



Projet de Fin d'Etudes

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

Techniques de dosage de l'hémoglobine glyquée et son intérêt dans le diagnostic du diabète

Présenté par : Mlle. Kassimi Fatima

Encadré par :

- Pr. TAHRI JOUTI Mohammed Ali (FST Fès)
- Pr. BENBELLA Imane (Laboratoire central CHU Hassan II Fès)

Soutenu le : 07/07/2021

Devant le jury composé de :

Pr.TAHRI JOUTI Mohammed Ali	FST-Fes
Pr.BENCHEMSI Najoua	FST-Fes
Pr.BENBELLA Imane	CHU-Fes

Stage effectué à :

Le laboratoire centrale des analyses médicales au CHU Fès – unité de biochimie

Année universitaire 2020-202

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا مَا عَلَّمْتَنَا إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ﴾ سورة البقرة آ: 32

DEDICACE

Avec l'expression de ma reconnaissance je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

A mon adorable mère, qui n'a épargné aucun effort pour mon confort, mon bonheur, et ma réussite

A mon chère père, qui m'a toujours fait confiance, m'a toujours encouragé, et a toujours voulu mon bien.

A mes chères sœurs et mes chers frères, qui ont rendu mon travail amusant

A mes chères amies, chacune avec son nom, que je suis fière de les avoir dans ma vie, et fière de notre amitié.

A ma chère copine en particulier Fatima Zahra Sayouri, pour son soutien, sa patience, sa compréhension, je la remercie de tout mon cœur.

REMERCIEMENT

D'abord je remercie ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce travail.

*Mes remerciements s'adresse au **Pr.HALOTI Said**, pour son organisation de notre filière durant cette année, et qui nous a consacré de son temps précieux, pour nous orienter, et nous aider pour trouver un stage de fin d'études dans les meilleures établissements.*

*Mes remerciements s'adressent également à **Mme. BENBELLA Imane**, professeure responsable au laboratoire des analyses biochimique au sein du centre hospitalier Hassan II, et à toute l'équipe du laboratoire pour leur aide pratique, leur suivi et leur encouragement durant la période de stage.*

*Je tiens aussi à exprimer mes remerciements au **Pr.BENCHEMSI Najoua** qui a accepté de juger ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de ma considération et ma reconnaissance les plus distingués.*

*Mes estime et ma profonde reconnaissance sont adressées particulièrement à **monsieur TAHRI JOUTI Mohammed Ali**. Je le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant ma préparation de ce rapport.*

SOMMAIRE

I. RESUME	8
II. PRÉSENTATION DE LA STRUCTURE D'ACCUEIL	9
III. INTRODUCTION.....	9
A. Hémoglobine.....	10
1. Hémoglobine glycosylée.....	11
2. Aperçu historique sur HbA1c.....	12
B. Physiopathologie du diabète.....	13
1. Critères biologiques de diagnostic du diabète sucré	13
2. Classification du diabète sucré	14
C. Les différentes techniques de dosages de l'HbA1c.....	15
1. Méthode immunologique.....	15
2. Méthodes électrophorétiques.....	16
16	
3. Méthodes chromatographiques.....	17
D. Standardisation	17
E. Limites et interférences de dosage.....	18
1. Métabolisme anormal de l'Hb ou des GR.....	18
a) Présence de variantes d'Hb	18
b) Présence d'autres Hb modifiées	18
2. Médicaments et toxiques.....	18
3. L'intérêt du dosage d'HbA1c chez les diabétiques.....	19
a) Corrélation entre l'HbA _{1c} et la glycémie.....	19
b) Valeurs usuelles	19
c) Utilité pour le diagnostic de diabète	20
IV. OBJECTIF DU TRAVAIL	21
V. MATERIEL ET METHODES.....	22
A. Etapes des analyses biochimiques.....	22
1. La phase pré-analytique	22
2. Phase analytiques	22
3. Phase post-analytique validation des résultats.....	23
B. Principe général d'HPLC.....	23
C. Appareil de dosage D'HbA1c :.....	24

1. Caractéristiques [23]	24
2. Etapes de mesure d'HbA1c avec ADAMS™ a1c HA8180v	25
a) Réception des échantillons	25
b) Etalonnage	25
c) Mode du travail	26
3. Interprétation du chromatogramme :	28
VI. RESULTATS ET DISCUSSION.....	29
A. Résultats	29
1. Conception de l'étude et sélection des patients.....	29
B. Discussion	31
1. Comparaison avec les normes marocaines	31
2. Comparaison avec les normes mondiales	31
3. Pourquoi HPLC ?	32
VII. CONCLUSION.....	34
VIII. BIBLIOGRAPHIE	35
IX. WEBOGRAPHIES.....	36

LISTE DES ABREVIATIONS

HbA1c : Hémoglobine glyquée

Hb : Hémoglobine

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

DCCT: Diabetes Control and Complication Trial

UKPDS: United Kingdom Prospective Diabetes Study

IFCC: International Federation of Clinical Chemistry

CLHP/HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

NGSP: National glycohemoglobin standardization program

EPO: Erythropoïétine

ADA : American diabete association

OMS : Organisation Mondiale De Santé

SFBC : Société Française De La Biologie Clinique

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

CRP : Protéine C Réactive

LP : Liquide Pleural

HGPO : Hyperglycémie Provoquée Par Voie Oral

ENPSF : Enquête Nationale Sur La Population Et La Santé Familiale

CIQ : Contrôle Interne de Qualité

CV : Coefficient de variation

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Tétramère d'hémoglobine avec l'emplacement du tétramère-dimère et les interfaces dimère-monomère indiqués par des flèches. La couleur cyan indique les hélices E et F, tandis que le reste de chaque sous-unité est gris. L'hème est rouge.....	11
Figure 2: Formation d'HbA1c à partir de la liaison du glucose à l'hémoglobine A.	12
Figure 3: types d'hémoglobine à l'âge adulte chez une personne en bonne santé.	13
Figure 4: Diagnostic biologique de diabète sucré	14
Figure 5 : Dosage d'HbA1c par méthode immunologique.....	16
Figure 6 : Représentation schématique d'un appareillage d'électrophorèse	16
Figure 7 : résultat de séparation d'Hb par EC.....	17
Figure 8 : Appareil de centrifugation	22
Figure 9 : Principe général de la technique HPLC	23
Figure 10: Analyseur ADAMS™ A1C HA-8180V	24
Figure 11 : Etapes de dosage d'HbA1c par la technique d'HPLC	26
Figure 12: Colonne ARAKRAY échangeuse d'ions.....	27
Figure 13: Exemple du chromatogramme.	28

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Caractéristiques des diabètes de type 1 et 2	14
Tableau 2 : HbA1c comme indicateur du contrôle du diabète	20
Tableau 3: Résultats de l'étude de la répétabilité	25
Tableau 4: Répartition des patients selon le taux d'HbA1c mesuré	29
Tableau 5: Répartition des patients selon l'âge et le taux d'HbA1c	29

Ce rapport constitue le résultat de mon travail accompli dans le cadre du projet de fin d'étude au sein du laboratoire des analyses biochimiques au CHU-Fès, l'objectif de ce projet est la détermination des différentes techniques de dosage de l'hémoglobine glyquée et son intérêt chez les diabétiques.

Le travail dans ce projet s'est déroulé comme suit : j'ai commencé par définir les différents termes qui sont en relation avec le sujet de mon travail ; l'hémoglobine et l'hémoglobine glyquée (HbA1c), la physiopathologie du diabète sucré et son diagnostic à travers le dosage d'HbA1c par les différentes techniques utilisées dans les laboratoires des analyses.

Ensuite, la détermination des valeurs du dosage d'HbA1c standardisées en se basant sur les différentes études réalisées par NGSP/ IFCC et d'autres associations internationales, Ainsi les facteurs et les limites qui interfèrent ce dosage.

