

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

وزارة التعليم العالي و ابحاث اعلمي

**ECOLE NATIONALE VETERINAIRE – ALGER**

المدرسة الوطنية للبيطرة - الجزائر

**PROJET DE FIN D'ETUDES  
EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLOME DE DOCTEUR VETERINAIRE**

**DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE  
GLYQUEE CHEZ LE CHIEN  
VALEURS ET INTERETS**

**Présenté par Melle. ABDELLI Mouni Kahina**

**Soutenu le 10 juin 2007**

**Le jury :**

- **Président : Mr. BENDEDOUCHE. B. chargé de cours à l'ENV**
- **Promoteur : Mr. BENTCHIKOU.T. chargé de cours à l'ENV**
- **Co-promoteur : Mr. ZOUAMBI. B. chargé de cours à l'ENV**
- **Examinatrice : Mme BOUABDELLAH. R. chargée de cours à l'ENV**
- **Examinatrice : Mme REMICHI. H. Maître assistante à l'ENV**

**Année universitaire : 2006/2007**

**Résumé :**

L'hémoglobine glyquée s'accumule dans l'hématie pendant toute la durée de vie de celle-ci soit 110 à 120 jours environ, faisant d'elle le reflet de la glycémie des 4 à 8 semaines précédant le dosage. Le diabète sucré chez le chien est une maladie fréquemment associée à des complications graves imposant un traitement lourd souvent difficile à juger.

L'hémoglobine glyquée et plus précisément l'HbA1c reste le marqueur essentiel de la surveillance de l'équilibre glycémique d'un animal diabétique sous traitement.

Les concentrations en HbA1c ont été évaluées chez 75 chiens présentant une glycémie normale, en utilisant une méthode chromatographique d'échange d'ions, nous avons obtenus une corrélation significative entre le taux d'HbA1c % et la glycémie ( $r = 0.78$  ;  $p < 0.0001$ ).

**Mots clés :**

Chien  
Hémoglobine glyquée  
Diabète sucré  
Surveillance glycémique

**Abstract :**

Glycated haemoglobin accumulates in red blood corpuscle during all the lifespan of this one is 110 to approximately 120 days, making of it the reflection of the glycemia from the 4 to 8 weeks preceding proportioning.

The diabetes mellitus in the dog is a disease frequently associated serious complications imposing a heavy treatment often difficult to judge

glycated haemoglobin and more precisely HbA1c remain the essential marker of the monitoring of the balance glycemic of a diabetic animal under treatment.

The concentrations of HbA1c were evaluated in 75 dogs presenting a normal glycemia, by using a chromatographic method of exchange of ions, we obtained a significant correlation between the rate of HbA1c % and the glycemia ( $R = 0.78$ ;  $p < 0.0001$ ).

**Key words:**

Dog  
Glycated haemoglobin  
Diabetes mellitus  
Glycemic Monitoring

الهيموغلوبين الغليكزية تتراكم داخل الكرية الحمراء و ذلك خلال مدة حياتها التي تبلغ تقريبا 110-120 يوم مما يجعلها مؤشر جيد لكمية السكر في الدم خلال فترة 4-8 اسابيع التي تسبق التعبير  
داء السكري عند الكلب يعتبر مرض مقترن غالبا باعراض سلبية واجبا علاج ثقيل صعب المراقبة  
الهيموغلوبين الغليكزية و خصوصا AbH1c تعتبر المؤشر الأساسي في مراقبة توازن نسبة السكر في الدم عند الحيوان  
المصاب بداء السكري الخاضع للعلاج  
تم تعبير نسبة AbH1c عند 75 كلب ذوي نسب عادية من السكر الدموي و ذلك باستعمال طريقة الكروماتوغرافية مبدلة الأيونات و قد تحصلنا علا تناسب و اضح بين AbH1c و فركسلا أمبسن و AbH

#### كلمات المفاتيح:

الكلب  
الهيموغلوبين الغليكزية  
داء السكري  
مراقبة توازن نسبة السكر

#### LISTE DES FIGURES :

Figure 1 : Etapes de formation d'une protéine glyquée (exemple de l'HbA1c)

