

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ ABOU BEKR BELKAÏD
FACULTÉ DE MÉDECINE
DR. B. BENZERDJEB - TLEMCEM



وزارة التعليم العالي
والبحث العلمي

جامعة أبو بكر بلقايد
كلية الطب

د. ب. بن زرجب - تلمسان

DEPARTEMENT DE PHARMACIE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES POUR
L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR EN PHARMACIE

THÈME :

**Etude comparative du dosage de l'Hémoglobine glyquée par
deux analyseurs HPLC : BIORAD D10[®] et TOSOH G8[®]**

Présenté par :

- BAYA Sanaa

- ZAIMI Oussama

Le Jury

Président :

- Dr. DJEDID Souad

Maître assistante en Pharmacologie

Examineurs :

- Dr. HADDOU Marwa

Maître assistante en Biochimie

- Dr. NORDINE Zakaria Ibrahim. Maître assistant en Chimie Analytique

Encadrante :

Dr. GHENIMI Fatima Zahra Maître assistante en Chimie Analytique

Année Universitaire 2019-2020

Remerciement

Nous adressons nos sincères remerciements à ceux qui ont contribué à l'élaboration de notre mémoire. En premier lieu, On remercie DIEU tout puissant de nous avoir permis de mener à bien ce modeste travail. Nous tenons tout particulièrement à remercier notre promoteur **Dr. GHENIMI Fatima Zahra**, qui nous a guidés, encouragés et conseillé pendant plus d'une année.

Nous tenons à remercier chaleureusement :

Dr **DJEDID Souad**, vous nous faites l'honneur d'avoir bien voulu présider ce jury pour avoir pris le temps de commenter et de corriger notre travail.

Dr **HADDOU Marwa** et Dr **NORDINE Zakaria Ibrahim** Pour l'honneur que vous me faites en prenant part à ce jury de mémoire et pour avoir accepté d'être nos examinateurs.

Cette occasion nous permet de vous présenter nos plus sincères remerciements pour la bienveillance que vous nous avez manifestée.

Notre plus grand merci s'adresse à tous nos enseignants de département de pharmacie de Tlemcen, pour votre don naturel à transmettre vos connaissances et la simplicité avec laquelle vous le faites nous a marqué.

Un grand merci à Pr BRIXI, chef de service du laboratoire de biochimie CHU Tlemcen et à tout le personnel du laboratoire.

Merci aux membres de laboratoire de Biochimie de l'EHU Oran spécialement **Docteur Zineb CHELLOUAI** pour leur aide.

Enfin nous remercions nos parents, nos proches et nos amis, pour leur présence et leur soutien qui nous 'ont permis d'arriver jusqu'ici et réaliser ce travail.

DEDICACE:

***A l'esprit de Mon Cher père,
'Papa I will always be missing the biggest piece of my heart and I
would have been a better stronger person if you were here', repose en
paix.***

***A ma mère,
Nulle dédicace ne saurait t'exprimer toute ma gratitude, sans ton
soutien et tes prières je ne serais jamais arrivé là.***

***A Mona,
Une sœur par âme, Qui m'a partagé le trajet, unis et inséparables on a
surmonté tous ensemble les moments difficiles. Dieu merci d'avoir
nous croiser les chemins.***

***A Rita,
Tout mon amour.***

Sanaa Jehan

Je dédie ce modeste travail,

A mes très chers parents, Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler. Que dieux leurs procure bonne santé et longue vie.

A mes frères et ma sœur,

A mes proches et mes amis,

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous remercie.

Oussama

Table des matières

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION :Error! Bookmark not defined.

PARTIE THEORIQUE : REVU DE LA LITTERATURE

I. LE DIABETE.....	3
I.1. DEFINITION	3
I.2. CLASSIFICATION DE DIABETE	3
I.2.1. DIABETE TYPE 1	3
I.2.2. DIABETE TYPE 2.....	3
I.2.3. DIABETE GESTATIONNEL	4
I.3. EPIDEMIOLOGIE	5
I.3.1. DANS LE MONDE :.....	5
I.3.2.EN ALGERIE :.....	5
I.4. DIAGNOSTIC:	5
I.4.1. SIGNES CLINIQUES DE L'HYPERGLYCEMIE :.....	5
I.4.2. BILAN BIOCHIMIQUE :.....	6
I.4.3. LE PREDIABETE :.....	7
I.5.TRAITEMENT DU DIABETE :	7

I.5.1. DIABETE TYPE 1 :	7
I.5.2. DIABETE TYPE 2 :	8
I.6. SURVEILLANCE DU DIABETE :	9
I.6.1. L'AUTO-SURVEILLANCE :	9
I.6.2. SURVEILLANCE A MOYEN TERME :	10
I.6.3. DEPISTAGES DES COMPLICATIONS :	10
II. L'HEMOGLOBINE GLYQUEE	12
II .1. RAPPEL SUR L'HEMOGLOBINE	12
II .1.1.DEFINITION	12
II .1.2.STRUCTURE DE LA MOLECULE DE L'HEMOGLOBINE.	12
II.1.3.DIFFERENTES FORMES DE L'HEMOGLOBINE :	13
II.2.PHENOMENE DE GLYCATION DE L'HEMOGLOBINE :	13
II.2.1.DEFINITION :	13
II.2.2.LA REACTION DE GLYCATION DE L HEMOGLOBINE :	15
II.2.3.LES PRODUITS DE LA REACTION DE GLYCATIONS DE L'HEMOGLOBINE:	15
II.3.HEMOGLOBINE GLYQUE :	16
II.3.1. DEFINITION DE L' HBA1C :	16
III.DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE GLYQUEE (HBA1C) :	17
III.1. INTERET DU DOSAGE :	17
III.1.1.DIAGNOSTIC ET SUIVI DU DIABETE:	17

III.1.2.REDUCTION DES RISQUES MICROVASCULAIRES ET MACROVASCULAIRE:	17
III.1.3.DETERMINATION DE LA GLYCEMIE MOYENNE:	18
III.2.PHASE PRE ANALYTIQUE:	20
III.2.1.PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS :	20
III.2.2. PRETRAITEMENT DES ECHANTILLONS:	20
III.3.PRINCIPALES METHODES DU DOSAGE :	21
III.3.1.METHODES BASEES SUR LA MODIFICATION DE CHARGE DE L’HBA1C PAR LA GLYCATION :	21
III.3.2.METHODES BASEES SUR LA MODIFICATION DE STRUCTURE PAR LA GLYCATION :	23
III.4. LES INTERFERENCES AU DOSAGE :	25
III.4.1.VARIABILITES PHYSIOPATHOLOGIQUES :	25
III.4.2.LES VARIANTES DE L'HB OU DE SA REPARTITION :	27
III.4.3.MEDICAMENTS ET TOXIQUES:	28
III.4.4. VARIABILITES ANALYTIQUES:	28
III.5.STANDARDISATION DES METHODES DE DOSAGE :	30
PARTIE PRATIQUE :	
IV. RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE:	32
V.MATERIELS ET METHODES	34
V.1.LIEU ET PERIODE DE L ETUDE PRATIQUE:	34

V.2. ECHANTILLONAGE :	34
V.3. ANALYSEUR A TESTER:	34
V.4.AUTOMATE DE COMPARAISON :	36
V.5.METHODES:	38
V.5.1.INTERET DE LA COMPARAISON DE METHODES:	39
V.5.2. PROTOCOL DE COMPARAISON DE METHODES :	39
V.5.3. METHODE DE CALCUL :	40
V.5.4. COMPARAISON STATISTIQUE DES RESULTATS:	40
V.5.5. CALCUL DU COEFFICIENT DE CORRELATION:	40
VI. RESULTATS ET DISCUSSIONS :	42
VI.1.REPARTITION DES ECHANTILLONS :	42
VI.2.RESULTATS DU DOSAGE DE L' HBA1C:	44
VI.2.1.RESULTATS DU DOSAGE DE L' HBA1C PAR L'ANALYSEUR BIORAD D10^(R) :	44
VI.2.2.RESULTATS DU DOSAGE D'HBA1C PAR L'ANALYSEUR TOSOH G8^(R) :	47
VI.3. RESULTATS DE LA GLYCEMIE :	52
VI.4.RESULTATS DE LA COMPARAISON DES METHODES :	54
VI.4.1. ÉTUDE DE CORRELATION ENTRE LES DEUX METHODES	54
VI.4.2.ANALYSE DES DIFFERENCES ET DES RAPPORTS:	55

VI.4.3.TEST T DE STUDENT :	60
VI.5.RAPPORT DE LA COMPARAISON DE METHODES:	61
CONCLUSION	63
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:	64
RESUME:	70
Annexes:	71

Liste des tableaux

Tableau I:Principales caractéristiques du diabète de type 1 (DT1) et de type 2 (DT2).	4
Tableau II :diagnostic du diabète.....	6
Tableau III: diagnostic de prédiabète. 8.....	7
Tableau IV:les différentes formes de l'hémoglobine	13
Tableau V:Les différentes formes glyquées de l'HbA	15
TableauVI :Corrélation entre les valeurs d'HbA1c et les glycémies moyennes des 2-3 mois précédant le prélèvement sanguin.	19
Tableau VII : déffirentes techniques de dosage d'HbA1c	25
Tableau VIII :Facteurs interférents avec la mesure de l.Hb1Ac.....	30
Tableau IX : résultats de dosage d'HbA1C par l'analyseur BIORAD D10(R).....	44
Tableau X :résultats de dosage d'HbA1C par l'analyseur tosoh G8	48
Tableau XI : résultats de la glycémie calculée.....	51
Tableau XII:résultats des diffrénces et des rapports d'HbA1c obtenues par BIORAD D10 et tosoh G8	Error! Bookmark not defined.
Tableau XIII:les limites de suivi	59
Tableau XIV tableau statistique de la moyenne et l'ecart type	61
Tableau XV:tableau récapulatif.....	Error! Bookmark not defined.

Liste des figures :

Figure 1 : traitement non médicamenteux du diabète.....	8
Figure 2:structure de l'hémoglobine.....	12
Figure 3: les différentes étapes de la glycation non enzymatique des protéines	14
Figure 4: Structure de quelques AGE parmi les plus connus.	15
Figure 5:relation entre l'hbA1c et la réduction des risques	18
Figure 9: L'analyseur D-10® de Bio Rad.....	35
Figure 12: Rapport de patient du dosage de l'HbA1C par Biorad D10.....	47
Figure 13°: Rapport de patient du dosage de l'HbA1C par Tosoh G8 avec présence de variant.	51
Figure 14: Tracé comparatif pour toutes les valeurs du dosage de l'HbA1c obtenues par les deux automates	55
Figure 15: Diagramme des différences	59
Figure 16: diagramme des rapports	60

Liste des annexes :

Annexe 01 :Critères d'attribution du niveau des données probantes aux études publiées.

Annexe 02 : Critères d'attribution de la catégorie aux recommandations pour la pratique clinique.

Annexe 03 : la table du student.

Liste des abréviations

ACD: Anticoagulant Citrate Dextran.

ADAG: A1c-Derived Average Glucose.

AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire de Produits de Santé.

AGE: Advanced Glycation End-Products.

AOMI: AnthériopathieOblitérante des Membres Inférieurs.

CHUT : Centre Hospitalier et Universitaire de Tlemcen.

CIQ : Contrôle Interne de Qualité.

CLBP : Chromatographie Liquide a Basse Pression.

COFRAC :GUIDE TECHNIQUE D'ACCREDITATION DE VERIFICATION
(PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) DES METHODESEN BIOLOGIE
MEDICALE

DCCT: Diabetes control and complications trial.

EDTA: Ethylène diamine tétra acétate.

EEQ : Evaluation Externe de la Qualité.

EHUO : Etablissement Hospitalier et Universitaire d'Oran.

EPO : Erythropoïétine.

FFD : Fédération Française du Diabète.

FI : Fidélité Intermédiaire.

FPOX : Fructosyl Peptide Oxydase.

HAS: Haute Autorité de Santé.

Hb: Hémoglobine.

HbA1c: Hémoglobine Glyquée.

HPLC: Chromatographie Liquide Haute Performance.

IDF: International Diabetes Federation.

IFCC: International Federation of Clinical Chemistry.

ISO : Organisation International de Normalisation.

OMS: Organisation Mondiale de Santé.

UKPDS: United Kingdom Prospective Diabetes Study.

Le diabète constitue un problème de santé publique majeur et il est une des quatre maladies non transmissibles prioritaires ciblées pour une intervention par les dirigeants du monde. On a assisté au cours des dernières décennies à une augmentation constante du nombre des sujets diabétiques et de la prévalence de la maladie. [1]

En Algérie, Une enquête réalisée en 2016-2017 par le ministère de la Santé en coordination avec l'OMS, a détecté que plus de 14 % des Algériens âgés de 18 ans à 69 ans souffrent de diabète. Selon l'IDF, avec 42 500 cas, l'Algérie, derrière les États-Unis, l'Inde, le Brésil, la Chine et la Russie, est le sixième pays qui compte le plus grand nombre de cas de diabètes de type 1 chez les enfants et les adolescents en 2017. [2]

C'est une maladie grave qui, sans traitement approprié, peut être à l'origine de maladies cardiaques, de la cécité, de l'impuissance, voire d'amputations.

Un suivi régulier est essentiel pour vérifier l'équilibre du diabète. Il permet de contrôler l'évolution de la maladie, de déceler les éventuelles complications et de prévenir leur aggravation. C'est ainsi que le dosage de l'hémoglobine glyquée reste le paramètre biologique le plus pertinent pour le suivi du diabète.

Ce paramètre est, en effet, très utile car il reflète la moyenne des glycémies des trois derniers mois. Les recommandations de mai 2006 de l'HAS (Haute Autorité de Santé) préconise un taux d'HbA1c <7,5% chez le diabétique de type 1 et <6,5% chez le diabétique de type 2. [3]

Plusieurs méthodes ont été développées dans le but de déterminer le taux de l'HbA1C dans le sang. Parmi ces méthodes, celles par chromatographie liquide haute performance (HPLC) ont acquis la reconnaissance de méthodes dites de référence. Elles ont de nombreux atouts : automatisation, spécificité, capacité à identifier les variant de l'hémoglobine.

Le problème qui se pose aujourd'hui au biologiste est celui du choix de l'analyseur garantissant la qualité optimale des résultats surtout dans le contexte de l'accréditation des laboratoires. [4]

C'est pour répondre à cette question que nous avons proposé ce travail qui a pour objectif de comparer les résultats de l'HbA1C obtenus par l'analyseur HPLC Variant II - Bio Rad D-10® à ceux obtenus par un analyseur de référence : le Tosoh G8®

Ce mémoire est scindé en deux parties :

La première partie est consacrée à l'étude théorique.

Dans le chapitre I, nous nous sommes intéressés à citer une revue de la littérature sur le diabète tout en expliquant la prévalence de la maladie, sa classification, son diagnostic et sa prise en charge.

Le deuxième chapitre représente des généralités sur l'HbA1C, alors que le troisième est consacré aux méthodes de dosage de l'HbA1C.

Dans une première partie de ce chapitre nous avons fait une étude comparative des principales méthodes de dosage ainsi que les interférences biologiques et analytiques.

Dans la deuxième partie nous avons abordé la standardisation des techniques de dosage de l'HbA1c.

La deuxième partie du travail comporte trois chapitres :

Le premier englobe l'ensemble des articles, publications et thèses qui ont servi de support bibliographique à notre travail.

Le deuxième détaille les analyseurs utilisés ainsi que la méthode de comparaison.

Le troisième récapitule les résultats de la comparaison des méthodes avec une discussion de chaque point de cette dernière.

En fin du travail une conclusion générale présente les limites de cette étude ainsi que les perspectives souhaitées.