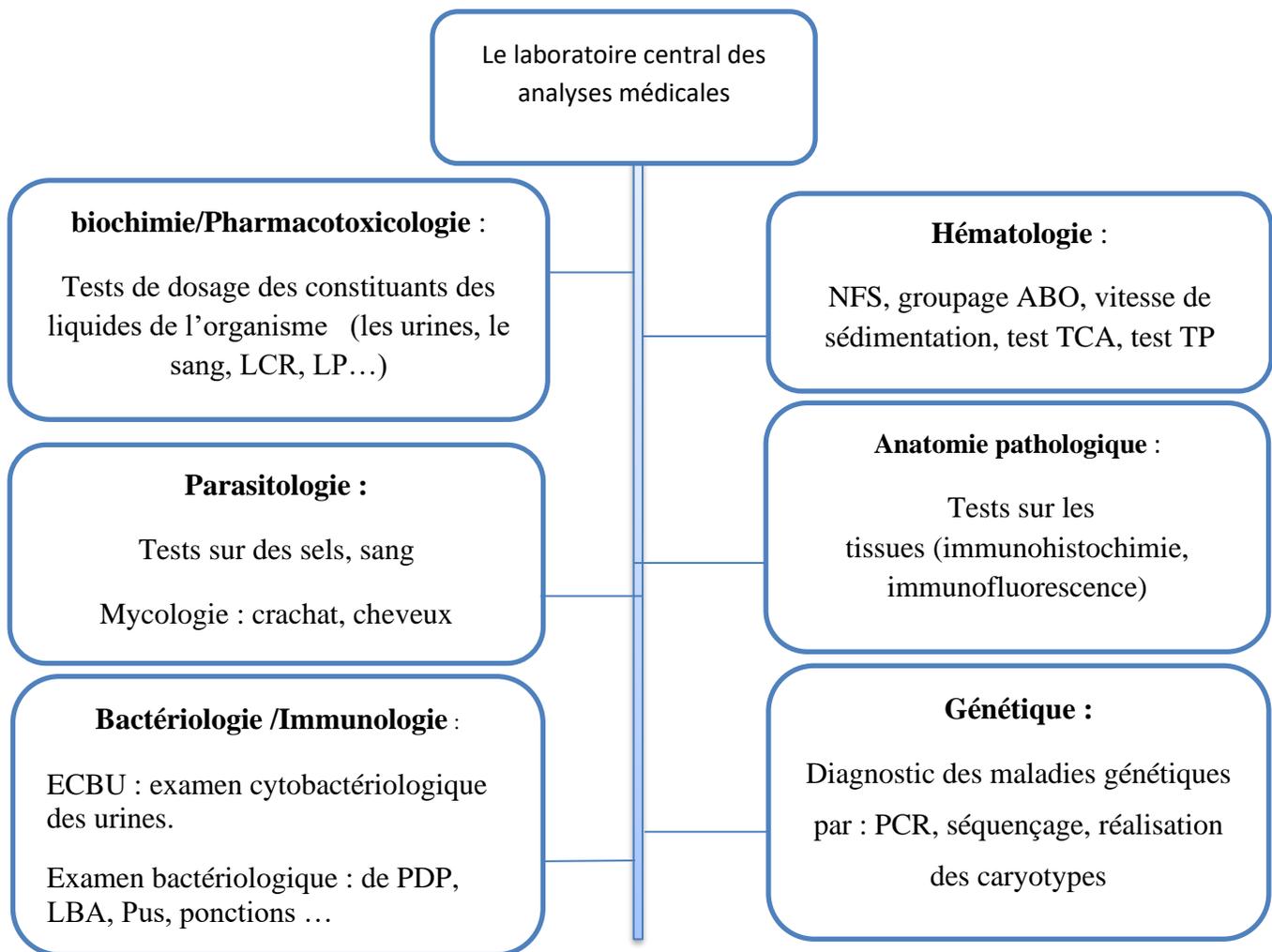
L'étape suivante consiste à étudier la technique de chromatographie liquide à haute performance pour le dosage d'HbA1c utilisée dans le laboratoire de biochimie au CHU-Fès, et apprécier sa fiabilité et sa praticabilité par rapport aux autres techniques.

Enfin, j'ai pu réaliser une étude statistique sur un échantillon de 401 patients venus au laboratoire pour réaliser le test de dosage d'HbA1c pendant une période déterminée ,et à partir des résultats obtenus , j'ai pu discuter la prévalence de diabète selon l'âge et le sexe et comparer ces résultats avec les normes marocaines puis avec les normes mondiales .

II. PRÉSENTATION DE LA STRUCTURE D'ACCUEIL

Le stage de fin d'étude est considéré indispensable pour chaque étudiant vu son importance dans l'acquisition des connaissances, l'apprentissage de nouvelles techniques omniprésentes dans le marché de travail, mais également pour l'amélioration de l'esprit analytique et pratique dans son domaine de spécialité. Dans le cadre de préparation de mon projet de fin d'étude, j'ai effectué un stage pratique d'initiation d'une durée de 2 mois, au laboratoire centrale des analyses médicales de CHU Fès, au sein de l'unité de (biochimie).

Le Laboratoire Central d'Analyses Médicales (CHU Hassan II –Fès) est situé au bâtiment J est conçu comme un pôle d'activité hospitalière comportant plusieurs spécialités d'analyses médicales :



III. INTRODUCTION

Le sang est composé essentiellement de globules rouges qui représentent une fraction de 52% de la composition sanguine chez les hommes et 42% chez les femmes. Un globule rouge est une cellule discoïde biconcave dépourvue de noyau, de mitochondries et de ribosomes, et contenant une grande quantité d'hémoglobine lui donnant sa coloration. Les globules rouges fixent l'oxygène dans les tissus grâce au fer contenu dans l'hémoglobine, leur pigment rouge.

Les érythrocytes transportent le dioxygène (O_2) des poumons à toutes les cellules de l'organisme et une partie du dioxyde de carbone (CO_2) des cellules aux poumons. A maturité, les globules rouges normaux prennent une forme des disques biconcaves anucléés contenant de l'hémoglobine et des enzymes nécessaires pour le métabolisme érythrocytaire. [22]

A. Hémoglobine

L'hémoglobine est le principal composant du globule rouge, c'est un complexe qui associe une protéine et un pigment ferreux rouge contenu dans les érythrocytes. La molécule de l'hémoglobine, de poids moléculaire 68000 daltons, est formée de quatre hèmes, chacun contenant un atome de fer ferreux Fe^{2+} , et de quatre chaînes de globines. Plusieurs formes d'hémoglobines existent, différant par la composition de leur chaîne de globine.

Chaque molécule d'hémoglobine est liée de manière réversible à quatre molécules d'oxygène pour former une molécule d'oxyhémoglobine rouge vif. Au fur et à mesure de leur fixation, les molécules d'oxygène modifient la forme de l'hémoglobine. Lors de leur dissociation les phénomènes se passent en sens inverse, chaque molécule d'oxygène libérée facilite la libération de la molécule suivante. Cela explique que la courbe de dissociation ait une forme de sigmoïde. L'hémoglobine réduite, rouge foncé, ayant délivré son oxygène aux tissus, transporte du dioxyde de carbone lié à la globine sous forme de carbhémoglobine. L'hémoglobine est un important composant des systèmes tampons qui limitent les variations de pH sanguin.

Chez le fœtus, il existe une hémoglobine spéciale HbF qui a une grande affinité pour l'oxygène, ce qui compense la basse pression partielle en oxygène du placenta (le fœtus recevant l'oxygène par la circulation fœto-maternelle). Dans la petite enfance, l'hémoglobine fœtale est presque entièrement remplacée par l'hémoglobine A (HbA

et HbA1). Normalement les adultes ont entre 11.5 et 18g d'hémoglobine pour 100 ml de sang, les concentrations les plus élevées se trouvent chez l'homme. [1]

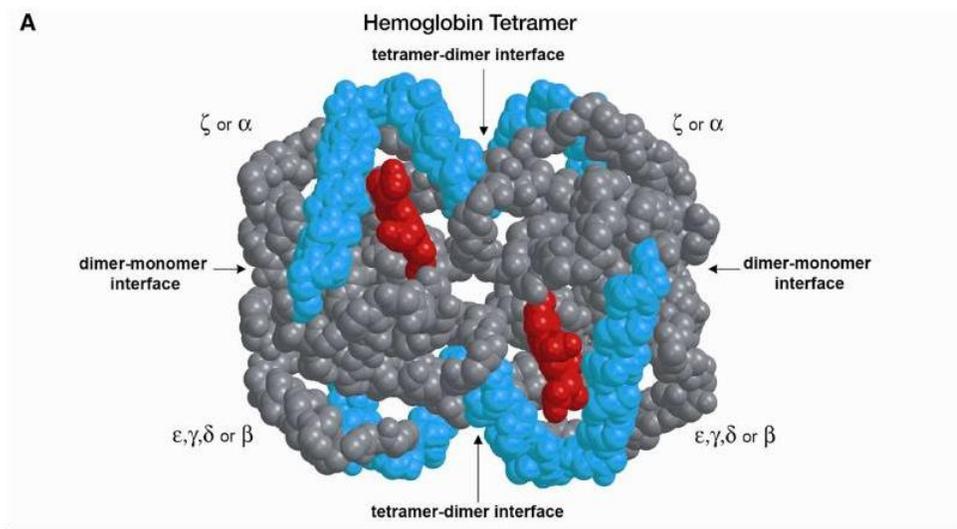


Figure 1: Tétramère d'hémoglobine avec l'emplacement du tétramère-dimère et les interfaces dimère-monomère indiqués par des flèches. La couleur cyan indique les hélices E et F, tandis que le reste de chaque sous-unité est gris. L'hème est rouge.

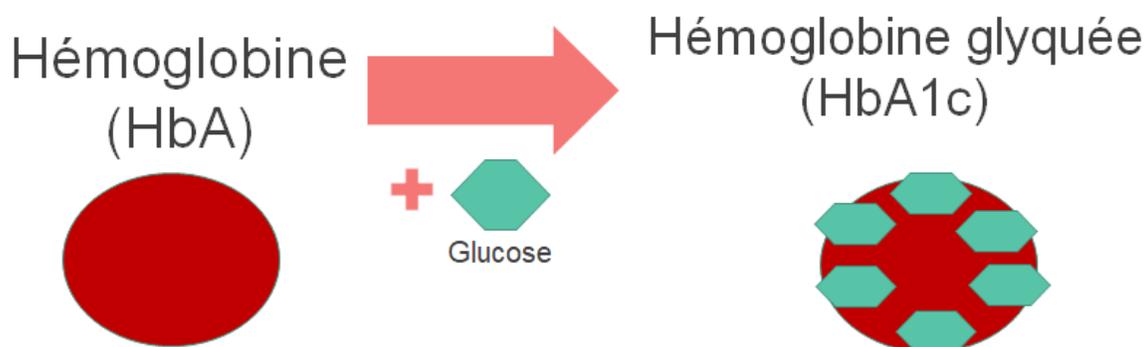
1. **Hémoglobine glycosylée**

Les protéines sont fréquemment glyquées au cours de diverses réactions enzymatiques lorsque les conditions sont physiologiquement favorables. Cependant, dans le cas de l'hémoglobine, la glycation se produit par la réaction non enzymatique entre le glucose et l'extrémité N-terminale de la chaîne β , qui forme une base de Schiff. Lors du réaménagement, la base de Schiff est convertie en produits d'Amadori, dont le plus connu est l'HbA1c (fig. 2).