**Figure 2 : Condensation de Maillard**

**Figure 3 : Condensation de Maillard entre le glucose et l'hémoglobine**

**Figure 4 : Réarrangement d'Amadori (18)**

**Figure 5 : Réarrangement d'Amadori aboutissant à la formation de la molécule d'hémoglobine glyquée**

**Figure 6 : Etapes de formation de l'hémoglobine glyquée**

**Figure 7 : Aspect d'une courbe de glycémie idéale**

**Figure 8 : Aspect d'une courbe de glycémie idéale chez un chien diabétique sous traitement**

**Figure 9 : Aspect de l'effet Somogyi sur la courbe glycémique**

**Figure 10 : Aspect de la courbe de glycémie lors d'utilisation d'une insuline d'action trop brève**

**Figure 11 : Aspect de la courbe glycémique lors d'insulino-résistance**

**Figure 12 : Traitement du diabète sucré non cétonurique**

**Photo 1 : Glucomètre Accu-Chek**

**Photo 2 : Kit Biosystems**

**Schéma 1 : Préparation de l'hémolysat**

**Schéma 2 : Microcolonne d'échange d'ions**

**Schéma 3 : Application de l'hémolysat sur la résine d'échange d'ions**

**Schéma 4 : Elimination de la fraction HbA1a après son élution**

**Schéma 5 : Elimination de la fraction HbA1b après son élution.**

**Schéma 6 : Elution de l'HbA1c.**

**Schéma 7 : Préparation de l'Hb TOTALE.**

**Figure 13 : Evolution du taux d'hémoglobine glyquée en fonction de la glycémie**

**Figure 14 : Evolution de l'hémoglobine glyquée en fonction de la glycémie.**

**LISTE DES TABLEAUX :**

**Tableau 1 : Terminologie des Hémoglobines glyquées**

**Tableau 2 : Classification, Pathogénie et étiologie du diabète sucré**

**Tableau3 : Quelques insulines disponibles**

**Tableau 4 : Correction de l'insulinothérapie**

**Tableau 5 : Evaluation de l'HbA1c%**

**Tableau 6 : Moyennes d'HbA1c% obtenues chez 3 groupes glycémiques croissants**

**SOMMAIRE :**

**INTRODUCTION.....1**

## **CHAPITRE 1 : Hémoglobine glyquée : Aspect biochimique**

<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>2</b>
<b>II. L'HbA1c : une protéine « glyquée » .....</b>	<b>3</b>
II. 1. Historique .....	3
II. 2. Glycation non enzymatique des protéines : un phénomène général .....	3
II. 3. Etapes de formation d'une protéine glyquée .....	4
II. 4. Paramètres .....	5
II. 5. Hémoglobine A1c et Hémoglobine glyquée .....	6
II. 6. Terminologie .....	7
<b>III. Signification pour la clinique .....</b>	<b>8</b>
<b>IV. Bases biochimiques de la glycation des protéines et processus de formation de l'hémoglobine glyquée.....</b>	<b>9</b>
IV. 1. Biochimie de la glycation :.....	9
IV. 2. Etapes de formation de l'hémoglobine glyquée :.....	10
IV. 2. 1. Condensation de Maillard entre le glucose et une fonction amine.....	10
IV. 2. 2. Réarrangement d'Amadori ou de Heynes.....	11

## **CHAPITRE 2 : Diabète sucré chez le chien : Aspect clinique**

<b>I. DEFINITION.....</b>	<b>.....13</b>
<b>II. SYMPTOMES : .....</b>	<b>13</b>
II. 1. COMMUNS A TOUS LES TYPES DE DIABETE	
II. 2. SYMPTOMES SUPPLEMENTAIRES LORS DE « diabète juvénile »	
II. 3. SYMPTOMES SUPPLEMENTAIRES LORS DE « diabète gras » non insulino-dépendant	
II. 4. COMPLICATIONS A LONG TERME .....	14
<b>III. DIAGNOSTIC: .....</b>	<b>14</b>
III. 1. DU DIABETE .....	14
III. 2. DU TYPE DE DIABETE .....	14
<b>IV. TRAITEMENT :.....</b>	<b>16</b>
IV. 1 .Traitement diététique .....	16
IV. 1. 1. PRINCIPES.....	16
IV. 1. 2. MISE EN ŒUVRE PRATIQUE .....	16
IV. 2. Thérapeutique hypoglycémiant orale .....	17
IV. 3. Insulinothérapie .....	17
<b>V. DIABETE NON CÉTONURIQUE :</b>	
V. 1. Détermination de la dose quotidienne correcte .....	19

