmatique	
	Veineux	Capillaire	Veineux	Capillaire
<b>Diabète</b>				
Glycémie à jeun ou HGPO	$\geq 1,10$ (6,1) $\geq 1,80$ (10,0)	$\geq 1,10$ (6,1) $\geq 2,0$ (11,1)	$\geq 1,26$ (7,0) $\geq 2,0$ (11,1)	$\geq 1,26$ (7,0) $\geq 2,2$ (12,2)
<b>IGT</b>				
Glycémie à jeun (si mesurée) et HGPO	$< 1,10$ (6,1) et 1,20-1,79 (6,7-9,9)	$< 1,10$ (6,1) et 1,40-1,99 (7,8-11,0)	$< 1,26$ (7,0) et 1,40-1,99 (7,8-11,0)	$< 1,26$ (7,0) et 1,60-2,1 (8,9-12,1)
<b>IFG</b>				
Glycémie à jeun et HGPO (si mesurée)	1,0-1,09 (5,6-6,0) $< 1,20$ (6,7)	1,0-1,09 (5,6-6,0) $< 1,40$ (7,8)	1,10-1,25 (6,1-6,9) $< 1,40$ (7,8)	1,10-1,25 (6,1-6,9) $< 1,60$ (8,9)

IGT : intolérance au glucose. IFG : hyperglycémie modérée à jeun.

## 3.2 Exploration de l'homéostasie du glucose

### 3.2.1 Evaluation de l'insulinorésistance

Il existe une méthode de référence permettant cette mesure : le **Clamp euglycémique hyperinsulinique** décrit par Andres et DeFronzo en 1979. (25) Cependant, cette technique n'est pas utilisée en routine du fait de sa réalisation complexe mais il existe de nombreuses méthodes alternatives plus simples. Leurs index simplifiés offrent une sensibilité et une spécificité suffisante pour les études épidémiologiques mais leur utilité dans la pratique clinique reste néanmoins à démontrer.

#### 3.2.1.1 . Le Clamp euglycémique hyperinsulinique

Son principe repose sur la mise en place d'une perfusion d'insuline exogène à débit continu associée à une perfusion variable de glucose, adaptée de façon à maintenir la glycémie normale et constante. Si la dose d'insuline est suffisante pour inhiber la production hépatique de glucose, la quantité de glucosé perfusée est le reflet de la sensibilité à l'insuline ; plus elle sera importante plus la sensibilité sera élevée (Figure 11).

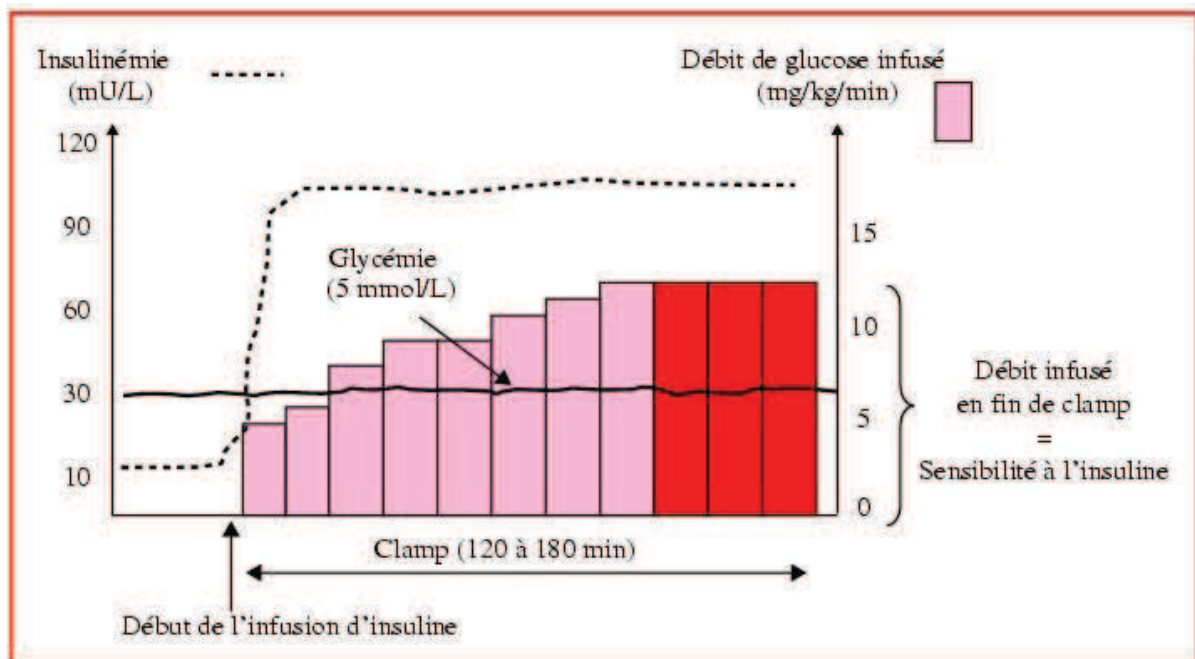


Figure 11. Clamp euglycémique hyperinsulinique



Cette technique peut être couplée à la perfusion d'isotope stable du glucose pour mesurer avec plus de précision l'utilisation totale du glucose ou des mesures calorimétriques pour mesurer le métabolisme oxydatif et non oxydatif du glucose.

Elle permet de différencier la sensibilité à l'insuline entre différents groupes de population (sujets témoins, diabétiques type 2, obèses...) et permet aussi de suivre l'amélioration de la sensibilité à l'insuline avant et après une intervention comme la perte de poids, un programme d'entraînement physique ou une intervention pharmacologique.

### **3.2.1.2 Clamp hyperglycémique**

Cette technique consiste à perfuser du glucose de façon à maintenir la glycémie du sujet à 5.5 (1g/l) ou 7.0 mmol/l (1.25 g/l) et permet d'évaluer dans un même test, la sécrétion et la sensibilité à l'insuline. La glycémie est dosée toutes les 5 à 10 minutes de façon à adapter la perfusion de glucose pour maintenir la glycémie en plateau pendant 2 heures. La sensibilité à l'insuline du patient est déterminée par la quantité de glucose perfusée dans les 30 dernières minutes des 2 heures que dure le test.

### **3.2.1.3 Minimal model de Bergman**

Cette technique plus simple que les deux précédentes, permet d'évaluer l'insulino-sécrétion et la sensibilité à l'insuline. Cette dernière est estimée à partir de la vitesse de disparition du glucose à la suite d'injection intraveineuse de glucose éventuellement suivie d'une injection de tolbutamide. (26)

### **3.2.1.4 Combinaison d'une hyperglycémie par voie intraveineuse et d'un clamp euglycémique : la méthode BOTNIA**

Cette technique en deux temps permet de mesurer l'insulinosécrétion et la sensibilité à l'insuline. Le premier temps consiste en une hyperglycémie provoquée en intraveineuse permettant de mesurer l'insulinosécrétion réactionnelle sur 60 minutes puis un second temps correspondant en la perfusion d'insuline exogène. Cette technique serait reproductible et permettrait de différencier des groupes de sujets ayant une sensibilité à l'insuline différente. Elle

permet de calculer le DI (*disposition index*) qui est une mesure de l'insulinosécrétion ajustée pour la sensibilité à l'insuline.

### **3.2.1.5 Test de suppression insulinique ou SSPG (steady state plasme glucose)**

Le principe de cette méthode repose sur la perfusion de glucose et d'insuline à débits fixes et prédéterminés dans le but d'éviter une hypo- ou une hyperglycémie susceptible d'enclencher une réponse hormonale. Elle dure 150 minutes. Le degré de résistance à l'insuline est obtenu en mesurant la proportionnelle avec le niveau de glycémie atteint à l'état d'équilibre ou SSPG.

### **3.2.1.6 Test de tolérance intraveineuse à l'insuline**

Ce test consiste en l'injection de 0.1 unité d'insuline par kg de poids corporel et permet le calcul d'un index de décroissance de la glycémie au cours des 15 à 30 premières minutes suivant l'injection. L'avantage de cette technique est sa simplicité contrebalancée néanmoins par un risque de survenue d'une hypoglycémie induisant une contre régulation hormonale. De même, ce test ne donne qu'une évaluation globale mais néanmoins bien corrélée avec celle du *clamp* euglycémique hyperinsulinique.

## **3.2.2 Index obtenus à l'aide de prélèvement à jeun (état basal)**

Il existe deux indices obtenus à partir d'une formule basée sur le produit ou l'addition de l'insulinémie et de la glycémie, validés et largement utilisés :

- **Le modèle HOMA/ HOMA-IR** (*homesostasis model assessment insulin resistance*)
- **Le QUICKI** (*quantitative insulin sensitivity check index*)

Ils sont basés sur une modélisation mathématique de la réponse quantitative des principaux organes impliqués dans l'homéostasie du glucose. (Tableau 2)

**Tableau 2. Principales équations et références des index évaluant la sensibilité à l'insuline à partir des insulinémies en (pmol/l ou U/ml) et des glycémies (mmol/l ou mg/dl) obtenues à jeun.**

<i>Index</i>	<i>Formule</i>
<b>HOMA-IR</b>	$\text{Ins}_0 / (22,5 e^{-\text{LnGly}_0})$ ou $(\text{Ins}_0 \times \text{Gly}_0) / 22,5$
<b>QUICKY</b>	$1 / [\text{Log}(\text{Ins}_0) + \text{Log}(\text{Gly}_0)]$
<b>QUICKY modifié</b>	$1 / [\text{Log}(\text{Ins}_0) + \text{Log}(\text{Gly}_0) + \text{Log}(\text{AGNE}_0)]$

Ins<sub>0</sub> : Insulinémie à jeun ; Gly<sub>0</sub> : Glycémie à jeun ; AGNE<sub>0</sub> : acides gras non estérifiés à jeun

Ils présentent de nombreux avantages :

- Bonne corrélation avec la sensibilité à l'insuline mesurée à l'aide du clamp euglycémique ou autres
- Reproductibilité satisfaisante : CV 10%. Le QUICKI est semble-t-il plus reproductible que le HOMA lorsque l'on dispose d'un seul prélèvement (27,28)
- Bonne fiabilité même en cas d'altération de la capacité de sécrétion de l'insuline comme dans le diabète de type 2 (27)
- Validés pour prédire le risque de développer un diabète de type 2 (29,30)
- Permet de différencier la sensibilité à l'insuline dans différents groupes de population et de suivre l'évolution de la sensibilité à l'insuline après une intervention de manière prospective (29,30)
- Simple et adapté aux études épidémiologiques (30)

Ils présentent cependant quelques inconvénients :

- Possibilité de biais si le prélèvement sanguin n'est pas réalisé chez un sujet en état stable (régime hypocalorique, activité physique intense, diabète très déséquilibré...) (31–33)
- Corrélation avec le *clamp euglycémique hyperinsulinémique* significativement supérieure dans les situations d'insulinorésistance importante chez les sujets normaux (28)
- Utilisation impossible chez le diabétique de type 1 ou de type 2 insulino-traités car l'insulinémie mesurée devient le reflet de l'intervention thérapeutique.

NB : une partie de ces limitations peuvent être surmontées si on ajoute la valeur des acides gras non estérifiés à jeun dans la formule du QUICKI (tableau 2)

En conclusion, l'obésité androïde, cliniquement bien appréciée par l'index de masse corporelle (IMC) et le tour de taille, est fortement associée à la présence d'une insulino-résistance et au risque de développer un diabète de type 2. Toutefois, de nos jours, il n'existe pas de formules simples qui permettent de prédire l'insulinorésistance et l'ajout des données basiques comme l'IMC, le tour de taille etc... aux formules utilisant les valeurs de glycémie et insulinémie n'apporte pas de sensibilité ou de spécificité supplémentaire (30)

### **3.2.3 Evaluation de l'insulino-sécrétion :**

#### **3.2.3.1 L'insulino-sécrétion**

L'insulino-sécrétion est un mécanisme physiologique complexe puisqu'il est caractérisé non pas par une, mais par trois oscillations (34):

- Rapide (pulsabilité de 10-15 minutes)
- Ultradiennes (périodicité de 90-120 minutes)
- Circadiennes (périodicité de 24 heures)

De même, il existe une réponse précoce et tardive de la sécrétion insulinique dont l'amplitude dépend non seulement du niveau de la glycémie mais aussi de la vitesse du changement de la concentration en glucose. Il existe aussi un rétrocontrôle physiologique entre insuline et glucose qui nécessite d'interpréter l'insulinémie en fonction de la glycémie ambiante. Aussi, lors de l'interprétation de la mesure d'insulinosécrétion, il faudra tenir compte du fait que l'insulinosécrétion va de pair avec l'insulinosensibilité. Cependant, l'hyperglycémie chronique du diabétique de type 2 désensibilise la cellule bêta des îlots pancréatiques et ampute voir annihile ce rétrocontrôle. (35)

Enfin, l'insulinosécrétion dépend de deux caractéristiques primordiales :

- la sensibilité de réponse de la cellule bêta à l'augmentation de la concentration de glucose
- la capacité de sécrétion maximale

Ces deux caractéristiques sont complémentaires mais n'évoluent pas de façon parallèle.

- Pourquoi l'évaluer ?

Dans le diabète de type 2 et contrairement au diabète de type 1, la réserve insulinaire endogène reste relativement importante au moment du diagnostic mais vouée à être déficitaire étant donné l'imprégnation glycémique chronique de la pathologie. Outre la recherche d'un processus tumoral comme l'insulinome pour lequel la sécrétion d'insuline n'est pas régulée, il est intéressant de mesurer l'insulinosécrétion pour les raisons suivantes :

- Phase initiale du diabète : une hyperinsulinémie peut être le reflet d'une insulino-résistance dans la phase précoce de la découverte du diabète
- Prédiction du risque d'évoluer vers un diabète de type 2 : par exemple, rechercher un déficit insulino-sécrétoire précoce chez l'intolérant au glucose
- Evaluer la décroissance progressive de la cellule bêta
- Evaluer certains types de diabète comme le MODY...
- Evaluer l'efficacité des thérapeutiques anti-diabétiques à la fois les traitements stimulateurs comme les agents insulino-sécrétagogues (analogue du GLP-1, glinides...) ou les traitements protecteurs de la fonction sécrétoire dont l'objectif est la correction de l'insulino-résistance (biguanides...)
- Décision de passage à l'insuline (36)

- Que doser : Insuline et/ou peptide C ?

L'insuline tout comme le peptide C sont sécrétés en quantité égale dans le sang et sont issus du clivage de la pro-insuline (figure 12)

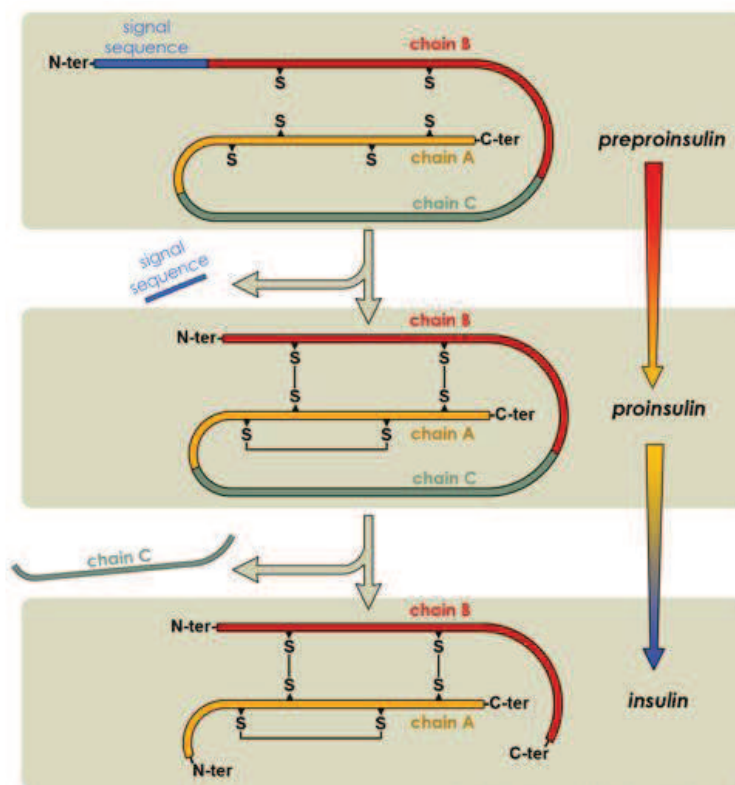


Figure 12. Synthèse de l'insuline

Même si les techniques de dosage actuelles de l'insuline se sont grandement améliorées permettant ainsi d'éviter les interférences de dosage telles que l'excès de pro-insuline chez les insulino-résistants (cf matériel et méthodes), le cycle biologique inhérent à l'insuline comme nous l'avons vu précédemment empêche l'évaluation de la fonction endocrine du pancréas sur un seul et unique prélèvement. Ainsi la concentration de l'insuline obtenue dépend de deux principaux facteurs : le premier facteur est la pulsativité de l'hormone dont la variabilité inter-individuelle est importante (nadir ou pic) (34), le second est le premier passage hépatique, présentant une grande variabilité inter- et intra-individuelle, qui sous-estime jusqu'à 50% la concentration réelle de l'hormone.(37)

Quant au peptide C, il présente l'avantage de ne pas subir de clairance hépatique, d'avoir une demi-vie plasmatique environ dix fois plus longue (30 *versus* 3 minutes). Sa clairance est essentiellement rénale avec une variabilité inter- et intra-individuelle très faible (à l'exception de l'insuffisant rénal)

Ainsi, à première vue il semble plus avantageux de doser le peptide C que l'insuline puisque cela permettrait de gommer les fluctuations fugaces liées à la sécrétion pulsatile de l'insuline.

Cependant, il a été démontré que la clairance du peptide C dépend de paramètres anthropométriques comme l'âge, le poids, la taille et le sexe.

- Comment la mesurer ?

En premier lieu, il faut déterminer si le dosage se fait à l'état basal ou à l'état stimulé. L'état basal est principalement utile pour rechercher une sécrétion autonome d'insuline comme retrouvée dans l'insulinome. Pour le reste on préférera un test à l'état stimulé plus à même de faire apparaître avec plus d'acuité un déficit insulino-sécrétoire et d'étudier en particulier le pic insulino-sécrétoire précoce. (38)

Dans un deuxième temps, on choisira à la fois le stimulus et la voie d'administration. Concernant le stimulus, plusieurs possibilités existent et déterminent avec la voie d'administration, une technique de dosage particulière.

Ainsi, soit le test est physiologique à l'image de la prise d'un Repas mixte par voie orale soit le stimulus est non physiologique comme le glucose et le glucagon et la voie d'administration soit orale soit parentérale.

L'avantage de l'utilisation du glucose comme stimulus dans une technique de dosage comme l'**HGPO** (HyperGlycémie provoquée Par voie Orale) est le respect partiel de la physiologie digestive du glucose modulée par les aléas de la vidange gastrique. *A contrario*, l'**HGPIV** shunte ce passage mais ne prend pas en compte l'effet dit incrétine correspondant à l'amplification de la réponse insulino-sécrétoire par certaines hormones digestives comme le GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*).

Aussi, l'utilisation d'un repas mixte composé de glucides, protéines et lipides, prendra plus en compte l'importante contribution de ces hormones sur la réponse insulino-sécrétoire que le glucose seul, et aboutira donc à des résultats plus fiables.(38). Cependant, son utilisation présente une reproductibilité limitée du fait d'une complexité de mise en place plus grande que pour l'HGPO, reproductibilité néanmoins minorée par l'intérêt discuté de l'HGPO de faire absorber une grande quantité de glucose à un diabétique.

Dans certains cas d'insulinorésistance avancée où la cellule bêta devient insensible au glucose mais continue de répondre à des stimuli non glucosés, on utilisera des stimuli comme le glucagon ou d'autres sécrétagogues.

**Le test au glucagon** est le seul test utilisant un stimulus non glucosé passé dans la pratique courante. Il permet d'évaluer la réserve insulinaire endogène chez les diabétiques de type 1 et 2. (39) Il présente un certain nombre d'avantages comme :

- Mode opératoire simple et réalisation brève : injection standardisée intraveineuse (IV) de **1 mg de glucagon** et mesure du peptide C 6 minutes après. (40)
- Excellente reproductibilité intra-sujet (41)
- Bonne corrélation entre les valeurs du peptide C obtenues avec le glucagon et le repas mixte (entre autres stimuli)

Il présente cependant quelques inconvénients limitant son utilisation de nos jours :

- Hétérogénéité inter-sujet avec impossibilité de classer un diabète sur la seule valeur du peptide C après glucagon (42)
- Test non physiologique avec effets digestifs indésirables (nausées, vomissements)
- Donne une réponse insulino-sécrétoire non glucose dépendante. Seule la présence ou non d'une insulinosécrétion est mesurée. (42)
- Ne permet pas de tester la sensibilité des cellules bêta et des cellules des tissus cibles au glucose
- N'implique pas les incrétines.

