UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Projet de Fin d'Études

Licence Sciences & Techniques
Sciences Biologiques Appliquées et Santé
(LST - SBAS)

Le dosage de l'HbA1c dans le suivi des malades diabétiques

Présenté par : CHIKH NOUHA

Encadré par : Pr EL FARRICHA OMAR (FST Fès)

Dr AMEZIANE HASSANI FOUAD (Labo Abou Inane)

Soutenu le : 08/06/2018

Devant le jury composé de :

- **Pr EL FARRICHA Omar**
- **Dr AMEZIANE HASSANI Fouad**
- **Pr EL GUISSI Sanae**

Stage effectué au laboratoire Abou Inane d'Analyses Médicales
Année universitaire 2017-2018

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail:
À ceux qui ont attendu avec patience le fruit de leurs bonnes éducations, ma source de tendresse et d'amour, vous m'avez élevé dans l'honneur et dans la vertu.....
Mes très chers Parents.

****

À mes frères et sœurs, je suis faite du même métal que vous, et j'estime votre valeur, votre aide, aussi bien que votre amour protecteur.

****

À ceux qui étaient toujours présents durant cette année, j'ai passé les plus difficiles moments de ma vie, mais grâce à votre encouragement, amour et fidélité, j'étais capable de tout surmonter, même la douleur de tout perdre.....
Vous méritez à mes yeux le titre de meilleurs (es) amis (es).

****

À vous aussi cher lecteur, lectrice.....

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord ***Pr EL FARRICHA Omar,*** *professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès d'avoir bien accepté d'encadrer mon travail, pour sa rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et son soutien ainsi de son suivi pendant la période de stage.*

Mes sincères remerciements s'adressent particulièrement à

Dr AMEZIANE HASSANI Fouad, *Ex Médecin chef labo régional Hôpital Al Ghassani CHU Hassan II et chef de labo actuel, pour m'avoir accepté au sein de son laboratoire et m'avoir assuré toutes les conditions afin que je puisse effectuer mon stage dans des meilleures formes.*

Pr EL GUISSI Sanae *d'avoir accepté de faire partie de ce jury et de sacrifier une partie de votre temps pour examiner mon travail.*

Je remercie également les deux techniciens ***OTHMANE*** *et* ***SAID*** *qui ont facilité la tâche et la rendu plus agréable, ce qui a contribué à la réussite de ce modeste projet de fin d'étude.*

Je profite par le biais de ce rapport, pour exprimer mes remerciements à toute personne qui a aidé, de près ou de loin, au succès de ce travail

SOMMAIRE

Remerciement iii
Liste des figures vi
Liste des abréviations vii
Présentation du lieu de stage viii
Résumé ix
Introduction 1

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

A. Le diabète 3
1. Définition 3
2. Les types de diabète 4
- **Diabète type 1(DID):** 4
- **Diabète type 2(DNID)** 4
- **Diabète gestationnel(DG) :** 4

B. L'hémoglobine glyquée HbA1c 5
1. L'hémoglobine 5
1.1. Définition 5
1.2. Les fractions d'hémoglobine 6
2. L'hémoglobine glyquée 7
2.1. Définition 7
2.2. L'HbA1c et le diabète 7
2.3. Biopathologie 8
2.4. Indications du dosage 9
2.5. La corrélation entre le taux d'HbA1c et la glycémie moyenne : 9
2.6. Techniques de dosage spécifique d'HbA1c 10
- ❖ **La CLHP** 10
- ❖ **Immunoessais** 12
- ❖ **Électrophorèse** 12

2.7. Standardisation 13
2.8. Limites de dosage d'HbA1c 13

Chapitres II: Matériel et Méthodes

I. Population étudiée **16**

1. Techniques de dosage **16**

1.1. **Échantillon** **16**

1.2. **Mode opératoire :** **17**

Chapitres III: Résultats et Discussion

Résultats **20**

Discussion **23**

Conclusion **25**

Références bibliographiques **26**

Références webographiques **27**

Liste des figures

Figure 1 : Diabète (DID) et (DNID).

Figure2: Schéma descriptif de la structure d'hémoglobine.

Figure3: Schéma représentant le pourcentage des fractions d'hémoglobine humain

Figure4: Schéma des différentes fractions d'HbA1.

Figure5: Relation entre HbA1c et glycémie moyenne selon le DCCT ou glycémie estimée selon l'étude ADAG.

Figure6: Schéma des deux phases constituantes la colonne chromatographique.

Figure7: Les étapes d'un prélèvement sanguin

Figure8: Schéma de principe d'une chaine HPLC

Figure 9: L'analyseur automatisé D10 d'hémoglobine glyquée d'HbA1c

Figure 10: le chromatogramme du dosage d'HbA1c chez 3 patients différents

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Relation entre HbA1c et glycémie moyenne selon le DCCT ou glycémie estimée selon l'étude ADAG.

Tableau 2: Critères d'interprétation des résultats selon le pourcentage d'HbA1c.

Liste des abréviations

ADAG: A1c-Derived Average Glucose.

CLHP: Chromatographie Liquide à Haute Performance**.**

DCCT: Diabetes Control and Clinical Trial.

Hb: Hémoglobine**.**

HbA1c: Hémoglobine glyquée.

IFCC: International Federation of Clinical Chemistry.

NGSP: National Glycohemoglobin Standardization Program.

UKPDS: United Kingdom Prospective Study of Diabetes.

SFBC: Société Française de Biologie Clinique.

SFD : Société Francophone de Diabétologie.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Présentation du lieu de stage

Le laboratoire ***ABOUINANE*** d'analyses médicales:

Au sein de la résidence ***ATTAJ***, avenue ***ECCHERIF RADI*** il est conçu comme un pôle de plusieurs types d'analyse (biochimie, bactériologie, immunologie, hématologie, hormonologie, parasitologie, virologie).

Il est composé de :

- Salle de réception.
- Salle d'attente.
- Salle de prélèvement.
- Le bureau de docteur ***AMEZIANE***.
- Laboratoire

Laboratoire ***ABOU INANE*** est doté de presque 15 appareils à différentes fonctions je site parmi eux les deux que j'ai utilisé le plus:

Une chromatographie liquide à haute performance (**CLHP**) ; l'analyseur d'hémoglobine glyquée de Bio-Rad (**D10**) et (**l'HLC-723GX**).

Résumé

Au fil des années, le diabète est devenu une des maladies mortelles les plus connues à l'échelle mondiale.
Pour lutter contre cette maladie et minimiser ses risques, la NGSP et l'IFCC ont confirmé le dosage d'hémoglobine glyquée dans le cadre de la surveillance et la prévention des complications liées à cette pathologie.

Notre étude a consisté à effectuer sur des malades diabétiques, le dosage de l'hémoglobine glyquée durant les trois mois de la vie érythrocytaire et à mettre en évidence les avantages de ce dosage, et détailler plus profondément les limites rencontrées au cours du dosage.

Afin de mieux éclaircir le protocole effectué au sein du laboratoire, 3 rapports de 3 patients différents vont être interprétés. Ces patients présentent les fractions d'hémoglobine dans le sang et qui sont révélées par l'analyseur D10 qui utilise la CLHP comme méthode de dosage spécifique d'HbA1c et qui est la méthode la plus fiable.

Introduction

Selon l'OMS la maladie diabète est l'une des principales causes mortelles du monde avec l'hypertension artérielle. 422 millions de personnes au niveau mondial sont affectés par le diabète [14].