I. Le diabète

I.1. définition :

Le diabète est une maladie chronique qui apparaît lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline ou que l'organisme n'utilise pas correctement l'insuline qu'il produit. Il en résulte une concentration accrue de glucose dans le sang (hyperglycémie).[5]

I.2. Classification de diabète:

Il existe différents types de diabètes:

I.2.1. Diabète type 1:

Le diabète de type 1 (précédemment connu sous le nom de diabète insulino-dépendant ou juvénile) est caractérisé par une production insuffisante d'insuline, suite à une destruction spécifique des cellules β des îlots pancréatiques par un processus auto-immun. Il exige une administration quotidienne de cette dernière. La cause de diabète de type 1 n'est pas connue, et en l'état des connaissances actuelles, il n'est pas évitable (**tableau 1**).[5][6][7]

I.2.2. Diabète type 2:

Le diabète de type 2 (précédemment appelé diabète non insulino-dépendant ou diabète de la maturité) résulte d'une mauvaise utilisation de l'insuline par l'organisme. Le diabète de type 2 représente la majorité des diabètes rencontrés dans le monde. Il est en grande partie le résultat d'une surcharge pondérale et de la sédentarité (**tableau 1**). [5][6]

Il est associé à :

+ Une insulino-résistance dominante avec insulino-pénie relative, [8]

+ Ou une diminution prédominante de l'insulino-sécrétion associée ou non à une insulino-résistance.[8]

L'augmentation du risque de développer un diabète de type 2 avec l'âge, l'obésité, la sédentarité et sa survenue plus fréquente chez les femmes ayant présenté un diabète

gestationnel et les sujets hypertendus ou dyslipidémiques [8], mais on le trouve désormais aussi chez l'enfant.[5]

Tableau I:Principales caractéristiques du diabète de type 1 (DT1) et de type 2 (DT2).[5]

Type de diabète	Type 1	Type 2
Fréquence	Rare : 5-10 % des patients diabétiques adultes	Très élevée : > 90 % des patients diabétiques adultes
Physiopathologie	Provoqué par une réaction auto-immune détruisant les cellules du pancréas produisant l'insuline	Résulte de l'incapacité de l'organisme à répondre pleinement à l'insuline couplée à une production inadéquate d'insuline
Auto-immunité	Présente (anticorps positifs)	Absente
Sensibilité à l'insuline	Normale	Diminuée
Sécrétion d'insuline	Absente	Variable
Facteurs de risque	Susceptibilité génétique combinée à des facteurs environnementaux	Obésité, intolérance au glucose, antécédents familiaux de diabète ou personnels de diabète gestationnel
Age au diagnostic	Débute dans l'enfance ou à l'adolescence, en majorité avant l'âge de 30 ans	Personnes adultes mais observé aussi chez des adolescents en raison de l'augmentation du taux d'obésité
Poids au diagnostic	Patient en général mince	Fréquence du surpoids et de l'obésité
Mode d'apparition	Rapide (semaines) en général Symptômes (soif excessive, urines abondantes, amaigrissement) et présence de corps cétoniques conduisant rapidement au diagnostic	Progressif (plusieurs mois ou années) Début insidieux avec fréquent retard au diagnostic (nombreux cas méconnus) Complications (plaie du pied, baisse visuelle, insuffisance rénale) pouvant révéler le diabète

I.2.3. Diabète gestationnel:

La définition qui est actuellement retenue est celle qui a été proposée lors de la 4e Conférence internationale du diabète gestationnel en 2007 mais également celle qui est définie par l'OMS. Il s'agit d'un trouble de la tolérance au glucose conduisant à une hyperglycémie de sévérité variable, survenu ou reconnu pour la première fois pendant la grossesse. [5][9]

Les femmes ayant un diabète gestationnel ont un risque accru de complications pendant la grossesse et à l'accouchement. Leur risque ainsi que celui de leur enfant, d'avoir un diabète de type 2 à un stade ultérieur de leur vie augmente également.[5][9]

Il est très souvent diagnostiqué au cours du dépistage prénatal et non pas suite à des symptômes.[5][9]

I.3. Epidémiologie :

I.3.1. Dans le monde :

Selon, l'OMS :Le nombre de personnes vivant avec le diabète ainsi que la prévalence de la maladie augmentent dans l'ensemble des régions du monde. En 2014, 422 millions d'adultes (ou 8,5% de la population) étaient atteints de diabète, comparé à 108 millions de diabétiques (4,7%) en 1980.[5]

L'épidémie de diabète a un impact sanitaire et socioéconomique majeur, en particulier dans les pays en développement.[5]

I.3.2.En Algérie :

Le développement socio-économique et la nette amélioration du niveau de vie des algériens amorcés depuis l'indépendance ont permis, dans les années 90, une modification du profil épidémiologique du pays. [10]

L'enquête TAHINA réalisé par l'Institut National de santé publique révèle en 2007 que les Maladies chroniques sont la première cause de morbidité en Algérie. Cette même enquête estime que dans la tranche d'âge 35-70ans, 56% des sujets sont en surpoids, 21 % sont obèses, 25 % sont hypertendus et 12% diabétiques.

Promouvoir des recherches de qualité sur l'épidémiologie du diabète et produire des estimations précises sur le diabète s'intègre dans le cadre de cette approche intégrée globale des MNT. C'est dans ce contexte que le registre du diabète de type 1 chez les moins de 15 ans dans la wilaya d'Alger a été mis en place en janvier 2010.

I.4. Diagnostic:

I.4.1. Signes cliniques de l'hyperglycémie :

Dans 60 à 75 % des cas, le diabète est diagnostiqué devant un syndrome cardinal, c'est à- dire l'association classique polyuro-polydipsie polyphagie-amaigrissement, conséquences de l'hyperglycémie.[7][11][12]

La polyurie osmotique est responsable de mictions diurnes et nocturnes (« nycturie») fréquentes et entraîne une polydipsie. La polyurie induit une déshydratation intra- et extracellulaire.

L'amaigrissement est secondaire à la déshydratation, se corrigeant rapidement à l'instauration du traitement, et à l'état catabolique lié à l'insulinopénie (lipolyse et catabolisme musculaire). Elle s'accompagne d'une grande asthénie.

I.4.2. Bilan biochimique :

Les critères biologiques de diagnostic sont établis et revus par le comité international d'experts de l'American Diabètes Association (ADA) et Canadian Diabètes Association (CDA). Le diagnostic de diabète sucré peut actuellement être posé de 4 façons [13][14]:

- Une glycémie ≥ 7 mmol/l (1,26 g/l), après un jeûne de 8 heures et vérifiée à deux reprises.
- ou une glycémie $\geq 11,1$ mmol/l (2 g/l) 2 heures après une charge de 75 g de glucose.
- ou une glycémie $\geq 11,1$ mmol/l (2 g/l), quelle que soit l'heure du prélèvement, en présence de symptômes cliniques (polyurie, polydipsie, perte pondérale inexplicée).[13]
- une HbA_{1c} $\geq 6,5$ % mesurée à l'aide d'un test normalisé et validé selon la référence du NGSP-DCCT, et en l'absence de facteurs compromettant la fiabilité du test.[13][14]

Tableau II :diagnostic du diabète.[13]

<p style="text-align: center;">Glycémie à jeun $\geq 7,0$ mmol/L À jeun = aucun apport calorique depuis au moins 8 heures ou Taux d'HbA_{1c} $\geq 6,5$ % (chez les adultes) Mesuré à l'aide d'un test normalisé et validé, en l'absence de facteurs compromettant la fiabilité du taux d'HbA_{1c} – et non en cas de diabète de type 1 soupçonné ou Glycémie 2 heures après l'ingestion de 75 g de glucose $\geq 11,1$ mmol/L ou Glycémie aléatoire $\geq 11,1$ mmol/L Aléatoire = à tout moment de la journée, sans égard au moment du dernier repas</p>
--

I.4.3. Le prédiabète :

Le prédiabète (défini comme un état exposant toute personne à un risque élevé de diabète et de complications liées à la maladie) est diagnostiqué si l'un des critères suivants est présent :

- Anomalie de la glycémie à jeun (6,1 à 6,9mmol/L) [**catégorie A, niveau 1** [15]] (**annexe 1 et 2**).[13][16]
- Intolérance au glucose (glycémie 2 heures après l'ingestion de 75 g de glucose entre 7,8 et 11,0 mmol/L) [**catégorie A, niveau 1** [15]] (**annexe 1 et 2**).[13][16]
- Taux d'HbA1c entre 6,0 et 6,4 % (à utiliser chez les adultes en l'absence de facteurs compromettant la fiabilité du taux d'HbA1c, et non en cas de diabète de type 1 soupçonné) [**catégorie B, niveau 2** [17]] (**annexe 1 et 2**).[13][16]

Tableau III: diagnostic de prédiabète. [13]

Épreuve de laboratoire	Résultat	Catégorie de prédiabète
Glycémie à jeun (mmol/L)	6,1 à 6,9	Anomalie de la glycémie à jeun
Glycémie 2 heures après l'ingestion de 75 g de glucose (mmol/L)	7,8 à 11,0	Intolérance au glucose
Taux d'HbA _{1c} (%)	6,0 à 6,4	Prédiabète

I.5.Traitement du diabète :

Dans le traitement du diabète de type 1 et de type 2, le contrôle de la glycémie par les patients et les prestataires de soins (**voir la figure 1**) est essentiel, ainsi d'ailleurs que celui des facteurs de risque cardiovasculaire.[18]

I.5.1. Diabète type 1 :

L'insulinothérapie est la pierre angulaire du traitement médical du diabète de type 1. L'insuline peut être administrée selon divers schémas posologiques, mais très peu de ces schémas ont été étudiés chez les enfants dont le diabète venait d'être diagnostiqué. Le schéma

posologique doit être choisi en fonction de l'âge de l'enfant, de la durée du diabète, du mode de vie de la famille, des facteurs socio-économiques et des préférences de la famille, du patient et du médecin. Indépendamment du schéma d'administration de l'insuline, il faut dans tous les cas chercher à atteindre les objectifs glycémiques.[19]

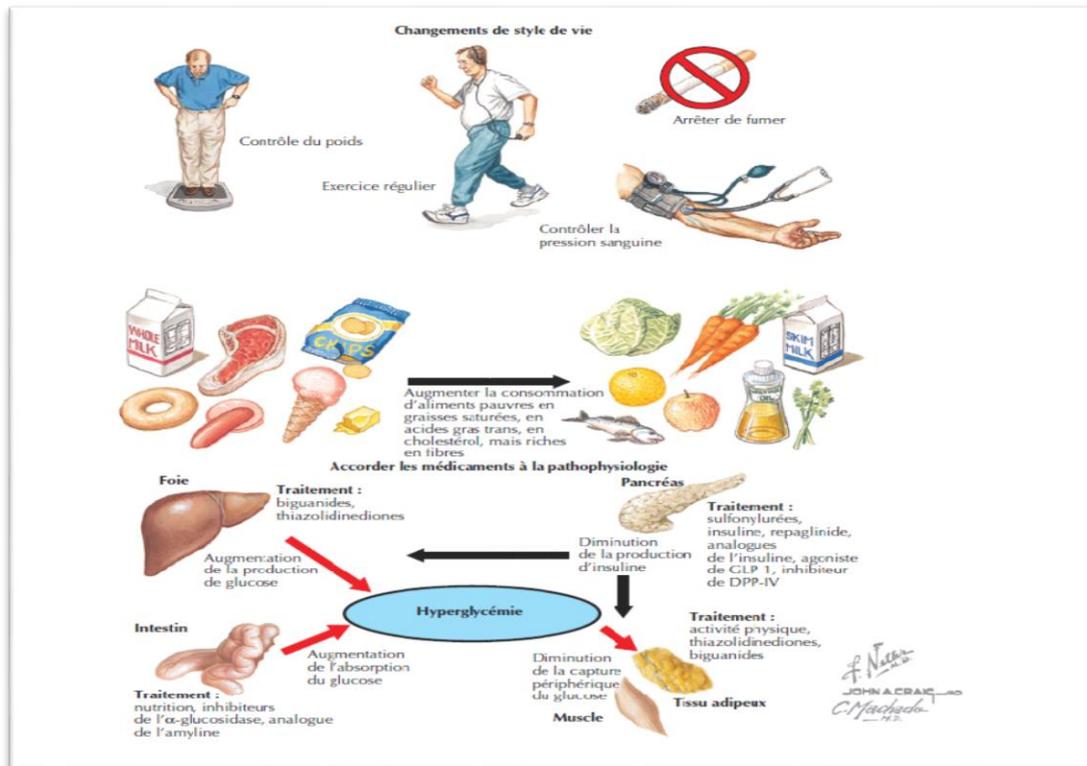


Figure 1 : traitement non médicamenteux du diabète[18]

I.5.2. Diabète type 2 :

L'objectif d'un traitement en diabétologie est de prévenir et de réduire les complications de la maladie mais aussi d'améliorer la qualité de vie des patients. Actuellement, diverses classes thérapeutiques permettent de traiter le diabète de type 2. Les médicaments les plus récents sont particulièrement intéressants en termes de tolérance et de coût.[20]

La prise en charge initiale du diabète de type 2 doit toujours reposer sur le régime et les modifications des habitudes de vie avant de recourir aux traitements médicamenteux. Les sulfamides, les biguanides, les inhibiteurs des alphaglucosidases, les glinides, ainsi que de nouveaux médicaments tels que les analogues des glucagon-like peptide-1 (GLP-1), les

inhibiteurs du Co-transporteur de la dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4) et les inhibiteurs de sodium-glucose de type 2 (SGLT2) permettent de traiter le diabète de type 2.

En dernier recours, si l'objectif glycémique n'est pas atteint malgré la trithérapie, les mesures hygiéno-diététiques et les exercices physiques, l'instauration d'une insulinothérapie (voie injectable sous-cutanée) sera envisagée. (**Figure 2**).

*Les indications à l'insuline sont :[21]

-Décompensation diabétique symptomatique.

-Diabète inaugural symptomatique (polyurie, polydipsie, asthénie et amaigrissement) avec cétonurie.

-Glycémie isolée $>16,7$ mmol/l.

-Valeur d'HbA1c $>11.5\%$.

-Echec d'obtention de la cible d'HbA1c sous ADO seuls.

I.6. surveillance du diabète :

Le maintien de l'équilibre glycémique est le principal objectif de la prise en charge du diabétique permettant d'éviter les complications métaboliques aiguës et de prévenir les complications vasculaires à long terme, selon la **FEDERATION FRANCAISE DU DIABETIQUE**:

I.6.1. L'auto-surveillance :

L'auto-surveillance glycémique (ASG) est évoquée comme une pratique indispensable en cas d'insulinothérapie dans le diabète de type 1 comme dans le diabète de type 2 pour ajuster au mieux les doses d'insuline, adapter l'alimentation et le programme d'activité physique, de façon à maintenir la glycémie dans la plage cible recommandée. [22]

Pratiquer l'auto surveillance glycémique, c'est mesurer sa glycémie capillaire qui nécessite une technique adaptée du prélèvement de sang capillaire et une utilisation adéquate du matériel de ponction et du lecteur.[23]

La HAS recommande l'usage de l'auto-surveillance glycémique chez les patients traités par insuline ou chez qui une insulinothérapie est envisagée à court ou moyen terme mais également chez les patients traités par insulinosécréteurs (sulfamides ou glinides, seuls ou associés à d'autres médicaments antidiabétiques), lorsque des hypoglycémies sont soupçonnées et chez les patients pour lesquels l'objectif thérapeutique n'est pas atteint, notamment en raison d'une maladie ou d'un traitement intercurrent.[22]

I.6.2. Surveillance à moyen terme :

I.6.2.1. Dosage HbA1c (hémoglobine glyquée) :

Tous les trois mois, mesurer le taux moyen de sucre dans le sang au cours des 3 derniers mois.[24]

I.6.2.2. Dosage des fructosamines :

Ce marqueur grâce à sa demi-vie courte reflète les moyennes glycémiques sur une période de temps moins longue que l'HbA1c, d'environ deux à trois semaines précédant le prélèvement. [25]

Elles prennent alors tout leur intérêt comme marqueurs de l'équilibre glycémique :

-Lorsqu'un contrôle à plus court terme de l'équilibre glycémique est nécessaire, comme par exemple chez les enfants, au cours de la grossesse, ou encore lors des modifications thérapeutiques. [26]

- Au cours des situations dans lesquelles le dosage de l'HbA1c est pris en défaut par exemple dans le cas de certaines hémoglobinopathies où il est difficile d'interpréter l'HbA1c en fonction de la méthode utilisée [25].

I.6.3. Dépistages des complications :

I.6.3.1. Bilan rénal:

Au moins une fois par an, dépister les complications rénales par le Dosage de la créatinine sanguine et la microalbuminurie.[24]

I.6.3.2 Bilan lipidique:

Au moins une fois par an, mesurer les graisses du sang pour évaluer le risque de complications cardiovasculaires par Dosages du cholestérol et triglycérides.[24]

I.6.3.3.Bilan cardiologique :

Au moins une fois par an, dépister d'éventuelles maladies cardiaques par un électrocardiogramme complété d'un test à l'effort par un bilan plus approfondi en fonction des résultats des lipides sanguins.[24]

I.6.3.4. Examen du fond de l'œil :

Au moins une fois par an, dépister d'éventuelles atteintes de la rétine par une rétinographie (photographie du fond d'œil).[24]

I.6.3.5. Examen des pieds :

Au moins une fois par an, vérifier la sensibilité et l'état des pieds (éventuelles lésions ou plaies) par un examen des pieds et un test au monofilament.[24]

II. L'hémoglobine glyquée

II .1. Rappel sur l'hémoglobine

II .1.1.définition

Les hémoglobines (Hb) sont des hémoprotéines qui transportent l'oxygène(O₂). Ces protéines, ou les gènes qui les expriment semblent être présents dans tous les organismes vivants. Comme les autres organismes vertébrés, les hémoglobines humaines se trouvent en fortes concentrations dans les érythrocytes (environ 640 millions de molécules / cellule), et sont leur composant principal. Malgré la diversité de l'hémoglobine, les structures moléculaires des hémoglobines sont très similaires, montrant un degré élevé de conservation au cours de l'évolution. [27]

II .1.2.structure de la molécule de l'hémoglobine.

Les hémoglobines sont des tétramères globulaires d'un poids moléculaire de 64450 Daltons, composés de deux paires de chaînes polypeptidiques appelées les globines, identiques 2 à 2. Une paire de chaînes est de type α (α ou ζ) et l'autre paire de chaînes est de type non α (β , δ , γ ou ϵ). Chaque globine a une structure globulaire compacte refermant une molécule de protoporphyrine IX appelée l'hème. Ce dernier maintient en son centre un atome de fer sous sa forme réduite (Fe^{2+}) qui peut se lier de manière réversible à l'Oxygène permettant ainsi son transport (Fig. 2). [27]

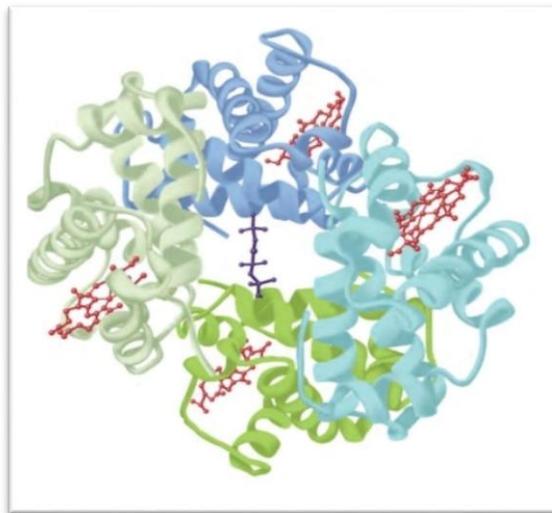


Figure 2:structure de l'hémoglobine. [28]

II.1.3. différentes formes de l'hémoglobine :

Au cours de la vie, plusieurs hémoglobines se succèdent et qui diffèrent par la nature de leurs sous-unités: α , β , γ , δ et ζ . [29]

Tableau IV: les différentes formes de l'hémoglobine [30]

Age	types d'hémoglobines rencontrés	proportion de chaque hémoglobine	chaîne de globine
adulte	Hb A	97 %	$\alpha_2\beta_2$
	Hb A2	2,2 – 3,2 %	$\alpha_2\delta_2$
	Hb F	< 1 %	$\alpha_2\gamma_2$
Fœtus	Hb F	80 – 95 %	$\alpha_2\gamma_2$
	Hb A	5 – 20 %	$\alpha_2\beta_2$

II.2. Phénomène de glycation de l'hémoglobine :

II.2.1. Définition :

Le phénomène de glycation est un processus chimique non enzymatique correspondant à la fixation spontanée d'oses, et en particulier de glucose, sur les groupements aminés libres des protéines. La formation des produits de glycation est cumulative et irréversible, et dépend directement de la concentration de glucose. [26]

La glycation de l'hémoglobine, comme décrite par Maillard, consiste à la fixation irréversible de glucose sur les groupements aminés libres de l'hémoglobine. Le diabète sucré est une pathologie qui favorise la réaction de glycation des protéines par l'hyperglycémie et le stress oxydatif qu'elle génère. [31]

Il s'agit d'un mécanisme complexe comprenant plusieurs étapes, dont les phases tardives génèrent un groupe hétérogène de composés appelés « produits de glycation avancée » ou « Advanced Glycation End-products » (AGE). En théorie, tous les types de sucres peuvent réagir avec les protéines mais ceux-ci présentent des degrés de réactivité variables (par exemple, le ribose est 20 fois plus réactif que le glucose) [31].