V. 2. Distribution des repas .....	19
<b>VI. LA COURBE DE GLYCEMIE :.....</b>	<b>20</b>
VI. 1. Réalisation de la courbe de glycémie .....	20
VI. 2. Intérêt de la courbe de glycémie.....	21
VI. 3. Interprétation de la courbe de glycémie .....	22
VI. 3. 1. Analyse de la courbe de glycémie.....	22
VI. 3. 2. Courbe de glycémie idéale (g/l).....	23
VI. 3. 3. Limites de cette analyse .....	24
VI. 3. 4. Intérêt dans de la mise au point du protocole d'insulinothérapie .....	24
VI. 3. 5. Intérêt lors du suivi à long terme .....	25
<b>VII. CAUSES D'ECHECS DE L'INSULINOTHERAPIE</b>	
<b>VII. 1. Echecs immédiats :.....</b>	<b>26</b>
VII. 1. 1. L'effet Somogyi .....	26
VII. 1. 2. Insuline de durée d'action trop courte.....	27
<b>VII. 2. Echecs au cours du traitement :.....</b>	<b>28</b>
VII. 2. 1. Fautes techniques .....	28
VII. 2. 2. Insulino-résistance.....	28
<b>VIII. DEMARCHE THERAPEUTIQUE.....</b>	<b>29</b>
<b>IX. DIABETE ACIDOCETOSIQUE ET COMA DIABETIQUE :</b>	
IX. 1. ACIDOCETOSE BENIGNE .....	30
IX. 2. ACIDOCETOSE GRAVE .....	30
<b>X. COMPLICATIONS DE L'INSULINOTHERAPIE :</b>	
X. 1. Hypoglycémie .....	31
X. 2. Traitement d'urgence .....	31
<b><u>CHAPITRE 3 : Evaluation de l'HbA1c : Aspect expérimental</u></b>	
<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>32</b>
<b>II. TECHNIQUES DE DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE GLYQUEE.....</b>	<b>32</b>
<b>II. 1. Les techniques qui dosent spécifiquement l'HbA1c (ou l'HbA1).....</b>	<b>32</b>
<b>II. 1. 1. Les techniques chromatographiques :</b>	<b>32</b>
II. 1. 1. 1 Des chromatographies sur microcolonnes.....	32
II. 1. 1. 2. Des chromatographies automatisées.....	33
<b>II. 1. 2. Les techniques électrophorétiques.....</b>	<b>33</b>
<b>II. 1. 3. Les techniques immunologiques.....</b>	<b>34</b>

<b>II. 2. Les techniques procédant à la mesure de la glycation globale des molécules d'hémoglobine :</b>	<b>34</b>
II. 2. 1. Minicolonnes	34
II. 2. 2. Méthodes automatisées	34
<b>III. INTERFERENCES POSSIBLES</b>	<b>35</b>
<b>IV. ETUDE EXPERIMENTALE :</b>	<b>36</b>
<b>IV. 1. Patients et méthodes :</b>	<b>36</b>
IV.1. 1. Patients	36
IV.1. 2. Evaluation de la glycémie	36
IV. 1. 3. Choix de la méthode et principe du dosage.	37
<b>IV. 2. Démarche Expérimentale</b>	<b>37</b>
IV. 2. 1. Etape pré-analytique.	37
IV. 2. 2. Prélèvements et conservation.	37
IV. 2. 3. Pré-traitement de l'échantillon et élimination de la fraction labile.	38
IV. 2. 4. Procédure	38
IV. 2. 4. 1. Préparation de l'hémolysat et élimination de la fraction labile	38
IV. 2. 4. 2. Présentation du dispositif.	39
IV. 2. 4. 3. Séparation des différentes fractions d'hémoglobine glyquée.	39
IV. 2. 4. 4. Préparation de la HbTOTALE.	42
IV. 2. 4. 5. Estimation du taux d'HbA1c%.	42
<b>V. RESULTATS.</b>	<b>43</b>
<b>VI. DISCUSSION.</b>	<b>46</b>
<b>VII. VALEUR SEMIOLOGIQUE.</b>	<b>47</b>
<b>VIII. CONCLUSION.</b>	<b>48</b>