C'est une maladie chronique, silencieuse et indolore, caractérisée par un taux de glucose très élevé (hyperglycémie), suite à un défaut de sécrétion de glucose ou d'utilisation d'insuline (la seule hormone hypoglycémiante dans l'organisme).

Il existe principalement le diabète de type 1, le diabète de type 2 et le diabète gestationnel avec quelques types rares.

Cette pathologie est accompagnée de plusieurs complications au niveau du cerveau, des yeux, des reins, des nerfs… Une bonne équilibration du taux de glucose est obligatoire, pour minimiser les risques de ces complications.
Pour cela les chercheurs ont choisi le dosage d'hémoglobine glyquée l'HbA1c (la forme glyquée d'hémoglobine) comme méthode de surveillance et de diagnostic du diabète.

Après plusieurs études d'optimisation des techniques de dosage et de standardisation des résultats, par plusieurs pôles de recherche tels que la NGSP et l'IFCC, il est actuellement assumé que la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) est la technique la plus fiable pour ce type de dosage.

Notre étude a pour but de surveiller le diabète, le contrôler, de définir son type pour donner le traitement approprié et de prévenir les risques liées à cette maladie.

Chapitre I :

Synthèse Bibliographique

A. Le diabète

1. Définition

Le diabète est une maladie chronique qui se développe graduellement sur une très longue période et qui dure toute la vie. Elle ne se guérit pas, mais elle peut être contrôlée et traitée. Cette maladie est engendrée suite à un manque ou un défaut d'utilisation d'insuline.
L'insuline est la seule hormone hypoglycémiante, secrétée par bouffées toutes les 10 min (sécrétion de base) par les cellules β pancréatiques.

Cette épidémie est peut être liée au vieillissement de la population, une mauvaise alimentation, à l'obésité ou au manque d'exercice physique.

Chez un individu non diabétique, l'insuline permet aux cellules d'utiliser le glucose comme carburant, pour profiter d'énergie dont ils ont besoin. Une personne diabétique ne peut plus utiliser le glucose comme source d'énergie ; d'où l'apparition de plusieurs complications au niveau des yeux, des reins, des nerfs, du cœur et des vaisseaux (figure1).

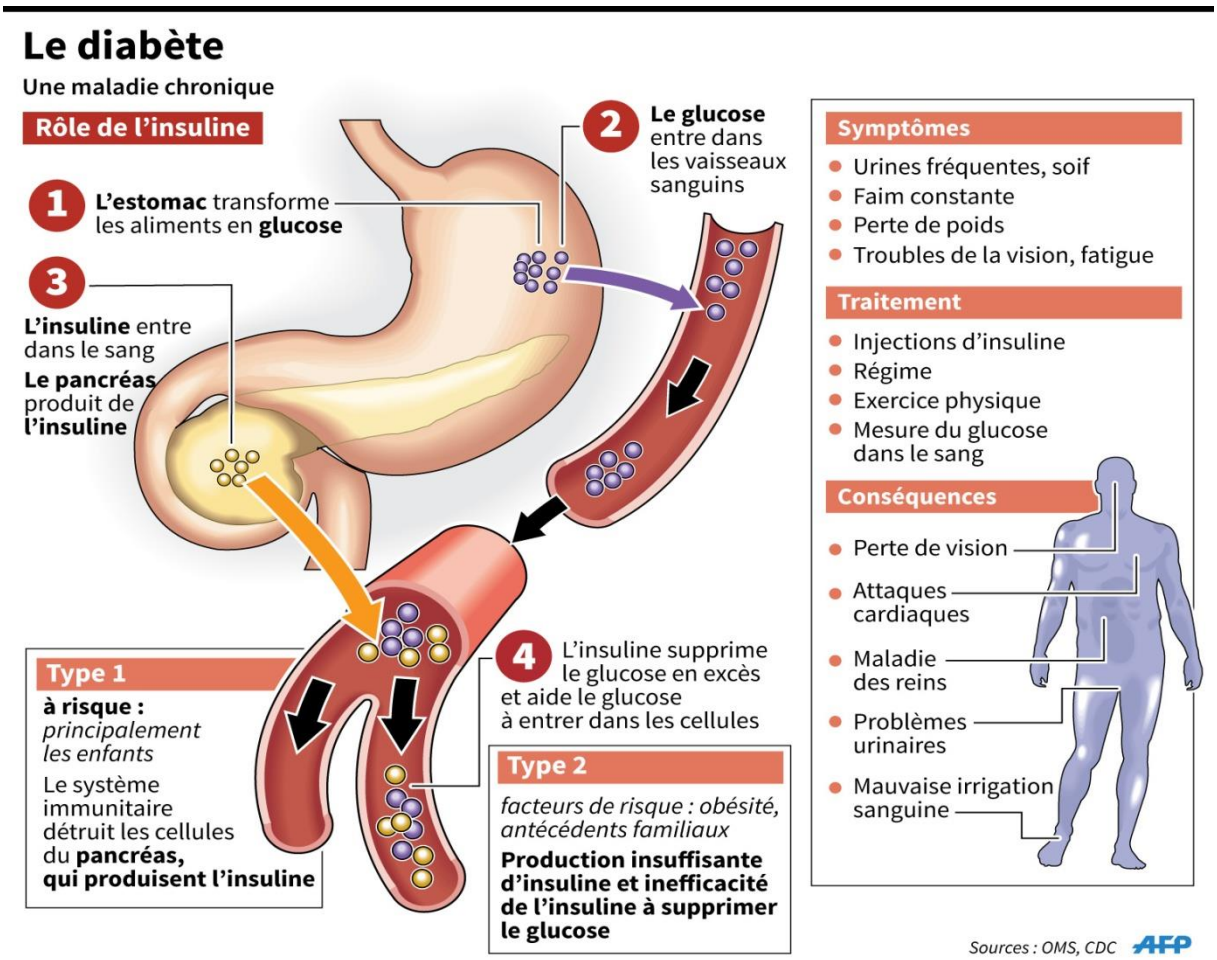

Figure 1 : Diabète (DID) et (DNID) [15].

Le diabète se défini par une hyperglycémie chronique, ou par une glycémie moyenne:

- à jeun : supérieure à 7mmol/l à 2 reprises.
- Après 2h d'une charge de glucose : supérieure à 11,1mmol/l
- Ponctuelle : supérieure à 11,1mmol/l [7]

2. Les types de diabète

- Diabète type 1(DID): Touche 10% des personnes diabétiques dans le monde, c'est le résultat d'une insulinopenie résultante d'une destruction des cellules β sécrétrices d'insuline par le système immunitaire. Le processus de destruction débute avant l'apparition des symptômes de la maladie et évolue habituellement pendant plusieurs années. Dans la chronologie de la pathologie, la production d'anticorps reconnaissant des antigènes de la cellule béta pancréatique précède la destruction des cellules béta et l'apparition de la maladie [1].

- Diabète type 2(DNID) : Le plus fréquent (90% des cas), il se manifeste généralement à l'âge adulte. Chez les personnes diabétiques de type2, la maladie est associée à : un déclin de la production d'insuline à cause d'une incapacité de sécrétion par les cellules β, ou une male utilisation par les tissus cibles, tels que le foie, les muscles et le tissu adipeux (résistante à l'insuline), aussi bien qu'une réduction de la masse des cellules β pancréatiques suite à une apoptose ou un excès d'apport lipidique. L'âge et l'obésité sont des facteurs de risque majeurs de cette maladie.