Dans la première étape de la formation d'hémoglobine glyquée, l'hémoglobine et le glucose sanguin interagissent pour former de l'aldimine dans une réaction réversible. Dans l'étape secondaire, irréversible, l'aldimine est progressivement transformée en forme de cétoamine stable. Les principaux sites de glycosylation de l'hémoglobine, dans l'ordre de prévalence, sont β -Val-1, β -Lys-66 et α -Lys-61. L'HbA1c représente environ 5% de la fraction d'HbA totale. Comme mentionné ci-dessus, le glucose dans le format à chaîne ouverte se lie à l'extrémité N-terminal pour former une aldimine avant de subir un réarrangement d'Amadori pour former une cétoamine plus stable. Il s'agit d'un processus non enzymatique qui se produit en continu *in vivo*. La formation de l'hémoglobine glyquée fait partie du cycle normal des fonctions physiologiques. Cependant, à

mesure que la glycémie moyenne augmente, la quantité d'hémoglobine glyquée dans le plasma augmente également. Cette caractéristique spécifique du biomarqueur de l'hémoglobine est utilisée pour estimer la glycémie moyenne au cours des deux à trois mois précédents. [2]

Figure 2: Formation d'HbA1c à partir de la liaison du glucose à l'hémoglobine A.



2. Aperçu historique sur HbA1c

C'est en 1958 que l'HbA1c a été séparée par chromatographie des autres formes d'hémoglobine par Titus H. Huisman, un néerlandais spécialiste de l'hémoglobine (États-Unis). Elle a été caractérisée, en 1968, comme une glycoprotéine par Robert M. Bookchin, un hématologue, et Paul Myron Gallop. Peu après, son augmentation dans le diabète a été décrite de façon fortuite par Samuel Rahbar, un chercheur de l'université de Téhéran (Iran), qui s'intéressait aux hémoglobinopathies, très fréquentes en Iran. [3]

En 1969, Samuel Rahbar et ses collègues ont découvert des concentrations plus élevées de fractions rapides de l'hémoglobine chez les patients diabétiques que chez les sujets non diabétiques. Après cela, il a fallu un certain temps avant que Trivelli suggère une relation entre les fractions d'hémoglobine rapide, les concentrations moyennes de glucose dans le sang et les complications à long terme chez les patients diabétiques. Le terme "rapide" est dérivé du fait que ces composants sont élués plus rapidement dans une colonne échangeuse de cations que les autres composants. Les fractions ont été décrites dans l'ordre dans lequel elles ont été éluées de la colonne : HbA1a, HbA1b et HbA1c, respectivement. Finalement, vers 1977 la première méthode commerciale d'HbA1c est devenue disponible. Il a fallu attendre 8 ans pour que l'OMS mentionne dans son rapport de 1985 l'utilité potentielle de l'HbA1c dans le traitement du diabète. Aujourd'hui l'HbA1c devient un **"ETALON-OR"** pour la gestion du glucose chez les patients diabétiques. [4]

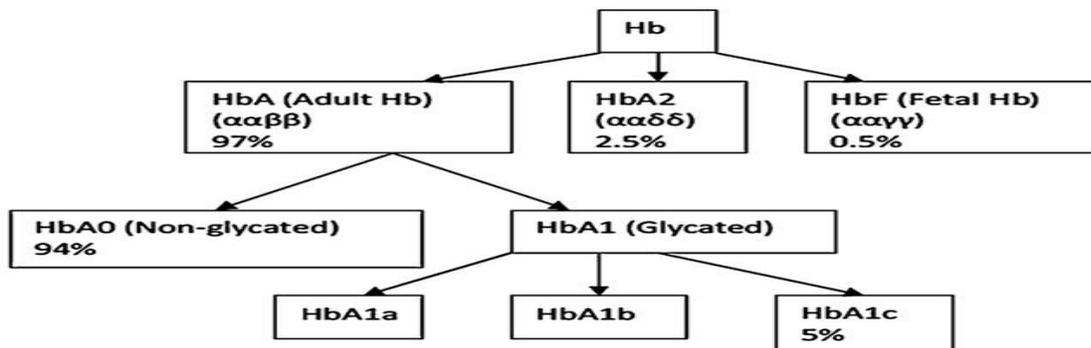


Figure 3: types d'hémoglobine à l'âge adulte chez une personne en bonne santé.

B. Physiopathologie du diabète

Le diabète sucré est défini par l'élévation chronique de la concentration de glucose dans le sang (hyperglycémie) et regroupe, dans un véritable syndrome, plusieurs maladies de pathogénie différente (trouble de la sécrétion et/ou de l'action de l'insuline). L'hyperglycémie chronique est la cause principale de la survenue des complications dégénératives de la maladie diabétique mais celles-ci sont néanmoins susceptibles d'être évitées ou tout au moins retardées par un traitement adéquat. [5]

1. Critères biologiques de diagnostic du diabète sucré

Selon les critères actuels, le diabète sucré est défini par une glycémie plasmatique à jeun $1,26 \text{ g/L}$ ou $> 2 \text{ g/L}$ quel que soit l'heure du prélèvement en présence de symptômes cliniques. Ce diagnostic peut également être posé devant une valeur de 2 g/L à la 120ème minute d'une épreuve d'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO). Le diagnostic biologique de routine du diabète sucré repose dorénavant sur la mesure de la glycémie à jeun et non sur l'HGPO qui est moins physiologique, peu reproductible et plus coûteuse. Une glycémie à jeun modérément augmentée ($\geq 1,1 \text{ g/L}$ mais $< 1,26 \text{ g/L}$) correspond à une « glycémie à jeun anormale », état qui indique un trouble de l'homéostasie glucidique. Cette catégorie est, grosso modo, équivalente à la classique intolérance au glucose définie par une glycémie $1,4 \text{ g/L}$ mais $< 2 \text{ g/L}$ à la 120ème minute de l'HGPO (Figure 4).

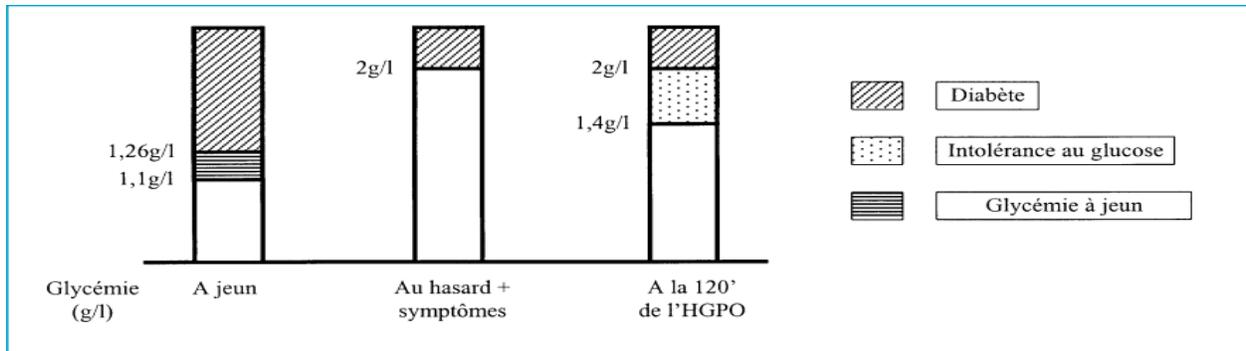


Figure 4: Diagnostic biologique de diabète sucré

2. Classification du diabète sucré

La classification nosologique du diabète publiée en 1997 par un groupe d'experts sous la responsabilité de l'Association Américaine du Diabète (ADA) classe les différentes catégories du diabète comme suit :

- Diabète de type 1
- Diabète de type 2 (à dominance d'insulinorésistance ou d'insulinopénie)
- Autres diabètes spécifiques (dits "secondaires")
- Diabète gestationnel

Altération de l'homéostasie glucidique : - glycémie à jeun anormale - intolérance glucidique Cette classification met en exergue les différences de physiopathologie des diabètes de type 1 et de type 2. **Dans le diabète de type 1**, l'hyperglycémie est due à une carence absolue en insuline, secondaire à la destruction auto-immune des cellules b des îlots de Langerhans même si certains cas rares de ce diabète apparaissent idiopathiques, Ce diabète est appelé aussi « diabète maigre » car il débute en général chez des enfants ou des adolescents, mais il peut apparaître également chez l'adulte avant 30 ans. **Dans le diabète de type 2**, la carence en insuline est relative et l'hyperglycémie est liée à l'association, à des degrés divers, d'une insulinorésistance et d'une insulinopénie, il est également appelé « diabète gras » et plus fréquent que celui de type 1, vu qu'il touche essentiellement les personnes de plus de 40 ans. . Ces 2 types de diabète ont de nombreuses caractéristiques cliniques et biologiques différentes (Tableau1).