On citera comme autres sécrétagogues, l'arginine ou l'isopropylnoradrénaline administré par voie intra-veineuse tout comme le glucagon. Cependant, leur utilisation n'est compatible avec la pratique clinique courante.



## 4 TECHNIQUES BIOLOGIQUES DE DEPISTAGE DU DIABETE ET RECOMMANDATIONS

### 4.1 Dosage biologique de la glycémie :(43)

Premièrement, sur le plan pré-analytique, il est recommandé que la glycémie soit mesurée sur du sang veineux pour pouvoir poser le diagnostic du diabète. Il est aussi fortement recommandé que l'analyse effectuée soit exécutée dans un laboratoire d'analyses médicales accrédité.

Le sang doit être prélevé le matin chez un patient à jeun c'est-à-dire n'ayant rien ingéré à l'exception d'eau *a minima* pendant une période d'au minimum 8 heures. (44)

En effet des études ont démontré que la glycémie chez un patient à jeun était plus haute l'après midi que le matin et qu'un prélèvement effectué l'après-midi pouvait entraîner des erreurs de diagnostic.(45)

Il est aussi recommandé de séparer le plus tôt possible (de préférence dans les 30 minutes ou dans les 4 heures suivant le prélèvement) le plasma du culot cellulaire afin de limiter le processus de **glycolyse**. Celle-ci induit **une baisse de 5%-7%/h de la glycémie totale**. Elle peut être cependant stabilisée 4 heures après le prélèvement si le tube utilisé contient du fluorure de sodium et ce jusqu'à 72 heures. Cependant, l'utilisation d'un tube fluoré n'inhibe pas la glycolyse durant les 4 heures suivant le prélèvement. De même, une forte leucocytose retrouvée par exemple dans certaines hémopathies lymphoïdes, augmentera la glycolyse malgré l'ajout de fluorure.(46) L'ajout d'un tampon citraté, d'EDTA au tube fluoré inhiberait davantage la glycolyse à des valeurs allant de 0.3% à 2 heures à 1.2 % à 24 heures.

Le glucose peut être dosé dans le sang total, le plasma ou le sérum.

La molalité étant la même pour le glucose, la glycémie est environ 11% plus élevée dans le plasma que dans le sang total puisque le plasma contient 11% plus d'eau que le sang total, le tout pour un hémocrite normal. Différentes études s'opposent sur la différence de glycémie mesurée dans le sérum et dans le plasma mais il s'avère au final que la différence soit minime. . (47)

Dans le plasma hépariné, la glycémie mesurée est 5% plus basse que celle mesurée dans le sérum. (48)

Malgré cela, il est recommandé d'utiliser du plasma pour poser le diagnostic de diabète.

Secondairement, sur le plan analytique, le dosage du glucose est exclusivement effectué par des techniques enzymatiques. 99% d'entre elles utilisent une hexokinase ou une glucose oxydase. Le reste utilise une glucose deshydrogénase.

Ces méthodes sont bien standardisées. Elles présentent un coefficient de variation (CV) inter-laboratoires  $\leq 2.6\%$ .

A l'heure actuelle aucun consensus n'a été trouvé concernant les paramètres finaux du dosage glycémique. Cependant, un ensemble d'études suggèrerait que l'imprécision d'une méthode de dosage glycémique ne doit excéder la moitié du CV biologique intra-individuel. Soit pour du plasma, un CV  $\leq 2.2\%$  avec un biais à 0%. (49)

Troisièmement, bien que sur le plan analytique, l'imprécision soit faible, il faut tenir compte des imprécisions supplémentaires liées aux variations biologiques intraindividuelles de la glycémie à jeun. Un ensemble d'étude dont la plus importante basée sur un large échantillon NHANES III aboutissent aux résultats suivant avec un intervalle de confiance IC à 95 %:

Moyenne des variations des glycémies à jeun 5,7% (IC 95%, 5,3% -6,1%),

CV intra-individuel 8.3%,

CV inter-individuel 12.5 %

pour une glycémie autour de 5.1 mmol/L (0.92 g/L)

(50,51)

Si on ajoute les 3% du CV analytique, on obtient un CV de 12.88%.

Ainsi, on observe que la variation biologique est substantiellement plus élevée que la variation analytique. **Westgard** propose des spécifications souhaitables pour le dosage du glucose tenant compte des dériviatives biologiques et analytiques :

**Imprécision analytique  $\leq 2.9\%$ , biais  $\leq 2.2\%$  et erreur totale  $\leq 6.9\%$ .**

Il n'existe pas de recommandations particulières quant à une fréquence type pour le dosage du glucose et sa confirmation dans le but de poser le diagnostic de diabète. Cependant, il est recommandé pour les sujets sains à risque de développer la maladie, d'effectuer un examen biologique tous les 3 ans.

## 4.2 Dosage biologique de l'insulinémie

Les premières techniques de dosage biologique de l'insuline étaient de type RIA (RadioImmunoAssay) et utilisaient des anticorps polyclonaux. Cependant, ces méthodes compétitives mises au point par Yalow et Berson en 1959 (prix Nobel 1977) étaient peu reproductibles et présentaient des effets crochets induits par les pro-insulines, les insulines bovines et les anticorps anti-insuline.

L'introduction d'anticorps monoclonaux spécifiques a permis une nette amélioration des techniques au niveau de la reproductibilité et de la précision des dosages.

Une étude utilisant 10 méthodes de dosage de routine proposées par l'ensemble des industriels du marché dont celle utilisée dans notre étude (ECLIA®/Roche) ainsi que la méthode de dosage de référence par spectrométrie de masse couplé à la chromatographie liquide, a tenté d'évaluer une standardisation des immuno-dosages d'insulines. Cette étude a ainsi comparée les méthodes standards à la méthode de référence en utilisant des concentrés purs d'insuline, des sérums poolés et des échantillons sériques individuels.

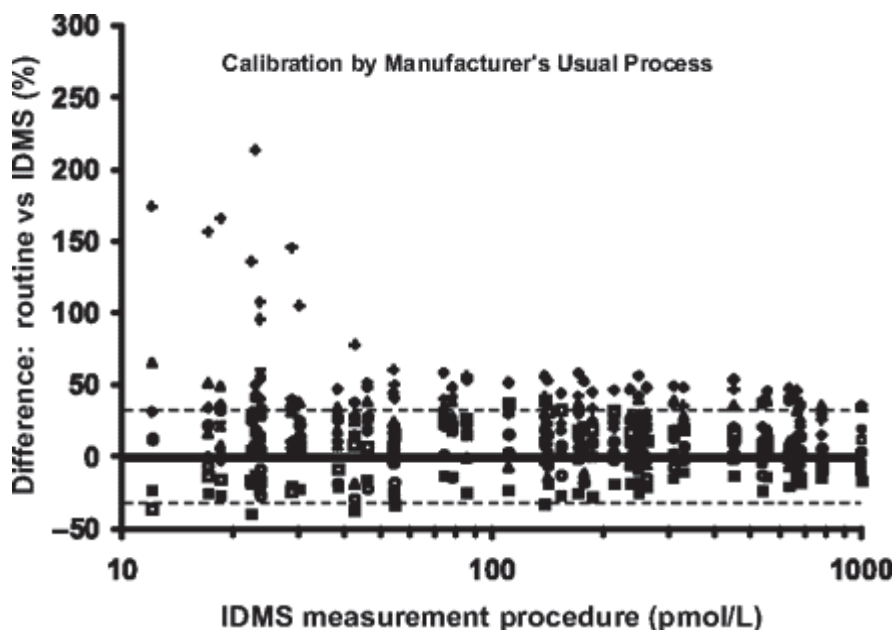
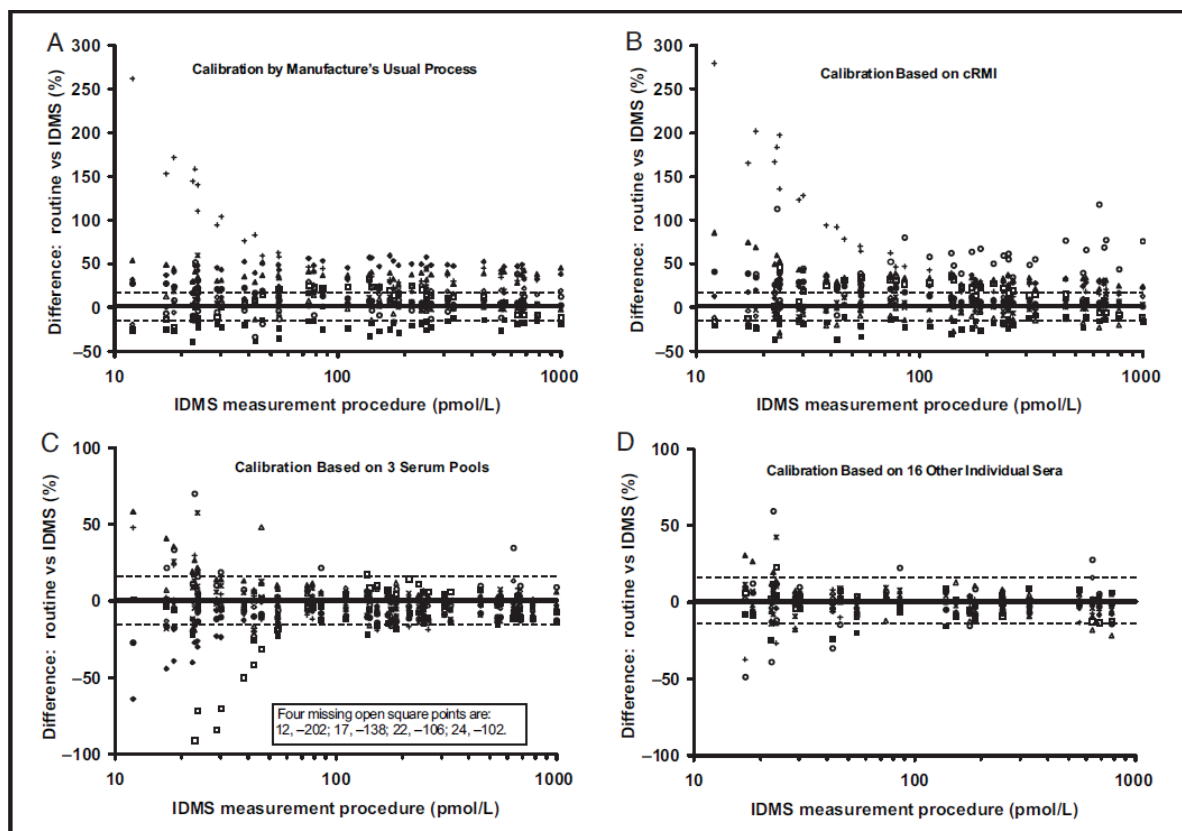


Figure 13. Différence de dosage entre une mesure simple pour chaque sérum individuel et la mesure par la méthode de référence (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse) comparé au dosage par la méthode de référence sur ce même échantillon selon Miller et al.(52).

Les lignes représentent les bornes supérieures et inférieures de l'erreur totale de 32% basée sur des critères de variabilité biologique. •, Abbott; ▲, Alpco; ■, Beckman-Coulter; □, Invitron; \*, Merckodia; +, Millipore RIA; ♦, Roche; ▲, Siemens Advia Centaur; ○, Siemens Immulite; ◆, Tosoh.



**Figure 14.** Différence entre la moyenne de tous les résultats pour chaque échantillon individuel de sérum et les résultats de la méthode de référence pour ces mêmes échantillons comparée aux résultats de dosage par la méthode de référence pour ces échantillons selon Miller et *al.*(52) Les lignes représentent les bornes supérieures et inférieures du biais de 15.5% estimé et basé sur des critères de variabilité biologique.

L'erreur totale acceptable pour une seule mesure était de  $\pm 32\%$  et le biais acceptable était de  $\pm 15.5\%$  comparé à la méthode de référence (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse). Le critère de variabilité biologique a été rendu grâce à la mesure du biais et de l'imprécision et à l'absence d'interférences spécifiques aux échantillons. Par ailleurs, aucun effet-crochet potentiellement mis en évidence sur l'ensemble des techniques en particulier vis-à-vis des pro-insulines, n'a perturbé le rendu des résultats de cette étude.

L'ensemble de la comparaison des différentes méthodes de dosage de routine a démontré que 4 d'entre elles dont la technique que nous avons utilisée pour notre étude (ECLIA/Roche)

avait 95% de ses valeurs comprises dans l'intervalle d'erreur totale acceptable vis-à-vis de la méthode de référence, pour une seule mesure. Concernant le biais, seule une méthode sur 10 avait ses valeurs comprises à l'intérieur de l'intervalle accepté. Chaque technique de dosage utilisait les calibrants fournis par les industriels.

En conclusion, l'ensemble des techniques de routine de dosage de l'insuline ne sont pas standardisées. Les mesurés qu'elles fournissent sont fiables si on les rapporte aux calibrations du fournisseur mais la majorité d'entre elles présentent une erreur totale trop importante vis-à-vis de la méthode de référence. Des améliorations impliquant entre autres les fabricants sont possibles comme par exemple, la mise à disposition d'un panel de sérum mono-donneurs couvrant l'ensemble des valeurs attendues (10-1000 pmol/L).(52)

### ***4.3 Dosage biologique du peptide C***

Une étude a été menée sur 16 échantillons de plasma hépariné dans 15 laboratoires différents localisés dans 7 pays, pour lesquels a été dosé le peptide C. L'ensemble de ces laboratoires utilisaient la plupart des techniques analytiques actuellement disponibles sur le marché dont celle utilisée dans notre étude. L'objectif de cette étude était la comparaison de ces différentes techniques de dosage. Une normalisation des résultats par l'intermédiaire de l'utilisation des réactifs de référence fournis par l'OMS était permise. Cependant, il s'est avéré que l'intervalle de confiance à 95 % pour l'écart type des méthodes utilisées par les laboratoires (0.0-0.061) ne correspondait pas avec l'intervalle de confiance des données brutes attendues (0.090-0.225). Ainsi cette étude conclut qu'à l'heure actuelle, une standardisation du dosage du peptide C n'est pas encore possible puisque la comparaison des différentes méthodes analytiques n'a pas été permise, spécialement pour des concentrations élevées en peptide C. Celle-ci induit en effet une augmentation de la variabilité inter-laboratoire des méthodes.(53)

Une autre étude a toutefois tenté une standardisation des méthodes de dosage du peptide C. Elle a permis la mise en relation de 40 échantillons de sérum humain avec 15 laboratoires. Un total de 9 techniques de dosage a été utilisé ici aussi dont l'ECLIA et la méthode de référence par spectrométrie de masse (LC-MS) (figure 15). Chaque méthode était comparée à la méthode de référence afin de normaliser les résultats.

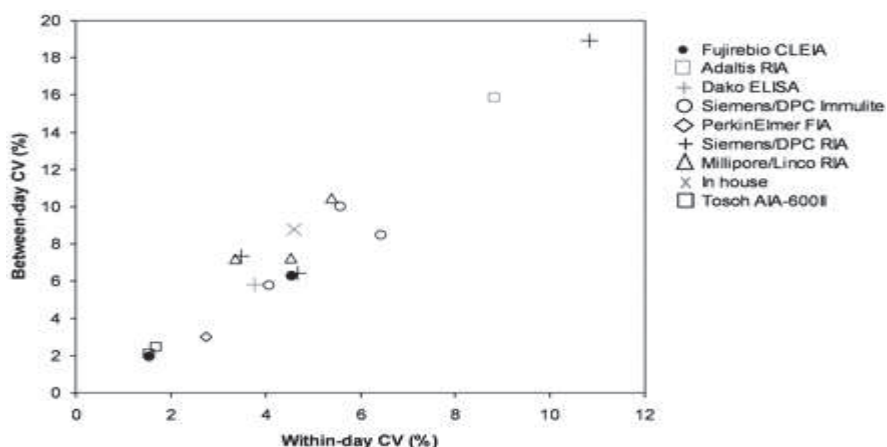


Figure 15. Représentation des CV intra- et inter-journaliers pour chaque combinaison laboratoire/méthode de dosage utilisée selon Wiedmeyer et *al* (53). (Chaque symbole représente une méthode différente de dosage du peptide C. CLEIA, immuno-enzymo dosage par chemiluminescence ; FIA, fluoro-immunodosage)

Les méthodes montrant les CV les plus bas (<4%) incluait le dosage immuno-enzymatique par chimioluminescence Fujirebio Lumipulse, le dosage fluoro-immunologique PerkinElmer et le dosage immunologique Tosoh AIA-600II.

Les plus haut CV montrant les plus hautes imprécisions incluait l'Adalitis RIA et une technique de RIA DPC avec des CVs égaux à 15 % environ.

Les autres méthodes dont l'ECLIA montraient des CVs entre 11 et 15 %.

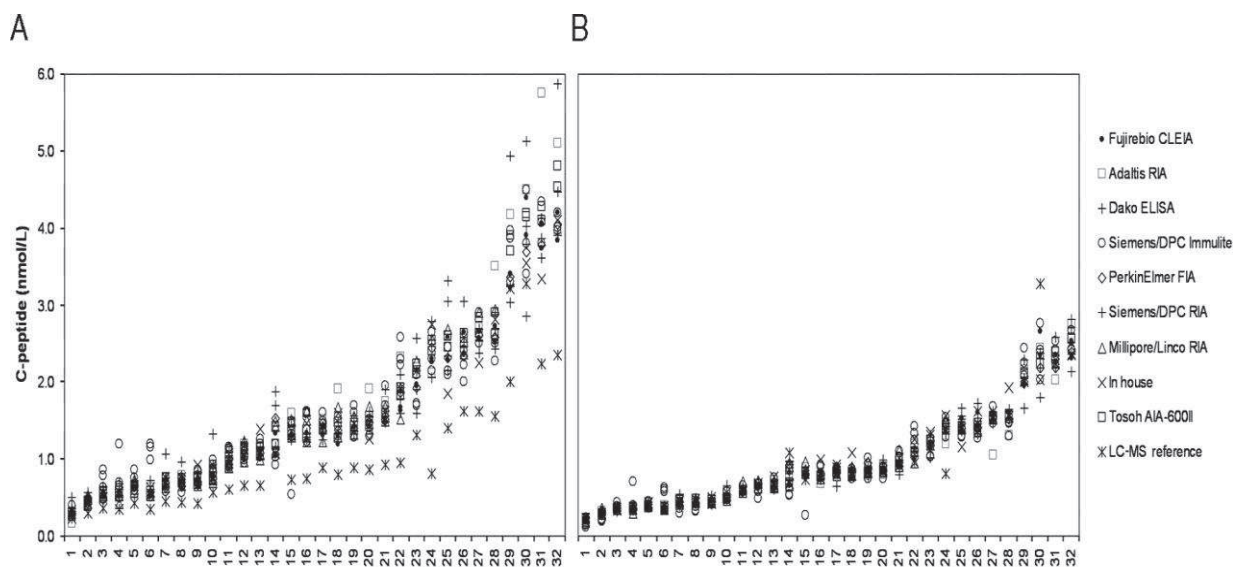


Figure 16. Comparaison des résultats de dosage du peptide C en fonction des méthodes utilisées. Les résultats A correspondent à l'expression des moyennes des méthodes utilisées en routine et les résultats B sont donnés après normalisation par des sérums calibrés selon Wiedmeyer et *al*. (53)

Autres différences observées, celles au niveau des moyennes pour chaque laboratoire. La grande majorité des méthodes utilisées montrent des résultats supérieurs à ceux de la méthode de référence voir très supérieurs sans qu'il y ait pour autant des concentrations pro-insuliniques élevées associées.

Après normalisation, la différence entre les moyennes était moins significative.

En conclusion, il s'avère qu'il existe une grande hétérogénéité entre les différentes méthodes et la méthode de référence. Cette différence est particulièrement visible dans l'expression des résultats en intra- et inter-journaliers. Cependant, l'utilisation de plasma ou de sérums ne présente aucun impact sur les précisions des méthodes. (54)

## **5 OBJECTIFS**

L'arsenal thérapeutique dans le diabète de type 2 s'est considérablement élargi et il apparaît de plus en plus indispensable de mieux phénotyper les patients afin d'optimiser et de personnaliser la prise en charge thérapeutique. C'est la raison pour laquelle nous avons mené cette étude dont l'objectif principal résidait dans la mise en place d'un test simple d'évaluation de l'insulinosécrétion.

# **MATERIELS ET METHODES**



# 1 Techniques biologiques de dosage utilisées

## 1.1 Dosage du glucose sur système Roche/hitachi cobas c®

### 1.1.1 Principe

Matériel :

Nous avons dosé les glycémies sur le module c 701 du Cobas du service de Biochimie situé à l'institut de Biologie Clinique au sein du centre hospitalo-universitaire Charles Nicolle de Rouen.

Méthode :

Le test utilisé est un test UV basé sur la méthode de référence enzymatique à l'hexokinase.