- Diabète gestationnel(DG) : Appelé aussi diabète de grossesse, caractérisé par une hyperglycémie durant la période de grossesse, ses valeurs sont supérieures à la norme, mais inférieures au seuil du diagnostic de diabète.
  S'il y a un risque accru de diabète pendant la grossesse, c'est que la grossesse est par nature diabétogène car il existe physiologiquement pendant cette période un état d'insulinorésistance qui va s'aggraver progressivement au cours de la grossesse.
  Dans tous les cas, le diabète gestationnel doit être surveillé et traité car il comporte un risque pour la mère comme pour l'enfant [12].

B. L'hémoglobine glyquée HbA1c

1. L'hémoglobine

1.1.Définition

L'hémoglobine est une métalloprotéine responsable du transport d'oxygène, des poumons, vers les cellules des tissus cibles, pour assurer la respiration cellulaire et fournir de l'énergie nécessaire au métabolisme. L'hémoglobine est une molécule hétérotétramérique formée de deux chaines α(α1 ; α2) et deux chaines β (β1 ; β2) (figure2).

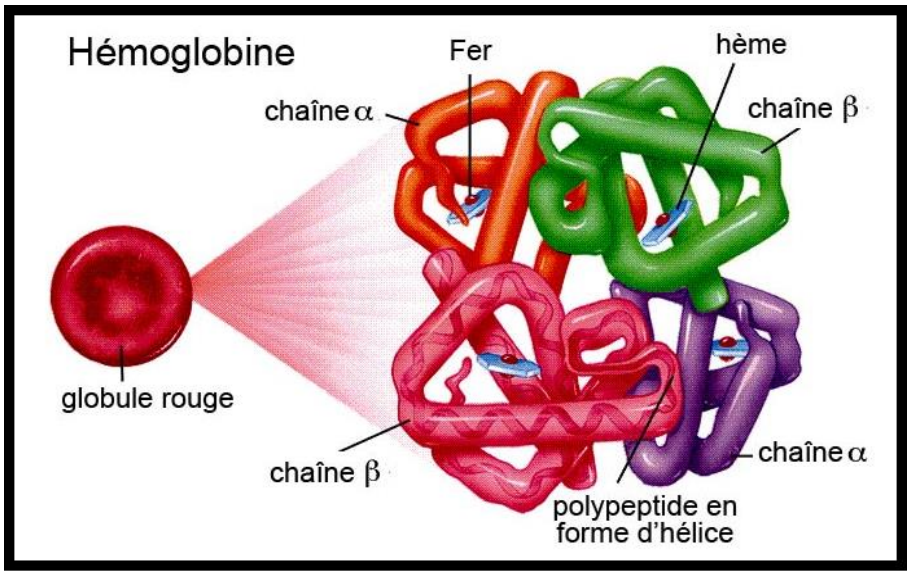

Figure 2 : Schéma descriptif de la structure d'hémoglobine [16]

Chacune des quatre chaînes est associée à un groupe prosthétique, (molécule organique non protéique maintenue dans une structure protéique) appelé hème, et constituée d'un cation de fer complexé avec une porphyrine. L'Hb est donc une hémoprotéine (figure2).

L'hémoglobine présente 96% de la matière sèche des globules rouge, et 35% de leurs contenus total en incluant l'eau [2].

Chaque molécule d'Hb peut fixer quatre molécules d'oxygène, donc il a un rôle capital dans le transport des gaz. Cette capacité lui permet de transporter 1,34 ml d'O_2 par gramme de protéine [3].

1.2.Les fractions d'hémoglobine

Chez un adulte normal, l'hémoglobine totale est représentée par l'HbA (97% d'Hb totale), l'HbA2 (2,5%) et l'HbF (0,5%). Cette différence est basée sur la nature de leurs chaines protéiques.

L'HbA : c'est la forme majeure, caractérisée par une structure protéique constituée de deux chaines α et deux chaines β, dans le corps humain.

L'HbA2: est une variante normale de l'HbA de faible quantité, formée de deux chaines α et deux chaines δ, sa valeur augmente chez des patients atteints d'une β thalassémie.

L'HbF: l'hémoglobine fœtale, formée de deux chaines α et deux chaines γ, elle présente une grande affinité à l'oxygène, on observe que des traces (figure3).

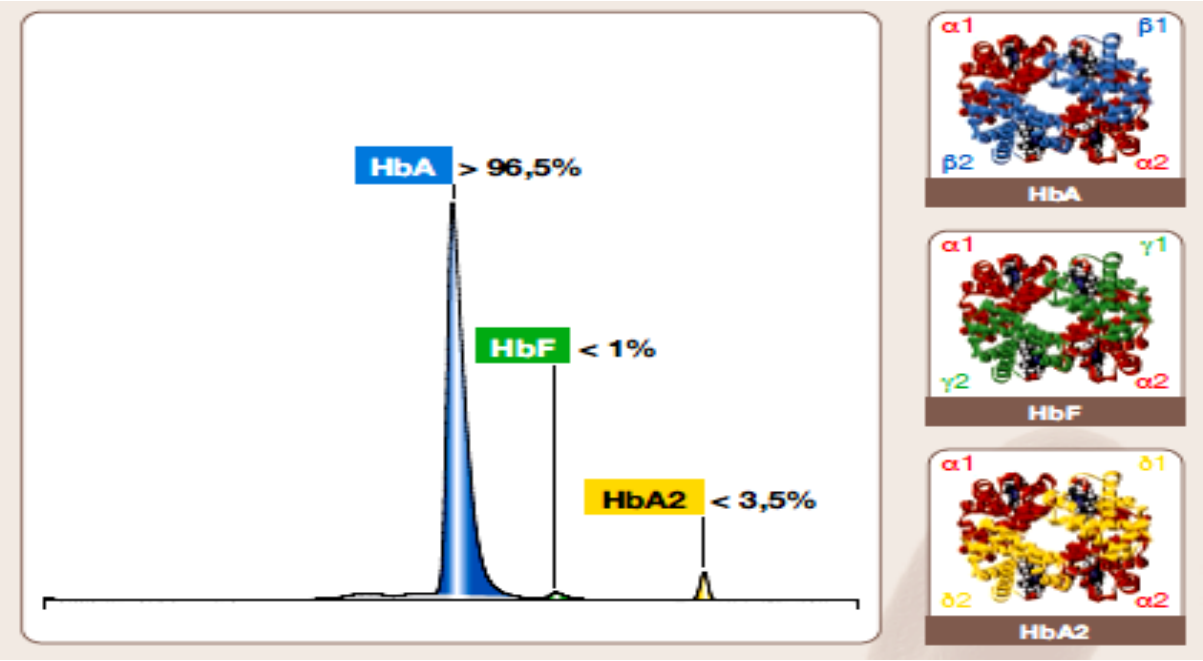

Figure 3: Schéma représentant le pourcentage des fractions d'hémoglobine humain [17].

L'**HbA** peut subir des modifications post-traductionnelles menées d'une formation de l'**HbA1a**, l'**HbA1b** et l'**HbA1c** (forme glyquée) (figure4).