### **REMERCIEMENTS :**

Au terme de ce travail, je tiens à adresser mes sincères remerciements à toute personne ayant contribué de loin ou de près à la réalisation du présent mémoire, qui n'aurait jamais été réussi sans leurs efforts et sacrifices. Je citerai :

- ❖ Mr. BENDEDOUCHE d'avoir bien voulu présider mon jury.
- ❖ Mme BOUABDELLAH pour avoir bien voulu examiner mon travail et accepter de faire partie de mon jury.
- ❖ Mme REMICHI pour m'avoir encouragé l'année dernière à poursuivre ce projet et qui a bien voulu examiner mon travail en faisant partie de mon jury.
- ❖ Mr. BENTCHIKOU mon promoteur qui a accepté avec plaisir de m'encadrer, son aide et ses précieux conseils m'ont été d'un grand secours dans la réalisation de ce travail
- ❖ Mr ZOUAMBI mon co-promoteur, qui m'a aidé tout le long de mes recherches et qui m'a souvent éclairé de son savoir.
- ❖ Mme SAIDI, pour son aide précieuse en me permettant de travailler à la fourrière canine ainsi que tout le personnel de la fourrière de Boumati.
- ❖ Les professeurs et tous les travailleurs de l'ENV

## **DEDICACES :**

Ce travail qui marque la fin de mes études pour l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire, est aussi l'occasion pour moi de partager ma joie avec les êtres qui me sont les plus chers, dont beaucoup ne s'imaginent même pas l'ampleur de ma gratitude

Je dédie alors ce travail à :

Mon père, pour m'avoir orienté vers la médecine vétérinaire, pour m'avoir communiqué son amour des animaux et pour son aide précieuse tout le long de mon travail

Ma chère mère, pour son soutien jour après jour, ses encouragements, ses sacrifices et sa sincère volonté de me voir heureuse

Ma sœur Lilia, qui croit en moi et qui m'a souvent rassuré tout le long de mon parcours

Ma sœur Ferial, qui m'a souvent fait rire et qui a toujours été là pour dédramatiser les soucis

Mon frère Mehdi, qui a supporté tant de fois mon humour particulier et qui n'a jamais cessé de me protéger

Mon beau-frère Yazid, mes tantes, mes oncles et mes cousins

Mes acolytes alias Ferial, Nassim, Myriam, Samed, Esma et Rym

Tous ceux qui m'ont aidé de près comme de loin dans mes études

## **INTRODUCTION :**

L'hémoglobine glyquée correspond à l'ensemble des molécules d'hémoglobine modifiées par fixation non enzymatique d'oses et principalement de glucose sur des les fonctions aminées de la globine

Puisque la durée de vie des hématies est d'environ 110 à 120 jours, la concentration d'hémoglobine glyquée renseigne sur la qualité de l'équilibre glycémique des 4 à 8 semaines qui précèdent le dosage.

Il s'agit donc d'un index rétrospectif et cumulatif à long terme, pouvant être utilisé dans la surveillance du diabète sucré chez le chien. Permettant un meilleur équilibre du diabète, qui constitue l'aspect essentiel du traitement, ce marqueur a un rôle essentiel dans la prévention des complications dégénératives de la maladie

L'hémoglobine HbA constituée de 2 chaînes a et 2 chaînes b de globine, représente la forme principale d'hémoglobine retrouvée, l'HbA1c est une fraction de l'hémoglobine totale circulante, issue justement de la glycation de l'hémoglobine HbA et représente la fraction la plus importante.

L'hémoglobine glyquée est reconnue depuis plus d'une vingtaine d'années comme le paramètre le plus objectif du contrôle glycémique à moyen terme,

Nous nous sommes intéressés a ce paramètre qu'est l'hémoglobine glyquée, d'autant plus que nos premières recherches bibliographiques n'ont révélé l'existence que d'une seule étude sur le chien ayant fait l'objet d'une publication, il s'agit des travaux faits en l'an 2000 par MARCA et LOSTE et publiés dans le journal canadien des recherches vétérinaires.

Nous avons dosé le taux d'HbA1c sur une population de 94 chiens afin d'évaluer approximativement une valeur standard d'hémoglobine glyquée pouvant être utilisée par la suite comme référence pour permettre un suivi concret de l'animal diabétique, qui semblerait être l'aspect le plus délicat de l'insulinothérapie.