Tableau 1: Caractéristiques des diabètes de type 1 et 2

	Diabète de type 1	Diabète de type 2
Fréquence relative	10-15%	85-90%
ATCD familiaux	+	+++
Age de début	avant 30 ans	après 40 ans
Mode de début	brutal	progressif
Surpoids	absent	présent
Symptômes	+++	—
Insulinosécrétion	néant	persistante
Cétose	fréquente	absente
MAI associées*	oui	non
Auto-anticorps	présents	absents
Groupe HLA	oui	non
Traitement	insuline	régime, exercice, ADO**

* MAI : maladies auto-immunes - **ADO : anti-diabétiques oraux

Les diabètes dits "spécifiques" sont secondaires à une maladie pancréatique, à une endocrinopathie, iatrogènes ou encore liés à des anomalies génétiques. Le diabète gestationnel correspond à un trouble de la tolérance glucidique apparaissant entre la 24ème et la 28ème semaine de grossesse et disparaissant après l'accouchement. Son diagnostic repose à l'heure actuelle sur la pratique d'une HGPO avec 100g de glucose.

La classe "altération de l'homéostasie glucidique" correspond à des anomalies minimales de la régulation glycémique qui traduisent une augmentation du risque de diabète et de maladies cardiovasculaires.

La présentation clinique d'un diabète sucré est très variable et le diabète peut être révélé par l'une de ses complications chroniques.

C. Les différentes techniques de dosages de l'HbA1c

Le dosage de l'HbA1c s'est progressivement affiné et standardisé. Au fil des années, Des sociétés savantes comme le NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program) et l'IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) ont contribué à sa standardisation, ce qui permet une comparaison inter-laboratoire des résultats. Son dosage fait appel à des méthodes chromatographiques, électrophorétiques ou encore immunologiques [6].

1. Méthode immunologique

Utilisent des anticorps dirigés contre le peptide N-terminal glyquée des chaînes β . L'HbA1c est calculée par rapport à l'Hb totale à l'aide d'une gamme d'étalonnage titrée. La spécificité est bonne,

cependant l'interférence des variants de l'hémoglobine peut se manifester ou non suivant la caractéristique des anticorps [7].

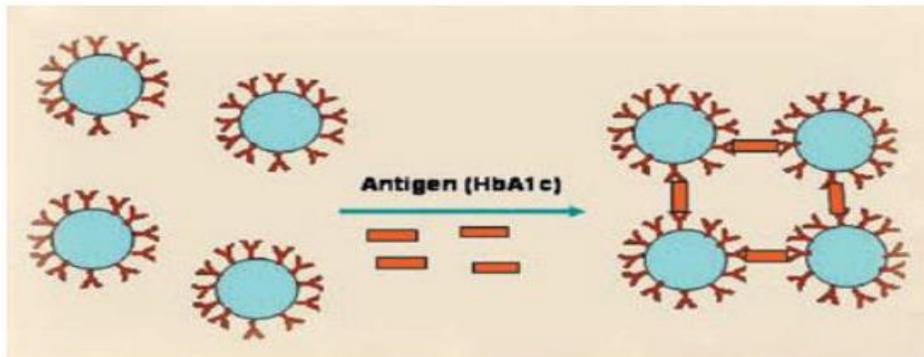


Figure 5 : Dosage d'HbA1c par méthode immunologique

2. Méthodes électrophorétiques

Séparent les fractions d'hémoglobine selon leur charge et leur quantification. Des applications de l'électrophorèse capillaire ont permis d'améliorer la précision de ces techniques électrophorétiques et permettent de doser l'HbA1c [7]. Cette dernière est caractérisée par une haute résolution des différentes variantes de l'hémoglobine [8].

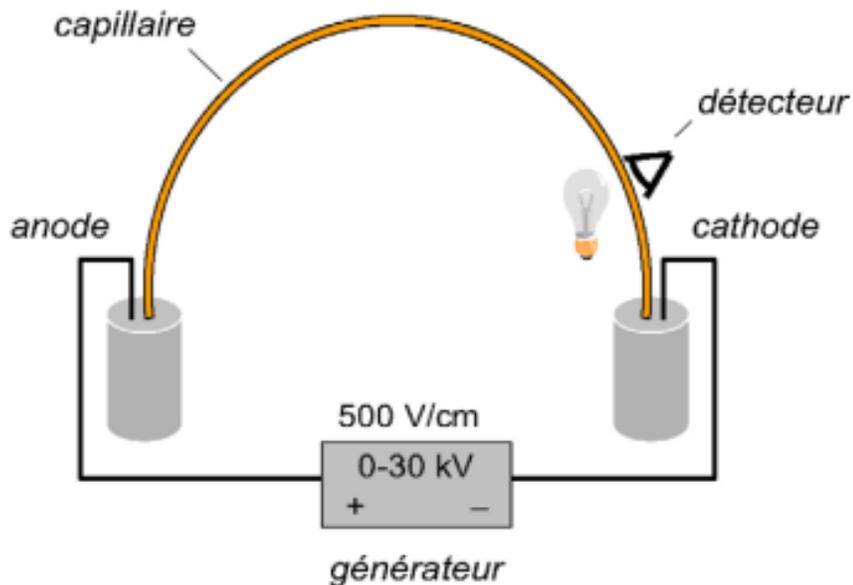


Figure 6 : Représentation schématique d'un appareillage d'électrophorèse

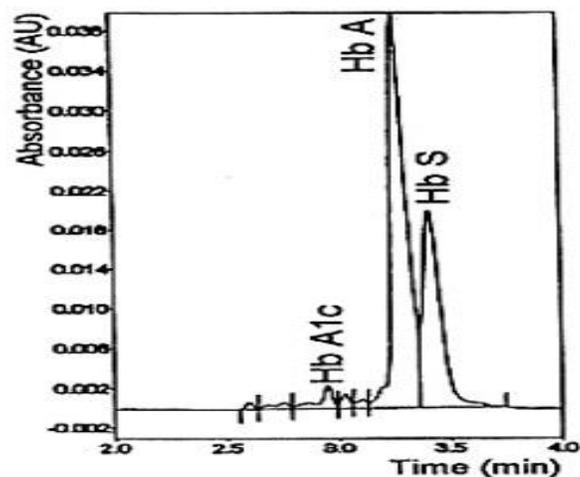


Figure 7 : résultat de séparation d'Hb par EC

3. Méthodes chromatographiques

Les méthodes d'affinité ont maintenant été adaptées pour être utilisées sur des analyseurs de chimie automatisés, et l'HPLC (chromatographie liquide à haute performance) sur gel d'affinité est désormais largement utilisée dans le monde entier. Les deux adaptations sont calibrées à l'aide du matériel du fabricant. [9]

D. Standardisation

En biologie clinique, la standardisation est indispensable pour permettre une comparaison inter-laboratoire des résultats. Cette standardisation se base sur les études prospectives réalisées par le Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) et l'United King-dom Prospective Diabètes Study (UKPDS). Ces études ne définissant l'étalon que par des critères chromatographiques, elle est sujette à de nombreuses interférences. Un groupe de travail de l'International Fédération of Clinical Chemistry (IFCC) a décrit en 2002 une méthode de référence qui repose sur une HPLC en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse. Ici, l'étalon est défini chimiquement : l'hexapeptide N-terminal glyqué de la chaîne. Cette technique est plus spécifique et donne des résultats 1 à 2 % plus bas que ceux de la NGSP/DCCT (Diabetes Control and Complication Trial). Une équation directrice permet la conversion entre les deux systèmes: Les résultats de la NGSP sont exprimés en % et ceux de l'IFCC en mmol/mol (depuis 2007), ce qui a l'avantage de marquer clairement le type de standard. De plus, il est actuellement recommandé d'exprimer les résultats d'HbA1c selon les deux unités dans les comptes rendus d'analyses médicales : $NGSP = [0,0915 \times IFCC] + 2,15$ [10].