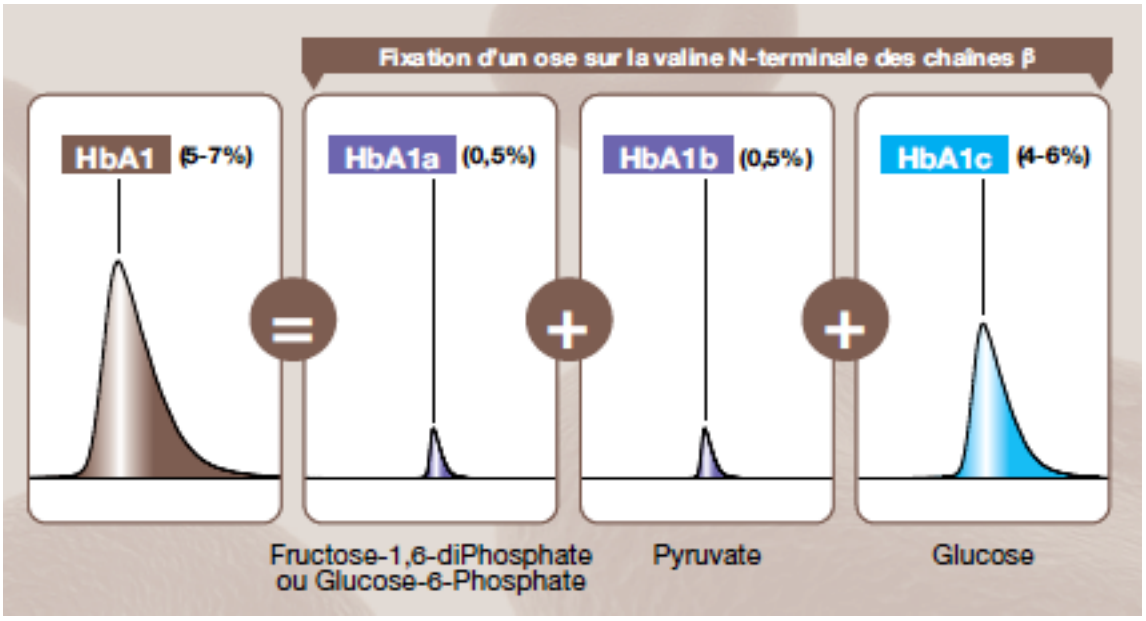

Figure 4 : Schéma des différentes fractions d'HbA1 [17].

2. L'hémoglobine glyquée

2.1.Définition

L'hémoglobine comme protéine à une demi-vie longue, elle peut être affectée par une modification dite la glycation non enzymatique (formation d'un composé dit base de Schiff). Cette glycation dépend de la durée de vie de chaque protéine, et la concentration en ose [7]. Le réarrangement de la base de Schiff est plus important que le composé stable (dit d'Amadori).

L'HbA1c est formée suite à cette modification, par la fixation d'une molécule de glucose sur la fonction amine N-terminale d'au moins une chaine β de l'HbA. L'intensité de cette glycation est déterminée par la concentration de glucose dans le sang et la durée d'exposition. Plus le taux de la glycémie est élevée, plus la glycation de l'HbA et importante, donc un taux élevé de l'HbA1c [4].

2.2.L'HbA1c et le diabète

L'HbA1c est un marqueur indispensable au suivi d'équilibre de la glycémie, proposé en 2009 comme critère de diagnostic [7].

Le dosage sanguin permet l'évaluation de l'équilibre glycémique sur une période de deux à trois mois. L'HbA1c est aussi un marqueur à long terme des complications liées à chaque type

de diabète telles qu'une altération des nerfs et des vaisseaux et, par voie de conséquence, une altération de certaines cellules de l'organisme, avec des répercutions sur plusieurs organes [5].

Le glucose comme un carburant indispensable au fonctionnement de notre organisme, il est véhiculé par le sang, il se fixe de manière irréversible sur l'hémoglobine, et s'accumule progressivement dans les globules rouges (renouvellement chaque 120 jours).

Chez une personne non diabétique le glucose se fixe en petite quantité.

Plus la concentration de glucose est élevée, plus la quantité de glucose fixée sur l'hémoglobine est importante. La durée d'exposition au sucre aussi joue un rôle capital.

Une prise de sang réalisée en laboratoire d'analyses tous les trois mois, permet de mesurer le taux d'hémoglobine des globules rouges ayant fixé du glucose pendant toute leur durée de vie [6].

Généralement, un diabète est considéré comme équilibré si le taux d'HbA1c est inférieur ou égal à 7%.

L'utilisation d'HbA1c comme marqueur est validée grâce à ces critères :

- ✓ Méthode de mesure standardisée.
- ✓ Plus faible variabilité physiologique (2%) que le glucose plasmatique à jeun (11% à12%).
- ✓ Traduit mieux la glycémie chronique
- ✓ Meilleure prédiction de complications.
- ✓ Pré-analyse plus stable et indépendante de l'heure ou du stress.
- ✓ Directive pour l'adaptation du traitement [7].

2.3.Biopathologie

Les deux études épidémiologiques la ***DCCT*** etl'***UKPDS*** ont validé l'utilisation d'HbA1c comme marqueur de surveillance du diabète.

L'étude ***DCCT*** menée chez des patients diabétiques de type 1 a démontré le lien étroit entre l'équilibre glycémique évalué par l'HbA1c et les complications diabétiques, à partir des thérapies intensives et conventionnelles, et leurs effets relatifs sur le développement et la progression de ces complications.

L'étude ***UKPDS*** chez des diabétiques de types 2 a démontré qu'une diminution d'un point de l'HbA1c égale à une réduction de 10% à 30% des complications microangiopathiques.

2.4. Indications du dosage

Pour un patient donné, le dosage d'HbA1c s'effectue dans le même laboratoire d'analyse médicale tous les deux à trois mois.

Il n'est pas obligatoire d'être à jeun pour la prise de sang.

Chez des individus normaux, le pourcentage d'HbA1c doit être compris entre 4% à 6%,7% comme seuil chez les diabétiques de type 1 et 6,5% chez les diabétique de type 2.

Les résultats de ce dosage reflètent par objectivité le taux de la glycémie.

2.5. La corrélation entre le taux d'HbA1c et la glycémie moyenne :

Comme il a été mentionné, le taux d'HbA1c est un miroir reflétant les variations de l'imprégnation glucidique chez un adulte durant les 8 à 11 semaines avant prélèvement.

Les données de l'étude ***ADAG*** ont permis d'établir une nouvelle équation de régression qui lie la glycémie moyenne et HbA1C. Dans cette étude, 500 individus, dont des diabétiques de type 1, des diabétiques de type 2 et des sujets sains ont eu des mesures prolongées du glucose interstitiel et la valeur moyenne des 3 mois précédents a été mise en relation avec l'HbA1C à la fin de la période. Ceci a permis de donner les valeurs estimées de glycémie pour chaque niveau d'HbA1C (tableau 1) [8].

La formule mathématique qui lie l'HbA1c à la glycémie moyenne est :

$$\mathbf{eGM\ (en\ mmol/l) = 1{,}59 \times HbA1c - 2{,}59}$$

Tableau 1: Relation entre HbA1c et glycémie moyenne selon le DCCT ou glycémie estimée selon l'étude ADAG [8].

HbA1c		Glycémie capillaire moyenne		Glycémie estimée	
%	**mmol/mmol**	**mmol/l**	**mg/dl**	**mmol/l**	**mg/dl**
4	20	3,5	65		
5	31	5,5	100	5,4	97
6	42	7,5	135	7	126
7	53	9,5	170	8,6	154
8	64	11,5	205	10,2	183
9	74	13,5	240	11,8	212
10	86	15,5	275	13,4	240
11	96	17,5	310	14,9	269
12	107	19,5	345	16,5	298

- **L'HbA1c en mmol/mmol a été calculée à partir des valeurs en % selon la formule HbA1c mmol/mmol = (HbA1c %-2,15)*10,929**[8].