La première étape consiste à la **phosphorylation** du glucose en glucose 6 phosphate médiée par l'**hexokinase** avec l'ATP comme substrat.

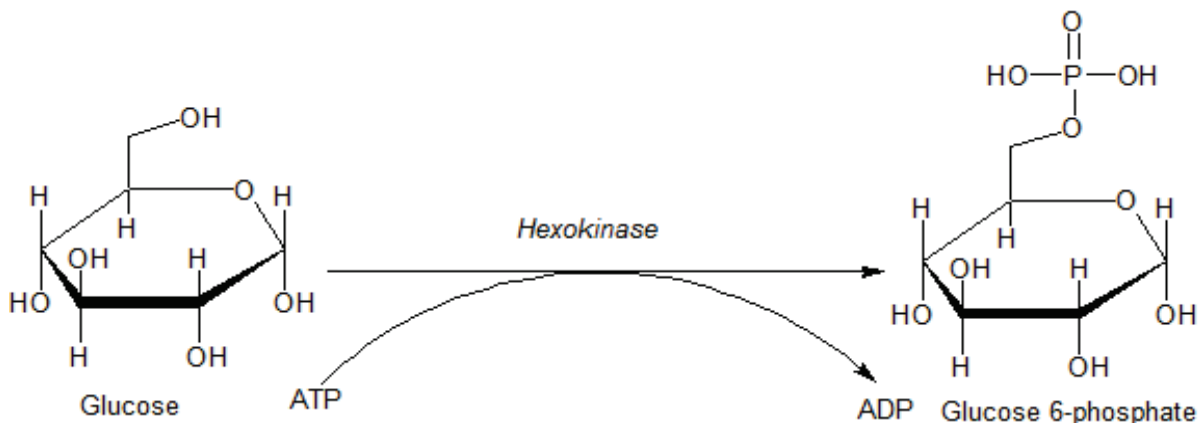


Figure 17. Voie de synthèse du Glucose 6-phosphate par l'Hexokinase

La seconde étape consiste en l'**oxydation** du G6P en 6-phosphogluconolactone médiée par la **glucose-6-phosphate deshydrogénase** en présence de NADP<sup>+</sup>.

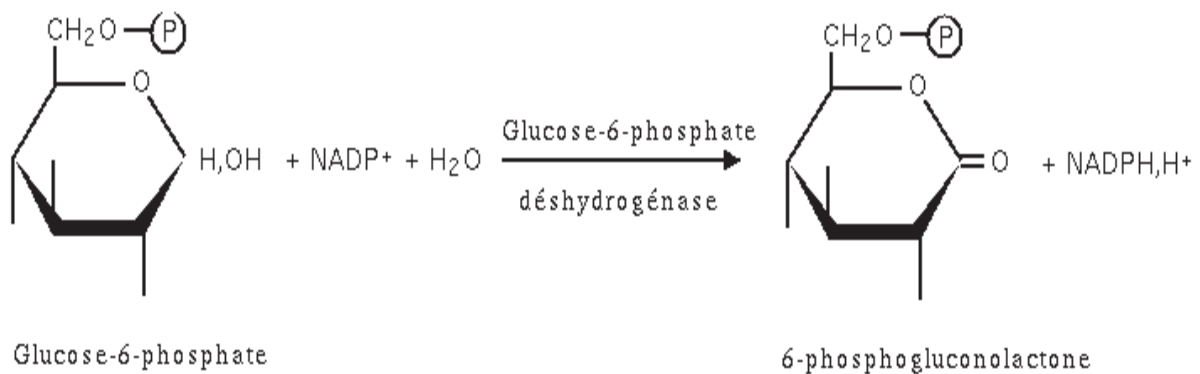


Figure 18. Synthèse du 6-phosphogluconolactone par la Glucose-6-phosphate déshydrogénase

La dernière étape consiste à la mesure du glucose sérique/plasmatique par **photométrie**.

Cette étape consiste à mesurer l'absorbance en envoyant une lumière calibrée à 340 nm au produit obtenu contenant le couple NADP<sup>+</sup>/NADPH dont le NADPH absorbe spécifiquement à la longueur d'onde 340 nm (idem pour NAD<sup>+</sup>/NADH). La concentration en glucose est proportionnelle à la concentration de NADPH produit et donc à l'absorbance du milieu.

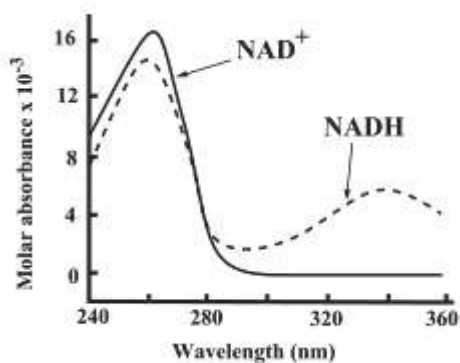


Figure 19. Domaine d'absorption spectrophotométrique du NAD<sup>+</sup> et du NADH

### 1.1.2 Domaine d'utilisation et échantillons

Matériels :

Echantillons utilisables : **sérum, plasma, urine et LCR humains**

Tubes de prélèvement in vitro utilisés : 1<sup>ere</sup> intention : tube bouchon **gris**/ tubes au fluorure.  
2<sup>ème</sup> intention : tube héparinate de lithium

Méthodes :

Les tubes au fluorure sont préférés aux autres puisqu'ils permettent l'inhibition de la glycolyse. Si recueil du sang veineux dans tube sans fluorures, il est nécessaire de centrifuger et séparer le plasma/sérum du caillot/culot cellulaire dans la demi-heure suivant le prélèvement. Un sang non centrifugé conservé à température ambiante voit sa glycémie diminuer en moyenne de 7% par heure (0.28 à 0.56 mmol/L)

Conservation :

Stabilité (sans hémolyse) : 8 heures entre 15 et 25 °C,  
72 heures entre 2 et 8 °C

Stabilité dans le plasma sur fluorure : 3 jours entre 15 et 25 °C

### 1.1.3 Limites de mesure – Interférences

**Limites de mesure :**

Sérum et plasma : 0.11-41.6 mmol/L

**Interférences :**

Ictère : Pas d'interférences significatives

Hémolyse : Pas d'interférences significatives

Lipémie : Pas d'interférences significatives

Médicaments : Pas d'interférences significatives aux concentrations thérapeutiques dans un panel de médicaments fréquemment administrés.

Autres : Rares cas de gammopathie (à IgM surtout) pouvant conduire à des résultats erronés

### 1.1.4 Performances analytiques – Valeurs de références

Valeurs de références : à jeun 4.11-6.05 mmol/L

Performances analytiques :

<i>Répétabilité</i>	<i>Moyenne mmol/L (mg/dL)</i>	<i>SD mmol/L (mg/dL)</i>	<i>CV %</i>
Precinorm U	5.17 (93.2)	0.04 (0.7)	0.8
Precipath U	13.4 (241)	0.1 (2)	0.7
Sérum humain A	3.27 (59.0)	0.02 (0.4)	0.5
Sérum humain B	19.1 (344)	0.1 (2)	0.7
Sérum humain C	36.1 (651)	0.3 (5)	0.7

## 1.2 Dosage de l'insuline sur système Roche/hitachi cobas e® et module d'immunoanalyse Elecsys®

### 1.2.1 Principe

Matériel :

Nous avons dosé l'insuline sur le module Elecsys d'un Cobas 6000® présent au sein du laboratoire polyvalent du centre hospitalier Henri Becquerel à Rouen.

Méthode :

Le test utilisé est un test immunologique par électrochimiluminescence « ECLIA »®. La méthode utilisée est dite « sandwich » utilisant deux anticorps monoclonaux dont l'interaction est spécifique de l'insuline humaine. Durée totale du cycle analytique : 18 minutes.

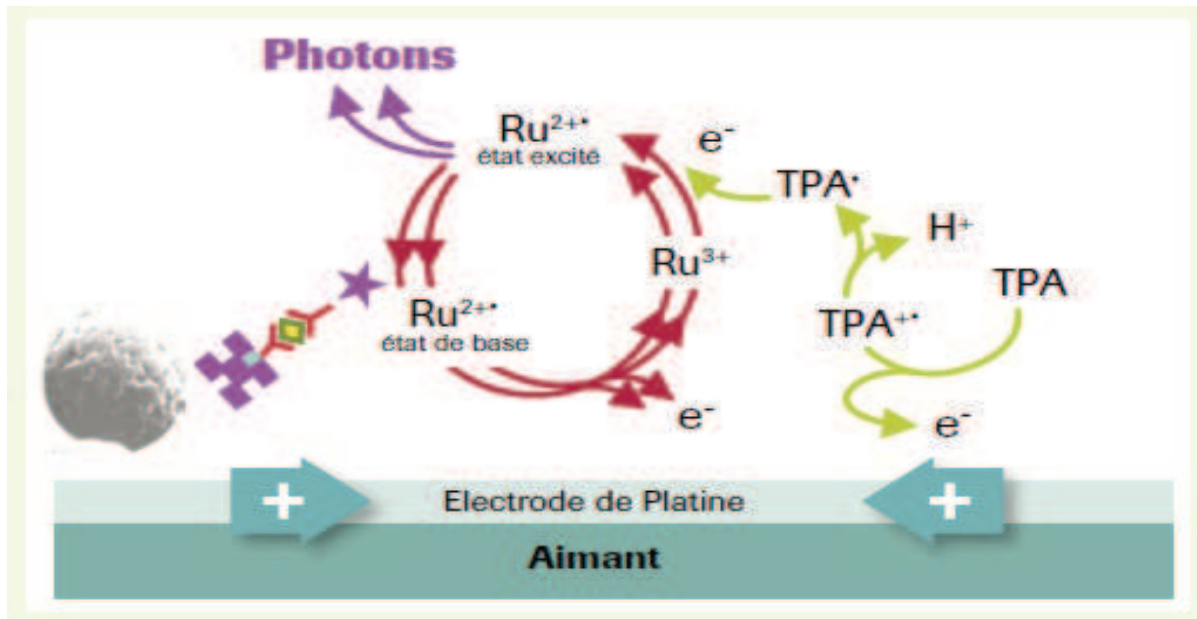


Figure 20. Principe de l'électrochimiluminescence « ECLIA »

- 1<sup>ère</sup> incubation : on met en présence d'un anticorps monoclonal anti-insuline spécifique biotinylé et un anticorps monoclonal anti-insuline spécifique marqué au ruthénium (Ru<sup>2+</sup>), l'échantillon correspondant au sérum/plasma du patient. Il se forme un « sandwich ».
- 2<sup>ème</sup> incubation : on ajoute dans la cuvette réactionnelle des microparticules tapissées de streptavidine. Le complexe immunitaire précédemment formé se fixe à la phase solide par une liaison streptavidine-biotine
- On transfère le mélange réactionnel dans la cellule de mesure et les microparticules chargées sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. Lavage avec élimination de la fraction libre par passage de ProCell ou ProCell M.
- On applique une différence de potentiel au niveau de l'électrode qui réduit le Ru<sup>3+</sup> en Ru<sup>2+</sup> sous forme excitée. Ce dernier va retrouver son état de base naturel en émettant des photons produisant ainsi une luminescence mesurée par un photomultiplicateur.
- Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Celle-ci est générée, pour l'analyseur utilisé, par une calibration en 2 points et une courbe de référence mémorisée dans le code-barres du réactif.

## 1.2.2 Domaine d'utilisation et échantillons

Echantillons utilisables : **sérum, plasma**

Tubes de prélèvement in vitro utilisés : 1<sup>ere</sup> intention : tube bouchon **marron**, sec avec activateur de la coagulation

2<sup>ème</sup> intention : tube bouchon violet, EDTA tripotassique

Conservation :

Stabilité (sans hémolyse) : 24 heures entre 2 et 8 °C  
6 mois à -20 °C

**L'hémolyse** est gênante puisqu'elle induit la catalyse de l'insuline par les peptidases libérées des érythrocytes.

Les échantillons prélevés sur tube sec avec précipités doivent être centrifugés et envoyés dans les **2 heures** au laboratoire exécutant.

Les échantillons peuvent être congelés une fois

## 1.2.3 Limites de mesure – Interférences

Limites de mesure :

Sérum et plasma : 0.2-1000 µU/ml ou 1.39-6945 pmol/L.

Pas de dilution nécessaire en cas de dépassement de la valeur supérieure limite de mesure.

Interférences :

Ictère : Pas d'interférences significatives

Hémolyse : Interférences importantes

Lipémie : Pas d'interférences significatives

Biotine : Pas d'interférences significatives jusqu'à biotine <246 nmol/L ou <60 ng/ml. Si le patient est traité par de fortes doses de biotine (> 5mg/jour), il est recommandé d'effectuer le prélèvement de l'échantillon au moins 8 heures après la dernière administration.

Médicaments : Pas d'interférences significatives aux concentrations thérapeutiques dans un panel de 20 médicaments fréquemment administrés.

Insuline exogène: aucune effet crochet avec des concentrations d'insuline biosynthétisée jusqu'à 138900 pmol/L.

Anticorps anti-insuline : Interférences possibles

Autres : des anticorps anti-streptavidine ou anti-ruthénium peuvent dans de rares cas provoquer des interférences dans le dosage.

#### 1.2.4 Performances analytiques – Valeurs de références

Valeurs de références : 2.6-24.9  $\mu\text{U/ml}$  (17.8-173 pmol/L)

Performances analytiques :

Analyseurs Elecsys 2010 et cobas e 411					
			Répétabilité		
Echantillon	Moyenne		SD		CV
	$\mu\text{U/mL}$	pmol/L	$\mu\text{U/mL}$	pmol/L	%
Sérum humain 1	6.36	44.2	0.122	0.847	1.9
Sérum humain 2	20.9	145	0.391	2.71	1.9
Sérum humain 3	747	5188	15.1	105	2.0

Analyseurs Elecsys 2010 et cobas e 411					
			Précision intermédiaire		
Echantillon	Moyenne		SD		CV
	$\mu\text{U/mL}$	pmol/L	$\mu\text{U/mL}$	pmol/L	%
Sérum humain 1	6.36	44.2	0.163	1.11	2.6
Sérum humain 2	20.9	145	0.593	4.10	2.8
Sérum humain 3	747	5188	18.6	129	2.5

Analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, <b>cobas e</b> 601 et <b>cobas e</b> 602					
<b>Répétabilité</b>					
Echantillon	Moyenne		SD		CV
	μU/mL	pmol/L	μU/mL	pmol/L	%
Sérum humain 1	5.93	41.2	0.09	0.62	1.5
Sérum humain 2	14.5	101	0.13	0.92	0.9
Sérum humain 3	49.9	346	0.58	4.05	1.2
Sérum humain 4	399	2768	3.32	23.1	0.8

Analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, <b>cobas e</b> 601 et <b>cobas e</b> 602					
<b>Précision intermédiaire</b>					
Echantillon	Moyenne		SD		CV
	μU/mL	pmol/L	μU/mL	pmol/L	%
Sérum humain 1	6.85	47.6	0.336	2.33	4.9
Sérum humain 2	16.7	116	0.616	4.28	3.7
Sérum humain 3	55.1	383	1.86	12.9	3.4
Sérum humain 4	425	2949	10.0	69.6	2.4

Spécificité analytique : les anticorps monoclonaux utilisés présentent les réactions croisées suivantes :

	Concentration testée	Réactivité croisée %
Insuline bovine	17360 pmol/L	25.0
Insuline porcine	8334 pmol/L	19.2
Proinsuline humaine	1000 ng/mL	0.05
Peptide C	100 ng/mL	n.d. <sup>d)</sup>
Glucagon	1000 pg/mL	n.d.
Somatostatine	100 pg/mL	n.d.
Insulin-like growth factor I	6579 pmol/L	0.04

d) n.d. = non détectable



### ***1.3 Dosage du peptide C sur système Roche/hitachi cobas e® et module d'immunoanalyse Elecsys®***

#### **1.3.1 Principe**

Matériel :

Nous avons dosé l'insuline sur le module Elecsys d'un Cobas 6000® présent au sein du laboratoire polyvalent du centre hospitalier Henri Becquerel à Rouen.

Méthode :

Elle est identique à la méthode de dosage de l'insuline

#### **1.3.2 Domaine d'utilisation et échantillons**

Echantillons utilisables : **sérum, plasma, urine**

Tubes de prélèvement in vitro utilisés : 1ere intention : tube bouchon marron, sec avec activateur de la coagulation

2<sup>ème</sup> intention : tube bouchon violet, EDTA tripotassique

Conservation :

Stabilité (sans hémolyse) : 4 heures entre 15 et 25 °C  
24 heures entre 2 et 8 °C  
30 jours à -20 °C

Les échantillons prélevés sur tube sec avec précipités doivent être centrifugés et envoyés dans les **2 heures** au laboratoire exécutant.

Les échantillons peuvent être congelés une fois.

### **1.3.3 Limites de mesure – Interférences**

Limites de mesure :

Sérum et plasma : 0.003-13.3 nmol/L ou 0.010-40.0 ng/ml. (Dans le cas où la concentration >13.3 nmol/L, une dilution au 1/10 est possible)

Interférences :

Ictère : Pas d'interférences significatives

Hémolyse : Pas d'interférences significatives

Lipémie : Pas d'interférences significatives

Biotine : Pas d'interférences significatives jusqu'à biotine <246 nmol/L ou <60 ng/ml. Si le patient est traité par de fortes doses de biotine (> 5mg/jour), il est recommandé d'effectuer le prélèvement de l'échantillon au moins 8 heures après la dernière administration.

Médicaments : Pas d'interférences significatives aux concentrations thérapeutiques dans un panel de 20 médicaments fréquemment administrés.

Pas d'effet crochet jusqu'à des concentrations en peptide C de 60 nmol/L (180ng/mL)

Autres : des anticorps anti-streptavidine ou anti-ruthénium peuvent dans de rares cas provoquer des interférences dans le dosage.

### **1.3.4 Performances analytiques – Valeurs de références**

Valeurs de références : 1.1-4.4 ng/mL ou 0.7-1.47 nmol/L

Performances analytiques :

Analyseurs Elecsys 2010 et <b>cobas e 411</b>					
			<b>Répétabilité</b>		
Echantillon de sérum	Moyenne		SD		CV
	nmol/L	ng/mL	nmol/L	ng/mL	%
Calibrateur de référence 3	0.302	0.907	0.005	0.015	1.6
Sérum humain 2	0.606	1.82	0.028	0.084	4.6
Sérum humain 3	1.90	5.69	0.034	0.103	1.8
Sérum humain 4	5.57	16.7	0.212	0.637	3.8
Sérum humain 5	8.05	24.1	0.105	0.315	1.3

Analyseurs Elecsys 2010 et <b>cobas e 411</b>					
			<b>Précision intermédiaire</b>		
Echantillon de sérum	Moyenne		SD		CV
	nmol/L	ng/mL	nmol/L	ng/mL	%
Calibrateur de référence 3	0.302	0.907	0.007	0.021	2.4
Sérum humain 2	0.606	1.82	0.030	0.090	5.0

Analyseurs Elecsys 2010 et <b>cobas e 411</b>					
			<b>Précision intermédiaire</b>		
Echantillon de sérum	Moyenne		SD		CV
	nmol/L	ng/mL	nmol/L	ng/mL	%
Sérum humain 3	1.90	5.69	0.042	0.126	2.2
Sérum humain 4	5.57	16.7	0.209	0.627	3.8
Sérum humain 5	8.05	24.1	0.141	0.424	1.8

Analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, <b>cobas e 601</b> et <b>cobas e 602</b>					
			<b>Répétabilité</b>		
Echantillon de sérum	Moyenne		SD		CV
	nmol/L	ng/mL	nmol/L	ng/mL	%
Calibrateur de référence 3	0.33	0.98	0.002	0.005	0.6
Sérum humain 2	0.643	1.93	0.003	0.009	0.5
Sérum humain 3	2.00	6.01	0.019	0.056	0.9
Sérum humain 4	5.99	18.0	0.054	0.163	0.9
Sérum humain 5	8.59	25.8	0.126	0.378	1.5

Analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, <b>cobas e 601</b> et <b>cobas e 602</b>					
Précision intermédiaire					
Echantillon de sérum	Moyenne		SD		CV
	nmol/L	ng/mL	nmol/L	ng/mL	%
Calibrateur de référence 3	0.307	0.922	0.006	0.017	1.9
Sérum humain 2	0.615	1.84	0.010	0.030	1.6
Sérum humain 3	1.92	5.75	0.044	0.132	2.3

Spécificité analytique : les anticorps utilisés ont montré les réactions croisées suivantes :

Substance	Concentration testée (µg/mL)	Réactivité croisée %
Proinsuline, humaine <sup>c)</sup>	0.10	32.5
Insuline, humaine <sup>d)</sup>	8.66	0.005
Insuline de porc <sup>e)</sup>	7.50	n.d. <sup>f)</sup>
Insuline bovine <sup>g)</sup>	7.69	n.d.
Somatomédine (IGF-I = Insulin-like growth factor 1)	1.0	n.d.
Hormone de croissance humaine (hGH)	10.0	n.d.
Glucagon	10.0	n.d.

c) préparation OMS 84/611

d) préparation OMS 66/304

e) préparation OMS 86/690

f) n.d. = non détectable

g) préparation OMS 83/511

## 2 Protocole de prélèvement

### 2.1 Type d'étude :

Il s'agit d'une étude prospective, monocentrique, qui s'est déroulée dans le service d'Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques du Centre Hospitalo-Universitaire de Rouen, entre novembre 2013 et avril 2014.