E. Limites et interférences de dosage

Il existe différents paramètres qui faussent le dosage de l'HbA1c et qui rendent ce dosage inutile quel que soit la méthode utilisée. **[12]**

1. Métabolisme anormal de l'Hb ou des GR

Traitement stimulant l'hématopoïèse, Hémorragies, Transfusions, Traitement antirétroviral
Splénectomie,

Hypertriglycémie (> 15 mmol/l) ou hyper-bilirubinémie (interférence avec les méthodes basées sur un immuno-essai)

Grossesse (abaissement de l'HbA1c par dilution) **[12]**

a) Présence de variantes d'Hb

Conséquences physiopathologiques :

- Diminution de la durée de vie des GR + hémolyse
- Cinétique de glycation différente

Conséquences analytiques (dépendent de la méthode)

- Détection du variant
- Interprétation et rendu des résultats **[12]**

b) Présence d'autres Hb modifiées

La fixation de substances non glucidiques sur l'Hb peut modifier ses propriétés physico-chimiques et augmenter les valeurs d'HbA1c

- Acétylation avec aspirine ou au cours de l'éthylisme chronique ou l'Hb acétylée peut représenter 2 à 3%
- Carbamylation de l'Hb lors d'insuffisance rénale : fixation d'isocyanate provenant de la décomposition de l'urée. **[12]**

2. Médicaments et toxiques

Vitamine C à haute dose (inhibition de la glycation)

Aspirine à hautes doses (valeurs faussement élevées, formation Hb acétylée)

Ethylisme chronique (valeurs faussement élevées, formation Hb anormale avec acétaldéhyde)

3. L'intérêt du dosage d'HbA1c chez les diabétiques

Le dosage de l'hémoglobine glyquée (HbA_{1c}) est le reflet le plus simple du taux moyen de glycémie, elle permet aux soignants et aux patients d'évaluer facilement le contrôle du diabète et de fixer des objectifs thérapeutiques [16].

a) Corrélation entre l'HbA_{1c} et la glycémie

Les premiers travaux montrant un lien entre l'augmentation de l'hémoglobine glyquée et le diabète ont été publiés dans les années 70. Sur la base principalement de l'analyse des résultats de l'étude DCCT, on a pu établir une corrélation entre le taux moyen de glycémie et la valeur de l'HbA_{1c} : **Glycémie moyenne (mmol/l) = 2xHbA_{1c} (%) – 6,0 [16].**

Une augmentation de l'HbA_{1c} observée dans des conditions de mauvais contrôle du diabète a été associée à une augmentation de la viscosité du sang.

La glycosylation de l'hémoglobine et l'augmentation des taux de glucose ont tendance à affecter les propriétés des globules rouges, réduisant la flexibilité des globules rouges et augmentant leur tendance à l'agrégation, entraînant une augmentation de la viscosité du sang. La glycosylation de l'hémoglobine peut également affecter les interactions entre les lipides membranaires et les protéines dans les globules rouges, altérant leur viscosité interne, modifiant les propriétés viscoélastiques des membranes érythrocytaires et altérant la déformabilité des globules rouges [2]

b) Valeurs usuelles

Depuis juin 2011, les résultats d'HbA_{1c} doivent être exprimés à la fois en mmol/mol (IFCC) et en pourcentage (NGSP). Les valeurs usuelles sont de 4 à 6 % (NGSP) et 20 à 42 mmol/mol (IFCC). Le dosage de l'HbA_{1c} doit se faire à une fréquence de 2 fois par an si l'objectif thérapeutique est atteint ; si ce n'est pas le cas ou lors d'un changement de traitement, il doit être réalisé chaque trimestre. Pour ce qui est de l'utilisation de ce marqueur dans le diagnostic du diabète l'OMS retient les critères suivants :

- HbA_{1c} ≥ 6,5 % (48 mmol/mol) à deux reprises
- HbA_{1c} ≥ 6,5 % et glycémie à jeun > 2 g/L [10]. Les valeurs, basées sur différentes unités, sont illustrées dans le tableau ci-dessous [2].

Tableau 2 : HbA1c comme indicateur du contrôle du diabète

GLUCOSE SANGUIN		STATUT	HbA1c	
mmol/L	mg/dL		%	mmol/mol
5.4	97	Normal	5	31
7.0	126		6	42
8,6	155	Pré-diabète	7	53
10.2	184	Diabète	8	64
11.8	212	Diabète	9	75
13.4	241		dix	86
14,9	268	Diabète	11	97
16,5	297		12	108

Les normes d'HbA1c (selon étude DCCT) ont été définies pour **[12]** :

- Une durée de vie normale des hématies: 120 jours (absence d'hémolyse, de transfusion.)
- Une synthèse normale d'hémoglobine
- Une population de patients homozygotes A/A (HbA0 > 95%)

c) Utilité pour le diagnostic de diabète

Premièrement, l'HbA_{1c} donne une indication de la glycémie chronique plutôt que d'être un test de glycémie à un moment donné. Il donne un index intégré de la glycémie sur toute la durée de vie de 120 jours du globule rouge, mais dans cette période de 120 jours, la glycémie récente a la plus grande influence sur la valeur de l'HbA_{1c}, avec 50 % de l'HbA_{1c} formée dans le mois avant l'échantillonnage et 25 % dans le mois précédent. Il semble donc logique qu'un tel test soit approprié pour diagnostiquer une maladie caractérisée par une hyperglycémie chronique et une évolution progressive vers des complications. Deuxièmement, il s'agit d'un test relativement pratique, qui n'oblige pas le patient à jeûner et n'utilise qu'un seul échantillon de sang. Il s'agit d'une considération importante, car elle peut permettre une meilleure utilisation des tests et une meilleure détection du diabète, étant donné la grande proportion des cas du diabète qui ne sont pas diagnostiqués. Contrairement au glucose plasmatique, l'HbA_{1c} présente une variabilité pré-analytique minimale. Elle est très stable après prélèvement sans modification de sa concentration « dans le tube de prélèvement (une semaine à 4 °C) **[16]**.

IV. OBJECTIF DU TRAVAIL

L'hémoglobine glyquée (HbA1c) est considérée comme un « Etalon d'or » utilisé pour le diagnostic de diabète et le contrôle glycémique à long terme, son dosage alors permet de déterminer la quantité de glucose cumulée dans les globules rouges pendant une période de 120 jours. A cet effet, le dosage d'hba1c bénéficie actuellement d'une trentaine de techniques différentes disponibles sur le marché.

Ce travail a pour objectif la détermination des différentes techniques recommandées et utilisées pour le dosage de l'hémoglobine glyquée à l'échelle mondial, et l'appréciation de la technique HPLC utilisée dans le laboratoire des analyses biochimiques au niveau de CHU-Fès .

De même qu'apprécier de ce dosage pour l'exploration de la pathologie de diabète et la surveillance de cette maladie chez les personnes diabétiques.

V. MATERIEL ET METHODES

A. Etapes des analyses biochimiques

Les étapes des analyses médicales dont j'ai appris de suivre et pratiquer dans le laboratoire de biochimie peuvent être résumées dans les suivantes :

1. La phase pré-analytique

- Réception des échantillons : prélèvement du sang, liquides biologiques du corps humain
- Etiquetage des tubes selon les analyses biochimiques demandées :

	Le code doit être terminé par	Applications
Tube vert	29	Biochimie
Tube rouge	28	Electrophorèse
Tube violet	27	Hémoglobine glycosylée
Tube gris	26	LCR

- Centrifugation.



Figure 8 : Appareil de centrifugation

2. Phase analytiques

- **Deux automates ARCHITECT C8000** dosage biochimique du sang , urine , LCR, LP : (ionogramme , vitamines , glycémie , créatinine , CRP , ferritine , test dans les urines bilirubine , enzymes , triglycérides)

- **Appareil d'électrophorèse SEBIA** séparation des protéines plasmatiques, immunofixation
- **Appareil HPLC ADAMS HbA1c** (dosage direct d'hémoglobine glyquée), sans passer par la centrifugation

3. Phase post-analytique validation des résultats

Mon sujet de stage se focalise sur la technique HPLC de dosage de l'hémoglobine glyquée utilisée dans le laboratoire.

B. Principe général d'HPLC

Cette technique est utilisée afin de séparer, identifier et quantifier la composition d'un mélange, sauf que dans cette technique d'HPLC (chromatographie liquide à haute performance), la phase mobile qui est constituée d'un solvant ou d'un mélange de solvant est forcée par une pompe. cette pompe permet d'avoir un débit d'écoulement élevé de la phase mobile ou de l'éluant ce qui permet de diminuer le temps nécessaire pour la séparation des composés d'un mélange tout au long de la phase stationnaire.

La séparation se fait dans une colonne chromatographique contenant la phase stationnaire, généralement elle est sous forme de Film polymérique qui recouvre ou qui est greffé sur la paroi interne de la colonne.

Cette méthode de CLHP est certifiée de NGSP pour le dosage d'HbA1c , la séparation alors est améliorée et l'automatisation est quasi complète.

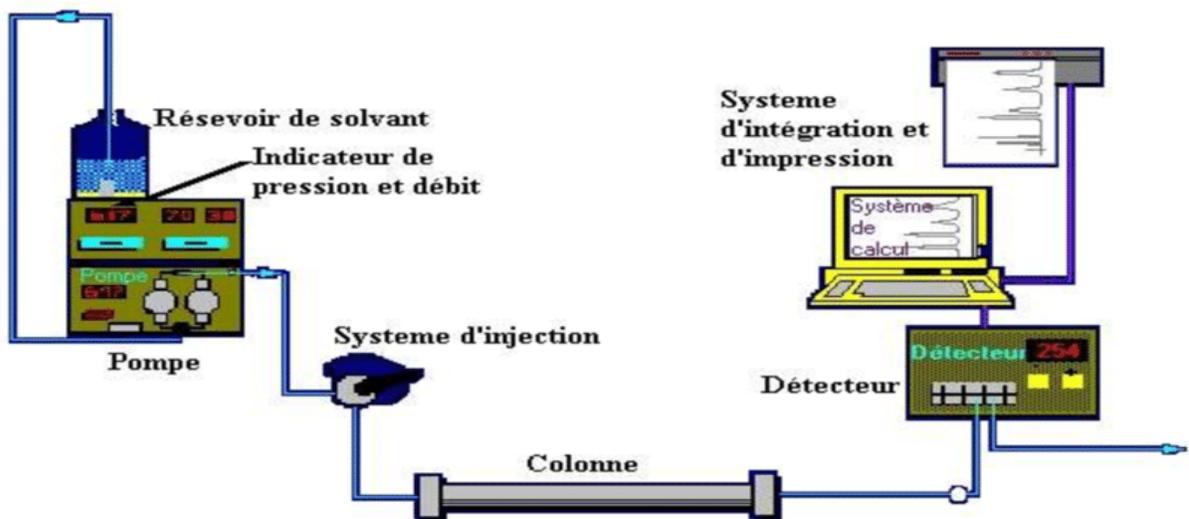


Figure 9 : Principe général de la technique HPLC

C. Appareil de dosage D'HbA1c :

Le dosage de l'HbA1c dans le laboratoire de biochimie au niveau de CHU-Fès repose sur une méthode d'HPLC avec l'analyseur ADAMS™ A1C HA-8180V.