2.6.Techniques de dosage spécifique d'HbA1c

Actuellement, les méthodes dosant spécifiquement l'HbA1c, sont soit des méthodes chromatographiques ou bien immunochimiques.

- *La CLHP*

La chromatographie liquide a pour rôle l'identification et la purification d'un ou plusieurs composés d'un mélange, pour les identifier puis les quantifier.

À l'origine, elle se faisait sur des colonnes en verre sous faible pression. Pour augmenter le débit, des manipulations ont été réalisées sous une pression plus forte. Le P de pression devenu P de performance après optimisation de la technique. Le principe de cette technique est la mise en solution dans un solvant des composés à séparer. Ce mélange est introduit dans une phase mobile (éluant) liquide suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé la colonne chromatographique. La phase mobile

poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme [9].

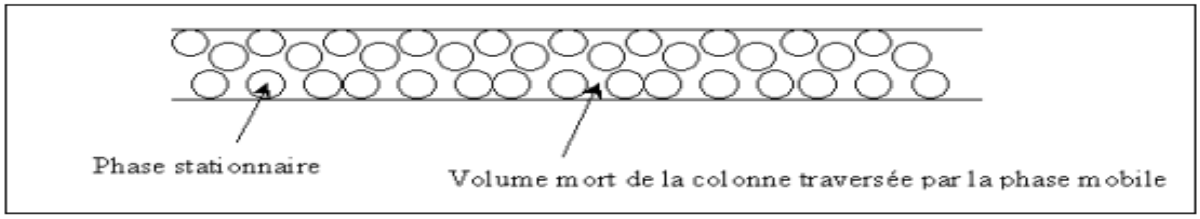

Figure6 : schéma des deux phases constituantes la colonne chromatographique [9].

Il y a deux phases : mobile ou éluant, c'est un liquide permettant d'introduire le mélange à travers la colonne, et stationnaire c'est un support poreux recouvert d'un liquide greffé.

Les notions fondamentales qui caractérisent l'utilisation de la CLHP sont :

Notion de temps : Temps d'injection t_0, temps mort t_m (temps passé dans la phase mobile), temps de rétention t_r (temps nécessaire pour qu'un soluté traverse la colonne), temps de rétention réduit $t_{r'}$ (temps passé par un soluté dans la phase stationnaire).

Notion de concentration : Le soluté est à la concentration **Cm** dans la phase mobile et **Cs** dans la phase stationnaire.

Notion d'efficacité : L'efficacité calculée d'une chromatographie, est en fonction de la vitesse de la phase mobile donc du débit, et de la qualité (régularité, remplissage) de la phase stationnaire. Plus le pic est fin plus l'efficacité est importante.

Notion de pression : À l'intérieur d'une colonne, la phase mobile frotte sur les parois de la colonne mais aussi sur les particules de phase stationnaire. Ces frottements définissent la résistance à l'écoulement. Afin de garder le débit constant dans la colonne, on augmente la pression (entre 20 et 150 bars).

Qualité de séparation : Assurée par la sélectivité (a), c'est le rapport des temps de rétention réduits des différents solutés, et la résolution (R) elle quantifie la qualité de la séparation en caractérisant le fait qu'il y ait ou non un chevauchement de 2 pics contigus [9].
La polarisabilité d'une molécule signifie sa capacité à créer un champ électrique local (détectable) grâce à une modification au niveau de ses orbites électroniques. Le principe de la chromatographie réside sur cette capacité, les deux phases déjà mentionnées ont une polarité différente assurant une bonne séparation et puis une bonne comparaison des molécules selon leur interaction avec ces phases [9].

La colonne est remplie d'une résine (Na+ / OH-) d'échange cationique et de tampon et /ou pH différent (acide), c'est une chromatographie d'échange ionique.

- *Immunoessais*

Leurs spécificités reposent sur la capacité des anticorps monoclonaux ou polyclonaux, qui reconnaissent la liaison glucose avec la partie N-terminale d'hémoglobine, à se lier à des formes glyquées d'hémoglobine. D'autre côte, cette technique ne peut pas identifier les HbS anormales (la drépanocytose est une maladie héréditaire de l'hémoglobine on l'appelle aussi l'anémie falciforme où l'HbS se polymérise entraînant une déformation des hématies en "faucille"[18]).

- *Électrophorèse*

Réalisée sur gel d'agarose, après migration des fractions d'HbA, elle permet la mise en évidence de la plupart des fractions anormales d'hémoglobine, sauf ceux qui sont modifiées (Hb carbamylées). L'efficacité de cette méthode réside sur la rigueur de la réalisation et la qualité des équipements utilisés.

2.7.Standardisation

- En 1990 (expression des résultats en mmol d'HbA1c/mol d'Hb totale):
  la NGSP a proposé de comparer les autres méthodes de dosage à une chromatographie d'échange d'ions sur résine. Cette méthode avait été utilisée dans les deux grandes études la DCCT et l'UKPDS.
  Au même temps, il y avait développement de la IFCC, elle a comme analyte de référence l'HbA1c, et comme méthode de référence la chromatographie liquide à haute performance en phase inverse + l'électrophorèse. Elle est plus spécifique que la NGSP mais difficile à appliquer quotidiennement.

NGSP(%) = 0,915 x IFCC (mmol/mol) + 2,15M

- En 2007 (en France) : Formulation de quelque proposition par la SFBC et la SFD.
- En 2009 : expression des résultats par pourcentage d'hémoglobine glyquée par hémoglobine totale, et en mmol HbA1C / mol Hb totale.
- En 2010 : confirmation de l'utilisation d'IFCC, présentation des résultats en double unité (mmol/mol et HbA1c%) et interprétation avec DCCT [4].

2.8. Limites de dosage d'HbA1c

L'hémoglobine est indépendante des injections journalières de sucre et du jeun et ne dépend pas d'effort physique.
Certaines variations pathologiques peuvent biaiser les résultats obtenues, comme des modifications de la demi-vie du GR, les hémolyses, hémorragie, le vieillissement prolongé des GR…

Il y a des problèmes analytiques liés à la méthode de dosage :

- **Les hémoglobines anormales :** comme résultat d'une mutation non dominante sur une chaine de globine, on les observe à l'état homozygote, ils sont asymptomatiques. Les variants les plus connus sont l'HbS, l'HbE, l'HbC et les Hb de type HbD (il y a plus de 1000 variants).
  Les HPLC détectent ces variants mais leur identification et leur séparation varient selon la méthode effectuée.
  La présence des variants induit une sur ou sous-estimation des résultats :

- **L'HbA1c labile :** c'est la forme instable de l'hémoglobine glyquée, elle est la projection d'une liaison récente d'un glucose à la partie N-terminale d'un Hb, elle peut par la suite être inversée avec détachement de glucose (l'HbA1c peut redevenir un HbA0).

- **L'Hb carbamylée :** la carbamylation est présente chez les patients à insuffisance rénale par fixation d'acide isocyanique à la valine N-terminale, la CLHP est parfois incapable de la séparée d'HbA1c complètement.