### 2.2 Objectif de l'étude :

L'objectif de ce travail est l'étude de l'insulinosécrétion au décours d'un repas standardisé, chez un groupe de patients diabétiques de type 2 naïfs d'insuline, versus un groupe de patients normoglycémiques.

#### Patients :

Deux groupes de patients ont été constitués parmi des patients hospitalisés en hôpital de semaine, de jour ou en secteur d'hospitalisation conventionnelle du service d'Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques du Centre Hospitalo-Universitaire de Rouen.

#### Groupe de patients diabétiques :

Il s'agit de patients âgés de 40 à 75 ans, diabétiques de type 2, traités par mesures hygiéno-diététiques seules, antidiabétiques oraux ou analogues du GLP-1 injectables, hospitalisés pour l'un des deux motifs suivants : bilan annuel du diabète ou diabète mal contrôlé. La définition du diabète retenue est celle de l'Organisation Mondiale de la Santé de 1999 (55).

Les critères d'exclusion ont été définis comme suit : présence d'un diabète de type 1, ou secondaire, insulinothérapie en cours, hospitalisation pour acido-cétose ou coma hyperosmolaire.

#### Groupe de patients normoglycémiques :

Le groupe témoin est constitué de patients âgés de 40 à 75 ans, avec un indice de masse corporelle inférieur à 40kg/m<sup>2</sup>, hospitalisés en hôpital de semaine pour l'exploration d'une pathologie endocrinienne, sans dysglycémie connue. La découverte d'un diabète ou d'une intolérance au glucose pendant l'hospitalisation ou un indice de masse corporelle supérieur à 40 kg/m<sup>2</sup> a entraîné la sortie de l'étude.

### **2.2.1 Données recueillies :**

Une première étape a consisté en la signature d'un formulaire de non-opposition au recueil des données cliniques et biologiques nécessaires à l'étude, après information du patient.

Pour l'ensemble des patients, étaient recueillis à l'inclusion par l'interne : les antécédents personnels et familiaux, les traitements en cours (en particulier hypoglycémifiants, anti-hypertenseurs et hypocholestérolémiants), l'âge, le poids (en kg), la taille (en m), l'indice de masse corporelle (en kg/m<sup>2</sup>), le périmètre abdominal (en cm).

De plus, pour les patients diabétiques, la durée d'évolution du diabète et la présence ou non de complications chroniques étaient précisées par l'interrogatoire et l'examen physique. Un prélèvement urinaire a été effectué pour mesure du rapport microalbuminurie (ou protéinurie le cas échéant) sur créatininurie (en mg/mmol).

Avant la sortie d'hospitalisation étaient relevées les éventuelles modifications thérapeutiques réalisées chez les patients diabétiques.

### **2.2.2 Repas standardisé ou repas « test » :**

Le « repas test » s'est déroulé en quatre étapes successives, définies ci-dessous :

1. A 8h (après 6h de jeûne au minimum), réalisation d'un prélèvement sanguin veineux pour dosages plasmatiques de glycémie à jeun (mmol/L), cholestérol total (g/L), LDL cholestérol (g/L), HDL cholestérol (g/L), triglycéridémie (g/L), créatininémie ( $\mu\text{mol/L}$ ) avec calcul de la clairance selon MDRD (mL/mn), hémoglobine glyquée (%), insulïnémie (pmol/L), peptide C (nmol/L).
2. Petit déjeuner standardisé, composé de 250 mL de thé ou de café sans sucre (ou édulcoré à l'aspartam), de 4 biscottes, et d'une portion individuelle de beurre (poids : 10g). La quantité estimée de glucides dans ce petit déjeuner est de 21.7 g, pour un apport calorique de 186.2 kcal. (annexe 5)

3. A 9h (ou 1h après le premier prélèvement veineux) : prélèvement sanguin veineux pour dosages plasmatiques de glycémie, insulïnémie, peptide C.
4. A 10h (ou 2 h après le premier prélèvement veineux) : prélèvement sanguin veineux pour dosages plasmatiques de glycémie, insulïnémie, peptide C.

Un document était laissé à la disposition des différents intervenants de cette étude (médecins, I.D.E., aides-soignantes) pour rappeler les modalités pratiques de prélèvement de glycémie, insulïnémie, C-peptide (cf annexe 4). De plus, les I.D.E. étaient chargés de remplir une fiche de traçabilité, présentée en annexe 2 ou 3.

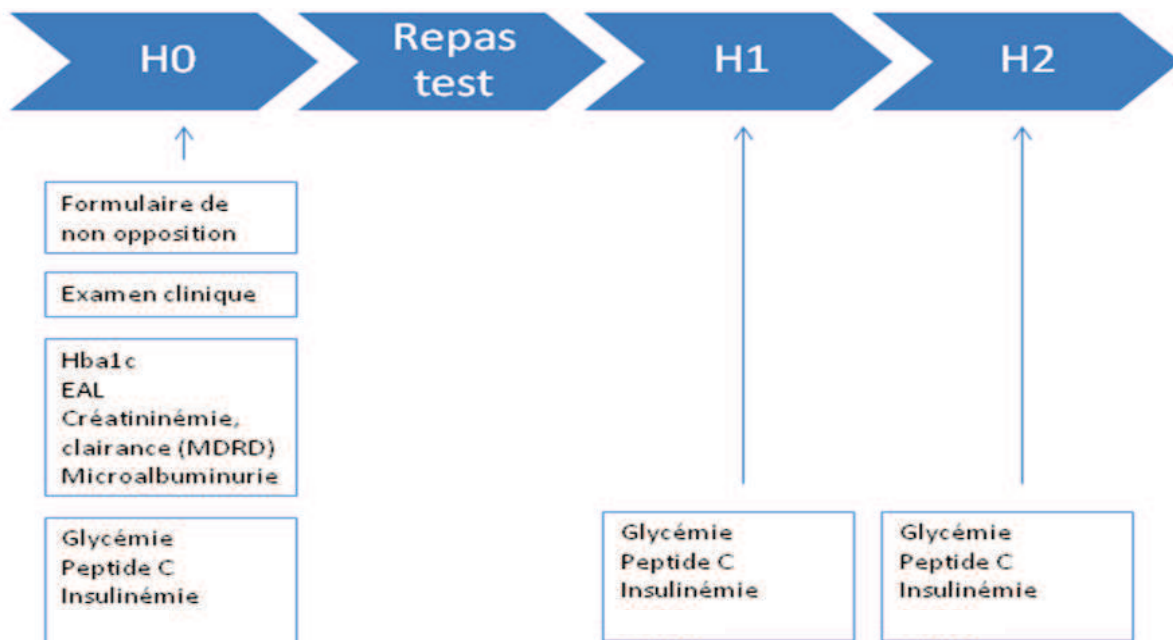


Figure 21. Schématisation des examens biologiques et cliniques effectués en fonction du déroulement du protocole

### 2.2.3 Analyse statistique :

Les valeurs citées ont été exprimées en moyenne avec leur erreur standard (SEM) respective.

Les comparaisons de glycémie, insulïnémie, C-peptide aux trois temps de prélèvement ont été effectuées avec une analyse de variance ANOVA à un facteur (avec répétition d'expérience) suivie d'un test de Bonferoni en cas de significativité.

Le seuil de significativité choisi est de 5%.

L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé avec les logiciels Excel® et Graph Pad Prism 4®.

### **3 Système d'assurance qualité**

Un des objectifs satellites de l'objectif premier de l'étude entreprise fut la mise en place d'un système qualité dans le service d'endocrinologie du Centre hospitalier de Bois-Guillaume.

En effet, depuis la mise en vigueur de la norme ISO 9001 15189 dédiée à l'exercice de la biologie médicale, l'Assurance Qualité est devenue obligatoire pour tous les laboratoires de biologie médicale de France.

Celle-ci stipule que le biologiste médical est garant de la mise en place d'un système de management de la qualité opérationnel en permanence (Chap. 4.2.2.2 de la norme 15189) avec une exigence forte concernant la phase pré-analytique (chap. 5.4) tout en assurant une prestation de conseil médical (Chap. 4.7).

Nous avons utilisé un système PDCA aussi appelé conduite de projet selon DEMING (Plan, Do, Check, Act)

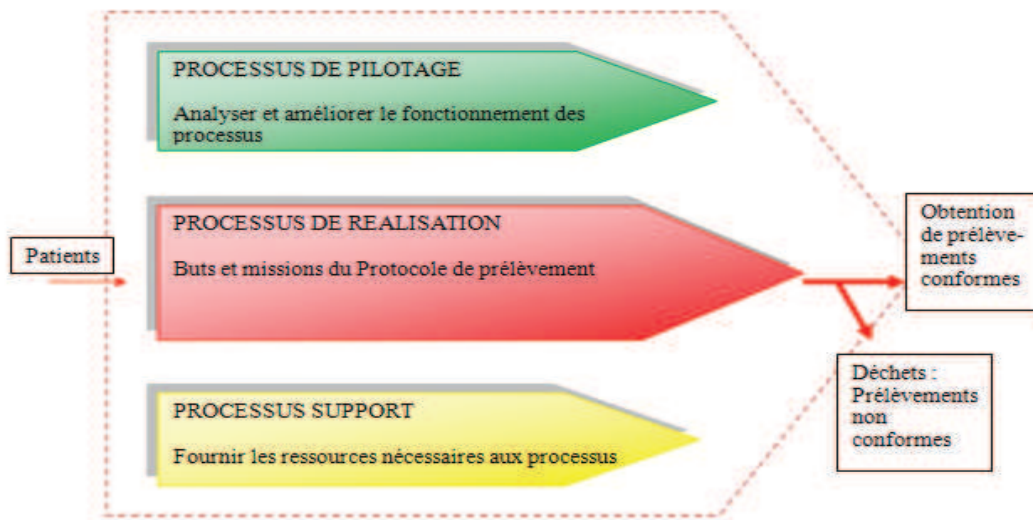
Nous allons détailler chaque étape.

1<sup>ère</sup> étape : PLAN/ Etape de planification

Dans un premier temps, nous avons procédé à la création du protocole de prélèvement et à une évaluation de sa faisabilité dans le service.

Pour cela, nous nous sommes aidés d'outils comme une cartographie de l'ensemble des processus préanalytique inhérent à la réalisation de l'étude ainsi que l'étude de risque dite des 5M.





Nous nous sommes servis de la méthode des 5M afin d'obtenir une fiche processus regroupant l'ensemble des ressources et des entrants nécessaires :

✓ **Main d'œuvre :**

- Internes et externes du service
- Responsables de l'étude
- Cadres du service

Mode de défaillance possible :

Mauvaise gestion du protocole par les responsables de l'étude

Non-respect des critères définis

- IDE
- ASH

Mode de défaillance possible :

Personnel non formé par rapport à la réalisation du protocole

Absence de connaissance des points critiques du protocole

Absence d'encadrement du personnel

Pas de vérification de la compréhension du protocole par toutes les personnes liées à l'étude

✓ **Matériels :**

- Logiciel de bureautique (EXCEL, WORD)
- Ordinateur
- Matériels de prélèvement (aiguille, vacutainer,...)

Mode de défaillance possible

Méconnaissance du matériel de prélèvement par le personnel

Méconnaissance de l'utilisation du matériel par le personnel : ordre des tubes, remplissage des tubes, homogénéisation des tubes

Mauvaises identification des tubes prélevés

✓ **Matières :**

- Patients sélectionnés dans l'étude
- Fiche de Non opposition au prélèvement
- Dossier du patient : contient les informations nécessaires au choix du patient

Mode de défaillance possible

Non-respect des critères d'intégration des patients ou des témoins dans l'étude

Nombre de patients et de témoins insuffisant pour valider l'étude

✓ **Milieu :**

- Service d'hôpital de jour et de semaine d'endocrinologie
- Contraintes de nombre : Refus possible du patient (chez les témoins particulièrement) qui retarderait l'aboutissement de l'étude en fonction des prévisions
- Contraintes de temps : Fermeture pendant les vacances et les jours fériés
- Contraintes de personnel : absence imprévue (maladie...), changement de poste, nouvel ASH ou IDE non formé au protocole...
- Modalités de transport des échantillons au laboratoire : délais et températures respectées

Mode de défaillance

Mauvaise organisation de l'étude

Absence de responsable pour encadrer l'étude

Absence de contrôle des possibilités de fonctionnement de l'étude

Absence d'anticipation par rapport aux contraintes avec impossibilité de réaliser l'étude

Non-respect des conditions de transport

✓ **Méthode :**

- Voir logigramme associé au protocole
- Le protocole rédigé
- La fiche de traçabilité

Mode de défaillance possible :

Protocole non rédigé ou mal rédigé

Protocole non connu, non diffusé ou non disponible pour le personnel de l'étude

Absence de document de traçabilité pour le suivi des patients et des témoins

Trois risques majeurs ont pu donc être identifiés grâce à cette analyse :

- 1) Erreur dans l'exécution du protocole par manque de formation du personnel
- 2) Absence d'exécution du protocole par une mauvaise gestion du déroulement de l'étude.
- 3) Non-respect des conditions d'acheminement des examens

2<sup>ème</sup> étape : DO/ Etape de réalisation

- Formation du personnel :

Cette étape est une étape clé dans le déroulement en bonne et due forme du processus. En effet, **chaque étape est une étape clé** puisque si l'une d'entre elle manque ou est erronée, alors l'ensemble des données reçues doit être rejeté ce qui retarde l'aboutissement de l'étude et induit une perte en terme de temps, de temps personnel, de sang, de temps patient.

Nous avons organisé une réunion regroupant l'ensemble des ASH, IDE et cadres du service dans l'optique de leur exposer les tenants et les aboutissants du protocole, les sensibiliser à l'importance du bon déroulement du prélèvement et du Repas TEST, leur expliquer l'intérêt de la mise en place de l'étude et de faire un rappel bibliographique concernant le diabète de type 2 et enfin, procéder à une formation générale et globale.

L'importance du bon déroulement du prélèvement pour ce protocole, permettra de souligner en même temps, les exigences de base à prendre en compte pour tout prélèvement réalisé dans le service les heures, les délais, le respect du timing dans le protocole, l'identification précise et rigoureuse des échantillons, les exigences concernant le choix des tubes, les informations associées au prélèvement ...

L'autre objectif de cette réunion a été d'avoir un premier retour quant à l'étude de faisabilité préalablement effectuée lors du premier brainstorming. En effet, l'ensemble du personnel pré-

sent lors de cette réunion n'a émis aucune réticence quant à la mise en place du protocole mais a souligné des problèmes organisationnels liés au changement quotidien du personnel à chaque poste pouvant inclure des personnes extérieurs au service donc non formés, ainsi que des problèmes liés aux examens de routine qui peuvent court-circuiter la mise en place du protocole.

L'intégralité du protocole a été présentée durant cette réunion.

Concernant la formation, l'ensemble des IDE avaient au préalable été déjà formé d'une part au prélèvement de base avec comme support, une procédure archivée dans l'outil de gestion documentaire du CHU nommé GEDI. D'autre part, il avait aussi été formé à la réalisation de protocoles similaires précédents, par le diabétologue relayé par les cadres de santé. Cette formation a donc consisté en une évaluation des pratiques professionnelles et une vérification du bon état de l'art de chacun en présence du pilote responsable du bon déroulement du pré-analytique. Pendant l'évaluation, le pilote prodiguait des conseils afin d'adapter les connaissances apparemment déjà acquises avec les nouvelles données du protocole en cours. Le support de cette évaluation était le protocole présenté en amont.

- Rédaction et diffusion de la fiche de traçabilité :

Une nouvelle fois, par l'intermédiaire des cadres du service, nous avons diffusé les feuilles de traçabilité aux différents secteurs d'hospitalisation du service, puis nous avons sensibilisé les acteurs du protocole à son utilisation. Pour cela, nous avons imprimé une série d'exemplaire que nous avons mis en évidence dans des espaces propices à leur utilisation. (cf annexes 2 et 3)

3<sup>ème</sup> étape : CHECK/ Etape de vérification

Nous avons cherché à vérifier le bon déroulement du protocole dans les différents secteurs d'hospitalisation. Nous avons donc évalué ceci :

- A partir de la feuille de traçabilité :

La Norme 15189 précise toujours dans le chapitre 5.4.4.3 b), qu'il doit être vérifié que le patient réponde aux exigences *de prélèvement d'échantillon à l'heure ou aux intervalles prédéterminés*. De même, dans le 5.4.4.3 c), il est dit que *les instructions relatives au prélèvement des échantillons sanguins et non sanguins primaires, avec la description du matériel de recueil des échantillons primaires et de tout additif nécessaire;*

Ces deux notions sont importantes à maîtriser dans la démarche qualité que l'on veut appliquer au prélèvement puisqu'il permet d'aboutir à des résultats en accord avec l'étude effectuée. En effet, nous nous devons de maîtriser la bonne exécution de chacun des trois prélèvements concernant le protocole avec une plage d'une heure stricte les séparant. Concernant l'alinéa c), il était tout aussi important que le patient prenne son Repas TEST entièrement afin que ce dernier puisse être qualifié de « repas standardisé » et pour cela, les instructions aux ASH devaient être claires. En plus de la formation initiale effectuée au début du stage, une composition détaillée de ce dernier a été incluse dans le manuel du protocole. La première version de la fiche de traçabilité mise en place (*voir en annexe fiche de traçabilité v1.0*) permettait à l'IDE de noter si le prélèvement dans sa globalité avait été fait ou non. Elle permettait donc de respecter l'alinéa b) du 5.4.4.3 mais pas le c).

Ainsi nous avons remarqué après évaluation des premiers résultats, **les non conformités suivantes** :

- absence de distinction dans la traçabilité entre les différents examens prescrits
- absence d'emplacement pour noter le déroulement de la prise du Repas TEST
- absence d'emplacement pour noter les problèmes rencontrés pendant le déroulement du protocole.

Ces non conformités ont pu être tracées après la mise en évidence **des erreurs aléatoires** suivantes :

- Repas TEST non pris en totalité
  - Patient non à jeun le matin ou sous l'effet de sa médication habituelle
- A partir du recueil de données :

Dans un second temps, nous avons pu évaluer l'efficacité du processus mis en place lors du recueil des données à posteriori permettant de repérer toutes les non conformités éventuelles. En effet, il est possible de repérer des non conformités de la phase préanalytique lors de la phase postanalytique.

Deux étapes cruciales au sens de la Norme n'ont pu faire l'objet d'une traçabilité :

- l'étiquetage et la conservation des échantillons primaires (voire secondaires) (chap. 5.4.4.3 e))
- le transport des échantillons (chap. 5.4.5)

Concernant l'étiquetage, il est effectué immédiatement après le prélèvement grâce à la liasse de soin située au lit du patient ce qui assure une prévention contre les erreurs d'étiquetage.

Concernant la conservation des prélèvements, les tubes nécessaires aux dosages respectifs de la glycémie, de l'insuline et du peptide C sont immédiatement envoyés par coursier à l'institut de biologie clinique pour y être immédiatement analysés, sous la responsabilité de l'IDE.

Des erreurs à ces niveaux ne sont repérables que lors du recueil des données.

Sur les 30 patients inclus dans l'étude, nous avons noté les non conformités suivantes :

- anomalie de prélèvement concernant 1 patient sur 30 ayant entraîné l'hémolyse du sérum : insulinémie non dosable
- patient ayant reçu une injection d'insuline exogène avant son prélèvement sans notification à l'IDE en charge du protocole : dosage de l'insuline et du peptide C caduque.

4<sup>ème</sup> étape : ACT/ Etape d'ajustement et d'amélioration

Les principales actions d'amélioration ont été permises grâce au suivi des écarts et non conformités rapportées par les feuilles de traçabilité et nous avons donc procédé en fonction de ces derniers:

**Actions correctrices immédiates :**

- nouveau prélèvement du patient
- nouveau protocole mis en place le lendemain matin
- exclusion du protocole si impossibilité de le re-prélever

**Action correctives/préventives :**

-mise à jour de la feuille de traçabilité (ajout de colonnes pour chaque analyse demandée ; voir feuille de traçabilité v1.2 en annexe 3)

Cependant, les non conformités rapportées pendant le recueil de données n'ont pu faire l'objet d'actions d'amélioration du fait de l'intervalle de temps trop grand entre l'exécution du protocole et la réception des résultats.