Figure10: Analyseur ADAMS™ A1C HA-8180V

1. Caractéristiques [23]

Type d'analyseur	HbA1 analyseur entièrement automatisé
Principe de mesure	Chromatographie liquide haute performance par échange d'ions
Plage de mesure garantie	HbA1c: 4 à 15% (20 à 140 mmol / mol) HbF: 0,3 à 5%
Longueur d'onde de mesure	420 nm / 500 nm (colorimétrie à deux longueurs d'onde)
Consommation d'échantillon	Environ 14 µL (sang total)
Volume d'échantillon requis	Tube d'échantillon: 10 mm du bas du tube
Débit	37 tests / heure
Vitesse de traitement	90 secondes / test
Capacité du rack d'échantillons	10 échantillons / rack
Mémoire	900 résultats (y compris les résultats d'étalonnage)
Environnement de mesure	Température: 10 - 30°C Humidité: 20-80% HR (sans condensation)

2. Etapes de mesure d'HbA1c avec ADAMS™ a1c HA8180v

a) Réception des échantillons

Les échantillons du sang sont prélevés par une ponction veineuse et le Sang total collecté dans des tubes K2-EDTA ou K3-EDTA (un agent anticoagulant) avec une couleur lavande de bouchon. Le sang ainsi prélevé est acheminé directement au laboratoire pour doser l'HbA1c.



b) Etalonnage

Avant de commencer le dosage il faut une calibration de l'appareil en réalisant deux contrôles: le premier contrôle détermine la valeur de référence d'un cas non diabétique qui est en moyenne de 5.6% d'HbA1c et le deuxième contrôle pour vérifier la deuxième valeur de référence chez un patient diabétique qui est en moyenne de 10.5%. Le système utilise l'étalonnage IFCC et fournit une valeur NGSP (certifiée par cette dernière. Les résultats de l'étude de la répétabilité avec les coefficients de variations calculés pour les deux niveaux sont respectivement de 0.338 % et 0.171 % (tableau 3). En les comparant avec le CV (coefficient de variation) fournisseur et celui retenu par la SFBC (Société Française de Biochimie Clinique, on constate que les résultats sont conformes [13].

Tableau 3: Résultats de l'étude de la répétabilité

RÉPÉTABILITÉ (applicable)							
Échantillon	Nombre de valeurs (n)	Moyenne	Écart-type	CV (%)	CV (%) Fournisseur	CV (%) (SFBC)	Conclusion
CIQ1 HbA1c = 5,4 % (36 mmol/mol)	30	5,4 36	0,018	0,338	10	3,75	Conforme
CIQ2 HbA1c = 10,7 % (94 mmol/mol)	30	10,7 94	0,018	0,171	10	3,75	Conforme

c) Mode du travail

Après avoir déposé le portoir des tubes dans l'analyseur ADAMS™ A1C HA-8180V, l'appareil doué d'automatisme commence par une agitation douce des tubes afin d'éviter la sédimentation du sang, suivi d'une lecture des codes barre, puis il entame la réaction de dosage.

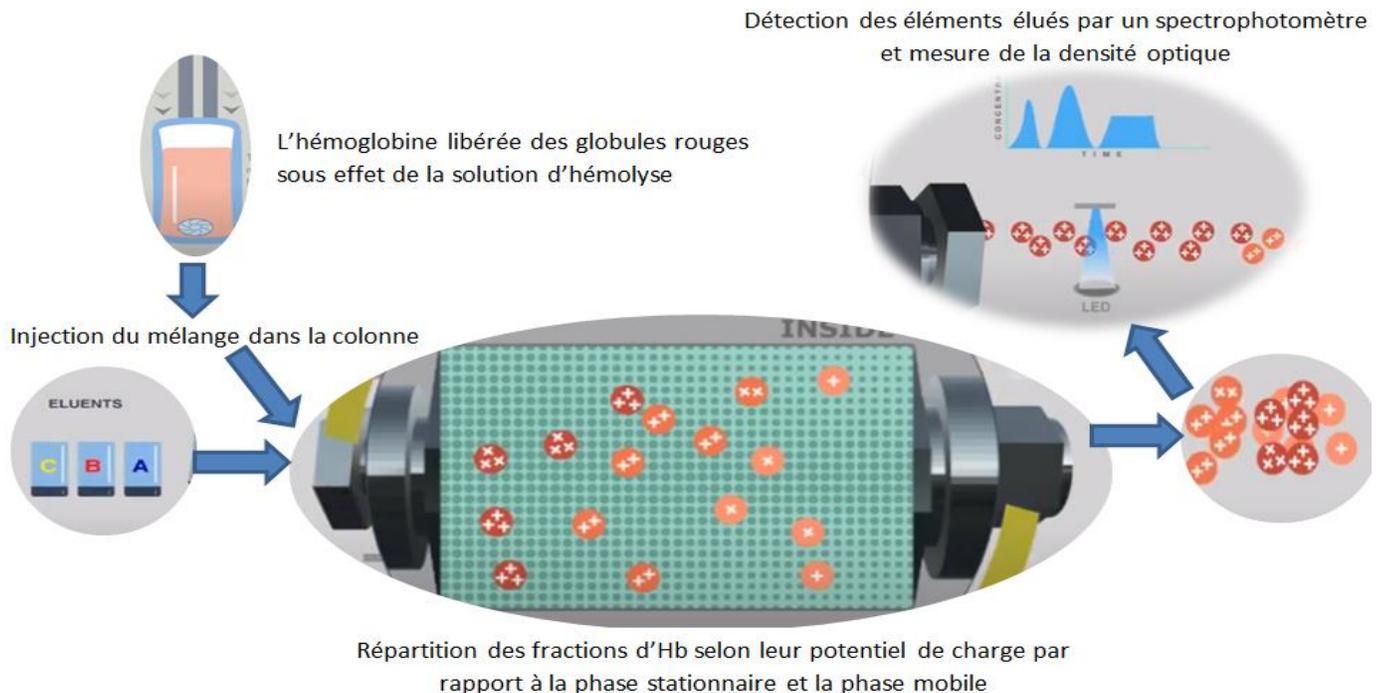


Figure 11 : Etapes de dosage d'HbA1c par la technique d'HPLC

Le processus de dosage peut être identifié en trois étapes principales :

1- L'hémolyse

Le sang est aspiré automatiquement puis dilué par une solution d'hémolyse constituée de Polyéthylène glycol éther p-octylphénylique ($\leq 0,1$) et de De l'azide de sodium ($\leq 0,02$). Cet échantillon dilué est injecté dans la colonne, un volume de 3,4 μl du sang total automatiquement dilué est injecté.

2- la séparation

La colonne ARKRAY en acier inoxydable, se compose d'un préfiltre pour se débarrasser des impuretés de l'échantillon hémolysée et d'une colonne analytique remplie d'une résine échangeuse d'ions (un polymère hydrophile d'un copolymère méthacrylate ester) (fig.12) [7].



Figure 12: Colonne ARAKRAY échangeuse d'ions

Le mélange à analyser est injecté puis transporté à travers le système chromatographique, les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire [14]. L'élution est réalisée dans un gradient de tampon phosphate en cinq étapes avec augmentation de la force ionique.

Il y a trois tampons (80A, 80B et 80CV) dans des emballages en aluminium :

- éluant 80A : composé de Perchlorate de sodium (<0,1%) et de l'azide de sodium(<0,1%)
- éluant 80B : composé de Perchlorate de sodium ($\leq 3,0\%$) et de l'azide de sodium(<0,1%)
- éluant 80CV : composé de Perchlorate de sodium ($\leq 3,0\%$) et de l'azide de sodium(<0,1%)

La colonne échangeuse d'ions utilise la polarité des solutés pour les séparer. Les fractions d'hémoglobines possèdent chacune un potentiel de charge différent, ce qui détermine l'affinité de chaque type par rapport à la phase stationnaire polaire. Les composés qui ont le potentiel de charge le plus grand sont les plus retenus par la résine et qui sont élués en dernier (HbA1c). En revanche, ceux qui ont le potentiel de charge le plus faible, ils prennent plus de temps à être retenus complètement et ils sortent les premiers(HbA0).