- **les autres conditions pathologiques qui peuvent influencer le dosage de l'HbA1c:** Les vitamines C et E, qui protègeraient de la glycation protéique, pourraient aussi altérer la précision des mesures. Les modifications du pH sanguin peuvent également altérer ce processus. Des facteurs extrinsèques, comme une intoxication alcoolique ou opiacée, ou une prise chronique d'acide salicylique, peuvent également entraîner des variations des taux d'HbA1c en modifiant la charge de l'hémoglobine [11].

Chapitres II:

Matériel et Méthodes

I. Population étudiée

L'étude est effectuée au laboratoire ABOUA INANE d'analyses médicales, sur des malades diabétiques de type 1 et de type 2. Elle s'est déroulée pendant 7 semaines. Ni le nom, ni le sexe, ni l'âge des patients n'ont été révélés.

1. Techniques de dosage

1.1. Échantillon

Les échantillons sont requis après des prélèvements effectués sur des tubes traités par un anticoagulant (EDTA), réalisés le matin sans que le patient soit à jeun(figure7).

Figure7 : Les étapes d'un prélèvement sanguin [20].

L'EDTA est l'abréviation de l'acide éthylène-Diamine-tétra-Acétique, en médecine il est utilisé comme anticoagulant, notamment dans les tubes de sang, puisqu'il capte les ions Ca2+ qui sont un facteur important de la coagulation.

*1.2.*Mode opératoire :

Le dosage est réalisé par l'analyseur D10® de Bio-Rad, c'est un automate de chromatographie liquide à haute performance, capable de doser l'HbA1c, l'HbA2, l'HbF et le dépistage des variantes d'hémoglobine, il est pourvu d'un :

- ✓ Système de prélèvement, de dilution des échantillons et de lavage.
- ✓ Un module chromatographique : Bouteille en verre comme réservoir de la phase mobile (solvant), pompe double piston délivrant en continu la phase mobile, un injecteur contenant une vanne à boucle d'échantillonnage et une colonne contenue dans une enceinte thermostatée (figure8).
- ✓ Un module électronique : Imprimante, écran tactile et un PC [10].

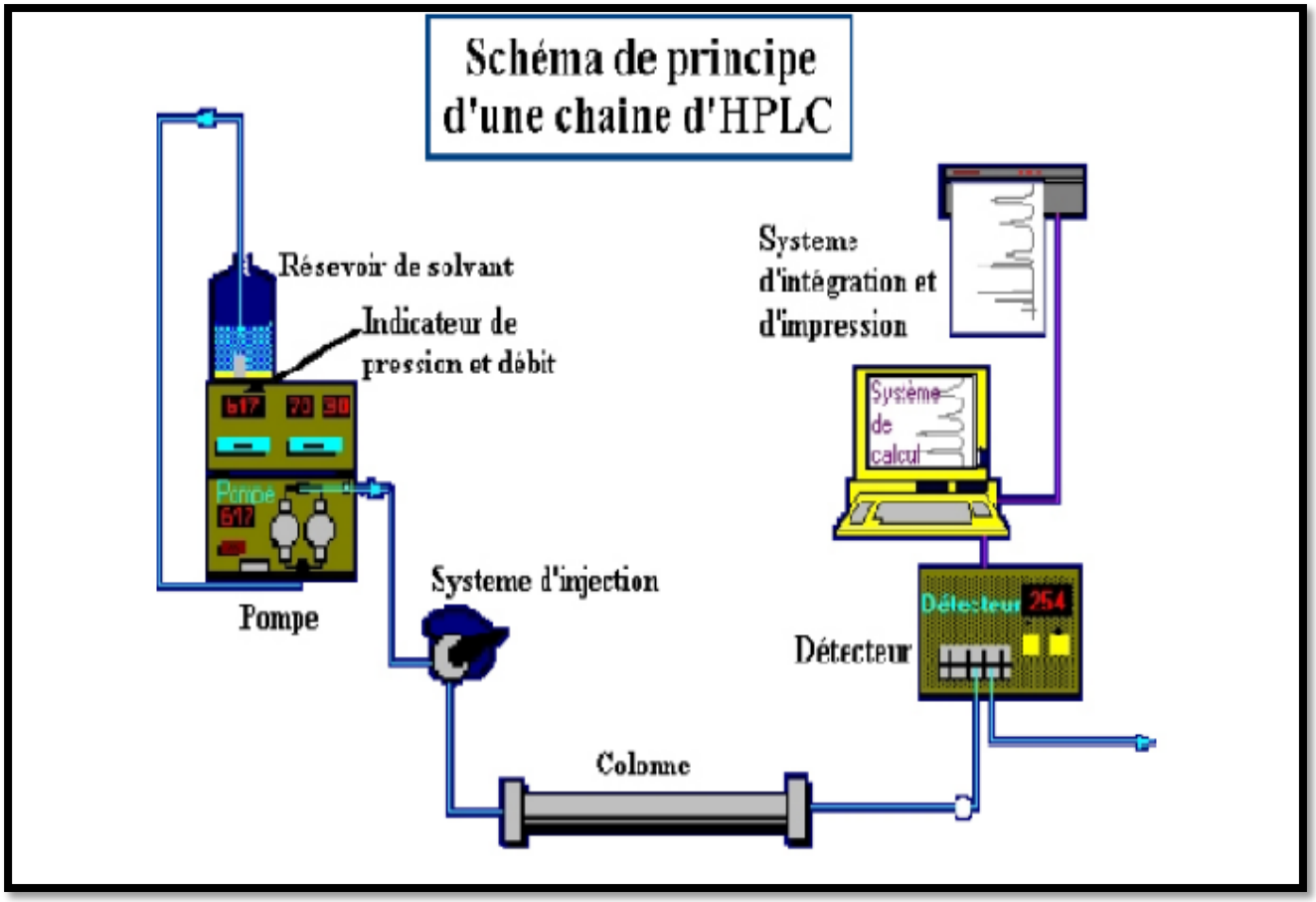

Figure8 : Schéma de principe d'une chaine HPLC

Le protocole analytique réalisé par la D10 (figure9) est le suivant:
le dosage est totalement automatisé, l'appareil travaille sur un tube de 5 ml (traité par l'EDTA). L'automate est pourvu d'une aiguille qui effectue le prélèvement d'une petite

quantité de sang après un perçage du bouchon de tube à échantillon, en effectuant une dilution automatique. Après analyse, les données de chaque prélèvement sont intégrées par le logiciel de la D10 et présentées sous forme d'un chromatogramme qui contient la date, l'heure, identification de l'injection, le chromatogramme et le taux de l'HbA1c en % (100×HbA1c/ Hb totale).

Figure9 : L'analyseur automatisé D10 d'hémoglobine glyquée d'HbA1c

Les échantillons sont automatiquement dilués dans le système D-10®, puis injectés dans le circuit d'écoulement analytique et appliqués à la cartouche analytique.
Le système D-10® envoie un gradient programmé de tampon de force ionique croissante dans la cartouche. Les molécules d'Hb sont alors séparées en fonction de leur interaction ionique avec les deux phases présentes dans la cartouche. Elles traversent ensuite la cellule à circulation du photomètre filtre où sont mesurés les changements d'absorbance à 415 nm [13].

Chapitres III:

Résultats et Discussion

Résultats

Au cours des deux mois de stage, on a analysé les cas de figures possibles (figure10) (HbA1C=7%, HbA1c < 7% et HbA1C > 7%) après le dosage d'HbA1c, chez des patients normaux et des autres qui avaient un taux élevé d'hémoglobine glyquée.