# RESULTATS

L'objectif initial de l'étude était de recruter 10 témoins et 20 diabétiques. Nous avons finalement inclus 33 personnes dont 10 témoins et 23 diabétiques puis éliminé à postériori, 2 diabétiques dont les données montraient une insulino-requérance inconnue, et 1 témoin dont les résultats biologiques dépistaient un diabète lui aussi non diagnostiqué. Soit n=21 pour les diabétiques et n=9 pour les témoins

### **Phénotypes cliniques et biologiques des témoins et des patients (tableau 9)**

Concernant le groupe des témoins, l'âge moyen était de 53,1 ans, le sex-ratio était 0 homme pour 9 femmes, la taille moyenne était de 1m 62, le poids moyen de 58,8 kilogrammes, le BMI moyen de 25.0, le tour de taille moyen de 90,6 cm, le taux de cholestérol total moyen de 6.0 mmol/l, le taux de LDL moyen de 3.8 mmol/l, le taux de HDL moyen de 1.7 mmol/l, le taux de triglycérides moyen de 1,2 mmol/l, le taux d'HbA1c moyen de 5.4 %, la créatininémie moyenne de 83,8  $\mu$ mol/l et la clairance de la créatinine moyenne calculée par la formule MDRD de 90,2 ml/min.

Concernant le groupe des diabétiques, l'âge moyen était de 55,5 ans, le sex-ratio était 9 hommes pour 12 femmes, la taille moyenne était de 1m 66, le poids moyen de 103.8 kilogrammes, le BMI moyen de 38,0, le tour de taille moyen de 122,8 cm, le taux de cholestérol total moyen de 4,6 mmol/l, le taux de LDL moyen de 2,4 mmol/l, le taux de HDL moyen de 1,3 mmol/l, le taux de triglycérides moyen de 1,9 mmol/l, le taux d'HbA1c moyen de 8.0 %, la créatininémie moyenne de 68,2  $\mu$ mol/l et la clairance de la créatinine moyenne calculée par la formule MDRD de 112,1 ml/min. La durée moyenne de diabète était de 7,1 ans avec un maximum de 28 ans.

En sus, nous avons résumé dans le tableau 9, la situation clinique de chaque diabétique ainsi que sa thérapeutique avant son inclusion dans l'étude et à sa sortie du service. On peut observer que 13 des 21 patients diabétiques ont bénéficié d'un changement dans leur thérapeutique avec pour la majeure partie d'entre eux, la mise en place d'un traitement par un analogue du GLP-1 (liraglutide) ou la majoration des posologies. Seul un patient a bénéficié d'une minoration de son traitement. Par ailleurs, un seul patient a été mis sous insuline sur les 21.



**Tableau 3. Récapitulatif des moyennes données cliniques cas versus témoins**

Groupes	Cas (moy. ± SEM)	Témoins (moy. ± SEM)
n	21	9
Age (années)	55,4 ± 2,6	53,1 ± 3,4
sexe ratio H/F	0,7	0,0
Taille (m)	1,65 ± 0,02	1,62 ± 0,02
Poids (kg)	103,8 ± 5,3	58,9 ± 5,0
BMI	38,0 ± 2,0	25,0 ± 1,0
Tour de taille (cm)	122,8 ± 4,7	90,6 ± 1,2
durée diabète (années)	7,1 ± 1,8	0,0
HbA1C	8,0 ± 0,5	5,4 ± 0,1
CT (mmol/L)	4,6 ± 0,2	6,0 ± 0,2
LDL (mmol/L)	2,4 ± 0,2	3,8 ± 0,2
HDL (mmol/L)	1,3 ± 0,1	1,7 ± 0,1
TG (mmol/L)	1,9 ± 0,2	1,2 ± 0,1
CREATININEMIE	68,2 ± 8,5	83,9 ± 23,3
Clairance (MDRD)	112,1 ± 8,6	90,2 ± 12,2

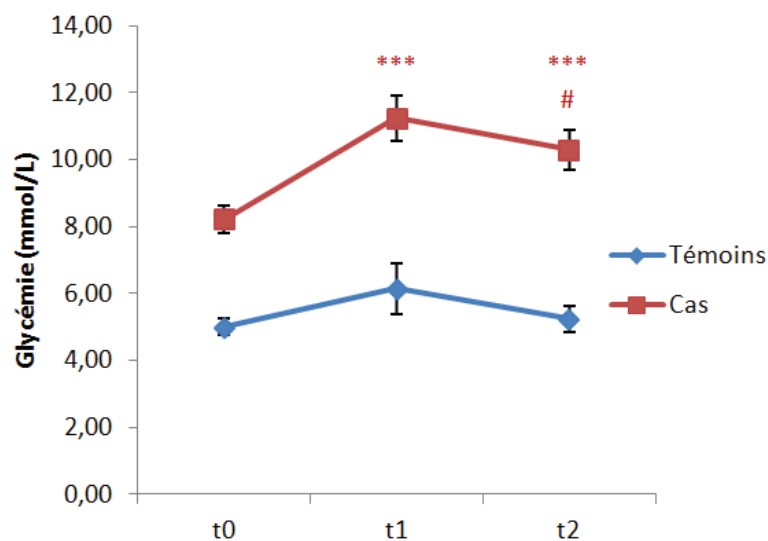
## Evaluation de la glycémie, de l'insulinémie et de la c-peptidémie

Les moyennes de plusieurs paramètres pour chaque groupe de patients et pour chaque temps du cycle ont été mesurées afin d'évaluer la cinétique de la glycémie et la réponse pancréatique par l'intermédiaire du dosage de l'insulinémie et du peptide C. Les paramètres biologiques évalués sont les suivants : Glycémie à jeun (t0), post-prandiale (t1 et t2), Insulinémie et Peptide C basaux (t0) et post-prandiaux (t1 et t2).

Voici résumées dans les tableaux 3,4 et 5, les moyennes et l'Erreur Standard à la Moyenne (SEM) des valeurs biologiques obtenues et ayant permis l'élaboration des courbes suivantes (figure 22, 23, 24) :

**Tableau 4. Moyenne des glycémies pour le groupe des cas et des témoins à chaque temps associé à leur erreur standard (SEM)**

Glycémie (g/l)		t0	t1	t2
Cas	Moy.	8.22	11.25	10.30
	SEM	0.42	0.67	0.60
Témoins	Moy.	5.01	6.14	5.26
	SEM	0.23	0.76	0.39



**Figure 22. Moyenne des glycémies des témoins et des cas à jeun (t0), une heure après prise du repas test (t1) et deux heures après (t2). La barre d'erreur correspond à l'Erreur Standard à la Moyenne. \*\*\* p < 0.001 (dans le groupe diabétique vs t0), # p < 0.05 (dans le groupe diabétique vs t1)**

Tableau 5. Moyenne des insulinémies pour le groupe des cas et des témoins à chaque temps associé à leur erreur standard (SEM)

Insulinémie (pmol/l)		t0	t1	t2
Cas	Moy.	118.52	235.57	248.20
	SEM	13.22	33.74	42.78
Témoins	Moy.	56.89	336.78	108.33
	SEM	7.53	73.21	29.39

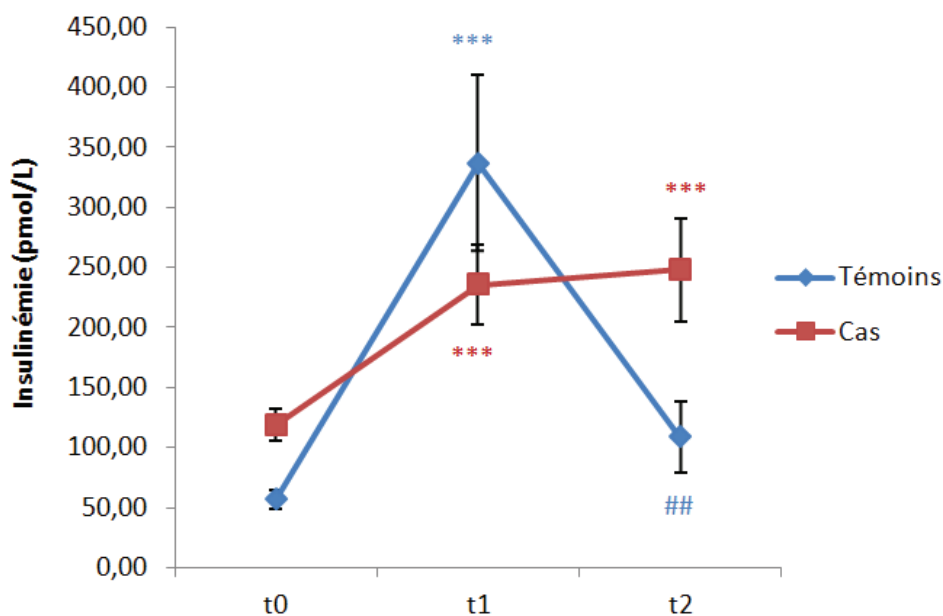


Figure 23. Moyenne des insulinémies des témoins et des cas à jeun (t0), une heure après prise du repas test (t1) et deux heures après (t2). La barre d'erreur correspond à l'Erreur Standard à la Moyenne. \*\*\*  $p < 0.001$  (dans le groupe diabétique vs t0), \*\*\*  $p < 0.001$  (dans le groupe témoin vs t0), ##  $p < 0.01$  (dans le groupe témoin vs t1)

Tableau 6. Moyenne des C-peptidémie pour le groupe des cas et des témoins à chaque temps associé à leur erreur standard (SEM)

Peptidémie C (pmol/l)		t0	t1	t2
Cas	Moy.	1347.9	1780.76	2024.19
	SEM	136.10	175.60	189.6
Témoins	Moy.	894.89	2341.33	1547.11
	SEM	97.39	297.80	215.00

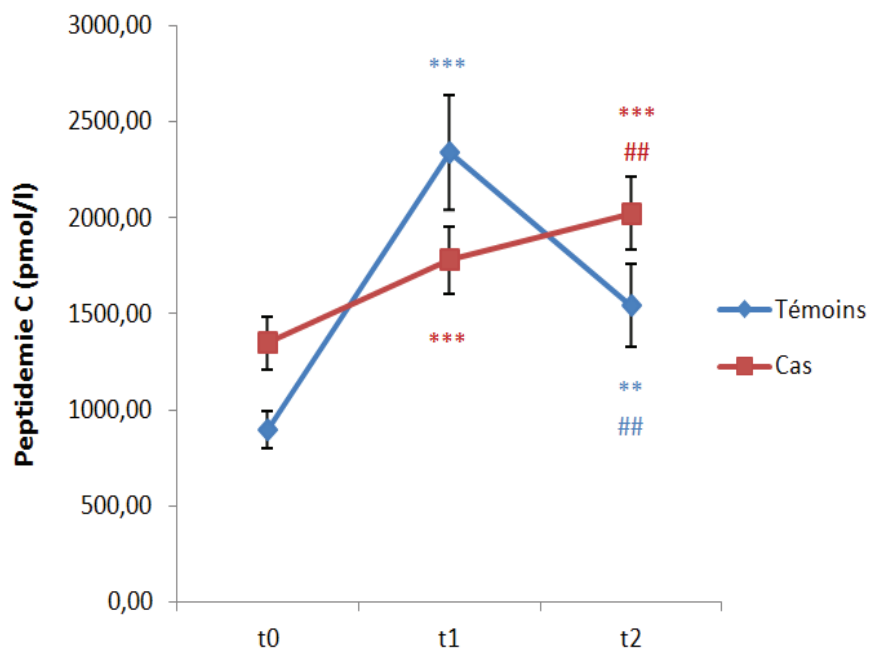
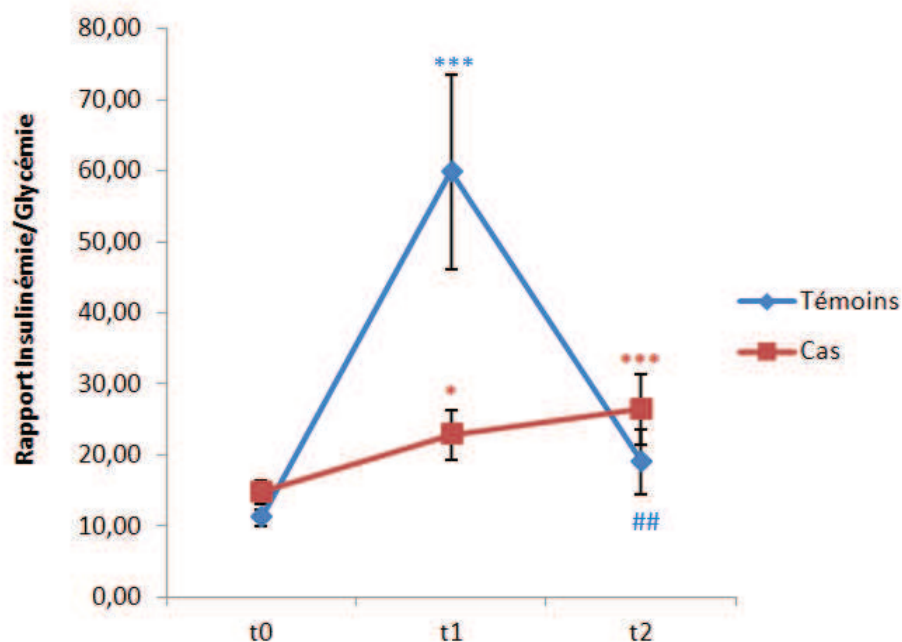


Figure 24. Moyenne des c-peptidémies des témoins et des cas à jeun (t0), une heure après prise du repas test (t1) et deux heures après (t2). La barre d'erreur correspond à l'Erreur Standard à la Moyenne. \*\*\* p < 0.001 (dans le groupe diabétique vs t0), ## p < 0.01 (dans le groupe diabétique vs t1), \*\*\* p < 0.001 et \*\* p < 0.01 (dans le groupe témoin vs t0), ## p < 0.01 (dans le groupe témoin vs t1)

Afin de s'affranchir des différences de glycémie observées entre témoins et diabétiques dans les dosages d'insuline et de peptide c, nous avons calculé les ratios peptidémie- c/glycémie et insulinémie/glycémie. Nous avons obtenus de nouvelles valeurs résumées dans les tableaux 6 et 7 suivants à l'origine des cinétiques observées sur les figures 25 et 26:

**Tableau 7. Rapport des moyennes des insulinémies sur les moyennes des glycémies respectives à chaque temps associé à leur erreur standard (SEM)**

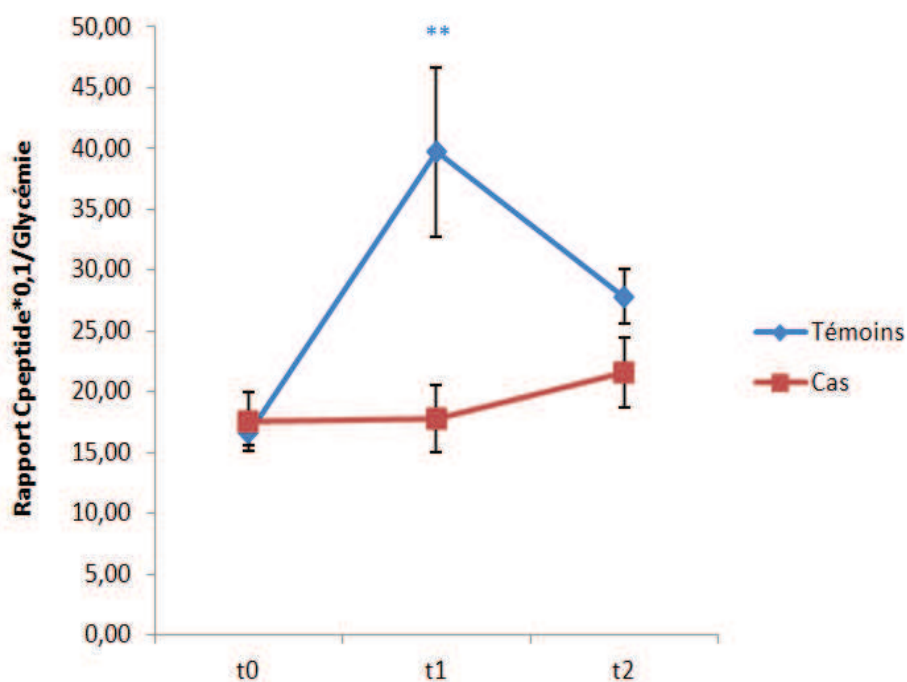
Insuline/Glyc. (pmol/l)		t0	t1	t2
Cas	Moy.	14.72	22.79	26.40
	SEM	1.63	3.57	4.94
Témoins	Moy.	11.15	59.89	19.04
	SEM	1.12	13.70	4.57



**Figure 25. Moyenne des insulinémies divisées par la moyenne des glycémies respectives des témoins et des cas à jeun (t0), une heure après prise du repas test (t1) et deux heures après (t2). La barre d'erreur correspond à l'Erreur Standard à la Moyenne. \*\*\* p < 0.001 et \* p < 0.05 (dans le groupe diabétique vs t0), \*\*\* p < 0.001 (dans le groupe témoin vs t0), ## p < 0.01 (dans le groupe témoin vs t1)**

**Tableau 8. Rapport des moyennes des C-peptidémie sur les moyennes des glycémies respectives à chaque temps associé à leur erreur standard (SEM)**

Peptid./Glyc. (pmol/)		t0	t1	t2
Cas	Moy.	17.54	17.78	21.60
	SEM	2.43	2.73	2.88
Témoins	Moy.	16.59	39.69	27.82
	SEM	0.96	6.91	2.27



**Figure 25. Moyenne des c-peptidémies divisées par les glycémies respectives des témoins et des cas à jeun (t0), une heure après prise du repas test (t1) et deux heures après (t2). La barre d'erreur correspond à l'Erreur Standard à la Moyenne. \*\* p < 0.01 (dans le groupe témoin vs t0)**

Aux vues des présents résultats, on peut observer que les glycémies sont significativement supérieures chez les cas/diabétiques que chez les témoins. Par ailleurs, il existe un pic insulini- nique représenté par l'insuline et le peptide C à t1 suite à la stimulation pancréatique par le Repas Test, chez les témoins mais absent chez les diabétiques. Cependant, l'erreur standard à la moyenne est plus élevée chez les témoins que chez les diabétiques à t1 pour ces deux para- mètres.

Après calcul des ratios Cp/G et Ins./G, la différence devient encore plus nette quant à la perte du pic insulini- que chez les diabétiques. En effet, la cinétique des courbes montrent une insuli- némie/peptidémie C qui continue à augmenter à t2 contrairement au groupe des témoins où celle-ci revient à t2 à une valeur proche de la valeur basale de t0.

Après appréciation des différents résultats précédemment présentés, les ratios c- peptidémie/glycémie aux temps t1 et t2 pour chaque groupe sont apparus comme étant les paramètres les plus discriminants de l'étude. En effet, le temps t1 démontre une très nette dif- férence numérique dans les valeurs obtenues entre diabétiques et témoins. Quant au temps t2, il présente les valeurs les plus élevées de la c-peptidémie (et de l'insulinémie) chez les diabé- tiques. Afin de confirmer ces observations pour le temps t1, une représentation par nuage de point d'une part et par bloc d'autre part de l'ensemble de ces valeurs a été réalisée afin d'en apprécier leur dispersion (figure 27 et 28).