**Hémoglobine glyquée :**

**Aspect biochimique**

## **Définition de l'Hémoglobine glyquée :**

Le glucose se fixe à toutes les protéines sur leurs fonctions amines, par une liaison céto-amine, selon un processus non enzymatique qui constitue la glycation, il s'oppose à la glycosylation (fixation enzymatique de sucres sur les protéines) d'où l'abandon du terme d'Hb glycosylée au profit d'Hb glyquée. L'intensité de la glycation dépend du niveau de la glycémie, de la durée de vie de la protéine, de sa structure et de son accessibilité. La concentration de protéines ayant subi ce mécanisme de glycation reflète donc l'équilibre glycémique et ses variations, constituant une sorte de "mémoire glycémique".

La protéine la plus utilisée est l'hémoglobine, en raison de ses faibles variations intra-individuelles et de sa durée de vie importante : 120 jours. Le glucose se fixe à l'extrémité N-terminale des chaînes  $\beta$ , en en modifiant les caractéristiques physico-chimiques, dont le pH isoélectrique, ce qui permet la séparation et le dosage de l'HbA1c.

## **L'HbA1c : une protéine « glyquée » :**

### **❖ Découverte des protéines glyquées :**

La glycation des protéines est une notion relativement récente. Cette réaction d'addition a été mise en évidence pour la première fois à la fin des années soixante, quand plusieurs publications ont décrit une hétérogénéité structurale inattendue de l'hémoglobine en chromatographie d'échange cationique faible. Ces conditions expérimentales permettaient en effet de séparer des fractions mineures, dont l'élution était plus rapide que celle du pic principal d'HbA, appelé pic d'HbA<sub>0</sub> [l'HbA, constituée de 2 chaînes  $\alpha$  et 2 chaînes  $\beta$  de globine, représente la forme principale d'Hb trouvée]. Ces fractions mineures d'HbA, également séparables par électrophorèse en raison de leur migration plus anodique, ont été appelées "Hb rapides" ou HbA<sub>1</sub>. Elles ont été désignées, en fonction de leur ordre d'élution, par une lettre minuscule (HbA<sub>1a</sub>, HbA<sub>1b</sub>...etc.). Parmi ces fractions d'Hb "rapides" figurait un pic prépondérant, l'HbA<sub>1c</sub>, dont la structure n'a été établie qu'au début des années 70 (fixation de glucose à l'extrémité N-terminale des chaînes  $\beta$  ). Parallèlement, une augmentation de ce pic était trouvée chez les patients diabétiques. Par la suite, on a montré que d'autres fractions de l'Hb étaient glyquées, sur le même site de l'Hb ou sur d'autres sites, et que la glycation affectait l'ensemble des protéines de l'organisme.

## ❖ **Glycation non enzymatique des protéines : un phénomène général**

La glycation non enzymatique désigne toute fixation de résidus osidiques simples sur des groupements aminés de protéines. Il s'agit d'un phénomène bien connu dans l'industrie alimentaire, décrit dès 1912 par le français L.C. Maillard, qui a donné son nom à certains de ces composés d'addition obtenus par condensation d'amines et d'oses, et possédant des propriétés de fluorescence.

Il s'agit d'un phénomène spontané, qui doit être différencié de la glycosylation, réaction enzymatique de la post traduction des protéines. La glycation peut se produire sur toute fonction amine libre de protéine, appartenant soit à l'acide aminé N-terminal de la protéine, soit à la chaîne latérale d'un résidu de lysine, à l'intérieur de la chaîne peptidique.