II.2.2. la réaction de glycation de l'hémoglobine :

La glycation non enzymatique de l'hémoglobine procède en deux étapes (Fig. 2).

Dans la phase précoce est formée une liaison aldimine instable appelée base de Schiff ou Hb A1C labile, par une réaction réversible entre la fonction aldéhyde de l'ose et la fonction amine libre de l'hémoglobine.

Secondairement une réaction de réarrangement se produit à la base de schiff pour former une cétoamine stable, caractéristique des produits d'Amadori. Cette seconde étape est pratiquement irréversible in vivo.

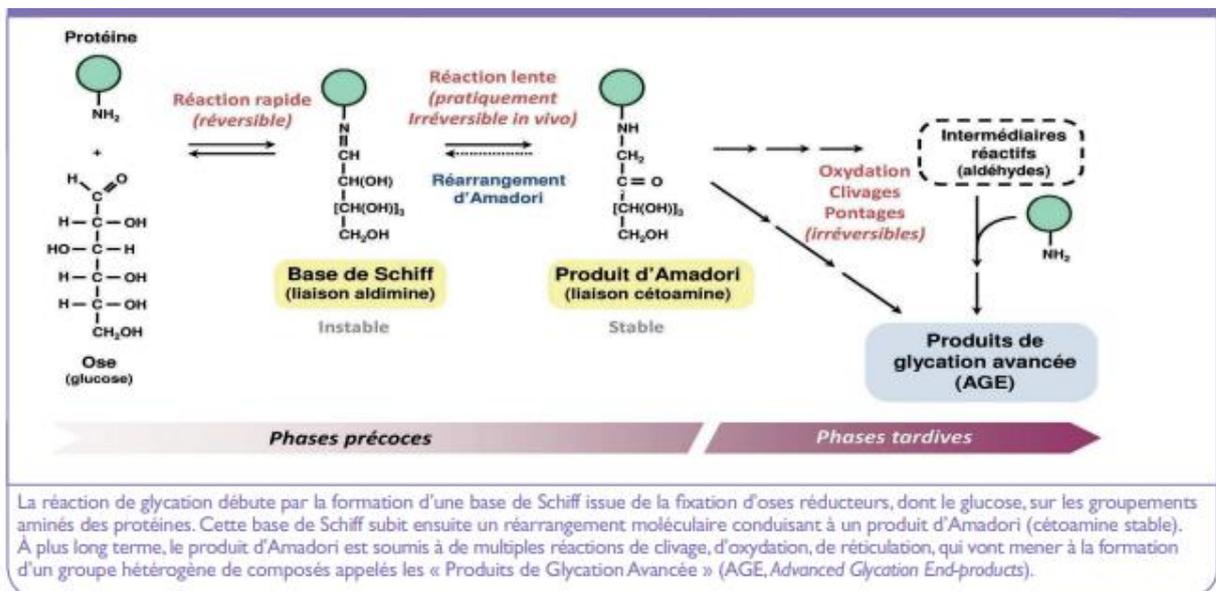


Figure 3: les différentes étapes de la glycation non enzymatique des protéines. [31]

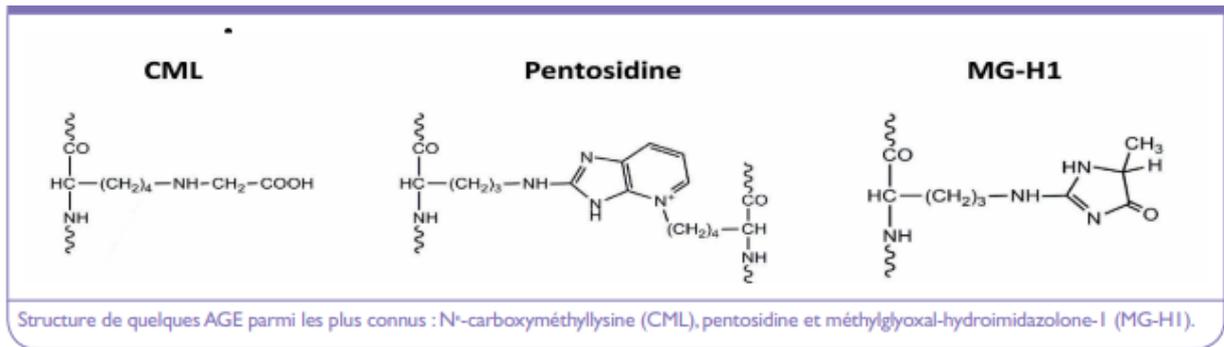


Figure 4: Structure de quelques AGE parmi les plus connus.[31]

II.2.2.les produits de la réaction de glycation de l'hémoglobine :

L'hémoglobine glyquée comprend l'ensemble des molécules d'hémoglobine modifiées par glycation d'oses (principalement de glucose) sur les fonctions aminées des protéines de l'hémoglobine.[32]

L'Hb A comporté différents sites potentiels de glycation et génère ainsi une multitude de formes glyquées rendant difficile la mise au point de dosages spécifiques et standardisés pendant longtemps (Tableau II). [33]

Les sites de glycation correspondent aux lysines non terminales des chaînes α et β et la valine N-terminale de la chaîne α

On parle d'hémoglobine A1 quand la fixation d'ose est localisée à l'extrémité N-terminale des chaînes et comporte plusieurs fractions selon la nature de l'ose.

Ainsi, on distingue :

- la fraction HbA1a1 (fixation du fructose1, 6biphosphate),
- La fraction HbA1a2 (fixation du glucose-6-phosphate),
- La fraction HbA1b (pyruvate),
- La fraction HbA1C dont la valine N-terminale des chaînes α a fixé une molécule de glucose.

L'HbA1c représente la forme majoritaire de l'hémoglobine glyquée et son dosage constitue un examen clé de la prise en charge du patient diabétique. [34]

Tableau V: Les différentes formes glyquées de l'HbA. [35]

Les différentes formes glyquées d'HbA	La molécule fixée sur l'extrémité β N-terminale	Pourcentage de la fraction
HbA0	Hb A non glyquée sur l'extrémité β N-terminale (phi non modifié)	98% de l'Hb totale
HbA1	HbA1a fructose 1-6 di-phosphate ou glucose 6- phosphate	0,5 % de l'Hb totale
	HbA1b le pyruvate	0,8 % de l'Hb totale
	HbA1c Glucose	4-6 % de l'Hb totale
Hb préA1c	Forme labile de l'HbA1c caractérisée par une fonction aldimine (base de Schiff)	
Hb glyquée totale	l'ensemble des molécules d'hémoglobines modifiées par fixation non enzymatique d'oses	

II.3. Définition d'hémoglobine glyqué HbA1C :

L'HbA1c est définie selon le groupe de travail de l'IFCC, comme étant : « l'hémoglobine A1 glyquée de manière irréversible à l'une des ou aux deux terminaisons N des valines des chaînes bêta ». [36]

L'HbA1c est Le produit de glycation le plus dosé en biologie médicale. [26]

C'est un marqueur qui prend de plus en plus d'importance vu son rôle à la fois dans le diagnostic et le suivi du patient diabétique de type 1 et de type 2. Il est le reflet de l'équilibre glycémique sur une période moyenne de 2 à 3 mois. [34]

III.Dosage de l'hémoglobine glyquée (HbA1c) :

III.1. Intérêt du dosage :

III.1.1. Diagnostic et suivi du diabète:

La glycation est un processus physiologique dont l'intensité augmente avec la glycémie. Le taux d'HbA1c c'est un reflet cumulatif et rétrospectif de la qualité de l'équilibre glycémique sur une période de 12 semaines précédant le dosage [34][37]. Ce marqueur a d'abord été utilisé pour le suivi des patients diabétiques, vu la corrélation qui existe entre sa valeur et le risque de complications (**figure 5[38]**). Sur proposition d'un comité international d'experts, l'HbA1c a été retenue par l'OMS depuis 2011 pour le diagnostic du diabète. [34][39]

III.1.2. Réduction des risques microvasculaires et macrovasculaires:

Selon des analyses épidémiologiques, des taux d'HbA1c supérieurs à 7,0 % sont associés à une augmentation significative du risque de complications tant microvasculaires que macrovasculaires. Deux études épidémiologiques à grande échelle ont établi la relation entre la valeur de L'HbA1c et les complications dégénératives du diabète: DCCT (Diabète Control and Complications Trial) sur le diabète de type 1 et UKPDS (United Kingdom Prospective DiabèteStudy) sur le diabète de type 2 ont démontré qu'il y avait un lien continu entre l'HbA1c et les complications du diabète et qu'il ne semblait pas y avoir de seuil sous lequel il n'y avait plus d'avantages. [40]

Au cours de l'étude DCCT, une baisse de 10 % de l'HbA1c a été associée à une baisse de 40 % à 50 % du risque de progression de la rétinopathie +. Au cours de l'étude UKPDS, ce lien était directement linéaire, chaque baisse (absolue) de 1,0 % du taux moyen d'HbA1c ayant été associée à une baisse de 37 % du risque de complications microvasculaires, de 14 % de la fréquence d'infarctus du myocarde et de 21 % des décès attribuables au diabète.

Les mêmes études ont démontré qu'une maîtrise énergique de la glycémie visant des taux d'HbA1c 7 % chez les diabétiques type 1 et de type 2 a des effets bénéfiques marqués sur les complications microvasculaires et, si elle est instaurée au début de la maladie, peut avoir des effets potentiels sur les complications macrovasculaires. Une intensification de la maîtrise glycémique visant un taux d'HbA1c 6,5 % peut être envisagée chez les patients atteints de diabète depuis peu, qui ne présentent pas de maladie cardiovasculaire manifeste et

CHAPITRE III. DOSAGE DE L'HÉMOGLOBINE GLYQUÉE

qui ont une longue espérance de vie, pourvu que cela n'entraîne pas d'augmentation significative de l'hypoglycémie. Un taux cible d'HbA1c 8,5 % pourrait être plus approprié chez les patients atteints de diabète de type 1 et de type 2 qui ont une espérance de vie limitée, un niveau élevé de dépendance fonctionnelle, des antécédents d'hypoglycémie grave, des maladies concomitantes à un stade avancé et qui ne réussissent pas à atteindre les objectifs glycémiques établis malgré une intensification du traitement.

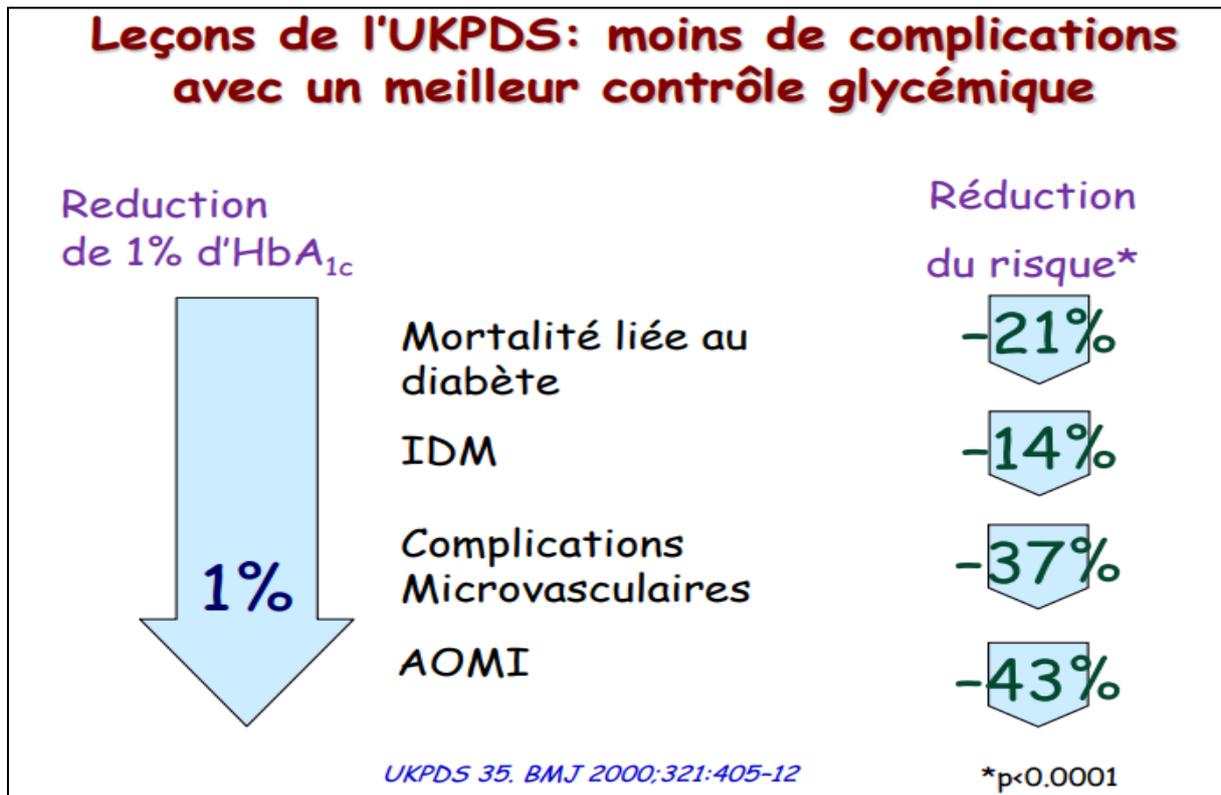


Figure 5: relation entre l'hbA1c et la réduction des risques. [38]

III.1.3. Détermination de la glycémie moyenne :

La relation entre l'HbA1c et la glycémie moyenne des 2-3 mois précédents, a été établie dans plusieurs études Comparant la moyenne de plusieurs glycémies quotidiennes mesurées sur plusieurs jours, aux valeurs d'HbA1c. ces études ont permis d'établir une relation mathématique entre la valeur de l'HbA1c et la glycémie moyenne: [34] [41]

$$\text{Glycémie (g/L)} = [(35,6 \times \% \text{HbA1c}) - 77,3] \times 0,01$$

CHAPITRE III.DOSAGE DE L'HÉMOGLOBINE GLYQUÉE

L'étude intitulée **A1c-derived average glucose (ADAG)** a proposé un modèle de régression linéaire permettant d'estimer la glycémie moyenne à partir de l'HbA1c exprimée en unité NGSP (**tableau VI**).

Une augmentation de 1 % ou 11 mmol/mol correspond à une élévation de la glycémie moyenne d'environ 0,30 g/L dans les 2-3 mois précédents. Actuellement, il n'est pas indiqué de rapporter cette relation glycémie moyenne par HbA1c dans le résultat du dosage. Si elle était rapportée, la possibilité de variations interindividuelles, pouvant atteindre 15 % en plus ou en moins, devrait être indiquée (**tableau VI**). Ces variations peuvent être dues aux techniques de dosage ou à une discordance, relativement modérée, entre HbA1c et glycémie moyenne.

Tableau VI : Corrélation entre les valeurs d'HbA1c et les glycémies moyennes des 2-3 mois précédant le prélèvement sanguin.[42]

HbA1c % NGSP	HbA1c mmol/mol IFCC	Glycémie moyenne (g/L)	Glycémie moyenne (mmol/L)
5	31	0,97 (0,76-1,20)	5,4 (4,2-6,7)
6	42	1,26 (1,00-1,52)	7,0 (5,0-8,5)
7	53	1,54 (1,23-1,85)	8,6 (6,8-10,3)
8	64	1,83 (1,47-2,17)	10,2 (8,1-12,1)
9	75	2,12 (1,71-2,53)	11,8 (9,4-13,9)
10	86	2,40 (1,93-2,82)	13,4 (10,7-15,7)
11	97	2,69 (2,17-3,14)	14,9 (12,0-17,5)

CHAPITRE III.DOSAGE DE L'HÉMOGLOBINE GLYQUÉE

III.2.Phase pré analytique:

III.2.1.Prélèvement et conservation des échantillons :

Le prélèvement se fait sur du sang veineux au pli du coude. Le dosage est réalisé sur le sang total. L'anticoagulant le plus utilisé est l'éthylène diamine tétra acétate (EDTA). D'autres anticoagulants peuvent également être utilisés, tels que l'héparine, les fluorures ou encore l'Anticoagulant Citrate Dextran (ACD).

L'HbA1c présente un avantage certain par rapport à la glycémie concernant la préparation du patient .Il n'est pas nécessaire que le patient soit à jeun et le prélèvement peut être fait à n'importe quel moment de la journée. [34]

L'HbA1c présente aussi une meilleure stabilité ; elle est donc moins sujette aux erreurs pré-analytiques. [34] [39].L'échantillon peut être conservé 4 à 5 jours à 4 °C ou 7 jours à cette température après hémolyse.

III.2.2. Prétraitement des échantillons:

Selon la méthode utilisée, il est parfois nécessaire de réaliser un prétraitement de l'échantillon consistant à provoquer une hémolyse et à éliminer les fractions labiles de l'hémoglobine glyquée. [34]

En effet, L'Hbglyquée labile ou pré-Alc est la base de Schiff formée dans la première étape réversible de glycation de l'Hb dont la quantité est fonction de la glycémie récente et non le reflet d'une glycation cumulative.