3- Détection

Les fractions d'hémoglobines éluées sont identifiées et quantifiées par l'absorption de la lumière émise par un détecteur avec une double longueur d'onde (420 – 500 nm) LED-photodiode. Au bout de 90 min , les résultats sont affichés sous forme des pics caractérisant les différentes solutés obtenus et l'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme. Le pourcentage d'HbA1c peut être obtenu même en présence de HbA, HbC, HbE, HbF et HbS , sans aucune interférence[7].

La détection des pics séparés se fait par un intégrateur qui mesure la surface sous un pic, et qui dépend de 2 paramètres [14] :

- * la largeur attendue des pics
- * le seuil d'intégration (sensibilité)

La largeur de pic détermine la fréquence d'échantillonnage du signal. Le pic est alors découpé en tranches. Le seuil d'intégration est la valeur du signal à partir de laquelle le calculateur repère un début de pic, Le résultat rapporté est dérivé du rapport HbA1c/HbA totale, ajustée pour l'étalonnage et exprimé dans les deux unités IFCC (mmol/mol) et NGSP (%), le résultat est figuré ci-dessous :

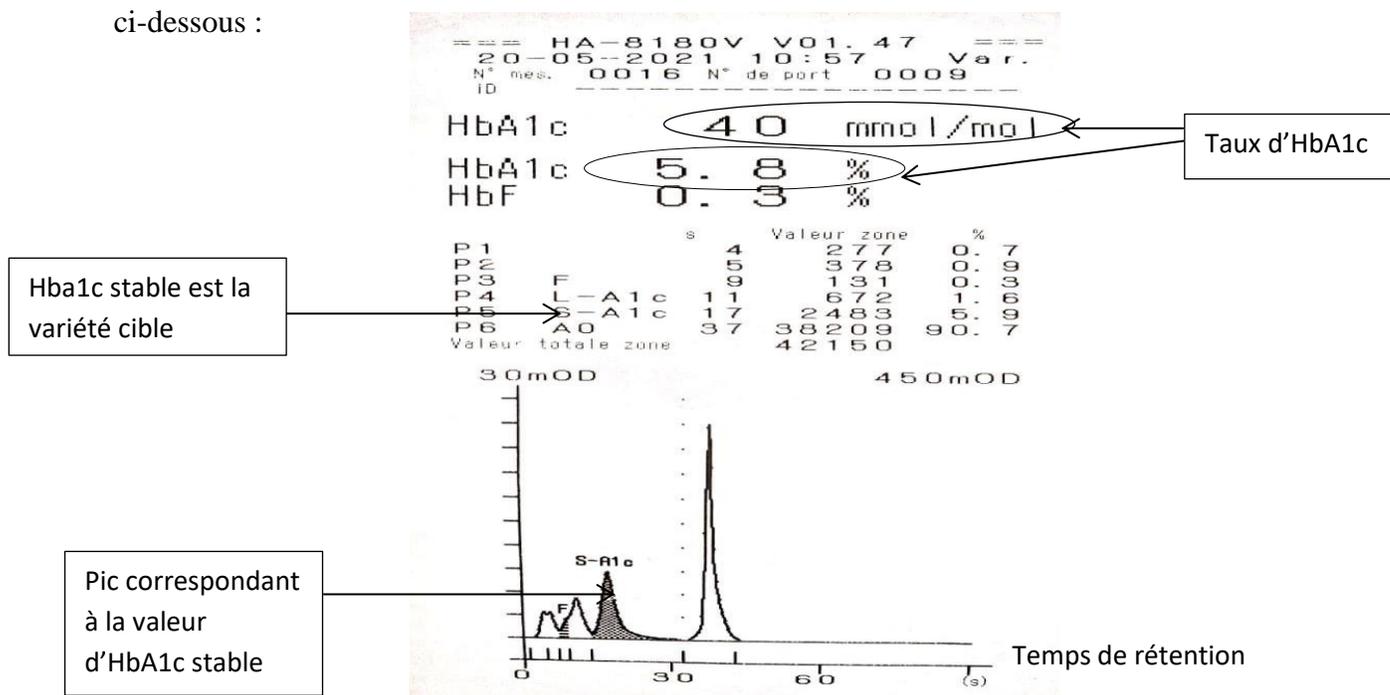


Figure 13: Exemple du chromatogramme.

3. Interprétation du chromatogramme :

Une bonne séparation des pics désigne une bonne caractérisation des différentes fractions d'hémoglobine, le traçage de la courbe se fait par la mesure de la densité optique en fonction de temps pris par la molécule pour son élution complète.

Le temps de rétention T_r : est le temps mis par un soluté pour traverser la colonne et pour qu'il soit complètement retenu par le solvant. Ce temps est caractéristique d'un soluté dans des conditions d'analyse donnés. La surface du pic est en fonction de la quantité du constituant

VI. RESULTATS ET DISCUSSION

A. Résultats

1. Conception de l'étude et sélection des patients

Il s'agit d'une étude statistique dans un but analytique chez 401 patients au laboratoire des analyses biochimiques de CHU-FES durant la période du 17/05/2021 jusqu'au 2/06/2021, afin de diagnostiquer ou surveiller leur état de diabète en réalisant le test de dosage d'hémoglobine glyquée (HbA1c).

L'objectif de cette étude est de déterminer l'intérêt de dosage d'HbA1c dans la gestion du diabète et ses variations selon l'âge et le sexe.

Notre population d'étude composée de 401 patients est répartie selon le sexe entre 263 femmes et 138 hommes.

Les données de cette étude sont saisies et traités sur Excel.

Tableau 4: Répartition des patients selon le taux d'HbA1c mesuré

Sexe HbA1c en %	Féminins (n=263) (65%)	Masculins (n=138) (34%)	État de patient	% dans la population (n= 401)
<7%	173 (65%)	98 (71%)	Normale	67%
=7%	5 (2%)	1 (0.7%)	Pré-diabétique	1,5%
>7%	85 (32%)	39 (28%)	Diabétique	31%

Tableau 5: Répartition des patients selon l'âge et le taux d'HbA1c

%HbA1c Âge	Féminins (n=263)			Masculins (n=138)			% dans la population
	<7%	=7%	>7%	<7%	=7%	>7%	
<18 ans	1	0	2	3	0	1	7 (1,75%)
18 – 45 ans	46	1	13	23	0	2	85 (21%)
>45 ans	126	4	70	72	1	36	309(77%)
% dans la catégorie (F ou M)	65%	2,5%	32,5%	69%	1%	30%	

Notre population constituée de 401 patients est hétérogène : le nombre de femmes (65% de la population) est supérieur au nombre des hommes (34% de la population)

La moyenne d'âge de la population étudiée est 55 ans avec un écart type de 21,92

La moyenne de taux d'HbA1c mesuré est 6,1% avec un écart-type de 1,41 ce qui correspond à une moyenne de 49,25 mmol /mol, avec un écart-type 16,97.

B. Discussion

1. Comparaison avec les normes marocaines

A partir de cette étude, on peut constater que la prévalence de diabète est **1,14** fois plus élevée chez les femmes (32%) que chez les hommes (28%), et elle est également élevée chez les gens ayant plus de 45 ans dans les deux catégories et qui représente 26,5% de la population totale, par conséquent le diabète gras qui est le plus répandu.

En 2018, le ministère de santé a réalisé une enquête nationale sur la population et la santé familiale (ENPSF) afin d'actualiser les données sur les maladies chroniques au Maroc, y compris le diabète. Cette étude a retrouvé une prévalence du diabète, estimée sur la base des déclarations recueillies au moment de l'enquête ménage, est de 4,8%, montrant une augmentation par rapport aux résultats de ENPSF – 2011 (3,3%). Cette prévalence est 1,7 fois plus élevée en urbain (5,7%) qu'en rural (3,3%) et **1,4** fois plus élevée chez les femmes (5,6%) que chez les hommes (3,9%). Les tranches d'âge de 50-59 ans et de 60 ans et plus enregistrent des prévalences respectivement de 13,4% et de 20%. Chez les moins de 30 ans la prévalence est inférieure à 1% et pour les 30 à 49 ans, elle est inférieure de 5,9%. On peut déduire qu'il y a une compatibilité entre les résultats de notre étude et les résultats obtenus par l'ENPSF-2018 [17].

2. Comparaison avec les normes mondiales

Le diabète, qu'il soit de types 1 ou 2, est plus fréquent dans la population masculine. On observe ce dysmorphisme sexuel partout à travers le monde, à l'exception de certains pays d'Afrique subsaharienne. Les hommes sont 26% plus susceptibles de souffrir de diabète. Les chiffres les plus récents de Public Health England montrent que 9,6 % des hommes âgés de 16 ans et plus souffraient de diabète, contre 7,6 % des femmes.

En 2014, le sexe masculin a enregistré près de deux fois plus de décès dus au diabète dans la tranche d'âge 15-64 ans que les femmes (hommes 493, femmes 255, (ONS 2014). La prévalence du diabète diagnostiqué par un médecin a augmenté entre 1994 et 2015, passant de 2,9 % à 6,7 % chez les hommes et de 1,9 % à 5,1 % chez les femmes. Les hommes d'origine africaine, africaine caribéenne, sud-asiatique ou chinoise sont plus à risque de développer un diabète de type 2 à un plus jeune âge. Ils ont également une tendance à progresser d'une intolérance au glucose à plus de deux fois le taux de la population blanche [18].