La glycation procède en plusieurs étapes. Dans un premier temps, la réaction entre glucose et groupement aminé conduit à la formation d'une liaison aldimine ou base de Schiff. Cette réaction est très rapide, mais réversible en raison de l'instabilité de l'aldimine. Dans un second temps, la base de Schiff subit un réarrangement moléculaire, appelé réarrangement d'Amadori, aboutissant à une liaison céto-amine (ou fructosamine) stable. Cette réaction lente est pratiquement irréversible. Ces produits glyqués sont connus sous le nom de "produits d'Amadori", et constituent les produits précoces de glycation. La réaction peut en effet se poursuivre. Les protéines glyquées subissent alors différentes modifications comme des fragmentations oxydatives, et forment des intermédiaires réactifs comme les désoxyglucosones et la N-carboxyméthyl-lysine (CML), capables de réagir entre eux et/ou avec d'autres protéines pour donner naissance, à long terme, à des produits stables, fluorescents, appelés "produits de glycation avancés" ou AGE (de l'anglais "advanced glycation end products"). On les trouve en faible quantité à l'état libre dans le sérum des patients, mais ils sont le plus souvent très rapidement fixés de façon irréversible aux protéines. Les AGE sont également appelés "produits de Maillard" et correspondent au "brunissement des protéines" de l'industrie alimentaire évoqué plus haut. Leur existence chez l'homme n'a été mise en évidence que depuis une vingtaine d'années. Les complexes réactions de glycation engendrent souvent des phénomènes oxydatifs, à tel point que glycation et oxydation sont souvent associées sous le terme de glycoxydation. Certains AGE peuvent même être formés sans glycation préalable, au cours de la peroxydation lipidique.

Différents facteurs conditionnent les réactions de glycation : facteurs physico-chimiques (pH, température), facteurs liés aux protéines (concentration ; durée de vie ; nombre, accessibilité et

environnement des groupements susceptibles de réagir), facteurs liés aux oses (concentration, nature). In vivo, seuls les deux derniers groupes de facteurs interviennent. La durée de vie de la protéine considérée est un paramètre capital, en raison du caractère cumulatif et irréversible de la glycation. De même, la concentration de glucose est déterminante, ce qui explique l'importance de ce mécanisme biologique au cours du diabète sucré. Cependant, il faut insister sur le fait que la glycation n'est pas provoquée uniquement par le glucose. De nombreux autres oses ou dérivés d'oses sont capables de glyquer les protéines avec une intensité supérieure à celle du glucose, qui est en fait l'un des moins réactifs. On peut par exemple, in vitro, induire la glycation avec le ribose, le fructose ou encore le glucose-6-phosphate. Bien évidemment, in vivo, l'ose dont l'activité de glycation prédomine est le glucose, en raison de son abondance. La glycation par le fructose, parfois appelée "fructation", peut être considérée comme physiopathologiquement importante, car ce composé est formé en excès au cours du diabète sucré par la voie du sorbitol.

La glycation non enzymatique est un phénomène général. Même si l'HbA1c en est le meilleur exemple en médecine, elle affecte aussi bien les protéines circulantes que tissulaires, extracellulaires qu'intracellulaires. Dans les cellules autres que les hématies, où les concentrations de glucose sont basses, on observe une glycation par des intermédiaires de la glycolyse ou de la voie des polyols. La liste des protéines glyquées in vivo est très longue : protéines sériques (lipoprotéines, fibrinogène, facteurs de coagulation), protéines tissulaires (collagènes, glycoprotéines structurales), protéines membranaires ou intracellulaires (protéines et enzymes cytosoliques, protéine tau des neurones, histones). On détecte les produits précoces comme l'HbA1c et les fructosamines, voire les AGE, dans le sang circulant, et les AGE s'accumulent dans les tissus. Au cours du diabète sucré, les phénomènes de glycation sont très augmentés en raison de l'hyperglycémie caractéristique de l'affection.

La glycation non enzymatique n'est pas un phénomène anodin : elle provoque des altérations structurales ou fonctionnelles des protéines, comme des troubles d'association ou des pertes d'activité, expliquant certaines complications à long terme du diabète. Différents composés comme l'aminoguanidine sont capables de s'opposer aux réactions de glycation. Des études sont en cours, afin de développer en thérapeutique des molécules capables de s'opposer à la glycation.

## ❖ **Hémoglobine A1c et Hémoglobine glyquée :**

Il n'y a pas une Hb glyquée mais des Hb glyquées. La glycation peut se produire soit à l'extrémité N-terminale des chaînes b de globine, ce qui modifie significativement les propriétés physico-chimiques de la molécule (Hb "rapides"), soit sur toute fonction aminée libre des résidus de lysine des chaînes a ou b . Même s'il existe des sites préférentiels de glycation (le plus réactif étant la valine N-terminale des chaînes b ), le nombre de fonctions susceptibles de fixer un ose génère une multitude de formes glyquées de l'Hb. L'hétérogénéité des Hb glyquées est accentuée par le fait que d'autres oses que le glucose peuvent se fixer.