Plusieurs protocoles d'élimination de la fraction labile ont été proposés tel que l'hémolyse à pH acide, l'incubation et le lavage des globules rouges dans une solution de NaCl 0,15 M à 37 °C.[43][44]

Certains coffrets de réactifs sensibles à cette interférence ont été commercialisés comprenant un agent d'hémolyse qui permet à la fois la lyse des cellules et l'élimination de la fractionlabile. [45]

CHAPITRE III.DOSAGE DE L'HÉMOGLOBINE GLYQUÉE

III.3.Principales méthodes du dosage :

Le dosage de l'**HbA1C** a suscité beaucoup d'intérêt à sa découverte ce qui est à l'origine de la multiplicité des techniques de dosage existantes. La mesure du taux d'HbA1c dépend des changements qui peuvent avoir lieu lors du phénomène de glycation. En effet la glycation du résidu N-terminal modifie aussi bien la structure de la molécule d'hémoglobine que sa charge électrique. Ainsi, Les techniques de dosage de l'Hbglyquée peuvent être réparties en deux groupes:

- Celles qui se basent sur la modification de charge de l' HbA1c par glycation.
- Celles qui se basent sur la différence structurale entre les formes glyquées et non glyquées de l'hémoglobine.

III.3.1.Méthodes basées sur la modification de charge de l'HbA1c par la glycation :

III.3.1.1. Techniques utilisant la chromatographie liquide d'échange d'ions:

La séparation est fondée sur le fait que la charge nette des hémoglobines glyquées sur l'extrémité N terminale des chaînes α est plus négative que celle de l'HbA₀, à pH neutre. Cette méthode a été mise au point par Trivelli en 1971.[34] Sur une colonne remplie de résines chargées négativement (résines d'échange cationique) l'hémolysat est déposé. Les différences de charge entre les différentes hémoglobines non glyquées (A1, A2, F) et glyquées (pré-A1c, A1c, A1a1, A1a2 et A1b) vont permettre par utilisation de tampons de force ionique et/ou de pH différents d'éluer de façon séquentielle ces différentes formes (25). On élue d'abord les hémoglobines rapides : HbA1a, HbA1b, HbA1c puis la fraction principale HbA₀. À la sortie de la colonne, les fractions sont détectées et quantifiées par mesure spectrophotométrique à 415 nm.[46]

Cette méthode est utilisée dans différentes techniques :

- Mini colonnes remplies de résines échangeuses d'ions pour les techniques manuelles,

CHAPITRE III.DOSAGE DE L'HÉMOGLOBINE GLYQUÉE

- Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP). De nombreux appareils de CLHP spécialisés pour le dosage de l'HbA1c sont commercialisés. Ils utilisent une colonne d'échange ionique et permettent un dosage automatisé,
- Chromatographie Liquide Basse Pression (CLBP). Des systèmes automatisés de CLBP ont également été proposés par différents industriels. D'utilisation réputée moins coûteuse, ces appareils doivent fournir une bonne séparation HbF/HbA1c [34]

Des systèmes automatisés de CLBP ont également été proposés par différents industriels. Ces appareils doivent fournir une bonne séparation HbF/HbA1c [34].

Ces méthodes sont très sensibles aux conditions techniques (température, pH, dilution de l'échantillon, force ionique, taille de la colonne). L'HbA1c est évaluée de façon spécifique par rapport aux autres Hb rapides et à l'HbA0 : un calcul de l'aire des pics d'élution permet d'effectuer un rapport.

Les techniques automatisées par CLHP ou CLBP fournissent un diagramme d'élution contrairement à la chromatographie sur micro colonnes. Cela permet la mise en évidence d'une mauvaise séparation éventuelle ou de détecter la présence d'une Hb anormale. [47]

III.3.1.2. Techniques électrophorétiques :

Les anciennes techniques d'électrophorèse sur support solide ont été avantageusement remplacées par les techniques d'électrophorèse capillaire beaucoup plus rapides.

Dans cette technique, l'utilisation du courant d'électroendosmose généré à l'intérieur d'un microcapillaire de silice dans lequel se trouve un tampon alcalin, et dans lequel l'hémolysat est injecté va permettre la séparation grâce à la différence de charge entre les différentes hémoglobines non glyquées (A1, A2, F) et glyquées (pré-A1c, A1c, A1a1, A1a2 et A1b). La quantification de chaque fraction est réalisée en sortie de capillaire par mesure spectrophotométrique à 415 nm. [46]

L'électrophorèse en gel d'agarose ou acétate de cellulose (électroendosmose) permet l'immigration en bloc de toutes les fractions d'HbA1. Certains systèmes peuvent également séparer spécifiquement la fraction HbA1c. Cette technique permet de mettre en évidence la plupart des Hb anormales sauf les hémoglobines modifiées (Hb carbamylées). L'obtention de

CHAPITRE III.DOSAGE DE L'HÉMOGLOBINE GLYQUÉE

résultats reproductibles exige une transpiration homogène du gel pour permettre une lecture correcte. [48]

Ces techniques délicates fournissent en général des résultats plus élevés. L'isoélectrofocalisation permet une très bonne séparation des fractions. C'est cependant une technique délicate, qui nécessite un appareillage très spécialisé. Elle n'est pas utilisée en pratique courante.

III.3.2.Méthodes basées sur la modification de structure par la glycation :

III.3.2.1. La chromatographie d'affinité :

La méthode utilise le principe d'affinité pour le boronate (acide phénylboronique) et la capture d'ions. Les résultats sont corrigés par rapport à une courbe d'étalonnage mémorisée qui a été titrée en HbA1c par chromatographie liquide haute performance (CLHP). Cette technique ne détecte cependant pas les hémoglobines anormales. [46]

Les groupements 1-2 cis-diol des molécules d'hexoses fixées sur l'hémoglobine forment un complexe avec l'acide phénylboronique immobilisé sur une matrice d'agarose. Une première solution tampon élue la fraction non glyquée, une deuxième solution contenant du sorbitol ou de l'acide citrique élue la fraction glyquée fixée sur la colonne. Ces techniques peuvent être sensibles à la concentration du ligand d'un lot de colonne à l'autre. Seules les hémoglobines normales ou anormales ayant fixées irréversiblement le glucose sont dosées, la fraction labile d'Hb n'interférant pas. La température et les hémoglobines carbamylées ou acétylées sont sans influence. [47]

Cette méthode a été appliquée à des techniques automatisées. Après hémolyse du sang, l'Hb glyquée est fixée sur un réactif d'affinité poly -anionique, puis le complexe est capté par une matrice cationique.

La détection utilise une réaction d'inhibition par l'hème, de la fluorescence d'un fluorophore.

Les résultats sont corrigés par rapport à une courbe d'étalonnage mémorisée qui a été titrée en HbA1c par une méthode CLHP. Ces techniques qui dosent l'hémoglobine glyquée totale, fournissent des résultats corrigés exprimés en HbA1c.[49]

CHAPITRE III.DOSAGE DE L'HÉMOGLOBINE GLYQUÉE

III.3.2.2. Les méthodes immunochimiques :

Elles utilisent des anticorps mono ou poly-clonaux spécifiques de la liaison glucose – valine de l'extrémité N-terminale de la chaîne β . Ces techniques ne détectent cependant pas les hémoglobines anormales et dépendent de la longueur de l'épitope reconnu.[46]

Différents systèmes sont commercialisés :

- Techniques immunoturbidimétriques en phase homogène adaptée à différents analyseurs de biochimie. Après hémolyse manuelle le pourcentage d'HbA1c est calculé par rapport à l'Hb totale dosée en parallèle.
- Technique d'immunoinhibition sur analyseur (BAYER DCA 2000 ou DCA Vantage). [50]
- Technique ELISA sur microplaques avec des anticorps monoclonaux. [50]

La spécificité de ces méthodes dépend de l'épitope reconnu qu'il convient de connaître pour déterminer leurs limites d'utilisation. Les fractions d'hémoglobines labiles ou modifiées ne sont pas dosées, mais les hémoglobines anormales et leurs dérivées glyquées peuvent ou non être pris en compte en fonction de la séquence glyquée reconnue et de sa longueur. En cas de présence d'une HbF ou d'une Hb anormale, la glycation de ces formes n'étant pas reconnue, il s'en suit des résultats par défaut puisque le dosage de l'hémoglobine totale inclut des formes non glyquées. Ce type de méthode ne permet pas d'identifier les hémoglobines anormales.[50]

III.3.2.3. Les méthodes enzymatiques :

De développement récent, elles utilisent la fructosyl peptide oxydase (FPOX) en présence d'oxygène couplée à une réaction de Trinder qui mesure le peroxyde d'hydrogène libéré lors de l'action de la FPOX sur l'HbA1c. En se référant aux résultats des différents programmes d'évaluation externe de la qualité (EEQ) nationaux et internationaux, on constate que les méthodes les plus utilisées sont celles par CLHP et par immunoturbidimétrie, mais qu'en France elles sont en recul au profit de la méthode par électrophorèse capillaire. [46]

CHAPITRE III.DOSAGE DE L'HÉMOGLOBINE GLYQUÉE

Tableau VII : différentes techniques de dosage d'HbA1c

	HPLC	Chromatographie d'affinité	Immunodosage
Avantages	Permet la détection de variants d'Hb Travaille sur tube primaire bouché.	Résultats non perturbés par la fraction labile ou la fraction carbamylée.	Peut être adapté sur un automate de biochimie.
Inconvénients	Nécessite l'achat d'un matériel spécifique.	Ne permet pas la détection de variant l'Hb.	Nécessite la plupart du temps la préparation de l'échantillon. Ne permet pas la détection des variants d'Hb. Est dépendant de la qualité de l'anticorps.

III.4. les interférences au dosage :

La connaissance de l'ensemble des facteurs pouvant influencé le dosage de l'HbA1c est essentiel pour pouvoir interpréter le résultat et pour une prise en charge optimale du patient diabétique (**tableau VIII**). La valeur d'HbA1c ne dépend pas de l'état de jeune, des variations journalières de glycémie, de l'exercice physique et du sexe.[50]

Pour que le résultat d'Hbglyquée soit interprétable, il faut :

- une durée de vie des globules rouges normale (120 jours).
- une synthèse normale (qualitative et quantitative) de l'Hb (97 à 99% d'HbA).

Si l'un de ces paramètres est modifié, l'équilibre entre réaction de synthèse/dégradation et réaction de glycation non enzymatique est perturbé et l'interprétation du dosage devient délicate voire impossible.

III.4.1.Variabilités physiopathologiques :

Ces situations peuvent fausser le dosage quel que soit la méthode employée.

CHAPITRE III.DOSAGE DE L'HÉMOGLOBINE GLYQUÉE

III.4.1.1. Métabolisme anormal de l'hémoglobine ou des GR :

Lorsque la durée de vie du globule rouge est inférieure à 120 jours, la glycation ayant lieu au cours de toute la vie du globule rouge dès les stades érythropoïétiques (phénomène cumulatif), celle-ci se fera sur une plus courte durée donc l'HbA1c sera diminuée. Toute situation d'hémolyse (auto-immune, mécanique, toxique, médicamenteuse).[50]

III.4.1.2. Hémorragie / transfusion : toute hémorragie ou spoliation sanguine

Importante entraîne par conséquent une diminution du taux d'HbA1c.

De même, une transfusion récente ou la prise de traitement stimulant l'érythropoïèse rajeunit la population de globule rouge et entraîne une diminution de l'HbA1c. [50]

III.4.1.3.splénectomie : Un allongement de la durée de vie des globules rouges augmente l'HbA1c. [50]

III.4.1.4. Grossesse:Au premier trimestre, les valeurs d'HbA1c ont tendance à être plus basses, ce qui peut être expliqué par l'hémodilution et une plus faible valeur de glycémie à jeun (phase d'anabolisme pour le développement fœtal avec augmentation de l'insulinémie et de l'insulinosensibilité). Au deuxième et troisième trimestre, les valeurs d'HbA1c sont plus élevées. [50]

III.4.1.5. Insuffisance rénale: Cette situation est fréquente chez le patient diabétique (néphropathie diabétique). Trois situations peuvent avoir une influence sur la valeur de l'HbA1c :

- La durée de vie du globule rouge est réduite en cas d'hémodialyse.
- La prise d'un traitement par l'EPO provoque un rajeunissement de la population érythrocytaire. [50]

III.4.1.6. Pathologie hépatique :

- En cas de cirrhose, une hémolyse, une augmentation de la séquestration splénique des globules rouges ou encore une modification de l'érythropoïèse peuvent modifier la durée de vie des globules rouges. [50]

CHAPITRE III.DOSAGE DE L'HÉMOGLOBINE GLYQUÉE

- En cas d'hépatite C, les résultats d'HbA1c peuvent être sous-estimés chez les patients traités par ribavirine qui peut provoquer une anémie régénérative. [50]

III.4.2.Les variantes de l'HB ou de sa répartition :

III.4.2.1.Les hémoglobinopathies:

L'Hb est soit qualitativement soit quantitativement anormale.[51]

L'hémoglobinopathie peut entraîner une hémolyse (variable et difficile à quantifier) et/ou une stimulation anormale de la production d'Hb. De même, une modification de la glycation et la formation éventuelle de produits glyqués différents peuvent se produire.

La présence de variants de l'Hb peut être à l'origine de résultats sur ou sous-estimés selon la technique utilisée, les rendant difficilement interprétables. Il est par conséquent important d'identifier la présence d'une Hb anormale chez un patient. Plus de 800 variants de l'Hb ont été décrits. Par exemple la présence d'une Hb C ou S:

- **L'hémoglobine C**: couramment symbolisée par HbC, est une hémoglobine anormale résultant d'une mutation génétique conduisant à la substitution d'un résidu de glutamate par un résidu de lysine en position 6 de la séquence de la sous-unité β -globine ; il s'agit par conséquent d'une substitution E6K, E et K étant respectivement les codes pour le glutamate et la lysine. Cette forme d'hémoglobine mutée réduit la plasticité des érythrocytes, provoquant une hémoglobinopathie généralement asymptomatique, hormis chez les homozygotes, pour lesquels elle demeure malgré tout bénigne.
- **L'hémoglobine S**: La drépanocytose également appelée anémie falciforme, hémoglobinose est une maladie génétique résultant d'une mutation sur le gène codant l'hémoglobine. Cette affection peut notamment occasionner un retard du développement de l'enfant, des crises vaso-occlusives, une prédisposition aux infections bactériennes et une anémie hémolytique.
- **L'hémoglobine E**: couramment symbolisée par HbE, est une hémoglobine anormale résultant d'une mutation génétique conduisant à la substitution d'un résidu de glutamate par un résidu de lysine en position 26 de la séquence de la sous-unité β -globine ; il s'agit par conséquent d'une mutation E26K, E et K étant respectivement les symboles du glutamate et de la lysine.

CHAPITRE III.DOSAGE DE L'HÉMOGLOBINE GLYQUÉE

III.4.2.2.L'hémoglobine fœtale :

Une autre interférence possible dans la mesure de l'HbA1c est la valeur élevée de l'hémoglobine fœtale (HbF). Chez les adultes, la valeur de l'HbF est généralement autour de 1%. Une augmentation anormale de HbF peut se produire dans certaines conditions pathologiques comme la thalassémie et la drépanocytose et certaines leucémies. Ainsi, il est nécessaire d'isoler HbF pour éviter tout risque d'interférence.

III.4.3.Médicaments et toxiques:

Des facteurs extrinsèques comme une intoxication alcoolique, opiacée ou une prise médicamenteuse peuvent également entraîner des variations des taux d'HbA1c en modifiant la charge de l'hémoglobine, nous citons:

-La Vit C et E : Les vitamines C et E qui protègent de la glycation protéique pourraient aussi altérer la précision des mesures. Des traitements à fortes doses pourraient ainsi sous-estimer la valeur de l'HbA1c. [46]

-L'aspirine : une prise chronique d'acide acétyl salicylique peuvent également entraîner des variations des taux d'HbA1c en modifiant la charge de l'hémoglobine.

- D'autres médicaments comme la dapson (anti-lépreux et immunomodulateur) peuvent engendrer une sous-estimation de la valeur d'HbA1c. En effet, ce traitement peut entraîner des hémolyses. [46]

III.4.4. Variabilités analytiques:

La variabilité observée entre les laboratoires a été longtemps un frein à l'utilisation de l'HbA1C, les performances analytiques des différentes techniques en matière d'exactitude et de précision demeurent encore inégales et les utilisateurs doivent avoir conscience de ces différences. [53]

Les méthodes et réactifs utilisés pour doser l'HbA1c doivent être conformes aux Recommandations de l'**Afssaps** 2006 préconisant des coefficients de variation (CV) de répétabilité et reproductibilité respectivement inférieures à 3 et à 4 %. [46]

CHAPITRE III.DOSAGE DE L'HÉMOGLOBINE GLYQUÉE

En se référant aux résultats des différents programmes d'évaluation externe de la qualité (EEQ) nationaux et internationaux, on constate que les méthodes les plus utilisées sont celles par CLHP et par immunoturbidimétrie. [46]

Les techniques CLHP, largement utilisées dans les laboratoires, présentent, globalement, des coefficients de variation inférieurs aux techniques immunologiques, souvent préférées dans les grands plateaux techniques de biologie. D'autres techniques sont susceptibles d'être utilisées en routine, notamment l'électrophorèse capillaire, qui semble présenter, d'après les premières évaluations, des performances comparables à celles de la CLHP. [53]

En CLHP, certains variants peuvent co-éluer avec l'HbA1c, entraînant une augmentation de son taux incompatible avec les variations observées en pathologie, ou avec l'HbA0, entraînant une diminution artéfactuelle du taux d'HbA1c.

Si les variants les plus courants sont correctement séparés ou pris en compte dans le calcul en CLHP et électrophorèse capillaire, certains engendrent encore des interférences spécifiques, variables selon les méthodes, comme l'HbE, l'Hb J Baltimore ou l'Hb Raleigh. Cependant, l'utilisation de ces techniques séparatives permet, dans la plupart des cas, de mettre en évidence les variants, ce que ne permettent pas les techniques immunologiques ou par affinité.