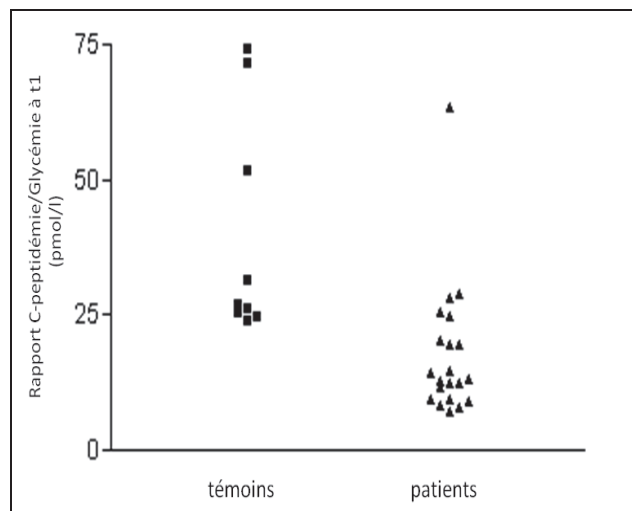
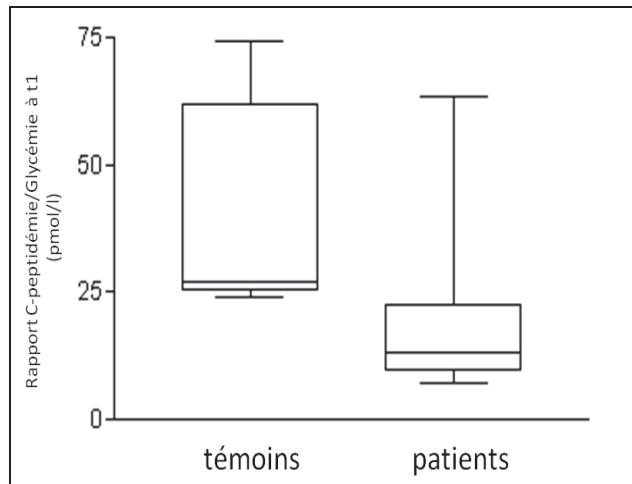
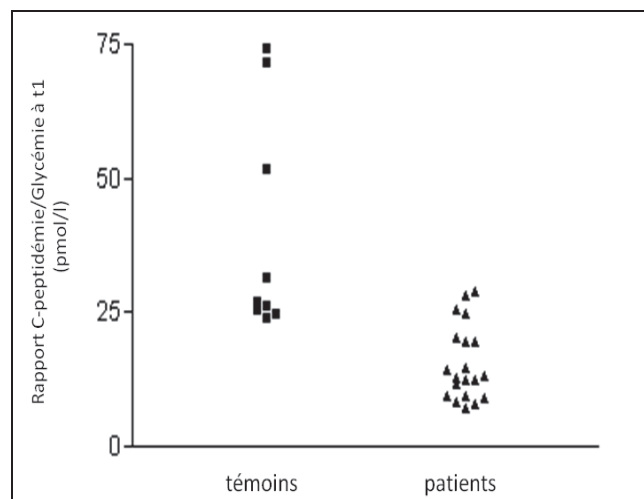


Figure 26. Répartition en nuage de points des valeurs C-peptidémie/Glycémie à t1 pour le groupe des cas/patients et le groupe des témoins. (n=30)



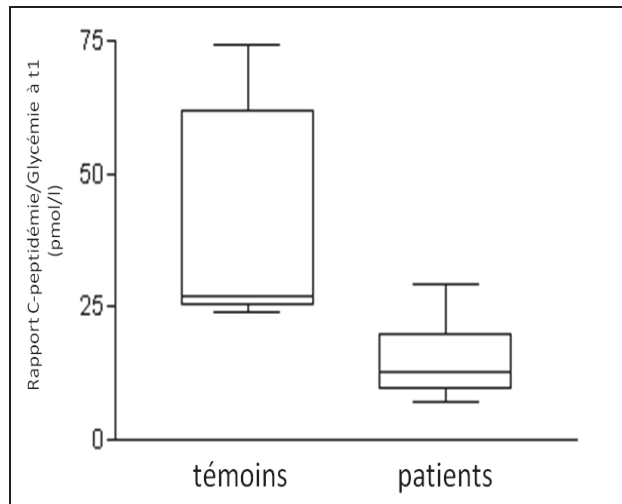
**Figure 27. Répartition en bloc des valeurs C-peptidémie/Glycémie à t1 pour le groupe des cas/patients et le groupe des témoins. (n=30)**

Un des patients diabétiques présentait un profil marginal plus compatible avec des valeurs d'un non diabétique. Après vérification, ce patient diabétique était le seul à ne pas bénéficier d'une thérapeutique pharmacologique mais uniquement d'un traitement par régime seul. De plus, son taux d'HbA1c étant normal ainsi que ses glycémies, une nouvelle représentation par nuage de points et par bloc a été réalisé sans tenir compte de ce patient afin d'observer la présence ou non d'une réelle différence entre les deux groupes. Les figures 28 et 29 présentent donc la nouvelle répartition des valeurs pour un échantillon total de patient passé de n=30 à n=29.



**Figure 28. Répartition en nuage de points des valeurs C-peptidémie/Glycémie à t1 pour le groupe des cas/patients et le groupe des témoins. (n=29)**





**Figure 29. Répartition en bloc des valeurs C-peptidémie/Glycémie à t1 pour le groupe des cas/patients et le groupe des témoins. (n=29)**

Il apparaît un clivage assez net entre les valeurs des ratios de l'ensemble des diabétiques et des témoins et le seuil semble de situer au niveau d'une valeur de Ratio C-peptide/Glycémie à 25 pmol/l.

### **ANOVA et comparaisons intra-individuelles**

Afin de confirmer les observations faites précédemment, nous avons procédé à des comparaisons intra-individuels pour chacun des paramètres par une étude ANOVA et test *post-hoc* (Bonferroni).

Concernant les glycémies, chez les diabétiques, il existe une différence significative ( $p < 0.001$ ) entre la glycémie à jeun (t0) et la glycémie postprandial à 1 heure (t1) et à 2 heures (t2) avec une différence peu significative entre t1 et t2. A contrario, chez les témoins, nous n'avons observé aucune différence entre les 3 points du cycle glycémique ( $p > 0.05$ ).

Concernant l'insulinémie, une sécrétion insulémique caractérisée par une différence significative ( $p < 0.001$ ) entre l'insulinémie basale à t0 et les insulinémies postprandiales à t1 et t2 apparaît chez les diabétiques. Cependant, une cinétique « en plateau » apparaît à t1 puisqu'il n'existe aucune différence statistique entre t1 et t2. Chez les témoins, la cinétique en pic est confirmée puisque les insulinémies à t0 et t2 diffèrent respectivement de manière significative ( $p < 0.001$ ) et assez significative ( $p < 0.01$ ) avec celle de t1 tandis que celles à t0 et à t2 ne diffèrent pas statistiquement entre elles ( $p > 0.05$ ). Avec les ratios insuline/glucose, les cinétiques avec les mêmes différences statistiques entre t1 et t0/t2 se confirment chez les témoins. Par contre, concernant les diabétiques, une cinétique en forme de courbe ascendante se confirme

puisque  $t_0$  diffère peu significativement de  $t_1$  ( $p < 0.05$ ), et significativement de  $t_2$  ( $p < 0.001$ ) mais  $t_1$  et  $t_2$  ne diffèrent pas entre eux ( $p > 0.05$ ).

Concernant la C-peptidémie, chez les diabétiques, une cinétique linéaire ascendante que pour le dosage de l'insulinémie apparaît avec cependant des différences plus marquées entre les valeurs de chaque temps. En effet,  $t_0$  diffère significativement de  $t_1$  et  $t_2$  ( $p < 0.001$ ) et  $t_1$  assez significativement de  $t_2$  ( $p < 0.01$ ). En utilisant les ratios peptide c/glycémie, la cinétique devient plus franche et plus caractéristique pour chaque groupe. Pour les diabétiques, la cinétique en plateau est plus marquée qu'avec le dosage de l'insulinémie et démontre davantage un retard dans la réponse pancréatique au stimulus glucosé. En effet, les valeurs du rapport C-peptide/Glucose ne diffèrent pas entre elles pour chaque temps. Pour les témoins, la cinétique en pic est moins marquée qu'avec le dosage de l'insuline puisque les valeurs à  $t_0$  et  $t_1$  diffèrent assez significativement ( $p < 0.01$ ) et  $t_2$  ne diffère pas de  $t_0$  et  $t_1$  ( $p > 0.05$ ).

### **Dispersion des valeurs et comparaison inter-individuelle**

Nous avons choisi les valeurs du rapport C-peptidémie/Glycémie à  $t_1$  pour modéliser la dispersion de ces valeurs et faire une comparaison inter-groupe puisque d'un point de vue purement statistique et cinétique, c'est avec ce paramètre que l'on observe une véritable différence entre la valeur basale à jeun ( $t_0$ ) et la valeur après stimulation ( $t_1$ ). Ainsi, on remarque sur la figure 29, que la totalité des patients diabétiques présente des valeurs inférieures à 25 tandis que la quasi-totalité des témoins présente des valeurs supérieures à 25. Ce cut-off est confirmé sur la figure 26, lorsque l'on intègre la patiente étiquetée diabétique mais dont le profil clinique et biologique se rapproche fortement d'un profil de témoin. En effet, la valeur de son rapport peptide-c/glucose est égal à 71.8 soit bien au-dessus du cut-off.

Cas	n=21	complications diabète	TTT DIABETE	Changement TTT DIABETE
Dia-Ma	22/09/1960	non	gliclazide 60mg, metformine 700 mg *3	liraglutide 1,2mg
Lab_Li	01/09/1957	non	glimepiride 4mg/jr, metformine 1000 mg*3	liraglutide 1,2mg
Fou_De	26/09/1960	non	glicazide 30 mg, metformine 850mg *2	liraglutide 0,6mg
Has_To	01/01/1957	non	metformine 1000*3, glimepiride 2mg/jr	sitagliptine 100mg/jr
Nev_Re	05/09/1952	non	metformine 1000*3, sitagliptine 100mg/jr, glibenclamide 5mg*3	introduction liraglutide
Gir_Je	07/03/1945	neuropathie sensitive	metformine 1000*3, glibenclamide 5mg*3, exenatide 10µg*2	0
Sab_Da	08/05/1948	non	régime seul	0
Moi_Fr	09/03/1956	rétinopathie non proliférante minime	metformine 700 mg*3	0
Por_na	01/11/1977	non	metformine, liraglutide	0
Che_ma	01/07/1954	néphropathie incipiens, neuropathie sensitive	association sitagliptine 50mg/metformine 1000mg *2	0
Leb_Od	10/05/1942	non	metformine 500mg*2	0
Dor_na	20/06/1969	non	metformine 500mg*2	majoration metformine 850mg*3 + ajout liraglutide 1,2mg/jr
Che-che	20/07/1984	non	diamicron 60, glucophage 500	relais par lantus, diamicron et glucophage
DeA_my	13/08/1956	non	glicazide 60mg, association metformine 1000/sitagliptine 50mg*2	introduction liraglutide 0,6mg
Sim_Mo	05/02/1981	non	sitagliptine 50mg/metformine 1000mg*2	0
Nev_Mar	26/02/1947	non	metformine 850mg*3, glimepiride 1mg	arrêt glimepiride
Cor_Mi	25/02/1954	rétinopathie proliférante (laser), AOMI, néphropathie incipiens	metformine 850mg*3, glicazide 30mg, liraglutide 1,2mg	arrêt glicazide, diminution metformine à 500mg*2
Car_Ge	09/04/1966	non	metformine 700mg/jr	0
Lem_Je	14/08/1957	non	metformine 850mg*2 + glicazide 90mg	arrêt glicazide, intro liraglutide 1,2mg
Lef_co	10/12/1940	non	metformine 700mg *2+ glicazide	arrêt glicazide
D'Ho_Mi	08/03/1950	neuropathie végétative	metformine 700mg*2, glibenclamide 5mg*3, vildagliptine 50mg	arrêt vildagliptine, introduction liraglutide

Tableau 9. Récapitulatif des données cliniques et thérapeutiques des diabétiques/cas inclus dans l'étude avant et après la mise en place du protocole

# **DISCUSSION**

Les premiers résultats statistiques obtenus grâce aux données cliniques recueillies auprès des patients cas/témoins inclus dans l'étude sont assez cohérents vis-à-vis de la littérature et la physiopathologie du diabète. En effet, bien que l'âge et la taille des patients dans chaque groupe ne diffèrent pas significativement (55 ans (cas) vs 53 ans (témoins) et 1,66 m vs 1,62m), le poids (103,8 kg vs 58,9 kg) associé à l'IMC (38,0 vs 25,0) ainsi que le tour de taille (122,8 cm vs 90,6 cm) sont logiquement et significativement plus élevés chez les diabétiques de type 2 que dans le groupe des témoins. En effet, le surpoids et l'obésité mesurables grâce à ces paramètres entraînent l'insulinorésistance qui participe à la physiopathologie du diabète. Par ailleurs, l'HbA1c se situe bien dans des valeurs pathologiques et démontre avec une valeur moyenne de 8%, que la majorité des diabétiques inclus souffrent d'un déséquilibre de leur diabète. Le groupe des témoins présentent une HbA1c compatible (5,4%) avec une absence de diabète attendue. Paradoxalement, le cholestérol total (4,6 mmol/l vs 6,0 mmol/l) ainsi que le LDLc (2,4 mmol/l vs 3,78 mmol/l) présentent des taux supérieurs chez les témoins par rapport aux diabétiques mais l'explication repose probablement sur la thérapeutique hypolipémique instaurée systématiquement chez les diabétiques et absente chez les témoins. Comme attendu, le niveau de triglycérides est plus élevé chez les patients diabétiques d'autant que les statines, composant majoritairement le traitement hypolipémiant des patients de l'étude, possèdent une activité pharmacologique dirigée majoritairement contre le cholestérol et dans une moindre mesure, vers les triglycérides.

L'objectif premier de cette étude fut la création et la mise en place d'un nouveau protocole de prélèvement associé à un petit déjeuner test dans le service clinique d'Endocrinologie du centre hospitalier de Bois-Guillaume. Ce travail a donc permis de mettre en évidence la faisabilité d'un protocole de prélèvement simple avec des résultats encourageants car permettant d'aboutir à un meilleur phénotypage des patients diabétiques. En effet, concernant la faisabilité du protocole, l'utilisation de la Norme Qualité ISO 9001 15189 inhérente à la biologie médicale, a permis de contrôler et maîtriser les différents paramètres critiques liés au pré-analytique. L'étude de risque réalisée a permis d'identifier les risques majeurs de survenue d'événements indésirables et d'en limiter la survenue. La formation et la diffusion du protocole dans les différents secteurs du service a été permise grâce à une bonne mobilisation de l'ensemble du personnel (IDE et ASH majoritairement). De plus, l'utilisation d'outils de traçabilité a permis un bon suivi du déroulement des prélèvements et un meilleur recueil des résultats. Avec seulement un prélèvement éliminé car hémolysé sur l'ensemble des actes réalisés et un patient écarté du protocole car ayant reçu de l'insuline de manière impré-

vue avant la réalisation protocole, l'évaluation de la faisabilité et du déroulement de l'étude demandés par la Norme 15189, a mis en évidence la bonne reproductibilité du protocole et la bonne maîtrise du pré-analytique.

L'analyse des résultats montrent premièrement des glycémies significativement plus élevées chez les patients diabétiques aux trois temps (t0, t1, t2) (8,22 vs 5,01 (t1); 11,25 vs 6,14 (t2) ; 5,26 vs 10,30 (t3) (g/l)) et présentant une cinétique d'évolution très différentes entre diabétiques et témoins. On retrouve ainsi une cinétique en cloche chez les témoins alors que chez les diabétiques, on observe une hyperglycémie perdurant dans le temps. Ceci montre que malgré un petit déjeuner avec une charge calorique faible (186 kcal), sa composition en biscottes (aliment ayant un index glycémique élevé > 70%) provoque une hyperglycémie significative chez le patient diabétique par rapport aux témoins sans exposer le patient au risque d'hyperglycémie sévère.

L'objectif central de l'étude était l'évaluation de l'insulinosécrétion chez le diabétique de type 2 non insuliné. Deux paramètres biologiques principaux étaient disponibles soit l'insulinémie et la C-peptidémie. Les deux marqueurs ont été dosés afin de déterminer si ces derniers étaient complémentaires ou bien redondants concernant leur interprétation clinico-biologique. Il était aussi important de confronter la cinétique de ces dosages à celle de la glycémie afin de tenir compte de l'insulinorésistance des patients diabétiques et d'éliminer les possibles biais dans l'inclusion des patients à chaque groupe (patients dits témoins mais présentant un diabète non diagnostiqué par exemple). Aussi, cela a permis d'analyser la relation entre l'action endocrine du pancréas et les fluctuations de la glycémie.

Concernant la cinétique aux trois temps des dosages de la c-peptidémie et de l'insulinémie chez les témoins, une allure en pic est retrouvée avec une différence marquée entre t1 et t0 (ainsi que t2) signifiant une réponse physiologique et appropriée au stimulus glucosé induit par la prise du repas test. Cependant, à t2, la c-peptidémie n'est pas retournée à sa valeur initiale de t0 contrairement à l'insulinémie. Cela s'explique par le fait que la demi-vie du peptide c dans le sang est bien supérieure à celle de l'insuline (30 minutes *versus* 3 minutes). Concernant les diabétiques, dans le cas des deux dosages, une dysrégulation a été mise en lumière avec un retard dans la sécrétion d'insuline et un maintien de sa sécrétion dans le temps puisque la cinétique prend la forme d'une courbe ascendante avec des valeurs à t2 supérieures à celles de t1. On a observé donc un phénomène de plateau (*versus* pic) concernant le cycle de l'insulinémie.

L'aspect quantitatif de la fonction endocrine a ensuite été mesuré grâce à l'utilisation des ratios peptide-C/glycémie et insuline/glycémie permettant d'intégrer les niveaux de glycémie différents entre les deux groupes de patients inclus. Les cinétiques obtenues avec ces ratios ne diffèrent pas significativement de celles obtenues avec les valeurs d'insulinémie et de c-peptidémie seules. Cependant, la valeur absolue de la sécrétion insulinique mesurée à chaque temps grâce à ces ratios s'est retrouvée fortement diminuée chez les diabétiques. Le fait de prendre en compte les rapports insuline/glucose et peptide c/glucose nous a apporté un premier élément de réponse quant au fait qu'ils étaient plus précis et instructifs d'un point de vue qualitatif et quantitatif que les valeurs simples d'insulinémie et de c-peptidémie seules afin d'évaluer l'insulinosécrétion (et dans une moindre mesure l'insulinorésistance) chez les diabétiques de type 2.

Nous avons ensuite recherché lors de l'analyse des résultats, quel était l'intérêt de chaque temps dans le phénotypage clinico-biologique de chaque patient. Le temps t0 mesurant l'état basal du patient n'a apporté aucune information utile dans leur analyse simple et isolée. En effet, excepté une différence significative attendue entre les glycémies à jeun des cas et des témoins, l'insulinémie et la c-peptidémie à l'état basal ne différaient pas assez significativement pour être utile au phénotypage des patients. D'où la nécessité d'une stimulation glycémique afin de provoquer une réponse pancréatique endocrine. Concernant les dosages postprandiaux, les temps t1 et t2 ont apporté tous les deux, des informations complémentaires. Le temps t1 permettait d'observer la différence la plus significative entre les valeurs des glycémies, insulinémies et c-peptidémies. Cette différence a été confirmée dans les figures 27 et 28 montrant la dispersion en nuage de points et en bloc des valeurs du ratio c-peptide/glycémie au temps t1 pour l'ensemble des patients de l'étude. On a pu observer que la majorité des patients diabétiques se situaient dans l'intervalle [0 - 25 pmol/l] tandis que la majorité des témoins se situaient dans l'intervalle [25 - 75 pmol/l]. Le temps t2, quant à lui, présentait les valeurs des marqueurs de l'insulinosécrétion les plus élevées et de ce fait, contrairement à t1, permettait une évaluation plus précise et plus juste de la réponse Bêta-cellulaire maximale au stimulus glucosé.

Ainsi le temps t1 a permis de mettre en lumière la présence d'un cut-off pour différencier les deux groupes dont la valeur se situait aux alentours de 25 pmol/l pour le ratio C-peptide/glycémie. t2 a semblé refléter plus précisément la capacité maximale de sécrétion insulinique et donc semble plus pertinent pour l'utilisation en tant que marqueur prédictif d'efficacité thérapeutique. L'analyse de ces deux temps concourrait donc au phénotypage qualitatif et quantitatif des patients diabétiques de l'étude.

Il existe de nombreux tests biologiques permettant de mesurer l'insulinosécrétion et/ou l'insulinorésistance mais il faut souligner que les tests sont assez différents en fonction des études et jusqu'à présent, il n'existe pas de Gold standard pour phénotyper facilement la fonction endocrine pancréatique.

Le test au glucagon, test probablement le plus utilisé jusqu'à présent dans la littérature, s'est montré efficace pour certains auteurs dans la décision d'instaurer ou non, une insulinothérapie.

Ainsi, une étude menée au Japon s'est intéressée à la relation entre la sécrétion du peptide C et le test de charge au Glucagon afin de prédire la mise en place ou non d'une insulinothérapie chez les patients âgés atteints de diabète de type 2. Cette étude s'est appuyée sur 43 patients tous atteints de diabète de type 2. Sur les 43 patients tous traités par antidiabétiques oraux comme l'étaient les diabétiques de notre étude, 25 d'entre sont restés avec leur traitement d'origine tandis que les 18 autres ont eu un traitement par insuline. Le test s'est déroulé en 2 temps. Premier temps : dosage du peptide C et de la glycémie à jeun (t0) ; Deuxième temps : dosage du peptide C et de la glycémie 6 minutes après l'injection (t1). Ils ont procédé à la modélisation de la distribution des valeurs obtenues entre chaque groupe pour les c-peptide à jeun (FCPR), le ratio C-peptide/glucose (CPI), le c-peptide post glucagon (CPR6) et l'augmentation du c-peptide après l'injection de glucagon.