Le terme d'HbA1c est réservé à l'HbA ayant fixé une molécule de glucose sur l'extrémité N-terminale d'une ou deux chaînes b . La forme la plus répandue est celle où une seule extrémité a fixé du glucose. D'autres molécules de glucose, ou d'autres oses, peuvent être fixées sur d'autres sites. L'HbA1c elle-même est donc par définition hétérogène

L'hémoglobine (Hb) comprend l'HbA, l'HbA2 et l'HbF

Ces trois variantes ont les mêmes chaînes alpha, et diverses chaînes non-alpha : chaînes bêta pour l'HbA, chaînes gamma pour l'HbF et chaînes delta pour l'HbA2.

L'HbA1 a pour la première fois été démontrée en 1955 par sa mobilité différente de celle d'HbA dans l'électrophorèse . On a après subdivisé cette fraction en différentes parties, dont l'HbA1c est la plus grande. Cette fraction HbA1c est très importante pour le contrôle du diabète.

L'hémoglobine est une des multiples protéines qui subissent une réaction de glycation non enzymatique, et « Hémoglobine glyquée (HbG) » est le nom commun d'une série de dérivés stables d'hémoglobine, formés par la réaction entre sucres et les groupements aminés de l'hémoglobine. Cette réaction est un processus lent qui se déroule en deux étapes. Les sites possibles de glycation sont les résidus N-terminaux de valine des quatre chaînes de Polypeptides, et les groupements aminés libres des 44 résidus de lysine. Les substances glyquantes sont le glucose et les phosphates de sucres comme le bi-phosphate 1,6 de fructose, le phosphate 6 de glucose, et le phosphate 5 de ribose. Ces hexoses et pentoses de phosphate réagissent plus de 10 fois plus rapidement avec l'hémoglobine que le glucose, mais leur concentration dans les corpuscules rouges est beaucoup plus basse. Il est possible que la réactivité moindre du glucose ait pendant l'évolution joué un rôle dans la sélection du glucose comme carburant sucré universel. L'HbA1c est le résultat de la réaction

entre le glucose et le groupement aminé N-terminal de la chaîne bêta, qui est le site dominant de la glycation, avec environ 60 % de glucose lié.

❖ **Terminologie :**

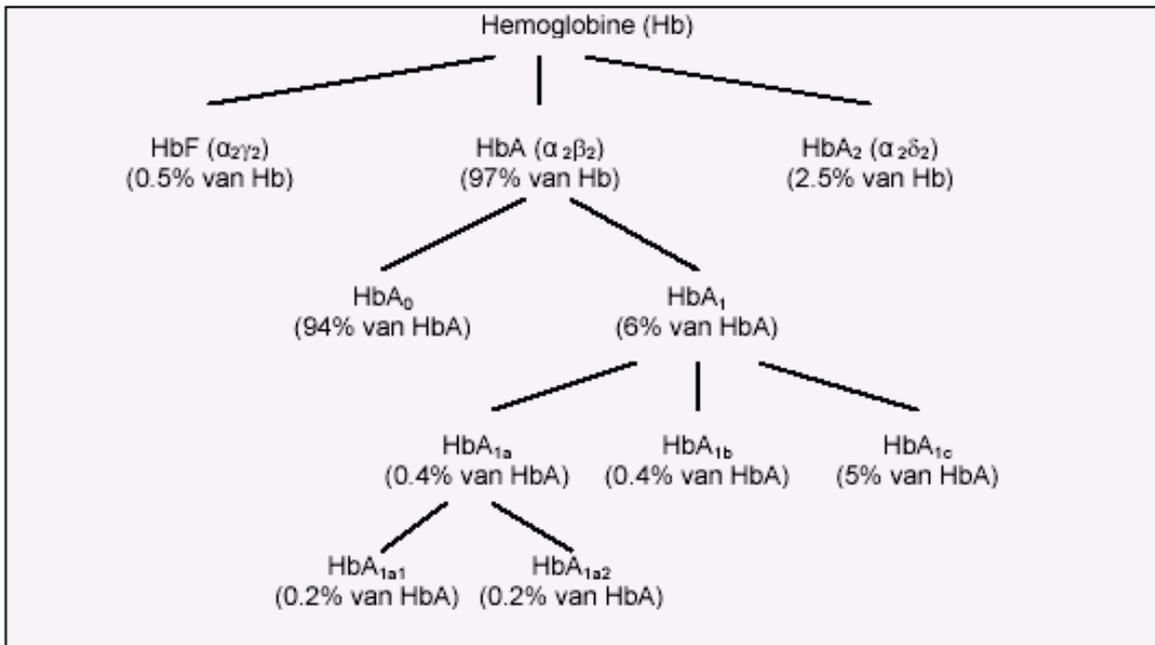
HbA	Tétramère $\alpha_2\beta_2$
Hb glyquée(s)	Ensemble des formes glyquées de l'hémoglobine (synonyme : glycohémoglobine)
HbA <sub>0</sub>	Composant majeur de l'HbA Comprend des formes non glyquées et des formes glyquées ailleurs que sur l'extrémité N-terminale des chaînes $\beta$
HbA <sub>1</sub>	Synonyme : Hb rapides HbA glyquée sur l'extrémité N-terminale des chaînes $\beta$ (quel que soit l'ose)
HbA <sub>1c</sub>	HbA glyquée par le <u>glucose</u> sur l'extrémité N-terminale d'au moins une chaîne $\beta$