CHAPITRE III. DOSAGE DE L'HÉMOGLOBINE GLYQUÉE

Tableau VIII : Facteurs interférents avec la mesure de l'Hb1Ac.[54]

	Situation avec HbA1c		
	Faussement élevée	Faussement abaissée	Pouvant être faussement élevée ou abaissée
- Variante de l'HbA1c			
Variation génétique de l'hémoglobine (Hémoglobinopathies : HbS, HbC, HbF, HbE)			+
Dérivés de l'HbA1c modifiés chimiquement : Hb carbamylée formée lors d'insuffisance rénale	+		
- Réduction de durée de vie des érythrocytes			
Anémie hémolytique		+	
Anémie hémolytique		+	
Hyperplénisme		+	
- Médicaments et toxiques			
Ethylisme chronique	+		
Abus d'aspirine ou d'opiacés	+		
Abus de vitamine C et E	+		
- Autres facteurs			
Hyperbilirubinémie	+		
Hypertriglycémie	+		
Anémie ferriprive	+		
Splénectomie	+		
Anémie aplastique	+		
Age (>70 ans)	+		
Grossesse		+	

III.5. Standardisation des méthodes de dosage :

Devant le grand nombre de techniques de dosage disponibles (> 100), une standardisation des méthodes de dosage a été proposée en deux étapes successives. La première a été proposée par le programme national de standardisation de l'hémoglobine glyquée (NGSP). Elle est fondée sur la comparaison des différentes méthodes de dosage par rapport à une CLHP échangeuse de cations. Son but est de standardiser les résultats de tous les laboratoires par rapport à ceux du DCCT et de l'UKPDS. [40] [55] [56]

C'est à cette même époque que les résultats des études du DCCT, puis de l'UKPDS, montrant le lien entre taux d'HbA1c et les complications dégénératives du diabète sucré, ont confirmé l'intérêt majeur du dosage. Ces études avaient été réalisées en prenant comme

CHAPITRE III. DOSAGE DE L'HÉMOGLOBINE GLYQUÉE

référence la méthode de CLHP d'échange ionique développée par le NGSP, dans le laboratoire de l'Université de Columbia (Missouri, États-Unis), etc'est sur la base de ces chiffres qu'ont été établis les seuils de diagnostic et de décision que nous utilisons encore à l'heure actuelle (par exemple, valeurs de référence de 4 à 6 % ; objectif thérapeutique à 6,5 ou 7 %). [53]

Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'Hb totale. Les normales sont : 4- 6%. [43][46][57]

En 2011, 112 laboratoires obtenaient la certification NGSP. Une nouvelle méthode de dosage plus spécifique couplant la CLHP à l'électrophorèse capillaire (ou à la spectrométrie de masse) a été proposée par l'International federation of clinical chemistry (IFCC). Le paramètre mesuré est l'hexapeptide N-terminal des chaînes de la globine, clivé par une enzyme : l'endo-protéinase Glu-C. Les hexapeptides glyqués sont séparés des non-glyqués par une technique CLHP. Les peptides sont ensuite quantifiés par une technique de spectrométrie de masse ou une électrophorèse capillaire. [43] [46][57]

L'HbA1c est mesurée comme un ratio d'hexapeptide glyqué sur les hexapeptides non glyqués. Les résultats sont exprimés en mmol d'HbA1c/mol d'Hb. Les normales sont de 20 à 42 mmol/mol.

Les deux standards sont liés par l'équation de régression suivante : [34][46][57][58][59]

$$\text{NGSP \%} = (0,0915 \times \text{IFCC mmol/mol}) + 2,15$$

$$\text{IFCC mmol/mol} = (10,93 \times \text{NGSP \%}) - 23,50$$

Il est actuellement recommandé d'exprimer les résultats d'HbA1c selon les deux unités dans les comptes rendus d'analyses médicales.

IV. Recherche Bibliographique:

Des études antérieures à la nôtre ont comparées les performances et les résultats obtenus par les analyseurs de dosages de l'HbA1C, à savoir: le TOSOH G5® (HPLC), TOSOH G7® (HPLC), TOSOH G8® (HPLC), Biorad D10® (HPLC), Biorad D100® (HPLC), ARKRAY ADAMS A1c® (HPLC), intègra 800® (immunturbidimétrie), et d'autres. **56/60/61/62/63/50/47/49**

Cependant quelques études ont travaillé sur la comparaison des systèmes HPLC les plus courants dans le diagnostic de l'hémoglobine: TOSOH G8® et Biorad D10®

Ci-dessous la démarche et les résultats d'une étude réalisée sur ces deux automates **[60]**

L'étude a été réalisée au **laboratoire de biochimie métabolique du groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière** (octobre 2017).

Les résultats de patients ont été comparés à ceux obtenus avec les automates Tosoh G5®, G7® et G8® (TosohBioscience). L'automate de référence est le Variant II® BIORAD D10®

Les paramètres de comparaison sont : la précision, l'exactitude du pourcentage d'hémoglobine A1c ainsi que sur l'interférence des hémoglobines anormales et des hémoglobines modifiées.

Deux comparaisons ont été effectuées :

- Premièrement, avec les résultats obtenus en routine dans le laboratoire pour des patients diabétiques ou non. 149 échantillons ont été analysés sur les appareils G5, G7 et G8 pendant 3 semaines. **[60]**
- Deuxièmement, une comparaison a été réalisée entre les résultats obtenus sur l'analyseur VariantII® (Bio-Rad) et le G8. Les droites de corrélation ont été estimées par la méthode des moindres carrés.

Les droites de corrélation obtenues pour la première comparaison s'expriment :

- Corrélation entre les analyseurs G5 et G8 :

$$y = 1,00x - 0,09 \quad (r^2 = 1)$$

- Corrélation entre les analyseurs G7 et G8 :

$$y = 0,99x - 0,03 \quad (r^2 = 1)$$

- Concernant la comparaison réalisée entre l'analyseur Variant II® (Bio-Rad) et le G8, la droite de corrélation estimée s'exprime :

$y = 1x + 0,04$ ($r^2 = 0,99$), Aucun résultat discordant n'a été obtenu au cours de ces comparaisons.

Comme conclusion ; l'évaluation de l'automate G8 a permis de mettre en évidence des qualités analytiques excellentes en termes d'exactitude et de précision, de séparation de variants d'hémoglobine. Sa simplicité d'emploi et sa cadence élevée (37,5 échantillons/heure) en font un automate particulièrement adapté aux laboratoires traitant une grande quantité de prélèvements. L'analyseur G8 présente des caractéristiques parfaitement adaptées au suivi de l'équilibre glycémique des patients diabétiques.

V. Matériels et méthodes

V.1. Lieu et période de l'étude pratique :

Notre étude a porté sur la comparaison de deux systèmes HPLC utilisés pour la détermination de l'HbA1c. Dans ce but nous avons opté pour le laboratoire central du Centre Hospitalier et Universitaire de Tlemcen (CHUT), disposant d'un analyseur HPLC type BioradD10® (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) comme méthode à tester. De même, nous avons choisi le laboratoire de Biochimie de l'Établissement Hospitalier et Universitaire d'Oran (EHUO) comme laboratoire de référence, disposant d'un analyseur HPLC type Tosoh G8. La période de notre travail s'est étalée du janvier 2020 au février 2020.

V.2. Echantillonnage :

V.2.1. Prélèvement et conservation:

Pour la détermination de l'HbA1c, nous avons utilisé des prélèvements du sang veineux, total sur tube EDTA de 5ml. Ils sont dosés chaque jour sur le Biorad D10® dans le mode de travail habituel du laboratoire. Ce même mode de passage a été appliqué sur le deuxième appareil d'HPLC tosoh G8®. Les mêmes échantillons ont été conservés après rebouchage au réfrigérateur à +4 °C pendant une durée de moins d'une semaine précédant le test de comparaison.

Les échantillons de contrôle sont ceux fournis par les laboratoires pour chaque analyseur.

V. 3. Analyseur à tester BIORAD D10®:

V.3.1. Description général :

L'analyseur D-10 (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) est un automate de chromatographie liquide haute performance (HPLC). L'appareil peut travailler directement sur tube primaire. La méthodologie BIORAD D10® est certifiée NGSP/DCCT et IFCC.

Le système D-10 offre des tests de dosage de l'hémoglobine automatisés dans un format compact. Le système combine des tests de suivi du diabète et de diagnostic des β -thalassémies sur une unique plateforme, le système permet un fonctionnement simple et efficace pour les laboratoires d'analyses médicales, les hôpitaux et les cliniques.

Développé pour offrir à la fois flexibilité et fiabilité, le D-10 dispose d'une fonction de contrôle du démarrage permettant une validation automatique des paramètres physiques par le système. Le fonctionnement par écran tactile, le changement de colonne en une seule étape et la lecture automatique du code-barres des échantillons permet d'optimiser le flux du travail. Le traitement sur sang total directement à partir des tubes primaires élimine la préparation manuelle des échantillons. [64]

Le système permet l'utilisation de deux programmes distincts de dosage : pour la quantification rapide de l'HbA1c (3 min) ou de l'HbA2/F/A1c (6,5 min).



Figure 6: L'analyseur D-10® de Bio Rad

V.3.2.Principe de fonctionnement:

Le programme de l'automate BIORAD D10® utilise les principes de la chromatographie liquide haute performance (HPLC) par échange d'ions. Les échantillons sont automatiquement dilués sur le D-10 et injectés dans la cartouche analytique. Le D-10 délivre un gradient de tampon programmé de force ionique croissante à la cartouche, où les hémoglobines sont séparées en fonction de leurs interactions ioniques avec le matériau de la cartouche. Les hémoglobines séparées passent ensuite à travers la cuve à circulation du photomètre à filtre, où les changements d'absorbance à 415 nm sont mesurés. [65]

V.3.3.Colonne et réactifs:

- Colonne HPLC d'échange cationique, 4,0 mm ID x 30 mm
- Tampon d'élution 1. Deux flacons contenant 2000 ml d'un tampon Bis-Tris / Phosphate, pH 6,0.
- Tampon d'élution 2. Un flacon contenant 1000 ml de tampon Bis-Tris / phosphate, pH 6,7.
- Solution de lavage / diluant. Une bouteille contenant 1600 mL d'eau déminéralisée
- Calibrateur 1
- Calibrateur 2
- Contrôle Normal niveau 01
- Contrôle Anormal niveau 02. [65]

V.3.4. performances:

- Dosage de l'HbA1c en trois minutes
- Une calibration par colonne
- Méthode certifiée NGSP et standardisée IFCC
- Aucune interférence de l'Hb labile et Hbcarbamylée
- Détection des variants de l'hémoglobine les plus communs (S, C, D et E). [66]

V.4.Automate de comparaisonTOSOH G8®:

V.4.1.Description générale :

Pour la comparaison des résultats nous avons utilisé leTOSOH G8®. Comme l'indique son nom, le G8 constitue la huitième génération d'automates développés par TosohBioscience pour la détermination de l'HbA1c.

La programmation se fait par l'intermédiaire d'un écran tactile. Les données peuvent être stockées sur le disque dur ou sur un support mémoire amovible. Huit cent chromatogrammes

peuvent être stockés sur le disque dur de l'analyseur et douze mille sur une smart card. La calibration s'effectue en deux points. Les échantillons sont placés sur des racks TosohBioscience qui permettent l'installation aléatoire de tubes primaires et de godets (godets de 2 mL) utilisés pour les calibrants, les contrôles, les prélèvements capillaires ou lorsque la quantité dans le tube primaire est insuffisante. Une position d'urgence permet d'intercaler un prélèvement sans interrompre la série. L'analyseur peut également être connecté à un PC indépendant équipé du logiciel PIANO afin d'assurer une traçabilité de tous les résultats, chromatogrammes inclus. Ce logiciel permet notamment de rechercher l'historique d'un patient ou d'un contrôle qualité, de tracer les résultats sous forme graphique, ou encore de superposer des chromatogrammes afin de faciliter leur interprétation. La séparation se fait en 96 secondes au terme desquelles les chromatogrammes sont imprimés sur un papier thermosensible sur le G8 ou en format A4 sur l'imprimante reliée à l'ordinateur sur. Les résultats peuvent être obtenus avec une ou deux décimales. [60]



Figure 10: Analyseur TOSOH G8®

V.4.2.principe de fonctionnement :

La séparation des différentes fractions d'hémoglobine est obtenue par injection de 4 µL d'échantillon dans une colonne non poreuse TSK-GEL (TSKgelGlycoHSi Variant Column), après dilution automatique de l'échantillon (1/200) et passage à travers un préfiltre destiné à éliminer les débris cellulaires. Les fractions sont éluées grâce à un step-gradient utilisant 3 tampons de force ionique croissante. Après séparation les différentes fractions sont quantifiées par passage devant une cellule photoélectrique à 2 longueurs d'onde : 415 et 510nm. Un échantillon est analysé en 96 secondes. Au démarrage d'une série, le premier résultat est obtenu en moins de 5 minutes puis les suivants toutes les 96 secondes. [67]

V.4.3.Colonne et réactifs

- colonne non poreuse TSK-GEL
- Tampon d'élution de variante G8 HSi n ° 1
- Tampon d'élution de variante G8 HSi n ° 2
- Tampon d'élution de variante G8 HSi n ° 3
- Solution d'hémolyse et de lavage HSi
- Calibrateur 1 (environ 5,5%)
- Calibrateur 2 (environ 10,5%)
- Contrôle Normal niveau 01
- Contrôle Anormal niveau 02

V.4.4.Performances:

- Dosage de l'HbA1c en 1.6 minutes
- Coefficient de Variation CV< 2%
- Méthode certifiée NGSP et IFCC
- Détection et pré-identification des principaux variants. [68]

V.5 .Méthode :

Dans ce travail, nous nous sommes proposé d'évaluer les performances analytiques de l'analyseur BIORAD D10®en le comparant avec un analyseur similaire qui est leTOSOH G8®.

Dans ce but, nous nous sommes référés au GUIDE TECHNIQUE D'ACCREDITATION, DE VERIFICATION et de VALIDATION DES METHODES EN BIOLOGIE MEDICALE (SH GTA 04, Révision 01)

V.5.1. Intérêt de la comparaison de méthodes:

La comparaison de méthodes est un critère de performance à vérifier lors d'une vérification ou validation d'une méthode analytique quantitative.

Dans le cadre d'appareils en miroir, la comparabilité des résultats doit être assurée, lors de la validation initiale, et de façon continue conformément à la norme ISO 15189.

Si des différences significatives sont observées, le biologiste médical formalise la conduite à tenir :

- Adaptation des intervalles de référence,
- Information des cliniciens prescripteurs,
- Utilisation transitoire et documentée d'un facteur de correction

Après analyse des résultats, les valeurs discordantes éventuelles devront être exploitées par le laboratoire afin de mener une analyse des causes et une analyse d'impact sur les divergences constatées entre les 2 méthodes testées.

V.5.2. Protocol de comparaison de méthodes :

Pour comparer les résultats d'une méthode Y (à tester) avec ceux d'une méthode X (utilisée comme référence), on analyse au moins 30 échantillons de patients couvrant de façon homogène l'étendue du domaine physiopathologique rencontré.

Ces échantillons, frais de préférence, sont analysés en simple par les 2 techniques, dans un délai le plus court possible.

V.5.3. Méthode de calcul :

Les résultats sont examinés au fur et à mesure, et il est vérifié si les discordances (écart entre les deux méthodes) sont jugées supérieures aux limites préétablies calculées comme suit:

$$\pm \sqrt{(3\sigma_{FI \text{ technique testée}})^2 + (3\sigma_{FI \text{ technique de comparaison}})^2}$$

Avec σ_{FI} : écart-type de la fidélité intermédiaire (FI) obtenue à partir des contrôles internes de qualité CIQ. Si $\sigma_{FI \text{ technique testée}} = \sigma_{FI \text{ technique de comparaison}} = \sigma$. Alors Limites de suivi = $\pm 4.24 \sigma$ pour chaque niveau de concentration

Pour chacun des couples retenus x_i (méthode X) et y_i (méthode Y), on doit :

- Calculer les différences $x_i - y_i$
- Calculer les rapports y_i / x_i
- Etablir les graphiques des différences, $(x_i - y_i)$ fonction de x_i et (y_i / x_i) fonction de x_i , et reporter les limites retenues sur ces graphiques.
- Noter le nombre d'échantillons discordants identifiés, et rechercher la cause de la discordance si elle subsiste après vérification.

V.5.4. Comparaison statistique des résultats:

Si un même paramètre biologique est analysé par 2 systèmes analytiques et que Les mêmes échantillons patients sont analysés sur les deux systèmes, Les différences observées sont évaluées par le test de student (test t des différences.) Les données des deux échantillons, de même effectif n , se présentent sous la forme de n couples.

Pour chaque couple on calcule la différence. On obtient n différences qu'on peut considérer comme un échantillon aléatoire de la population des différences. On calcule la Moyenne des différences (m_d) et l'écart-type des différences (σ_d). Le problème se ramène donc à la comparaison de la moyenne des différences à 0 (valeur de référence). Le t calculé sera comparé au t théorique. (donné par les tables de student)

V.5.5. Etude de la corrélation:

Le calcul du coefficient de corrélation ne s'applique qu'à des variables indépendantes pour démontrer un lien entre deux variables x et y .

Ce n'est pas le cas lors d'une comparaison de technique. La valeur du coefficient de corrélation n'a donc pas d'intérêt pour la comparabilité des deux méthodes. Les données pertinentes sont apportées par l'équation de la droite de régression dont la pente et l'ordonnée à l'origine exprimeront la similitude des méthodes comparées (similitude optimale avec pente égale à 1 et ordonnée à l'origine égale à 0).

VI. Résultats et discussions :

VI.1.Répartition des échantillons

VI.1.1. Répartition des échantillons en fonction de la valeur de l'HbA1c :1

Le nombre total des échantillons a atteint 35 prélèvements réparti de façon homogène sur trois niveaux de concentration de l'HbA1C (figure N°06), avec un intervalle de concentration allant de 4.5 à 12.4 %(25.68 à 112.032 mmol/l).