Il a été démontré que le taux d'hémoglobine glyquée est augmenté d'une manière physiologique chez les hommes que chez les femmes en raison de la différence bien connue du taux d'hémoglobine entre les deux sexes [19].

On se trouve alors devant une incompatibilité entre les résultats obtenus et les normes mondiales, dans ce cas on peut expliquer cette différence par plusieurs facteurs :

- **Variation essentiellement régionale** : plusieurs facteurs génétiques et environnementaux influençant le processus de la glycation, la déglycation, la durée de vies des hématies, la perméabilité membranaire au glucose et modifient potentiellement la valeur d'HbA1c qui peut varier d'une région à une autre. C'est ce qui est prouvé par l'étude précédente [20].
- **conditions pathologiques** : influencent le diagnostic de diabète (autres maladies chroniques, anomalies des érythrocytes, modification de ph sanguine, hémolyse...)
- **Administration des médicaments**: Dapsone, antiviraux, interféron, fer, EPO...
- **Conditions non pathologiques**: L'ethnie est un facteur de variabilité important des valeurs d'HbA1c, Une étude récente a montré la possible surestimation des diagnostics de diabète chez 1,8 % de la population noire américaine (contre 0,3 % de surestimation chez les "Blancs" non hispaniques) selon les critères récemment entérinés par l'ADA[21] .
- **limites de la relation "moyenne glycémique/HbA1c"**: les critères de corrélation entre la glycémie et le taux d'hba1c peuvent être non respectés probablement en raison de la capacité de glycation ou de pénétration du glucose au sein des érythrocytes chez l'individu, de la présence d'une anémie, d'une grossesse, d'une hémoglobinopathie, de traitement interférant avec le dosage de l'HbA1c ou encore en raison d'une variabilité glycémique trop importante. [20]

3. Pourquoi HPLC ?

Le choix de la technique et sa fiabilité est l'un des facteurs déterminants de la qualité des résultats des analyses au sein des laboratoires de biologie médicale. Depuis 1996, la chromatographie liquide à haute performance par échange d'ions devenait une technique recommandée et utilisée par les laboratoires des analyses biochimiques à l'échelle internationale pour le dosage et la quantification précise de l'hémoglobine glyquée dans les hématies [15]. Ce dosage, fréquemment prescrit, entraîne un recrutement important et permet, de ce fait :

- Une phase pré-analytique très réduite.
- Mettre en évidence de manière fortuite d'anomalies de l'hémoglobine.
- Une grande précision de mesure, par détection de variants d'Hb
- Une bonne alternative aux autres techniques en termes de performances analytiques, de praticabilité, de qualité des résultats, notamment lors des anomalies de l'hémoglobine.
- Un test de dosage est très court et plus pratique pour un laboratoire qui reçoit nombre élevé d'échantillons par jour. Les autres méthodes immunologiques et électrophorétiques nécessitent plus de temps que ça soit pour la préparation des échantillons ou pour la réaction de dosage.
- Pas d'interférences qui peuvent fausser l'interprétation des résultats obtenus.

VII. CONCLUSION

Le taux d'HbA1c reflète l'équilibre glycémique sur une période de deux à trois mois. Sa concentration exprimée en pourcentage et en mmol/mol ; une valeur située entre 4 et 6 % (20 à 42 mmol/mol) est souhaitable. Ce dosage est recommandé et très utilisé dans les structures de santé pour le diagnostic du diabète sucré et le suivi de son évolution chez les patients diabétiques.

Cependant, le dosage de ce biomarqueur peut être faussé et interféré par plusieurs facteurs pathologiques ou physiologiques donnant des résultats incorrects, La connaissance de ces limites d'interprétation permet également de relativiser la mise en place des correspondances entre HbA1c et moyenne glycémique dont l'utilisation tend à se généraliser.

Une variation régionale de prévalence du diabète est enregistrée ; elle est plus élevée chez les femmes que chez les hommes au Maroc , alors que les résultats sont considérablement différents dans les autres régions du monde qui connaissent une prévalence élevée du diabète chez les masculins que les féminins. D'autre part, le diabète gras est le plus répandu chez les deux sexes et à l'échelle mondiale.

VIII. BIBLIOGRAPHIE

[1] Christine Brooker. Le corps humain : Étude, structure et fonction. Deuxième édition traduite de l'anglais , publié en 1998 Masby international limited

[2] Sherwani, S. I., Khan, H. A., Ekhzaimy, A., Masood, A., & Sakharkar, M. K. (2016). Significance of HbA1c test in diagnosis and prognosis of diabetic patients. Biomarker insights, 11, BMI-S38440.

[3] Schlienger, J. L. (2018). Le demi-siècle de l'hémoglobine glyquée. Médecine des Maladies Métaboliques, 12(1), 93-96.

[4] Lenters-Westra, E., Schindhelm, R. K., Bilo, H. J., & Slingerland, R. J. (2013). Hemoglobin A1c: Historical overview and current concepts. Diabetes research and clinical practice, 99(2), 75-84.

[5] Jouli La Reine . Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique - 2001 - vol.25 - n°2. ACADEMIA Accelerating the world's research.

[6] The glycated hemoglobin: Indication, interpretation and limitations M. Zendjabil Laboratoire de biochimie, établissement hospitalier universitaire d'Oran 1er-Novembre-1954, BP 4166 Ibn Rochd, Oran, Algérie Reçu le 20 août 2014 ; accepté le 7 mars 2015 Disponible sur Internet le 6 avril 2015

[7] AMADOU SEIBOU, B. (2016). Vérification de la méthode de dosage de l'HbA1c par CLHP sur l'automate ARKRAY ADAMS A1c HA-8180V nouvellement acquis au laboratoire de Biochimie-Toxicologie de l'HMIMV (Doctoral dissertation).

[8] Pr Garry John, biochimiste clinicien à l'Hôpital universitaire de Norfolk et Norwich (Royaume Uni). Sebia : marquage CE pour l'HbA1c en électrophorèse.

[9] HISTOIRE HBA1C : John, WG, Mosca, A., Weykamp, C. et Goodall, I. (2007). Standardisation de l'HbA1c: histoire, science et politique. Les revues de biochimiste clinique , 28 (4), 163.

[10] Zendjabil, M. (2015, April). The glycated hemoglobin: indication, interpretation and limitations. In Annales pharmaceutiques françaises (Vol. 73, No. 5, pp. 336-339).

[12] IXème Congrès Maghrébin d'Endocrinologie et Diabétologie, 23-25 Novembre 2012- Alger

[13] Chemsj, H., & Kamal, N. (2020). Vérification de la méthode de dosage de l'HbA1c par HPLC au laboratoire de biochimie. Revue Francophone des Laboratoires, 2020(523), 22-27.

[14] C Yvelin, Catherine Chauvin, F Colomb . HPLC Principe et appareillage . Biochimie et Bio moléculaire - Biotechnologie & Biologie et Physiopathologie humaine - Académie de Rouen , mercredi 20 janvier 2010

[15] Lemée, V., Hue, G., Lahary, A., & Lavoine, A. (1999, November). Détection fortuite d'anomalies de l'hémoglobine lors du dosage de l'hémoglobine glyquée par une technique de chromatographie liquide haute pression. In Annales de Biologie Clinique (Vol. 57, No. 6, pp. 713)

[16] Florkowski, Chris. « HbA1c en tant que test de diagnostic du diabète sucré – examen des preuves ». The Clinical Biochemist Reviews 34.2 (2013): 75.

[19] Bae, JC, Suh, S., Jin, S.-M., Kim, SW, Hur, KY, Kim, JH, ... Kim, K.-W. (2013). Les valeurs d'hémoglobine A1c sont affectées par le taux d'hémoglobine et le sexe chez les Coréens non anémiques. Journal of Diabetes Investigation, 5 (1), 60-65.

[20] Wojtuszczyzn, A. (2012). Les pièges de l'HbA1c. Revues générales. [Cité 13 oct 2020]. Disponible sur: <http://www.realites-cardiologiques>.

[21] OLSON DE, RHEE MK, HERRICK K et al. Screening for diabetes and pre-diabetes with proposed A1C-based diagnostic criteria. Diabetes Care, 2010 33 : 2 184-2 189.

IX. WEBOGRAPHIES

[17] ENQUETE NATIONALE SUR LA POPULATION ET LA SANTE FAMILIALE (ENPSF-2018) https://www.sante.gov.ma/Publications/Etudes_enquete.

[18] CRISE DU DIABÈTE MASCULIN : POUVEZ-VOUS AIDER ? MENS HEALTHFORUM.ORG.UK <HTTPS://WWW.MENSHEALTHFORUM.ORG.UK/MALE-DIABETES-CRISIS-CAN-YOU-HELP>

[11] eurofins clinical diagnostics France © 2012 biomnis – précis de biopathologie analyses médicales spécialisées. <https://www.eurofins.com/clinical-diagnostics/>

[22] : Futura-santé <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/medecine-globule-rouge-715>

[23] : ARKRAY USA Diagnostic Clinique <https://www.arkrayusa.com/clinicaldiagnostics/products/hplc-hba1c>