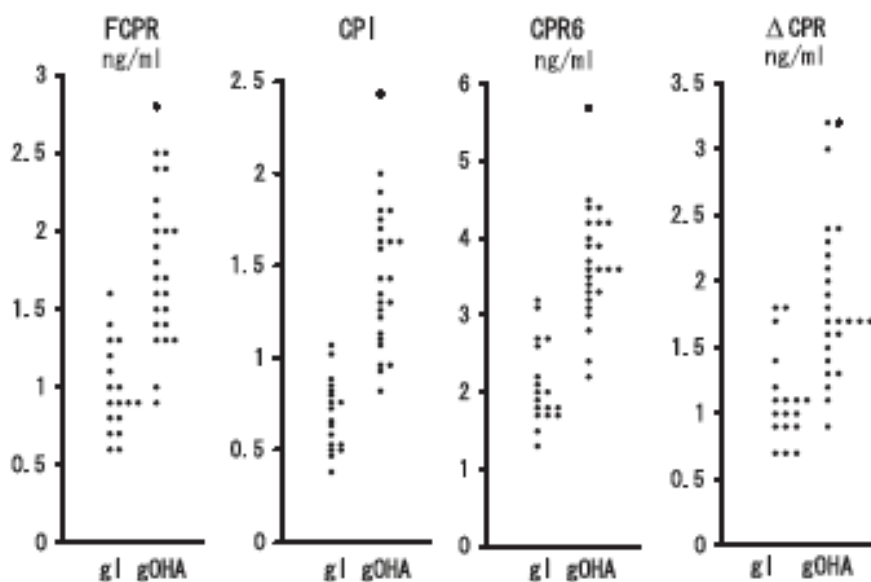


Figure 30. Fréquence de distribution pour les valeurs des c-peptide à jeun (FCPR), le ratio C-peptide/glucose (CPI), le c-peptide post glucagon (CPR6) et l'augmentation du c-peptide après l'injection de glucagon. gl (groupe avec insuline) ; gOHA (groupe avec antidiabétiques oraux) selon Miyamoto M. et al (56)



Ils ont ainsi pu déterminer que pour un certain ratio mesuré chez un patient diabétique de type 2, ce dernier nécessitait une insulinothérapie.(56)

Cependant, il faut souligner que le test au glucagon n'explore pas l'effet incrétine et que de plus en plus de données de la littérature suggèrent l'utilisation d'un stimulus glucosé par voie orale.

Une autre étude a comparé la réponse bêta-cellulaire après HGPO et après un Repas Test dans trois populations de patients distinctes. Les trois groupes étaient constitués d'un groupe avec des patients normo-glycémique (NGM, n =161), un groupe avec des patients considérés comme insulino-résistant (IGM, n = 19) et un groupe de patient diabétiques de type 2 (DM = 20). Le dosage de la glycémie, de l'insulinémie et de la c-peptidémie ont été effectués pour chaque modèle. Le cycle durait 120 minutes avec des prélèvements toutes les 20 minutes (versus toutes les 60 minutes dans notre protocole). Cependant, la donnée "insulin (pmol/l)" représentait une combinaison de l'insulinémie et de la c-peptidémie. (Figure 31)

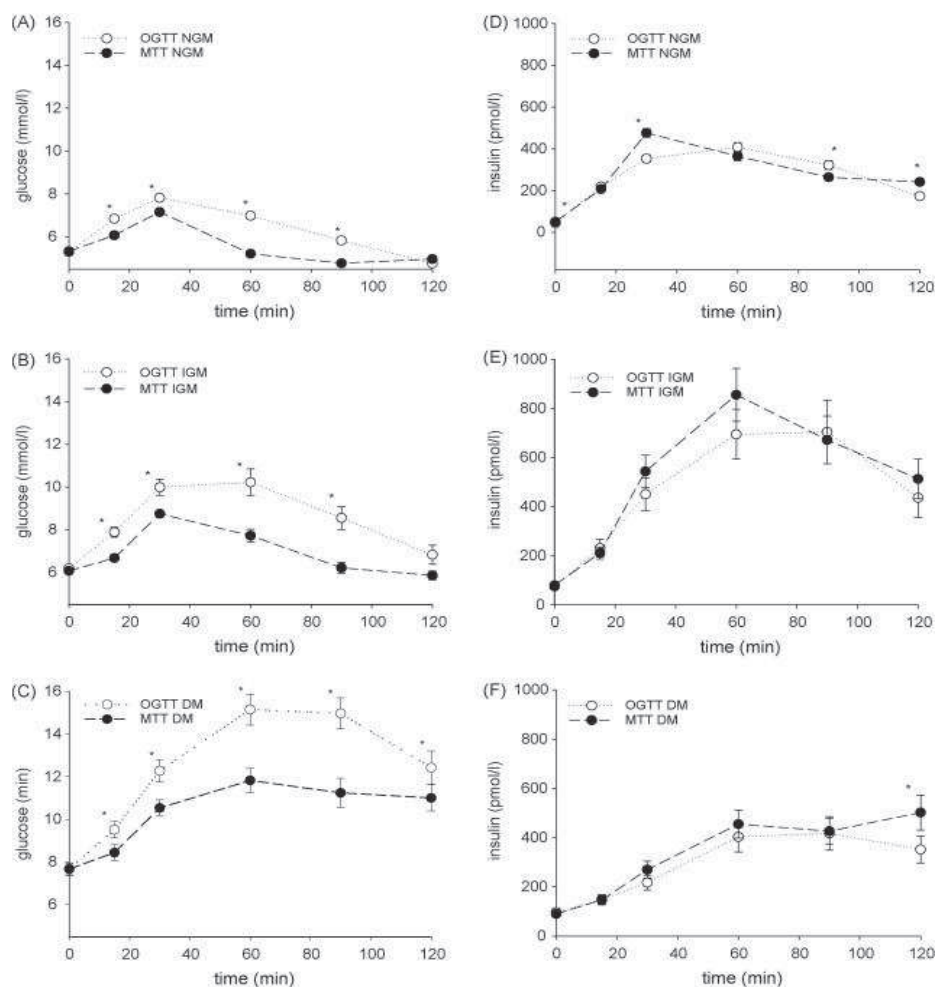


Figure 31. Réponse glycémique (A-C) et insulinique (D-F) (moyennes ± écart-type) suivant l'ingestion d'un repas mix standardisé (symboles noirs) ou d'une HGPO chez les sujets NGM, IGM ou DM selon Josina M. Rijkelijhuizen et al (57)

Cette étude a confirmé le caractère plus intéressant car plus physiologique du repas test par rapport à l'HGPO. En effet, elle a démontré la présence d'une réponse insulinique accentuée car compensatoire chez les IG voire retardée et prolongée chez les diabétiques. De même, la glycémie restait aussi logiquement à des valeurs pathologiques chez les diabétiques tandis qu'elle se normalisait rapidement chez les normoglycémiques. Enfin, l'étude montrait qu'il existait une meilleure réponse physiologique avec le repas test qu'avec l'HGPO puisque les sucres étaient absorbés de manière plus rapide lors du repas test et induisaient une réponse insulinique plus précoce. (57)

Enfin, une dernière étude incluant neuf diabétiques et neuf témoins avec un âge moyen de 24 ans, une HbA1c moyenne de 9 % et un âge moyen des diabètes de 7 ans, a démontré la différence entre un modèle statique et un modèle dynamique permettant de calculer de manière linéaire la fonction dose/réponse entre le glucose et l'insuline. L'étude aboutit aux résultats suivants : premièrement, elle suggère l'utilisation d'un modèle dynamique plutôt qu'un modèle statique pour mesurer l'insulinosécrétion puisque celui-ci permet de prendre en compte le retard de l'insulinosécrétion chez le patient diabétique. Deuxièmement, elle suggère l'utilisation d'un stimulus glucosé. Troisièmement, elle suggère l'utilisation de 3 repas tests afin de correspondre à la physiologie nutritionnelle normale bien qu'elle reconnaisse le frein induit par la répétition de ces repas test dans la reproductibilité du protocole. Quatrièmement, elle conseille l'utilisation du dosage du peptide C plutôt que celui de l'insuline car celui-ci règle le problème du premier passage hépatique de l'insuline.(58)

Un autre objectif du protocole mis en place dans notre étude fut la comparaison entre le dosage biologique de l'insuline et du peptide C. Pour cela, nous avons choisi une nouvelle fois de confronter les choix faits durant notre étude à la littérature. Concernant nos résultats, les cinétiques obtenues étaient plutôt identiques entre les deux paramètres avec un aspect en pic chez les témoins et un aspect en plateau/courbe ascendante pour les diabétiques. Malgré cela, nous avons choisi d'utiliser le dosage du c-peptide pour obtenir un cut-off prédictif puisque comme nous l'avons vu, il existe un léger décalage entre l'augmentation de l'insuline plasmatique et celle du c-peptide, cette dernière étant retardée. Cependant, aucun des deux dosages n'a posé plus de problèmes que l'autre au niveau pré-analytique et analytique puisque ceux-ci se faisaient sur les mêmes supports matériels (tube « sec ») et physiologiques « sang ». De même, les interférences principales qui ont induit une annulation de l'analyse étaient les mêmes à savoir l'hémolyse du sérum et un temps de transport au laboratoire trop élevé (>6h). De plus, la technique de dosage pour les deux paramètres était radicalement identique. Nous

nous sommes donc appuyés sur deux études pour justifier le choix du peptide C. La première est une revue publiée par R.Sapin et C.Demangeat traitant des « aspects analytiques des dosages d'insuline, peptide-c, proinsulines et glucagon »(59). Selon ces auteurs, le peptide-C serait un meilleur témoin de l'insulinosécrétion que l'insuline. En effet, sa présence prolongée dans le plasma/sérum en ferait un témoin moins fugace et en l'absence d'insuffisance rénale, sa concentration plasmatique serait un reflet de la sécrétion portale. Il peut être aussi dosé dans l'urine contrairement à l'insuline et le cas échéant, il donnerait un reflet de la sécrétion globale. Il ne présenterait pas d'effet crochet avec les anticorps anti-insuline et l'insuline exogène et la réactivité croisée avec les pro-insulines apparaîtrait également moins critique que pour le dosage de l'insuline. L'autre avantage du dosage du peptide C dans l'urine serait le shunt de tout effet crochet avec les proinsulines dont l'urine est dépourvue. Elle confirme aussi le fait que malgré la disponibilité de standards biosynthétiques, la standardisation des dosages resterait un problème puisqu'il apparaît clairement une grande variabilité des intervalles de référence ou l'analyse difficile des résultats des contrôles de qualité.

L'intérêt du c-peptide a été également discuté par l'étude de A.G. Jones et A.T. Hattersley (60) concernant le fait que le peptide C serait un meilleur voire un excellent reflet de l'insulinosécrétion particulièrement en l'absence d'insuffisance rénale. Selon les auteurs, l'utilisation du peptide C aurait son utilité 3 à 5 ans après le diagnostic de diabète comme marqueur discriminant le diabète de type 1, 2 ou monogénique. Au regard d'une grande variabilité inter-laboratoire et inter-technique, il n'existerait cependant pas de normes pour les différentes populations de diabétiques et l'auteur précise qu'il faudrait être prudent si la valeur obtenue lors du dosage est proche de la valeur seuil clinique fixée par le laboratoire en charge du diagnostic biologique, si cela doit entraîner une décision clinique. Elle confirme le choix fait dans notre étude puisque selon elle, le peptide C serait utile si associé à un test à jeun ou stimulé style repas test ou test au glucagon. En effet, il existerait une bonne corrélation entre le peptide C à jeun et le peptide c postprandial.

L'étude évoque l'idée d'utiliser un ratio C-peptide/Créatininémie afin de prendre en compte l'excrétion rénale du peptide c en fonction de la fonction néphronique. Utilisé en postprandiale, ce ratio donnerait des valeurs permettant de différencier un diabète de type 1 d'un MODY avec 97% de sensibilité et 98% de spécificité si C-peptide/créatinine  $\geq 0,2$  nmol/mmol. Cependant, cela ne permettrait pas de différencier un diabète de type 2 d'un MODY. Concernant le rôle clinique du dosage du peptide C, il permettrait selon l'étude d'exclure une carence absolue en insuline avant tentative d'arrêt de l'insuline chez un diabétique de type 2 étiqueté type 1 ou permettre la mise en place d'une insulinothérapie chez un

diabétique de type 2 de longue date ou l'ajout d'une thérapie orale dépendante de la sécrétion endogène d'insuline.

## Forces et limites de l'étude

Notre étude présente l'avantage de proposer un modèle simple, reproductible et robuste. En effet, le repas test proposé a été standardisé pour éviter les biais liés à des variations lors du pré-analytique (à l'origine de 70% des erreurs de diagnostic biologique). Sa composition est proche d'un petit déjeuner dit normal et est facilement ingérable par le patient. La faisabilité des prélèvements est satisfaisante puisque nous n'avons pas déploré de tubes manquants et seulement un prélèvement hémolysé. Enfin, si associé à une démarche d'assurance qualité avec respect de la traçabilité et des normes ISO 9001 15189 liées au pré-analytique, ce protocole aboutit à des résultats fiables.

Il existe cependant plusieurs limites à cette étude :

- Le nombre de patients diabétiques et témoins inclus dans l'étude est limitée.
- Il n'y a pas eu de suivi des patients (par exemple, dosage de l'HbA1c trois mois après un changement thérapeutique)
- Enfin, nous n'avons pas effectué de corrélation entre l'insuffisance rénale du patient et le dosage du peptide C.

## Perspectives de développement futur

La dispersion des valeurs du ratio c-peptide/glycémie permet de supposer que la capacité sécrétoire d'insuline était variable dans le groupe des patients, il conviendra d'évaluer si ce marqueur est prédictif de l'insulinopénie. Par exemple, nous nous sommes appuyés sur le cas d'un patient diabétique inclus dans l'étude, possédant une thérapeutique orale destinée à traiter son diabète de type 2 et présentant une cinétique en plateau avec des valeurs des rapport c-peptide/glycémie à t0 et t2 quasi similaires ( respectivement 7,22 et 7,32) et surtout un t1 le plus proche de 0 parmi tous les diabétiques ( 7,22). Le patient à la suite de son hospitalisation de semaine, a bénéficié d'un arrêt de sa thérapeutique orale au profit d'une mise sous insuline. Ainsi, il est resté le seul patient de l'étude à avoir été mis sous insuline.

Nous pourrions supposer que dans une perspective d'évolution thérapeutique, un patient diabétique présentant un rapport c-peptide/glycémie inférieur à 8 pourrait être considéré comme insulinopénique.

Cependant, afin de renforcer l'hypothèse de ce gradient, il serait bénéfique de réaliser ce même protocole avec un repas test sur une cohorte beaucoup plus grande entre les deux groupes afin de limiter la variabilité des résultats obtenus par notre étude et réaliser un lien de causalité entre un rapport c-peptide/glycémie à t1 < 8 et l'insulinopénie du patient.

Il serait intéressant aussi d'évaluer l'HbA1c des patients diabétiques inclus dans l'étude qui ont bénéficié d'un changement dans leur thérapeutique, trois mois après leur admission dans le service. Cela permettrait de mesurer l'impact bénéfique ou non du changement thérapeutique.

## Liste des Abréviations

ADO : Anti Diabétiques Oraux

ALD : Affection longue durée

ANAES : Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé

BMI : Body Mass Index

CRP : Protéine C reactive

CV : Circulum Vitae

GLP : Glucagon-Like Peptide

HbA1C : Hémoglobine A1C

HGPIV : Hyperglycémie Provoquée par voie Intra-Veineuse

HGPO : HyperGlycémie Provoquée par voie Orale

IG : Intolérant au Glucose

IL : Interleukine

IMC : Indice de Masse Corporelle

InVS : Institut de Veille Sanitaire

LDL : Low Density Lipoprotéine

MODY : Maturity Onset Diabetes of the Young

NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor appa B

NOS : Nitrite Oxyde synthase

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAI : Plasminogen Activator Inhibitor

RIA : RadioImmuno Assay

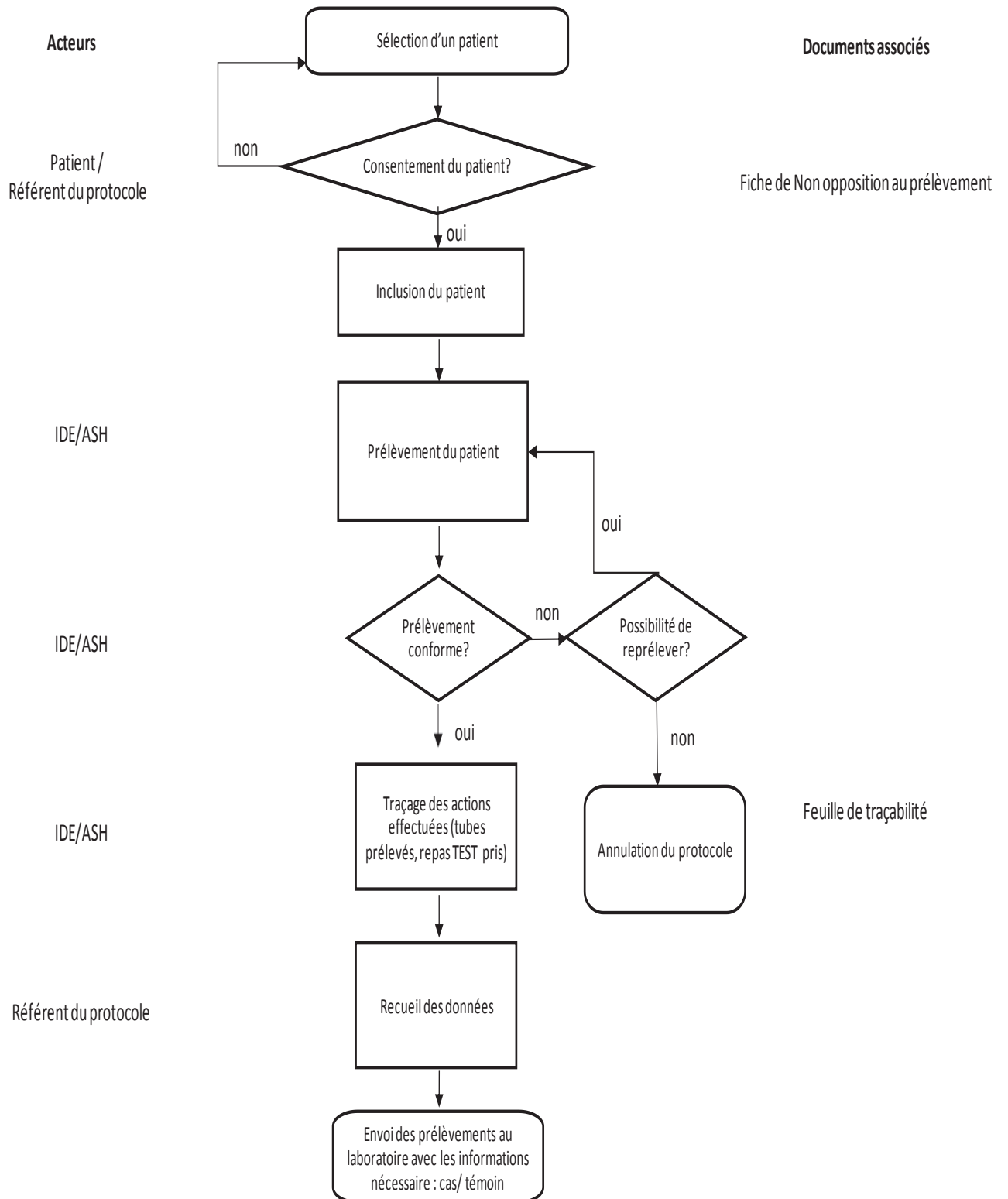
TNF : Tumor Necrosis Factor

VS : Versus



# **Annexes**

## Annexe 1



## Annexe 2

### FICHE DE TRACABILITE DU PROTOCOLE DE PRELEVEMENT

NOM DU PATIENT:

	FAIT	NON FAIT
PRELEVEMENT 8H		
PETIT DEJEUNER		
PRELEVEMENT 9H		
PRELEVEMENT 10H		

Mettre **HULOT Dorian Interne** en prescripteur

Rédigé par	Approuvé et vérifié par	Version du 20/11/2013
Dorian HULOT interne	Gaetan PREVOST PH	1.0

**Annexe 3**

FICHE DE TRACABILITE DU PROTOCOLE DE PRELEVEMENT

NOM DU PATIENT:

NOM DU PRELEVEUR

	FAIT				NON FAIT			
	Glycémie	C-peptide	insuline	26RFA	Glycémie	C-Peptide	Insuline	26RFA
PRELEVEMENT 8H								
PETIT DEJEUNER								
PRELEVEMENT 9H								
PRELEVEMENT 10H								

Remarque sur le déroulement du protocole (problème avec le repas test, avec les prélèvements, ressentis du patient etc...):

.....

.....

.....

.....

.....