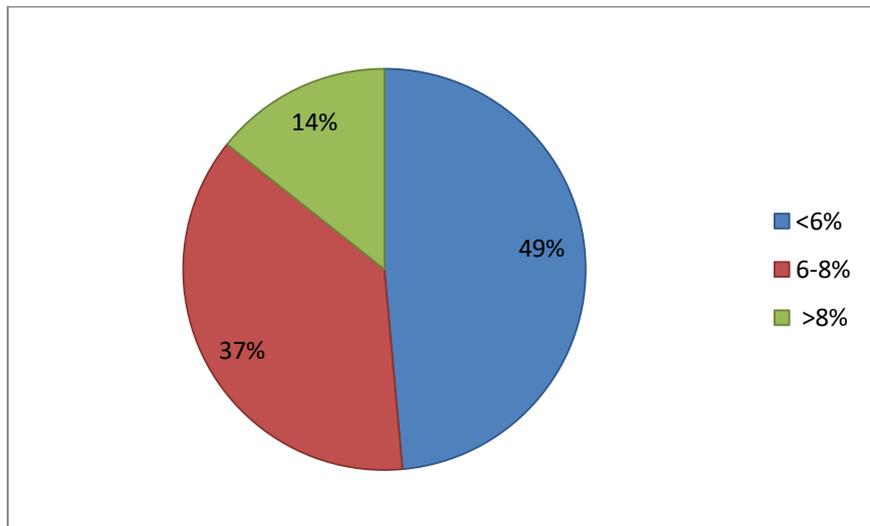


Figure 6: Répartition en pourcentage de l'HbA1c par l'analyseur biorad

Les patients ont de l'HbA1c >8% représente 14%, les patients ont un taux d'HbA1c entre 6 et 8 représente 37% et les patients ont un taux d'HbA1c < 6% représente 49%.

VI.1.2.Répartition des échantillons selon le sexe:

La répartition des patients étudiés selon le sexe est représentée dans la figure07 :

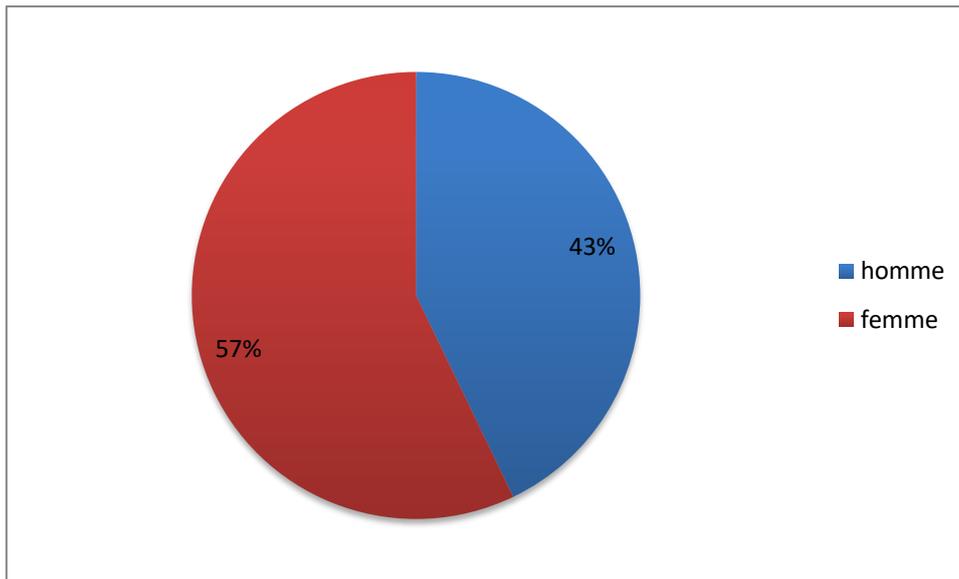


Figure 7: Répartition des échantillons étudiés selon le sexe

D'après la figure on remarque : sexe féminin 57%, sexe masculin 43% avec une sex-ratio (H/F) de 0.75.

VI.1.3. Répartition des patients en fonction du taux de la glycémie moyenne :

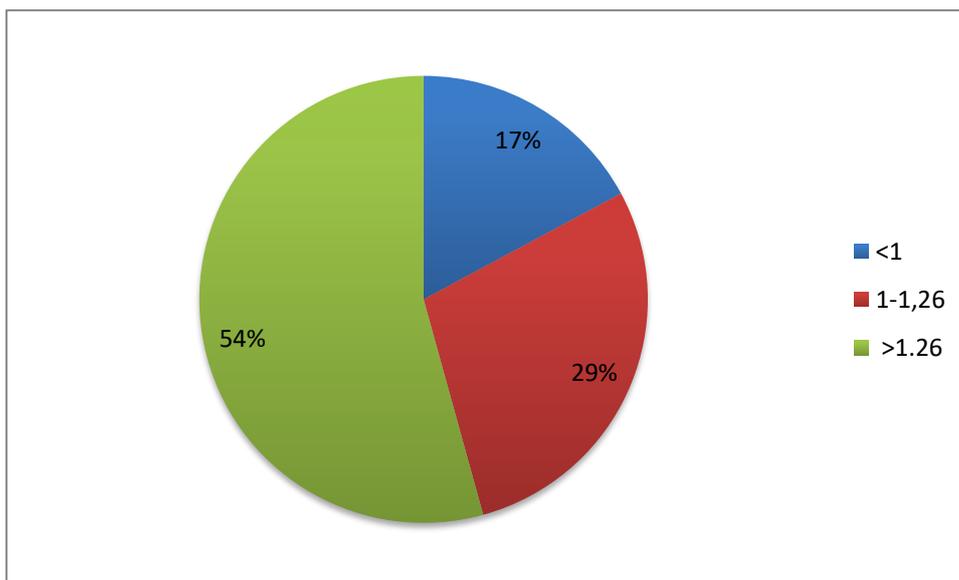


Figure 08: Répartition en pourcentage du taux de la glycémie

CHAPITRE VI: RESULTATS ET DISCUSSIONS

D'après les résultats du taux de la glycémie on remarque : la catégorie des patients qui ont un taux de glycémie >1.26 g/l représente le pourcentage le plus important de 54%, 1-1.26 g/l représente 29% et <1 représente 17%.

VI.2. Résultats du dosage de l'HbA_{1C} :

VI.2.1. Résultats du dosage de l' HbA_{1C} par l'analyseur BIORAD D10^(R) :

Le tableau suivant représente les résultats obtenus par l'analyseur BIORAD D10^(R) :

Tableau IX : résultats de dosage d'HbA_{1C} par l'analyseur BIORAD D10^(R)

Numéro d'échantillon	HbA _{1c} BIORAD D10 ^(R) en %	HbA _{1c} BIORAD D10 ^(R) mmol/mol calculé	Variants de l'HbA _{1C}
1	4,7	27,871	Présence
2	5,3	34,429	Absence
3	4,7	27,871	Absence
4	6,2	44,266	présence
5	5,3	34,429	Absence
6	7	53,01	Absence
7	9,2	77,056	Absence
8	4,6	26,778	Absence
9	5,2	33,336	Absence

CHAPITRE VI: RESULTATS ET DISCUSSIONS

10	5	31,15	Absence
11	5,5	36,615	Absence
12	6,2	44,266	Absence
13	4,6	26,778	Absence
14	5,6	37,708	présence
15	5	31,15	Absence
16	6,1	43,173	Absence
17	6,8	50,824	Absence
18	5,9	40,987	Présence
19	4,5	25,685	Absence
20	6	42,08	Absence
21	4,6	26,778	Absence
22	8,6	70,498	Absence
23	5	31,15	Absence
24	7,2	55,196	Présence
25	10	85,8	Présence(2)

CHAPITRE VI: RESULTATS ET DISCUSSIONS

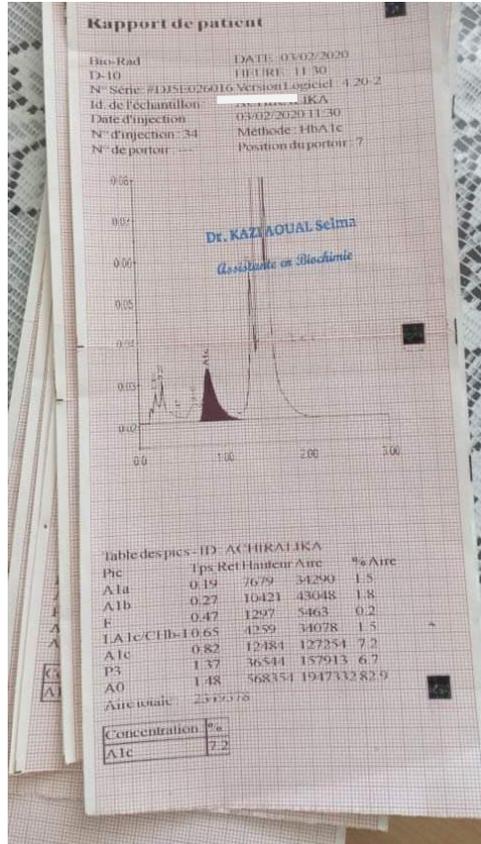
26	12,4	112,032	présence
27	6,5	47,545	Présence
28	7,2	55,196	Présence
29	6,2	44,266	Absence
30	5,6	37,708	présence
31	5,6	37,708	Absence
32	7	53,01	Absence
33	9	74,87	Absence
34	7,2	55,196	Absence
35	7,9	62,847	Absence

A partir de cette analyse, nous avons tiré les informations suivantes:

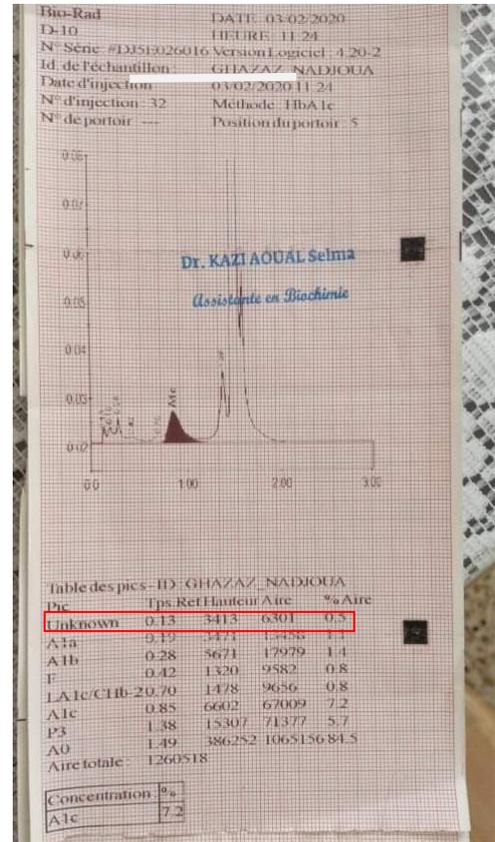
- L'analyseur BIORAD D10[®] permet de réaliser des dosages rapides de l'HbA1C, chaque résultat est obtenu au bout de trois minutes.
- La méthode est certifiée NGSP, et donc les résultats sont rendus en %.
- Les résultats peuvent être convertis en mmol/mol par la formule de standardisation IFCC.
- Nos résultats sont inclus dans un intervalle allant de 4.5% à 12.4%

CHAPITRE VI: RESULTATS ET DISCUSSIONS

- Nous avons détecté la présence d'une fraction inconnue (Unknown) dans 09 échantillons, supposées être des variant de l'HbA1c.
- L'automate ne donne aucune information concernant l'identification des variants détectés voir (figure N° 12)



(A)



(B)

Figure 7: Rapport de patient du dosage de l'HbA1C par BIORAD D10[®]

VI.1.2. Résultats du dosage d'HbA1C par l'analyseur tosho G8^(R) :

Les résultats du dosage d'HbA1C par l'analyseur tosho G8^(R) sont représentés dans le tableau suivant :

CHAPITRE VI: RESULTATS ET DISCUSSIONS

Tableau X : résultats de dosage d'HbA1C par l'analyseur TOSOH G8®

Numéro d'échantillon	HbA1C obtenu par l'analyseur TOSOH G8® en %	HbA1C obtenu par l'analyseur TOSOH G8® en mmol/l	Variants de l'HbA1C
1	5,4	35	Présence
2	6,1	43	Absence
3	5,3	34	Absence
4	7,2	56	Absence
5	6,3	45	Absence
6	8,9	74	Absence
7	11,6	103	Absence
8	5,4	35	Absence
9	6,2	44	Absence
10	5,7	39	Absence
11	6,4	47	Absence
12	7,4	58	Absence

CHAPITRE VI: RESULTATS ET DISCUSSIONS

13	5,4	35	Absence
14	6,6	48	Absence
15	6	42	Absence
16	7,4	57	Absence
17	8,3	67	Absence
18	7,1	54	Absence
19	5,3	35	Absence
20	7,1	54	Absence
21	5,6	37	Absence
22	10,8	94	Absence
23	5,9	41	Absence
24	8,9	74	Présence
25	12,8	116	Absence
26	12,3	111	Absence
27	6,1	43	Absence
28	6,8	50	Absence

CHAPITRE VI: RESULTATS ET DISCUSSIONS

29	5,9	41	Absence
30	5,3	35	Absence
31	5,4	35	Absence
32	6,6	48	Absence
33	8,7	72	Absence
34	7,1	54	Absence
35	7,6	59	Absence

La deuxième analyse nous a permis de conclure que :

- L'analyseur **tosoh G8^(R)** est encore plus rapide que le premier, chaque résultat est obtenu au bout de 1.6 mn.
- La méthode est certifiée NGSP et IFCC, et donc les résultats sont rendus en % et en mmol/mol.
- Nos résultats sont inclus dans un intervalle allant de 5.3% à 12.8%
- Nous avons détecté la présence de variant dans deux échantillons.
- la nature du variant peut être déterminée approximativement en fonction des données chromatographiques du pic du variant (voir figure N° 13)

CHAPITRE VI: RESULTATS ET DISCUSSIONS

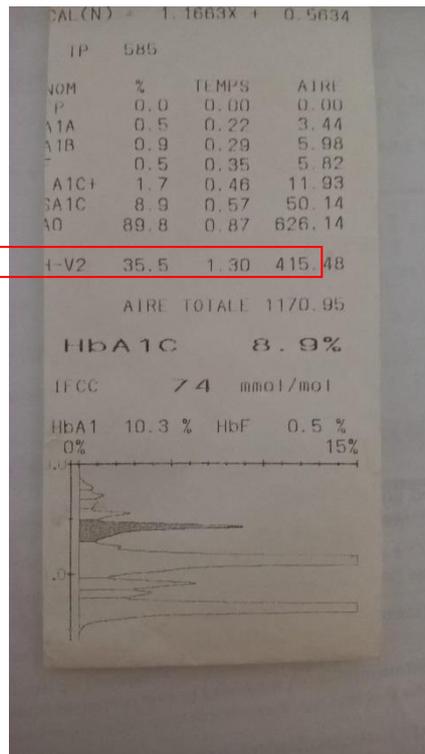


Figure 8°: Rapport de patient du dosage de l'HbA1C par TOSOH G8® avec présence de variant.

VI.3. Résultats de la glycémie :

Nous avons calculé approximativement la valeur de la glycémie à partir des valeurs de l'HbA1C obtenues par BIORAD D10® selon : (Voir tableau n° ...)

$$\text{Glycémie (g/L)} = [(35,6 \times \% \text{HbA1c}) - 77,3] \times 0,01$$

La glycémie moyenne de nos échantillons varie de 0,81g/l à 2,75 g/l

Une confirmation des résultats par un dosage de glycémie à jeun est nécessaire pour le diagnostic ou le suivi thérapeutique des patients.

Tableau XI : résultats de la glycémie calculée

Numéro d'échantillon	HbA1c BIORAD D10® en %	la glycémie moyenne g/l
1	4,7	0,9

CHAPITRE VI: RESULTATS ET DISCUSSIONS

2	5,3	1,09
3	4,7	0,9
4	6,2	1,41
5	5,3	1,09
6	7	1,695
7	9,2	2,471
8	4,6	0,847
9	5,2	1,07
10	5	1,004
11	5,5	1,101
12	6,2	1,41
13	4,6	0,847
14	5,6	1,212
15	5	1,004
16	6,1	1,389
17	6,8	1,624

CHAPITRE VI: RESULTATS ET DISCUSSIONS

18	5,9	1,306
19	4,5	0,8125
20	6	1,342
21	4,6	0,847
22	8,6	2,25
23	5	1,004
24	7,2	1,765
25	10	2,754
26	12,4	3,6
27	6,5	1,51
28	7,2	1,765
29	6,2	1,41
30	5,6	1,212
31	5,6	1,212
32	7	1,695
33	9	2,4

CHAPITRE VI: RESULTATS ET DISCUSSIONS

34	7,2	1,765
35	7,9	2,01

VI.4. Résultats de la comparaison des méthodes :

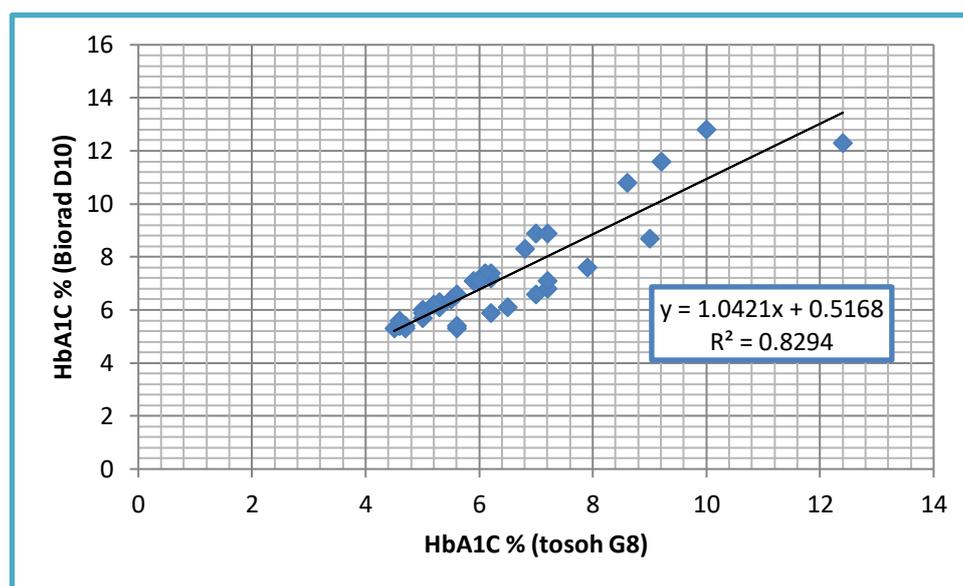
La comparaison des deux méthodes a été faite de trois manières:

- Etude de la corrélation
- Analyse des différences et des rapports
- Comparaison des moyennes par le test de student

VI.4.1. Étude de corrélation entre les deux méthodes :

Il s'agit d'une étude de corrélation pour toutes les valeurs du dosage de l'HbA1c obtenue par les deux analyseurs (BIORAD D10[®] et TOSOH G8[®]).