Notre étude a pour but, la mise en évidence des trois cas possible des chromatographes représentés par l'analyseur D10 après le do

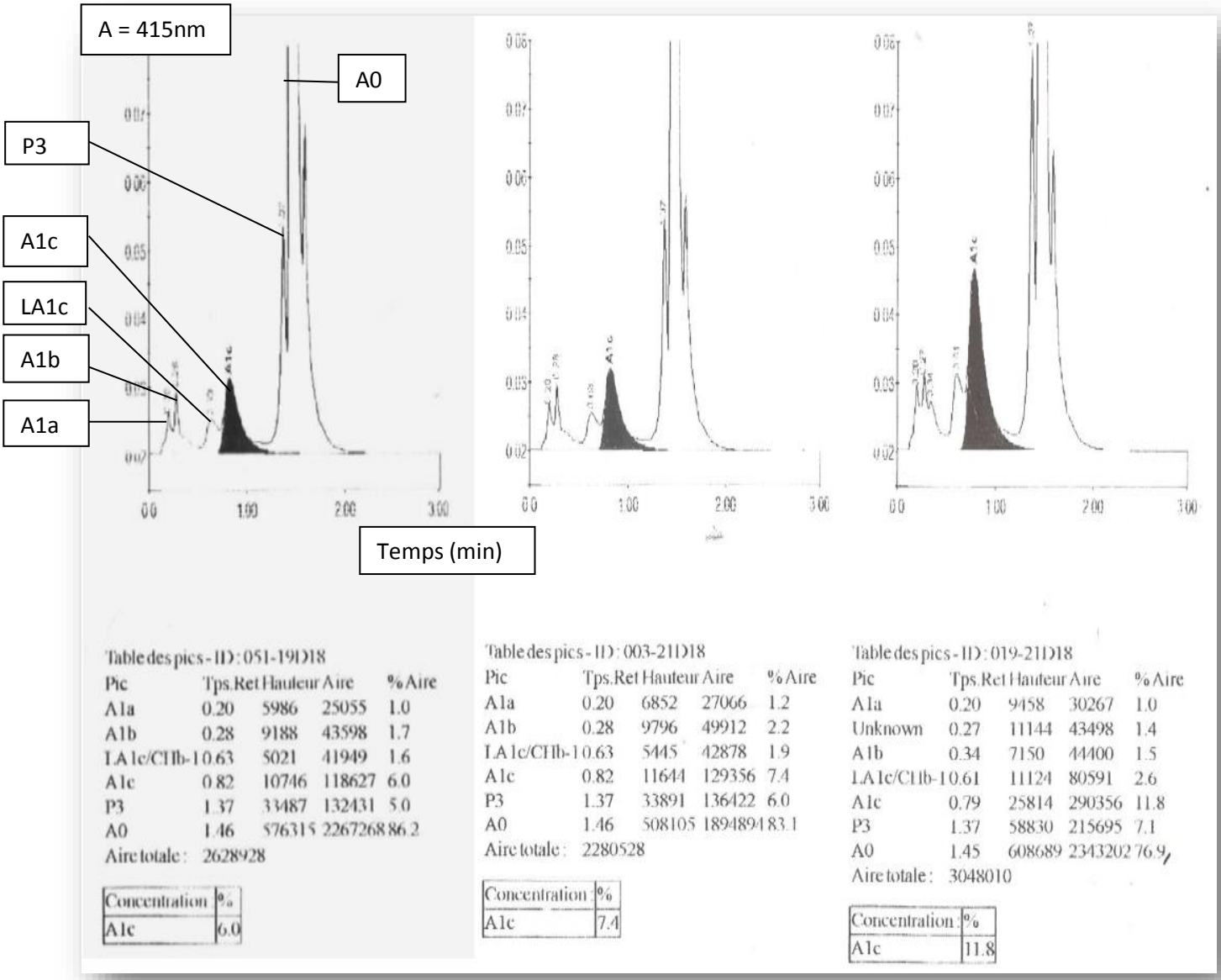

Figure 10 : les chromatogrammes du dosage d'HbA1c chez 3 patients différents.

Interprétation:

Les trois chromatographes sont révélés après la réalisation du dosage sur trois patients différents. Ils sont présentés sous forme d'un ensemble des pics. Chaque pic présente le pourcentage d'une fraction d'hémoglobine par rapport au pourcentage d'hémoglobine totale en fonction de temps. Le premier pic et le deuxième, appartiennent à l'HbA1a, suivi de l'HbA1b, sont des molécules d'Hb glyquée mais avec un ose différent du glucose.

Le pic LA1c est la forme instable (labile) d'hémoglobine glyquée, elle peut redevenir une molécule d'Hb normale très facilement, juste après détachement de glucose.

Le pic P3 est la fraction d'hémoglobine dégradée avec le temps.

Finalement le pic A0 présente la partie d'hémoglobine non liée

Selon l'UKPDS et la NGSP, pour assurer un bon suivi d'HbA1c, il faut respecter les valeurs suivantes (tableau 2) :

Tableau 2: Critères d'interprétation des résultats selon le pourcentage d'HbA1c.

HbA1c %	Critères d'interprétation des résultants
4 à 6	Intervalle non diabétique.
< 6,5	Excellent équilibre glycémique.
6,5 à 7,5	Assez bon équilibre glycémique.
>8	Mauvais équilibre glycémique.

Le premier rapport :

L'HbA1a et l'HbA1b présente les pourcentages les plus faibles 1% et 1,7% vue leur nature. LA1c égale à 1,6%.Le taux d'HbA1C est inférieur à 7% (=6%), La fraction dégradée (5%) est proche à la fraction d'Hb glyquée.

Le taux de la glycémie moyenne est bien équilibré ; le patient n'est pas atteint de diabète.

Le deuxième rapport :

L'HbA1a, l'HbA1b et LA1c ne présente pas une grande différence avec les résultats précédents, ils ont des pourcentages de 1,2%, 2,2% et de 1,9%. Le pourcentage d'HbA1c est supérieur à

7%, donc il présente un risque de développer le diabète avec le temps. La fraction dégradée P3 est de 6%.

Donc le patient est diabétique, et le diabète est moyennement équilibré.

Le troisième rapport :

L'HbA1a et l'HbA1b présentent 1% et 1,5% d'aire totale. Avec l'augmentation de la glycation, on constate une augmentation de LA1c aussi (2,6%).L'HbA1c = 11,8% est supérieur strictement à 7% le malade est atteint d'un diabète de type 2. 7,1% d'hémoglobine est dégradée.

Le chromatogramme présente une mauvaise équilibration glycémique.

Discussion

Selon les études réalisées par la DCCT sur les diabétiques de type 1 et l'UKPDS sur le type 2, il est confirmé qu'une augmentation de la glycémie moyenne est traduite par une élévation du taux de la glycation non enzymatique d'hémoglobine et la formation de l'HbA1c.
Ceci est confirmé par nos résultats qui montrent que les analyses effectuées par la D10 sur des sujets diabétiques présentent un taux élevé d'HbA1c.

Pour le premier rapport, l'HbA1c est de 6% d'hémoglobine totale correspond à 1,2 g/l de glucose, cela se traduit par une bonne équilibration glycémique chez un non diabétique. Selon la DCCT un diabétique de type 1 est considéré comme équilibré pour une HbA1C proche de 7% [4], donc s'il est un diabétique de ce type la valeur mentionnée reflète la présence d'une hypoglycémie chez ce patient. Par contre si le sujet est un diabétique de type 2, le résultat est de 6% est la norme d'un bon équilibre diabétique.