Mettre **HULOT Dorian Interne** en prescripteur

Rédigé par	Approuvé et vérifié par	Version du 20/04/2014
Dorian HULOT interne	Gaetan PREVOST PH	1.2

# PROTOCOLE DE PRELEVEMENT

Thèse Justine BONS/ Dorian HULOT

## Objectif

- Mettre en place une méthode d'évaluation de l'insulinosécrétion chez les patients DT2 non insulinés dans une perspective d'évolution thérapeutique.

## CRITERES D'INCLUSION

### Pour les CAS

- Age : 40 à 75 ans
- Diabète type II traités
  - par régime seul
  - Antidiabétiques oraux (+/- analogues du GLP-1)
- Hospitalisés dans le service d'Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques au CHU de Rouen
- Motif :
  - diabète mal contrôlé
  - bilan annuel du diabète

### Pour les TEMOINS

- Age : 40 à 75 ans
- Hospitalisés dans le service d'Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques au CHU de Rouen

## CRITERE D'EXCLUSION

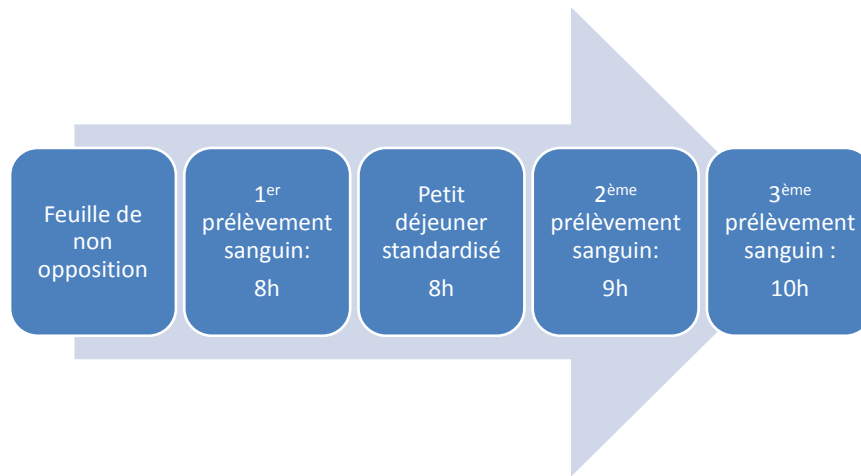
### Pour les CAS

- Diabétiques de type I
- Traitement par l'**Insuline**
- Hospitalisation pour acido-cétose ou coma hyperosmolaire
- Diabète secondaire

### Pour les TEMOINS

- Diabétiques ou intolérants au glucose

## Méthodologie du petit déjeuner standardisé



## Composition du Petit Déjeuner standardisé

	Quantité		Protéine	Lipide	Glucides	
Thé ou café	250	ml	0	0	0	
Biscotte	4	unité	3.20	1.40	21.60	
Beurre	1	unité	0.07	8.20	0.09	
			3.27	9.60	21.69	
	Apport calorique		13.08	86.40	86.74	
	Apport calorique total		186.22			kcal
			778.40			kj

# MODALITES DE PRELEVEMENT

## Glycémie à jeun

Analyte : Glucose  
Principe de la méthode: Méthode enzymatique (Hexokinase)  
Fiche de prescription: Examen 24/24h – IBCore

Laboratoire réalisant l'analyse : Biochimie

Réception des prélèvements : 24/24h , 7j/7

### Prélèvement

- Nature : Sang
- Contenant : Tube **fluoré**
- Conditions : **A jeûn depuis 8h**
- Sérothèque : non

### Transport

- Température : **ambiante**
- Délai d'acheminement : **4 heures**
- Prélèvement avant transport : **conserver à +4°C**

### Rendu du résultat

- Jour ou fréquence de réalisation : 7jours/7
- Délai maximum : 1 jours
- Réalisable en urgence : oui

## Glycémie post-prandiale

Analyte : Glucose  
Principe de la méthode: Méthode enzymatique (Hexokinase)  
Fiche de prescription: Examen 24/24h – IBCore

Laboratoire réalisant l'analyse : Biochimie

Réception des prélèvements : 24/24h , 7j/7

### Prélèvement

- Nature : Sang
- Contenant : Tube **fluoré**
- Conditions : **aucune**
- Sérothèque : non

### Transport

- Température : **ambiante**
- Délai d'acheminement : **4 heures**
- Prélèvement avant transport : **conserver à +4°C**

### Rendu du résultat

- Jour ou fréquence de réalisation : 7jours/7
- Délai maximum : 1 jours
- Réalisable en urgence : oui

## INSULINEMIE

Analyte : Insuline  
Principe de la méthode: electrochimiluminescence "ECLIA"/  
méthode type "sandwich"  
Fiche de prescription: Immuno analyse – LBC becquerel

Laboratoire réalisant l'analyse : Biochimie becquerel

Réception des prélèvements : **8h30 -17h30 lundi au vendredi**  
; **8h30 – 12h le samedi.**

### Prélèvement

- Nature : **Sang**
- Contenant : **Tube neutre(1ere intention), tube EDTA (2<sup>ème</sup> intention)**
- Conditions : **aucune**
- Sérothèque : non

### Transport

- Température : **+4°C**
- Délai d'acheminement : 6 heures
- Prélèvement avant transport : conserver à +4°C (24H)

### Rendu du résultat

- Jour ou fréquence de réalisation : Bi hebdomadaire
- Délai maximum : J0 à J3
- Réalisable en urgence : non

Normales: 36 – 179 pmol/L

## C-PEPTIDE

Analyte : C-peptide  
Principe de la méthode: electrochimiluminescence "ECLIA"/  
méthode type "sandwich"  
Fiche de prescription: Immuno analyse – LBC becquerel

Laboratoire réalisant l'analyse : Biochimie becquerel

Réception des prélèvements : **8h30 -17h30 lundi au vendredi**  
; **8h30 – 12h le samedi.**

### Prélèvement

- Nature : **Sang, Urine**
- Contenant : **Tube neutre(1ere intention), tube EDTA (2<sup>ème</sup> intention)**
- Conditions : **aucune**
- Sérothèque : non

### Transport

- Température : **+4°C**
- Délai d'acheminement : 6 heures
- Prélèvement avant transport : conserver à +4°C (24H)

### Rendu du résultat

- Jour ou fréquence de réalisation : Bi hebdomadaire
- Délai maximum : J0 à J3
- Réalisable en urgence : non

Normales

+ prélever un **tube neutre à chaque temps**,  
centrifuger et congeler le sérum pour le **26RFA**



## Résumé modalité de Prélèvement

- Prélever à 8h (avant petit déjeuner)
  - 3 tubes sec (marron)
  - 1 tube fluoré (gris)
- Prélever à 9h (ou une heure plus tard)
  - 3 tubes sec (marron)
  - 1 tube fluoré (gris)
- Prélever à 10 (ou une heure plus tard)
  - 3 tubes sec (marron)
  - 1 tube fluoré (gris)

## Modalité de Prescription

- Pour chaque patient
  - Clinique : taille,poids, **TOUR DE TAILLE (systématiquement)**, IMC/BMI, durée du diabète pour les DT2
  - Biologie:  
Prescrire si possible avec le Repas Test et sur la même fiche de prescription pour les cas ET les témoins:
    - Cycle glycémique : T0 (8h), T1 (9h), T2 (10h)
    - Cycle insulinique : idem
    - Cycle peptique C : idem
    - Cycle 26RFA : idem
    - EAL
    - Bilan rénale: microalbuminurie, créatininémie.
    - HbA1c
- **NB: bien noter sur la fiche de prescription, nom, prénom, âge, poids, renseignements cliniques**

## Bibliographie

1. Whorwood CB1, Donovan SJ, Flanagan D, Phillips DI, Byrne CD. Le fardeau mondial. [cité 26 mai 2014]; Disponible sur: <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/fr/le-fardeau-mondial?language=fr>
2. Prévalence et incidence du diabète, et mortalité liée au diabète en France / 2010 / Maladies chroniques et traumatismes / Rapports et synthèses / Publications et outils / Accueil [Internet]. [cité 27 mai 2014]. Disponible sur: <http://www.invs.sante.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-chroniques-et-traumatismes/2010/Prevalence-et-incidence-du-diabete-et-mortalite-liee-au-diabete-en-France>
3. Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest.* sept 1999;104(6):787-94.
4. Björklund A, Lansner A, Grill VE. Glucose-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> abnormalities in human pancreatic islets: important role of overstimulation. *Diabetes.* nov 2000;49(11):1840-8.
5. Carpentier A, Mittelman SD, Bergman RN, Giacca A, Lewis GF. Prolonged elevation of plasma free fatty acids impairs pancreatic beta-cell function in obese nondiabetic humans but not in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes.* mars 2000;49(3):399-408.
6. Unger RH, Zhou YT. Lipotoxicity of beta-cells in obesity and in other causes of fatty acid spill-over. *Diabetes.* févr 2001;50 Suppl 1:S118-21.
7. Ashcroft FM, Gribble FM. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia.* août 1999;42(8):903-19.
8. Postic C, Mauvais-Jarvis F, Girard J. Que nous apprennent les souris génétiquement modifiées sur la physiopathologie du diabète de type 2 ? *Médecine Thérapeutique Endocrinol Reprod.* 21 mai 2002;4(1):53-62.
9. Whorwood CB1, Donovan SJ, Flanagan D, Phillips DI, Byrne CD. Increased glucocorticoid receptor expression in hum... [Diabetes. 2002] - PubMed - NCBI. 5141066-75 [Internet]. avr 2002 [cité 26 juin 2014]; Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=whorwood+C%2C+donovan+s+increased+glucocorticoid>
10. Mikaela Sjöstrand , Agneta Holmäng , Peter Lönnroth. Measurement of interstitial insulin in human muscle. Vol 276no E151-E154. 1 janv 1999;
11. Roden M, Krssak M, Stingl H, Gruber S, Hofer A, Fürnsinn C, et al. Rapid impairment of skeletal muscle glucose transport/phosphorylation by free fatty acids in humans. *Diabetes.* févr 1999;48(2):358-64.

12. Blaak EE, Wagenmakers AJ, Glatz JF, Wolffenbuttel BH, Kemerink GJ, Langenberg CJ, et al. Plasma FFA utilization and fatty acid-binding protein content are diminished in type 2 diabetic muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* juill 2000;279(1):E146-54.
13. Ferreira LD, Pulawa LK, Jensen DR, Eckel RH. Overexpressing human lipoprotein lipase in mouse skeletal muscle is associated with insulin resistance. *Diabetes.* mai 2001;50(5):1064-8.
14. Teruel T, Hernandez R, Lorenzo M. Ceramide mediates insulin resistance by tumor necrosis factor-alpha in brown adipocytes by maintaining Akt in an inactive dephosphorylated state. *Diabetes.* nov 2001;50(11):2563-71.
15. Lindsay JR, McKillop AM, Mooney MH, O'Harte FPM, Bell PM, Flatt PR. Demonstration of increased concentrations of circulating glycosylated insulin in human Type 2 diabetes using a novel and specific radioimmunoassay. *Diabetologia.* avr 2003;46(4):475-8.
16. Cooksey RC, Hebert LF, Zhu JH, Wofford P, Garvey WT, McClain DA. Mechanism of hexosamine-induced insulin resistance in transgenic mice overexpressing glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase: decreased glucose transporter GLUT4 translocation and reversal by treatment with thiazolidinedione. *Endocrinology.* mars 1999;140(3):1151-7.
17. Crook ED, McClain DA. Regulation of glycogen synthase and protein phosphatase-1 by hexosamines. *Diabetes.* mars 1996;45(3):322-7.
18. Filippis A, Clark S, Proietto J. Increased flux through the hexosamine biosynthesis pathway inhibits glucose transport acutely by activation of protein kinase C. *Biochem J.* 15 juin 1997;324 ( Pt 3):981-5.
19. Magnusson I, Rothman DL, Katz LD, Shulman RG, Shulman GI. Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance study. *J Clin Invest.* oct 1992;90(4):1323-7.
20. Saloranta C, Koivisto V, Widén E, Falholt K, DeFronzo RA, Härkönen M, et al. Contribution of muscle and liver to glucose-fatty acid cycle in humans. *Am J Physiol.* avr 1993;264(4 Pt 1):E599-605.
21. Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature.* 18 juin 1998;393(6686):684-8.
22. Principes de dépistage du diabète de type 2 - Rapport [Internet]. [cité 11 juin 2014]. Disponible sur: [http://www.has-sante.fr/portail/plugins/ModuleXitiKLEE/types/FileDocument/doXiti.jsp?id=c\\_267634](http://www.has-sante.fr/portail/plugins/ModuleXitiKLEE/types/FileDocument/doXiti.jsp?id=c_267634)
23. C Augereau, J-P Couaillac, D De Mouy, J-F Dézier, M Fonfrède, J-P Lepargneur, A Szymonowicz, J Watine, Service de biochimie, Hôpital européen Georges Pompidou, Paris, Service de biologie, Hôpital de Cahors, Laboratoire de biologie privé, Paris, Laboratoire de biologie privé, Bain-de-Bretagne, Service de biochimie, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, Laboratoire de biologie privé, Toulouse, Service de biologie, Hôpital de Roanne, Service de biologie, Hôpital de Rodez. Dépistage et diagnostic du diabète gestationnel : évaluation de la qualité méthodologique des avis de la Haute autorité de santé, de l'American diabetes association et de l'Organisation mondiale de la santé. *Annales de Biologie Clinique* Volume 68, Numéro 1, 113-9, janvier-février 2010, qualité-accréditation.

Annales de Biologie Clinique. Volume 68, Numéro 1, 113-9, janvier-février 2010, qualité-accréditation. 2010;

24. John WG, UK Department of Health Advisory Committee on Diabetes. Use of HbA1c in the diagnosis of diabetes mellitus in the UK. The implementation of World Health Organization guidance 2011. *Diabet Med J Br Diabet Assoc.* nov 2012;29(11):1350-7.

25. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol.* sept 1979;237(3):E214-23.

26. Bergman RN, Prager R, Volund A, Olefsky JM. Equivalence of the insulin sensitivity index in man derived by the minimal model method and the euglycemic glucose clamp. *J Clin Invest.* mars 1987;79(3):790-800.

27. Mather KJ, Hunt AE, Steinberg HO, Paradisi G, Hook G, Katz A, et al. Repeatability characteristics of simple indices of insulin resistance: implications for research applications. *J Clin Endocrinol Metab.* nov 2001;86(11):5457-64.

28. Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, et al. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* juill 2000;85(7):2402-10.

29. Haffner SM, Kennedy E, Gonzalez C, Stern MP, Miettinen H. A prospective analysis of the HOMA model. The Mexico City Diabetes Study. *Diabetes Care.* oct 1996;19(10):1138-41.

30. Hanley AJG, Williams K, Gonzalez C, D'Agostino RB Jr, Wagenknecht LE, Stern MP, et al. Prediction of type 2 diabetes using simple measures of insulin resistance: combined results from the San Antonio Heart Study, the Mexico City Diabetes Study, and the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes.* févr 2003;52(2):463-9.

31. Bastard JP, Jan V, Maachi M, Rabasa-Lhoret R, Jardel C, Bruckert E, et al. Incorporation of non esterified fatty acids into QUICKI is not relevant in obese subjects during diet inducing weight loss. *Diabetes Metab.* sept 2002;28(4 Pt 1):333-4.

32. Duncan GE, Hutson AD, Stacpoole PW. QUICKI is not a useful and accurate index of insulin sensitivity following exercise training. *J Clin Endocrinol Metab.* févr 2002;87(2):950-1.

33. Katsuki A, Sumida Y, Urakawa H, Gabazza EC, Murashima S, Morioka K, et al. Neither homeostasis model assessment nor quantitative insulin sensitivity check index can predict insulin resistance in elderly patients with poorly controlled type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* nov 2002;87(11):5332-5.

34. Schmitz O, Brock B, Hollingdal M, Juhl CB, Pørksen N. High-frequency insulin pulsatility and type 2 diabetes: from physiology and pathophysiology to clinical pharmacology. *Diabetes Metab.* déc 2002;28(6 Suppl):4S14-20.

35. Robertson RP. Type II diabetes, glucose « non-sense, » and islet desensitization. *Diabetes.* déc 1989;38(12):1501-5.

36. Grimaldi A. Traité de diabétologie. Médecine Sciences Publications; 2005. 961 p.
37. Castillo MJ, Scheen AJ, Letiexhe MR, Lefèbvre PJ. How to measure insulin clearance. *Diabetes Metab Rev.* juill 1994;10(2):119-50.
38. Scheen AJ. Pathophysiology of insulin secretion. *Ann Endocrinol.* févr 2004;65(1):29-36.
39. Faber OK, Binder C. C-peptide response to glucagon. A test for the residual beta-cell function in diabetes mellitus. *Diabetes.* juill 1977;26(7):605-10.
40. Scheen AJ, Castillo MJ, Lefèbvre PJ. Assessment of residual insulin secretion in diabetic patients using the intravenous glucagon stimulatory test: methodological aspects and clinical applications. *Diabetes Metab.* déc 1996;22(6):397-406.
41. Castillo MJ, Scheen AJ, Paolisso G, Lefebvre PJ. Exhaustion of blood glucose response and enhancement of insulin response after repeated glucagon injections in type-2 diabetes: potentiation by progressive hyperglycemia. *Ann Endocrinol.* 1996;57(5):395-402.
42. Scheen AJ, Castillo MJ, Lefèbvre PJ. Glucagon-induced plasma C-peptide response in diabetic patients. Influence of body weight and relationship to insulin requirement. *Diabetes Metab.* déc 1996;22(6):455-8.
43. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Kirkman MS, et al. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* juin 2011;34(6):e61-99.
44. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* janv 2011;34(Suppl 1):S62-9.
45. Troisi RJ, Cowie CC, Harris MI. Diurnal variation in fasting plasma glucose: implications for diagnosis of diabetes in patients examined in the afternoon. *JAMA J Am Med Assoc.* 27 déc 2000;284(24):3157-9.
46. Chan AY, Swaminathan R, Cockram CS. Effectiveness of sodium fluoride as a preservative of glucose in blood. *Clin Chem.* févr 1989;35(2):315-7.
47. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2013. *Diabetes Care.* janv 2013;36 Suppl 1:S11-66.
48. Ladenson JH, Tsai LM, Michael JM, Kessler G, Joist JH. Serum versus heparinized plasma for eighteen common chemistry tests: is serum the appropriate specimen? *Am J Clin Pathol.* oct 1974;62(4):545-52.
49. Fraser CG. The necessity of achieving good laboratory performance. *Diabet Med J Br Diabet Assoc.* juill 1990;7(6):490-3.
50. Lacher DA, Hughes JP, Carroll MD. Estimate of biological variation of laboratory analytes based on the third national health and nutrition examination survey. *Clin Chem.* févr 2005;51(2):450-2.

51. Selvin E, Crainiceanu CM, Brancati FL, Coresh J. Short-term variability in measures of glycemia and implications for the classification of diabetes. *Arch Intern Med.* 23 juill 2007;167(14):1545-51.
52. Miller WG, Thienpont LM, Van Uytvanghe K, Clark PM, Lindstedt P, Nilsson G, et al. Toward Standardization of Insulin Immunoassays. *Clin Chem.* 1 mai 2009;55(5):1011-8.
53. Wiedmeyer H-M, Polonsky KS, Myers GL, Little RR, Greenbaum CJ, Goldstein DE, et al. International Comparison of C-Peptide Measurements. *Clin Chem.* 1 avr 2007;53(4):784-7.
54. Little RR, Rohlfing CL, Tennill AL, Madsen RW, Polonsky KS, Myers GL, et al. Standardization of C-Peptide Measurements. *Clin Chem.* 10 avr 2008;54(6):1023-6.
55. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med J Br Diabet Assoc.* juill 1998;15(7):539-53.
56. Miyamoto M. [Indicators for insulin therapy in late elderly patients with type 2 diabetes mellitus--the relationship between plasma C-peptide on glucagon load test and insulin therapy]. *Nihon Ronen Igakkai Zasshi Jpn J Geriatr.* mai 2009;46(3):244-9.
57. Rijkeljkhuizen JM, Girman CJ, Mari A, Alsema M, Rhodes T, Nijpels G, et al. Classical and model-based estimates of beta-cell function during a mixed meal vs. an OGTT in a population-based cohort. *Diabetes Res Clin Pract.* févr 2009;83(2):280-8.
58. Mari A, Tura A, Gastaldelli A, Ferrannini E. Assessing Insulin Secretion by Modeling in Multiple-Meal Tests Role of Potentiation. *Diabetes.* 2 janv 2002;51(suppl 1):S221-6.
59. Sapin R, Demangeat C. Aspects analytiques des dosages d'insuline, peptide-C, proinsulines et glucagon. *Médecine Nucl.* 2001;25(2):73-84.
60. Jones AG, Hattersley AT. The clinical utility of C-peptide measurement in the care of patients with diabetes. *Diabet Med.* juill 2013;30(7):803-17.

## SERMENT DE GALIEN

Je jure d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.