Ci-dessous, le diagramme de corrélation obtenu par Excel.



CHAPITRE VI: RESULTATS ET DISCUSSIONS

Figure 9: Tracé comparatif pour toutes les valeurs du dosage de l'HbA1c obtenues par les deux automates

La droite de régression linéaire a pour équation :

$HbA1c_{(BIORAD D10)} = 0.516 + 1.042 \times HbA1c_{(TOSOH G8)}$ et le coefficient de régression R^2 est égal **0.829**.

Selon les recommandations du cofrac, La valeur du coefficient de corrélation n'a donc pas d'intérêt pour la comparabilité des deux méthodes. Les données pertinentes sont apportées par l'équation de la droite de régression (pente et l'ordonnée à l'origine)

Une similitude optimale est obtenue avec pente égale à 1 et ordonnée à l'origine égale à 0.

Selon l'équation de régression : la pente $a = 1$ et l'ordonnée à l'origine $b = 0.516 > 0$

On peut conclure que la corrélation entre les deux méthodes n'est pas optimale mais plutôt bonne.

VI.4.2. Analyse des différences et des rapports:

Ci- après les résultats des différences $HbA1C_{(TOSOH G8)} - HbA1C_{(BIORAD D10)}$ Et des rapports $HbA1C_{(BIORAD D10)} / HbA1C_{(TOSOH G8)}$.

Tableau XII: résultats des différences et des rapports d'HbA1c obtenues par BIORAD D10[®] et TOSOH G8[®]

numéro d'échantillon	Différences TOSOH G8 [®] - BIORAD D10 [®]		Rapports BIORAD D10 [®] /TOSOH G8 [®]	
	en %	en mmol/L	en %	en mmol/L
1	0,7	7,129	87,04	79,6314286
2	0,8	8,571	86,89	80,0674419

CHAPITRE VI: RESULTATS ET DISCUSSIONS

3	0,6	6,129	88,68	81,9735294
4	1	11,734	86,11	79,0464286
5	1	10,571	84,13	76,5088889
6	1,9	20,99	78,65	71,6351351
7	2,4	25,944	79,31	74,8116505
8	0,8	8,222	85,19	76,5085714
9	1	10,664	83,87	75,7636364
10	0,7	7,85	87,72	79,8717949
11	0,9	10,385	85,94	77,9042553
12	1,2	13,734	83,78	76,3206897
13	0,8	8,222	85,19	76,5085714
14	1	10,292	84,85	78,5583333
15	1	10,85	83,33	74,1666667
16	1,3	13,827	82,43	75,7421053
17	1,5	16,176	81,93	75,8567164

CHAPITRE VI: RESULTATS ET DISCUSSIONS

18	1,2	13,013	83,10	75,9018519
19	0,8	9,315	84,91	73,3857143
20	1,1	11,92	84,51	77,9259259
21	1	10,222	82,14	72,372973
22	2,2	23,502	79,63	74,9978723
23	0,9	9,85	84,75	75,9756098
24	1,7	18,804	80,90	74,5891892
25	2,8	30,2	78,13	73,9655172
26	-0,1	-1,032	100,81	100,92973
27	-0,4	-4,545	106,56	110,569767
28	-0,4	-5,196	105,88	110,392
29	-0,3	-3,266	105,08	107,965854
30	-0,3	-2,708	105,66	107,737143
31	-0,2	-2,708	103,70	107,737143
32	-0,4	-5,01	106,06	110,4375

33	-0,3	-2,87	103,45	103,986111
34	-0,1	-1,196	101,41	102,214815
35	-0,3	-3,847	103,95	106,520339

Nous avons tracé deux diagrammes:

- 1- Diagramme des différences en fonction des valeurs obtenues par la méthode de référence (voir figure N 15)

$$\mathbf{HbA1C}_{(TOSOH\ G8)} - \mathbf{HbA1C}_{(BIORAD\ D10)} = \mathbf{F} (\mathbf{HbA1C}_{(TOSOH\ G8)}).$$

-2- Diagramme des rapports en fonctions des valeurs obtenues par la méthode de référence (voir figure N16)

$$\mathbf{HbA1C}_{(BIORAD\ D10)} / \mathbf{HbA1C}_{(TOSOH\ G8)} = \mathbf{F} (\mathbf{HbA1C}_{(TOSOH\ G8)}).$$

VI.3.2.1. Diagramme des différences :

Afin d'établir le diagramme des différences nous avons calculé les limites de suivi comme suite :

Limite de suivi $\pm \sqrt{(3\sigma_{FI\ technique\ testée})^2 + (3\sigma_{FI\ technique\ de\ comparaison})^2}$ =

Avec σ FI : écart-type de la fidélité intermédiaire (FI) obtenue à partir des contrôles internes de qualité CIQ

Nous n'avons pas réussi à faire le test de fidélité intermédiaire pour l'appareil BIORAD D10[®]. Les résultats de test de fidélité intermédiaire pour l'analyseur TOSOH G8[®] sont représentés dans le tableau n° XIII. Ainsi, nous avons considéré que FI de BIORAD D10[®] est égale à FI de TOSOH G8[®]:

Donc les Limites de suivi = +/- 4.24 * σ FI Tosoh G8 = +/- 3.21 (les limites les plus étroites).

CHAPITRE VI: RESULTATS ET DISCUSSIONS

Tableau XIII: les limites de suivi

	CIQ niveau 1 %(n=30)	CIQ niveau 1 mmol/mol (n=30)	CIQ niveau 2 % (n=30)	CIQ niveau 2 mmol/mol (n=30)
moyenne	5,08	31,89	9,82	83,92
ecart-type	0,08	0,76	0,12	1,36
RSD/CV	1,59	2,38	1,22	1,62
limites de suivi +/-	0,34	3,21	0,51	5,77

Ci- dessous le diagramme des différences avec les limites de suivi:

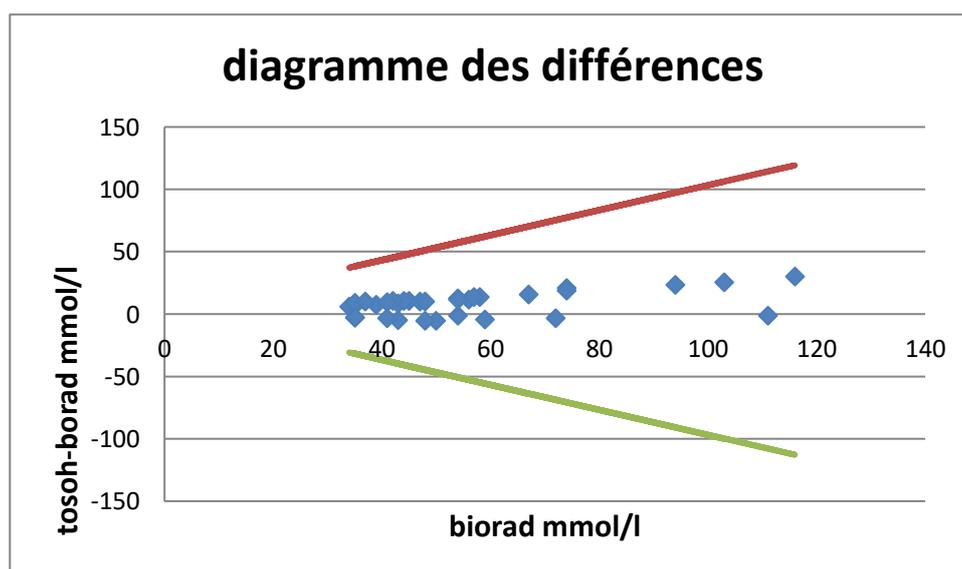


Figure 10: Diagramme des différences

CHAPITRE VI: RESULTATS ET DISCUSSIONS

L'analyse du diagramme des différences a montré que tous les résultats de différences sont inclus entre les limites de suivi préalablement établies.

Aucun résultat discordant n'a été obtenu au cours de cette comparaison.

VI.4.2.2. Diagramme des rapports :

Ci- dessous le diagramme des rapports:

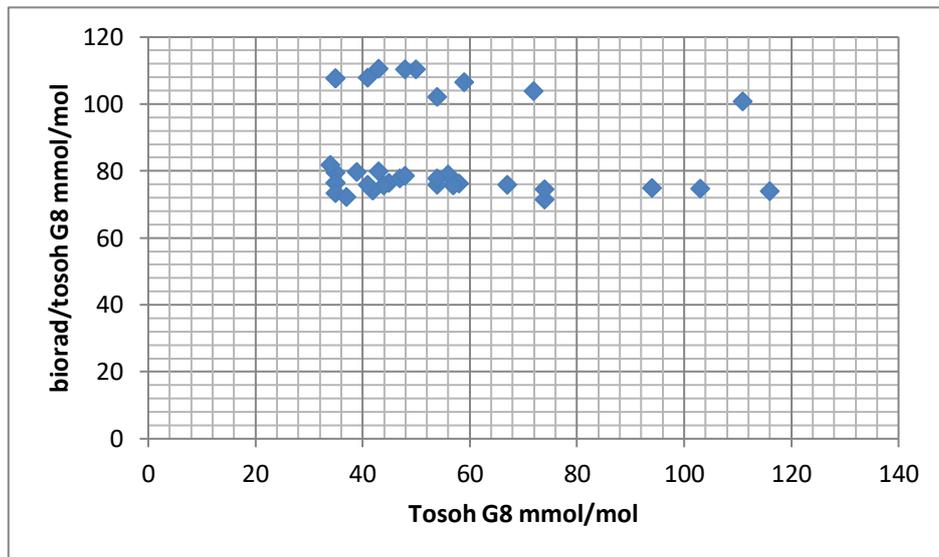


Figure 11: diagramme des rapports

A partir de ces résultats, nous avons remarqué que la valeur du rapport la plus basse est de 71.637 et la valeur la plus haute est de 110.569.

Nos résultats sont inclus dans un intervalle allant de -28.36 % à + 10.56%

Nous pouvons conclure que les résultats fournis par les deux analyseurs sont similaires dans un intervalle de +/- 30 %

VI.4.3. Test t de student :

Pour comparer 2 moyennes M1 et M2, on utilise le test de Student qui consiste à calculer le (t calculé) et à le comparer à la valeur seuil (t théorique) donné dans la table pour (M1+M2-2) degré de liberté DDL.

Tableau XIV : tableau statistique de la moyenne et l'écart type

	N	moyenne	écart type
Hba1c en % selon biorad	35	6,38	1,76
Hba1c en % selon tosoh	35	7,16	2,01

La valeur de $t_{calculée}$ est donnée selon cofrac par la formule suivante:

$$t_{calculé} = \frac{|mA - mB|}{\sqrt{\frac{\sigma^2 A}{nA} + \frac{\sigma^2 B}{nB}}}$$

t calculé = 1.73

t théorique (DDL= 68 et alpha=0.05) = 1,995 (voir annexe n°...)

Nous avons obtenu un $t_{calculé} < t_{théorique}$ donc les deux moyennes ne diffèrent pas significativement.

VI.5. Rapport de comparaison:

L'ensemble des résultats de la comparaison sont regroupés sous forme d'un rapport que nous pouvons joindre avec le rapport de validation / vérification des performances de l'appareil Biorad D10^(R) (Voir tableau N°XV)

Afin de rédiger ce rapport, nous avons suivi le modèle donné par le cofrac.

CHAPITRE VI: RESULTATS ET DISCUSSIONS

comparaison de méthodes

Données bibliographiques	données fournisseur + publications
méthode de référence	TOSOH G8®- Laboratoire de biochimie EHU ORAN
nombre des mesures	35
intervalle de comparaison.	25,68 mmol/mol à 112,03 mmol/mol
Equation de la droite de régression	$Y = 1,042 x + 0,516R^2 = 0,829$

Diagramme des différences et des rapports

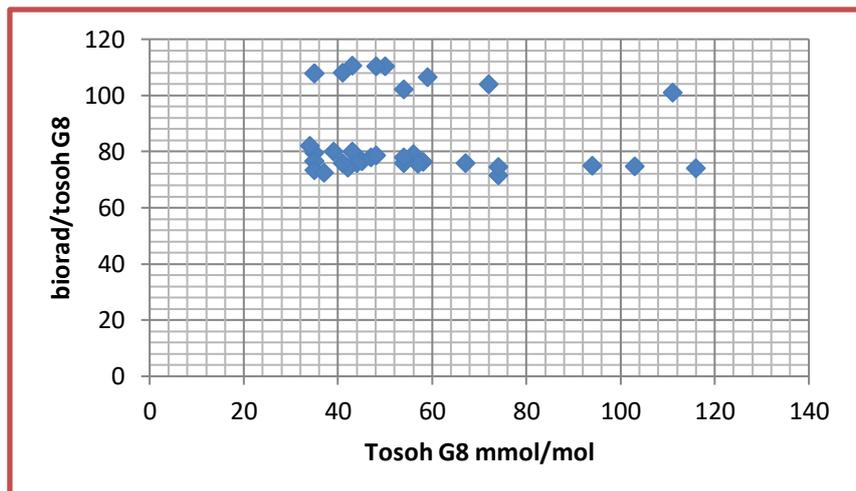
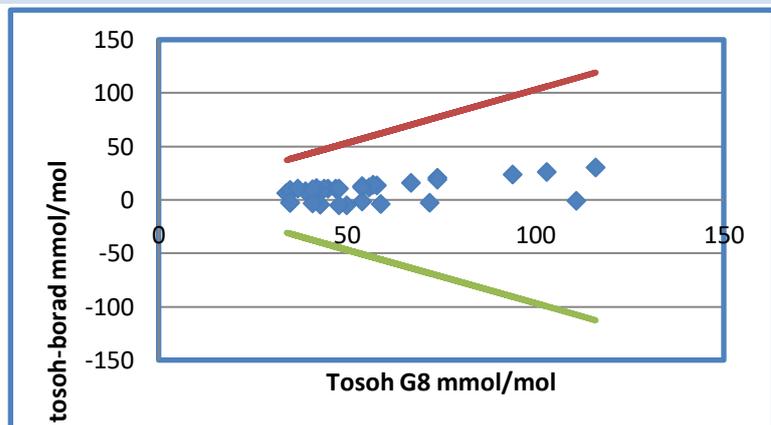


Tableau XV : comparaison des deux méthodes

Conclusion

L'objectif principal de ce travail était de comparer l'analyseur du dosage de l'HbA1C du laboratoire de Biochimie du CHU Tlemcen, Variant II Biorad D10^(R) à son homologue Tosoh G8^(R) présent au niveau du laboratoire de Biochimie de l'EHU Oran, ayant tous deux comme technique de dosage la chromatographie liquide haute performance .

Dans ce but, on a choisi une gamme de 35 échantillons qui couvre les taux physiologiques et pathologiques de l'HbA1c.

Les taux de l'HbA1C ont été déterminés par les deux automates sur les mêmes échantillons avec un intervalle de temps de moins d'une semaine.

les études réalisées pour l'analyse des résultats de comparaison de méthodes , et suivant le protocole décrit par le guide technique d'accréditation , de vérification et de validation des méthodes en biologie médicale SH GTA 04 / Révision 01, montre que l'analyseur Biorad D10^(R) , comparé à l'analyseur de référence Tosoh G8^(R) , donne des résultats similaires et présente les performances requises en vue de l'analyse en routine de l'HbA1C dans le sang total .

Au moment de conclure ce travail, de nombreuses perspectives demandent à être explorés plus en détail, à savoir :

- Les vérifications des performances de l'analyseur Variant II Biorad D10 (R).
- L'étude de la stabilité des échantillons et l'effet de l'hémolyse sur le taux de l'HbA1C.
- La recherche et l'identification des variants de l'HbA1C

Références bibliographiques :

1. WHO_NMH_NVI_16.3_fre.pdf. Accessed September 28, 2020. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204875/WHO_NMH_NVI_16.3_fre.pdf;jsessionid=1468B807D15DE0863A307D804C4D19FB?sequence=1
2. Thouraya C. Plus de 14% des Algériens âgés entre 18 et 69 souffrent de diabète. Accessed September 28, 2020. <http://www.aps.dz/sante-science-technologie/80698-plus-de-14-des-algeriens-ages-entre-18-et-69-souffrent-de-diabete>
3. L'HbA1c ou hémoglobine glyquée | Fédération Française des Diabétiques. Accessed September 10, 2020. <https://www.federationdesdiabetiques.org/information/glycemie/hba1c>
4. Masson E. Étude comparative du dosage de l'hémoglobine glyquée par trois méthodes : HPLC sur G7[®] (Tosoh Bioscience) et D10[®] (Biorad), et immunoturbidimétrie sur Intégra 800[®] (Roche). EM-Consulte.
5. OMS | Diabète [Internet]. WHO. World Health Organization; [cité 05 avr 2020]. Disponible sur: http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/fr/
6. Feldman-Billard S. Prise en charge du diabète et de ses complications oculaires. Rev Francoph Orthopt. avr 2019;12(2):69-76.
7. Bouhours-Nouet N, Coutant R. Clinique et diagnostic du diabète de l'enfant. EMC - Pédiatrie. août 2005;2(3):220-42.
8. Drouin P, Blickle JF, Charbonnel B, Eschwege E, Guillausseau PJ, Plouin PF, et al. DIAGNOSTIC ET CLASSIFICATION DU DIABÈTE SUCRÉ LES NOUVEAUX CRITÈRES. 1999;25:12.
9. Vambergue A. Le diabète gestationnel : diagnostic et prise en charge à court et à long terme. Presse Médicale. mai 2013;42(5):893-9.
10. Surveillance épidémiologique du diabète de l'enfant : Claire Lévy-Marchal, Anne FagotCampagna, Madeleine Daniel INSERM-INVS
11. Karjalainen J, Samela P, Ilonen J, Surcel H, Knip M. Acomparaison of childhood and adult type 1 diabetes mellitus. N Engl J Med 1989; 320:881-6.
12. Chaïeb M, Boisson C, Castano L, Chaussain J, Bougnères P. Données cliniques et biologiques caractérisant en France le diabète insulino-prive de l'enfant au moment de son diagnostic Arch Fr Pediatr 1989;46:107-12.