Dans le deuxième rapport, le taux d'HbA1c = 7,4%, il faut confirmer le diagnostic. En pratique courante, le médecin est d'abord alerté par une histoire familiale (antécédents familiaux du diabète), ou des signes cliniques évocateurs, tels que le surpoids [1]. Des études suggèrent un objectif d'HbA1c < 7,5 % pour les jeunes adultes qui ont un diabète de type 1. Un objectif < 6,5 % est souhaitable lorsqu'il existe un risque artériel significatif. Ces études soulignent aussi que chez ceux qui n'atteignent pas ces objectifs, toute baisse de l'HbA1c est bénéfique [8].
Pour un diabète de type 2 traité par des antidiabétiques oraux, le taux d'hémoglobine glyquée doit être inférieur à 6,5% (ou 7% selon le type de traitement) et pour un diabète de type 2 traité par insuline, il doit être inférieur à 7%. Au cours d'un diabète de type 2 d'un sujet très âgé, ce taux doit être inférieur à 8% [20].

Pour le troisième rapport, l'HbA1c = 11,8%, une très mauvaise équilibration glycémique est notée. Elle est la cause principale des complications dégénératives engendrées par l'endommagement continu des petits vaisseaux vasculaires, surtout des yeux et des nerfs. Certaines parties de notre corps ne sont plus assez irriguées, elles peuvent être endommagées. Une hyperglycémie est aussi liée aux complications dermatologiques, les diabétiques sont plus sensibles aux infections cutanées, buccales et gynécologiques parce que les bactéries "aiment" le sucre. Les pieds sont particulièrement fragiles et les plaies mal soignées peuvent conduire à des abcès voire des gangrènes, donc des amputations [20].

D’après plusieurs études il est confirmé que le diabète est étroitement ancré à un déclin des fonctions du cerveau, encore une bonne raison de garder votre corps en bonne santé !

Le diabète et l'hypertension artérielle sont souvent associés à des problèmes d'inactivité physique et sont désormais liés à une diminution rapide des capacités cognitives. Cette découverte publiée dans la revue Neurologie est basée sur l'estimation des capacités mentales de 10 963 personnes âgées de 47 à 70 ans à six ans d'intervalle. Les résultats témoignent d'un déclin mental chez l'ensemble des participants, mais chez les patients souffrant d'hypertension artérielle et de diabète, la diminution est beaucoup plus importante. Les chercheurs pensent que le diabète et l'hypertension artérielle pourraient, sans en être la cause, rendre les personnes plus susceptibles de développer la maladie d'Alzheimer [20].

Le dosage d’HbA1c est la méthode la plus fiable, pour un bon contrôle glycémique mais la loi de notre existence exige le secret de l’imperfection humaine.
l’utilisation d’hémoglobine glyquée a des limites présentés principalement par des surestimations des résultats du dosage, suite à quelque pathologies telles qu’une hypertriglycéridémie, insuffisance rénale/hyper urémie (Hb carbamylée), déficit en fer, vitamine b12, folates, ou à des sous-estimations à cause des vitamines C et E, qui protègeraient de la glycation protéique, l’hémolyse, l’hémodialyse, présence d’HbS, grossesse et d’autres médications comme la dapsone (utilisée comme anti-lépreux et immunomodulateur, et qui peut entraîner des hémolyses) [11].

Trois piliers sont indispensables à la prise en charge des patients diabétiques :
Une alimentation équilibrée, des activités physiques et un traitement adapté au type de diabète (injection d’insuline pour le type 1 et des médicaments antidiabétique pour le type 2).

Conclusion

Les pôles de recherche nationaux ont validé l'utilisation de l'HbA1c comme intermédiaire dans le suivi des malades diabétiques. Après plusieurs efforts de standardisation, ils ont assumé que l'hémoglobine glyquée est l'outil efficace pour un diagnostic fiable de diabète, car il corrèle bien avec le risque des complications du diabète. Le dosage de l'HbA1c est donc un élément majeur de la prise en charge de cette maladie afin d'ajuster un traitement qui limitera ses complications

La CLHP est une des méthodes spécifiques utilisées dans ce dosage, après interprétation des résultats affichés par l'analyseur le sujet peut être déclaré diabétique ou non, cela permettra aussi de définir le traitement convenable par la suite.

Cependant, il faut rester méfiant dans l'interprétation des résultats de dosage d'hémoglobine glyquée car un changement dans les paramètres de synthèse d'hémoglobine, ses fractions et ses variants, peut altérer et biaiser les résultats obtenus. Il convient donc aux biologistes de connaître les limites de la méthode utilisée afin d'avoir un regard critique sur le résultat et d'apporter une aide à l'interprétation.

Références bibliographiques

[1]: Tenenbaum M, Bonnefond A, Froguel P, Abderrahmani A. Dossier scientifique Physiopathologie du diabète Les marqueurs des complications des diabètes. RFL Rev Francoph des Lab [Internet]. 2018;2018(502):26–32.

[4]: Biomnis. "Glyquee H. Hemoglobine glyquee". Précis de biophatologie analyses médicales spécialisées 2012;1–4.

[7]: Moutereau S. Intérêt du dosage g enzymatique d ’ HbA1c en routine. 2012;

[8]: Larger E, Lemoine AY, Gonfroy-leymarie C, Borie-swinburne C. HbA1c pour le diagnostic et le suivi du diabète: le point de vue du diabétologue. Rev Francoph des Lab. 2012;439 bis:7–10.

[9]: Biotechnologie E. HPLC Principe et appareillage. 2010;1–10.

[10] : Tenenbaum M, Bonnefond A, Froguel P, Abderrahmani A. Dossier scientifique Physiopathologie du diabète Les marqueurs des complications des diabètes. RFL Rev Francoph des Lab [Internet]. 2018;2018(502):26–

[11] : Wojtusciszyn A. Les pièges de l’HbA1c. 2010:1-5.

[13] : C Marzullo et M Minery. Évaluation de l’analyseur D10® pour le dosage de l’hémoglobine A 1C. In : Annales de Biologie Clinique. 2008. p. 95-99.

[17] : Dr. M.F.Rossier « Nature et dosage de l’HbA1c ». Institut central (ICHV) Service de Chimie clinique et Toxicologie 2014.

[18] : Françoise Balédent « Diagnostic biologique de la drépanocytose ». Développement et Santé N°150 Décembre 2000.

Références webographiques

[2] : https://fr.wikipedia.org/wiki/H%C3%A9moglobine#Mol%C3%A9cules_analogues

[3]: https://fr.wikipedia.org/wiki/H%C3%A9moglobine#Mol%C3%A9cules_analogues

[5]. https://www.federationdesdiabetiques.org/information/complications-diabete

[6]: https://www.federationdesdiabetiques.org/information/glycemie/hba1c

[12]: https://www.federationdesdiabetiques.org/information/diabete-gestationnel

[14] : http://ceed-diabete.org/fr/le-diabete/les-chiffres/

[15] : https://www.sciencesetavenir.fr/sante/le-diabete-un-tueur-impitoyable-qui-progresse-toujours_108029

[16] : https://infograph.venngage.com/p/193833/la-thalassmie-michael-mourad

[20] : http://www.doctissimo.fr/html/dossiers/diabete/articles/895-diabete-complications.htm