13. Booth G, Cheng AYY. Méthodes. *Can J Diabetes*. oct 2013;37:S365-8
14. Standards of Medical Care in Diabetes—2014. *Diabetes Care* 2014;37(Suppl. 1):S14–S80
Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2014;37(Suppl. 1):S81–S90 - March 01, 2014
15. Santaguida PL, Balion C, Morrison K, et al. Diagnosis, prognosis, and treatment of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. Evidence report/technology assessment no. 128. AHRQ Pub. No 05-E026-2. Rockville,MD: Agency for Healthcare Research and Quality. Septembre 2005.
16. Roncero-Ramos I, Alcala-Diaz JF, Rangel-Zuñiga OA, Gomez-Delgado F, Jimenez-Lucena R, García-Rios A, et al. Prediabetes diagnosis criteria, type 2 diabetes risk and dietary modulation: The CORDIOPREV study. *Clin Nutr*. févr 2020;39(2):492-500.
17. Zhang X, Gregg E, Williamson D, et al. A1C level and future risk of diabetes:a systematic review. *Diabetes Care* 2010; 33:1665e73
18. Buse JB. Diabète et prédiabète. In: *Médecine interne de Netter* [Internet]. Elsevier; 2011 [cité 4 oct 2020]. p. 319-26. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9782294709517000396>
19. Wherrett D, Huot C, Mitchell B, Pacaud D. Le diabète de type 1 chez les enfants et les adolescents. *Can J Diabetes*. oct 2013;37:S531-41.
20. Pillon F, Tan K, Jouty P, Frullani Y. Le traitement médicamenteux du diabète de type 2. *Actual Pharm*. déc 2014;53(541):23-8.
21. Standards of medical care in diabetes – 2016, *Diabetes care*, January 01 2016; volume 39 issue Supplement 1
22. Guerci B, Benhamou P-Y, Durain D, Bahloul A, Jeanbat V. Pratique de l'auto-surveillance glycémique en France : données d'une enquête nationale. 2017;29:13.
23. . Blickle J.F .Complications métaboliques aiguës(comas chez le diabétique) .Livre,Masson éd.292-296 Buffet C ,Vatier C. *Endocrinologie diabétologie nutrition* .Paris : Elsevier Masson ;2010.
24. Fédération française des diabétiques . Votre suivi médical du diabète.

25. Gillery P. Quelles perspectives pour le dosage des fructosamines en 2014 ? Médecine Mal Métaboliques. 2014 Jun;8(3):306–10.
26. Gillery P. Dosage de l'HbA1c et des produits d'Amadori en biologie humaine. Ann Pharm Fr. 2014 Sep;72(5):330–6.
27. Jorge SE, Ribeiro DM, Santos MNN, de Fátima Sonati M. Hemoglobin: Structure, Synthesis and Oxygen Transport. In: Costa FF, Conran N, éditeurs. Sickle Cell Anemia [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [cité 1 oct 2020]. p. 1-22. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-06713-1_1
28. Biochimie de Harper - Kathleen M Botham, Anthony Weil, Victor W Rodwell, Peter J Kennelly, David A Bender - Google Books [Internet]. [cité 1 oct 2020].
29. Vinatier I. Recommandations pour la mise en oeuvre et l'interprétation de l'étude de l'hémoglobine [En ligne]. Les cahiers CERBA. Laboratoires CERBA; p. 341, 313. Disponible sur : http://www.lab-cerba.com/newus/cahier_cerba/N1_GB.pdf
30. MONNIER L., COLLETE C. (2017). Discordance entre l.Hba1c et résultat de l'auto surveillance glycémique. Elsevier Masson.
31. Jaisson S. Les produits de glycation avancée des protéines. :8.
32. Farcet A, Delalande G, Oliver C, Retornaz F. About the HbA1c in the elderly. Gériatrie Psychol Neuropsychiatr Viellissement. mars 2016;14(1):42-8.
- 33 . John G, English E, Milosevich E. In vitro determination of hemoglobin A1c for diabetes diagnosis and management: technology update. Pathol Lab Med Int. 2014 Jul 16;6:21–6.
34. Zendjabil M. L'hémoglobine glyquée : indication, interprétation et limites. :4.
35. PROCOPIOU M. (2006). Hémoglobine glyquée : mise au point et nouveautés. Revue Médicale Suisse. 31392
36. Weykamp C, Renzo Galanello R, Mosca A. Standardisation Des Dosages De L'HbA1c Et De L'HbA2. Spectra Biol [IE n ligne]. 2007 Nov [consulté le 1 jan 2015];(n° 162).

Disponible sur: <http://www.manuelpdf.net/pdf/as2/standardisation-des-dosages-de-lhba1c-et-de-lhba2.html>

37. Nathan DM, Turgeon H, Regan S. Relationship between glycosylated haemoglobin levels and mean glucose

38. Bigot-Corbel DE. Méthodes de dosage de l'HbA_{1c}. :40.

39. Saudek CD, Herman WH, Sacks DB, et al. A new look at screening and diagnosing diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:2447—53

40. Imran SA, Rabasa-Lhoret R, Ross S. Objectifs du contrôle de la glycémie. *Can J Diabetes*. oct 2013;37:S394-7.

41. Nathan DM, Kuenen J, Borg R, Zheng H, Schoenfeld D, Heine RJ, et al. Translating the hemoglobin A_{1c} assay into estimated average glucose values. *Diabetes Care* 2008;31:1473—8.

42. Farcet A, Delalande G, Oliver C, Retornaz F. About the HbA_{1c} in the elderly. *Gériatrie Psychol Neuropsychiatr Viellissement*. mars 2016;14(1):42-8.

43. Szymezak J, Leroy N, Lavalard E, Gillery P. Interférence de l'hémoglobine glyquée labile sur le dosage de l'HbA_{1c} par une méthode de chromatographie liquide haute performance. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2008 Jul 1;66(4):459–63.

44. Camargo JL, Felisberto M, Gross JL. Effect of pre-analytical variables on glycohemoglobin measurements in routine clinical care. *Clin Biochem*. 2004 Sep;37(9):836–9.

36. Szymezak J, Leroy N, Lavalard E, Gillery P. Interférence de l'hémoglobine glyquée labile sur le dosage de l'HbA_{1c} par une méthode de chromatographie liquide haute performance. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2008 Jul 1;66(4):459–63.

45. Mario N, Lasnier E. Les difficultés d'interprétation du dosage de l'hémoglobine A_{1c}. *Rev Francoph Lab*. 2006 May;2006(382):39–43.

46. Hay-Lombardie A, Bigot-Corbel E. Biomarqueurs permettant le suivi de l'équilibre glycémique du patient diabétique. *Rev Francoph Lab*. mai 2018;2018(502):33-43.

47. GILLERY P., GUILLEMIN, C., DELPECH M., Hémoglobine glyquée : méthodes de dosage et problèmes de standardisation, *Ann. Biol. Clin.*, 1994, 52, 157-163

48. Nathan DM, Kuenen J, Borg R, Zheng H, et al. Translating the A_{1c} assay into estimated average glucose values. *Diabetes Care*. 2008; 31: 1473–8.

49. . Shubham Gupta, Priti Vijay Puppalwar, Anita Chalak Correlation of fasting and post meal plasma glucose level to increased HbA1c levels in type-2 diabetes mellitus International Journal of Advances in Medicine | July-September 2014 | Vol 1 | Issue 2 ; 127-
50. DB Sacks., Carbohydrates. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Textbook of clinical 25. MF Rossier. Nature et dosage de l'HbA1c Formation ICHV ; 2014
51. Shubham Gupta, Priti Vijay Puppalwar, Anita Chalak Correlation of fasting and post meal plasma glucose level to increased HbA1c levels in type-2 diabetes mellitus International Journal of Advances in Medicine | July-September 2014 | Vol 1 | Issue 2 ; 127-
52. SOBHANIFAR S. (2015). Blood Substitute Anyone. Faculty of medicine-Centre for Blood Research (CRB), Canada.
53. P. Gillery Laboratoire de biologie et de recherche pédiatriques, American Memorial Hospital, CHU de Reims. Le dosage de l'hémoglobine A1c en 2013 Hemoglobin A1c assay in 2013.
54. Gariani K. Hémoglobine glyquée: nouvel outil de dépistage? Diabète. 2011;298(22):1238-42.
55. GUIDE TECHNIQUE D'ACCREDITATION DE VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) DES METHODES EN BIOLOGIE MEDICALE.
56. Szymanowicz A, Bernay A, Lornage C, Neyron MJ. Étude comparative du dosage de l'hémoglobine glyquée par trois méthodes : HPLC sur G7® (Tosoh Bioscience) et D10® (Biorad), et immunoturbidimétrie sur Intégra 800® (Roche). Immuno-Anal Biol Spéc. oct 2009;24(5-6):272-80.
- 57.] Gillery P, et al. Propositions pour l'expression standardisée des résultats d'HbA1C. Ann Biol Clin 2009;67:669-71.
58. Hoelzel W, Weykamp C, Jeppsson J-O, Miedema K, Barr JR, Goodall I, et al. IFCC Reference System for Measurement of Hemoglobin A1c in Human Blood and the National Standardization Schemes in the United States, Japan, and Sweden: A Method-Comparison Study. Clin Chem. 1 janv 2004;50(1):166-74.
59. Sacks DB. Measurement of Hemoglobin A1c: A new twist on the path to harmony. Diabetes Care. 1 déc 2012;35(12):2674-80.

60. Samaan S, Lesellin A, Baron S, Fonfrède M. Evaluation de l'analyseur G8 et du logiciel PIANO (Tosoh Bioscience) pour la détermination de l'hémoglobine A1c. 2007;8.
61. Artiss JD, Walters WF, Mt J. Hemoglobin A1c: Comparison of Pointe Scientific's 2-Part Direct Hemoglobin A1c with the Bio-Rad Variant II and the Tosoh G8. :6.
62. Aykal G, Atakan Erkal F, Yeğin A, Eren E, Yılmaz N. Comparison of the BioRad D-10™ and Tosoh HLC 723 G8 HPLC instruments for the detection of HbA2. Turk Bull Hyg Exp Biol. 2016;73(3):245-52.
63. Jaisson S, Guillard E, Leroy N, Gillery P. Comparison of analytical interferences on HbA1c measurement by two high pressure liquid chromatography analyzers. Ann Biol Clin (Paris). janv 2011;69(1):63-9.
64. 48. Ouzzif Z, Renard C, Dami A, Daunizeau A, Derouiche M. Validation de la méthode de dosage de l'hémoglobine A1c par CLHP sur D-10® Bio-Rad. Rev FrancophLab. 2009 May; 2009(412):53-7
65. Coffret D-10 Dual Kit Program | Diagnostic clinique | Bio-Rad [Internet]. [cité 5 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.bio-rad.com/fr-fr/product/d-10-dual-program-reorder-pack?ID=54f588f5-ca29-47d6-b4a0-bce4f740f8a4>
66. Système D-10 : pour le dosage des HbA1c, HbA2 et HbF | Diagnostic clinique | Bio-Rad [Internet]. [cité 5 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.bio-rad.com/fr-fr/category/d-10-hemoglobin-testing-system?ID=aa5c4d05-2570-48c4-908a-be21c0274a72>
67. G7BUFFERSTANDARD_FR.pdf.
68. G8 HPLC Analyzer | <https://www.diagnostics.us.tosohbioscience.com> [Internet]. [cité 5 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.diagnostics.us.tosohbioscience.com/analyzers/g8>

Résumé :

L'hémoglobine glyquée (HbA1c) peut être évaluée par des techniques variées (chromatographie liquide haute performance d'échange ionique ou d'affinité, électrophorèse capillaire, immunodosage, technique enzymatique) et est considéré comme le marqueur de choix du suivi des patients diabétiques. Notre étude visait à comparer deux analyseurs de dosage de l'HbA1c par méthodes chromatographique : Bio-rad D-10 et TOSOH G8.

35 échantillons ont été prélevés chez les patients. L'analyse de HbA1c a été réalisé en par (HPLC) sur un système Bio-rad D-10 et TOSOH G8. La comparaison des techniques montre une corrélation très significative avec un $R^2=0.829$ et une équation de la régression linéaire $Y = 1,042 x + 0,516$.

Les résultats obtenus pour les diagrammes des déférences et des rapports montrent qu'il y a pas une discordance ainsi une similarité dans un intervalle de +/- 30 %. Le test t du student donne des résultats des moyennes qui ne diffèrent pas significativement.

En conclusion, les deux méthodes fournissent des résultats avec un niveau conforme aux recommandations du confrac.

Abstrat :

Glycated hemoglobin (HbA1c) can be assessed by various techniques (high performance ion exchange or affinity liquid chromatography, capillary electrophoresis, immunoassay, enzymatic technique) and is considered the marker of choice for monitoring diabetic patients. Our study aimed to compare two analyzers for the determination of HbA1c by chromatographic methods: Bio-rad D-10 and TOSOH G8.

Methods: 35 samples were taken from the patients. The HbA1c analysis was performed using high pressure cationic ion exchange liquid chromatography (HPLC) on a Bio-rad D-10 and TOSOH G8 system. Comparison of the techniques shows a very significant correlation with an $R^2 = 0.829$ and a linear regression equation $Y = 1.042 x + 0.516$.

The results obtained for the deference plots and the ratios show that there is not a mismatch as well as a similarity in an interval of +/- 30%. The student's t test gives results of the means which do not differ significantly.

In conclusion, the two methods provide results with a level that complies with the recommendations of confrac.

Critères d'attribution du niveau des données probantes aux études publiées

Niveau	Critère
Études sur le diagnostic	
Niveau 1	a) Interprétation indépendante des résultats du test (sans connaissance du résultat du test diagnostique ou de la norme d'étalon d'or) b) Interprétation indépendante du test diagnostique de référence (sans connaissance du résultat du test) c) Sélection de personnes chez qui on soupçonne la présence du trouble (sans en être certain) d) Description reproductible du test ainsi que du test diagnostique de référence e) Au moins 50 sujets qui ont le trouble et 50 qui ne l'ont pas
Niveau 2	Satisfait à 4 des critères de niveau 1
Niveau 3	Satisfait à 3 des critères de niveau 1
Niveau 4	Satisfait à 1 ou 2 des critères de niveau 1

- Annexe 01 : Critères d'attribution du niveau des données probantes aux études publiées.

Critères d'attribution de la catégorie aux recommandations pour la pratique clinique

Catégorie	Critère
Catégorie A	Les meilleures données probantes étaient de niveau 1
Catégorie B	Les meilleures données probantes étaient de niveau 2
Catégorie C	Les meilleures données probantes étaient de niveau 3
Catégorie D	Les meilleures données probantes étaient de niveau 4, ou il y a eu consensus

- Annexe 02 : Critères d'attribution de la catégorie aux recommandations pour la pratique clinique

Degrés de liberté	Aire dans la queue supérieure de la distribution					
	0,20	0,10	0,05	0,025	0,01	0,005
35	0,852	1,306	1,690	2,030	2,438	2,724
36	0,852	1,306	1,688	2,028	2,434	2,719
37	0,851	1,305	1,687	2,026	2,431	2,715
38	0,851	1,304	1,686	2,024	2,429	2,712
39	0,851	1,304	1,685	2,023	2,426	2,708
40	0,851	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704
41	0,850	1,303	1,683	2,020	2,421	2,701
42	0,850	1,302	1,682	2,018	2,418	2,698
43	0,850	1,302	1,681	2,017	2,416	2,695
44	0,850	1,301	1,680	2,015	2,414	2,692
45	0,850	1,301	1,679	2,014	2,412	2,690
46	0,850	1,300	1,679	2,013	2,410	2,687
47	0,849	1,300	1,678	2,012	2,408	2,685
48	0,849	1,299	1,677	2,011	2,407	2,682
49	0,849	1,299	1,677	2,010	2,405	2,680
50	0,849	1,299	1,676	2,009	2,403	2,678
51	0,849	1,298	1,675	2,008	2,402	2,676
52	0,849	1,298	1,675	2,007	2,400	2,674
53	0,848	1,298	1,674	2,006	2,399	2,672
54	0,848	1,297	1,674	2,005	2,397	2,670
55	0,848	1,297	1,673	2,004	2,396	2,668
56	0,848	1,297	1,673	2,003	2,395	2,667
57	0,848	1,297	1,672	2,002	2,394	2,665
58	0,848	1,296	1,672	2,002	2,392	2,663
59	0,848	1,296	1,671	2,001	2,391	2,662
60	0,848	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660
61	0,848	1,296	1,670	2,000	2,389	2,659
62	0,847	1,295	1,670	1,999	2,388	2,657
63	0,847	1,295	1,669	1,998	2,387	2,656
64	0,847	1,295	1,669	1,998	2,386	2,655
65	0,847	1,295	1,669	1,997	2,385	2,654
66	0,847	1,295	1,668	1,997	2,384	2,652
67	0,847	1,294	1,668	1,996	2,383	2,651
68	0,847	1,294	1,668	1,995	2,382	2,650
69	0,847	1,294	1,667	1,995	2,382	2,649
70	0,847	1,294	1,667	1,994	2,381	2,648
71	0,847	1,294	1,667	1,994	2,380	2,647

Annexe 03 : la table du student