NB: Il est évident que toutes les formes d'Hb, et pas seulement l'HbA, sont glyquées. Les Hb mineures (HbA<sub>2</sub>, HbF) ainsi que les variants éventuels existent aussi sous forme glyquée.

**Figure ci-dessous :**

**Les variantes circulantes de l'Hb. HbA<sub>1</sub> comprend des dérivés formés par la condensation de la valine N-terminale de la chaîne  $\beta$  avec le glucose (HbA<sub>1c</sub>), pyruvate (HbA<sub>1b</sub>), diphosphate 1,6 de pyruvate (Hb1a<sub>1</sub>) et phosphate de glucose (HbA<sub>1a2</sub>).**

**Remarque importante: les valeurs présentées entre parenthèses sont les valeurs moyennes obtenues chez les sujets humains normaux.**



### **Signification pour la clinique :**

Puisque les érythrocytes sont relativement bien perméables pour le glucose la vitesse de formation de l'HbA<sub>1c</sub> (ou HbG) est proportionnelle à la concentration de glucose dans le sang. La teneur en HbA<sub>1c</sub> dans le sang est le résultat de la glycémie pendant les 120 jours précédents (la durée de vie moyenne des érythrocytes). Les niveaux de glycémie récents y ont un effet prépondérant. Il y a une liaison linéaire entre l'HbA<sub>1c</sub> et le niveau moyen de glucose : une variation de 1 % de teneur en HbA<sub>1c</sub> correspond à une variation de concentration de glucose sérique d'environ 35 mg/dl. Un effort ou un repas récents n'influencent pas les valeurs d'HbA<sub>1c</sub>.

Des études prospectives ont démontré qu'une thérapie intensive du diabète va de pair avec une diminution du développement, et une progression plus lente des diverses complications macrovasculaires et microvasculaires.

L'hémoglobine, est une protéine de demi-vie brève, ainsi elle subira la condensation et le réarrangement d'Amadori pour former un produit de glycation précoce : l'hémoglobine glyquée. Ces deux étapes étant dépendantes de la glycémie, le taux d'HbA<sub>1c</sub> sera plus ou moins important suivant le niveau du diabète et la réversibilité potentielle de ces produits suivant l'évolution de la

glycémie nous fournit un indicateur de l'évolution du diabète. Ainsi, en mesurant le taux d'HbA1c entre deux dates, on peut en déduire l'évolution du diabète. De plus, la durée de vie dans l'organisme de l'Hb glyquée étant comprise entre 1 et 2 mois, on a coutume d'analyser le taux d'HbA1c par intervalle de 4 à 8 semaines, ainsi les protéines glyquées l'ont été durant cet intervalle de temps car les protéines déjà modifiées ont été dégradées entre temps. Ainsi, le taux d'HbA1c constitue un reflet de la glycémie moyenne des 4 à 8 semaines précédant le dosage.

## **Bases biochimiques de la glycation des protéines et processus de formation de l'hémoglobine glyquée :**

### **1 Biochimie de la glycation :**

Il s'agit d'une classe chimique à part, résultant de la fixation d'un sucre réducteur (glucose ou fructose) ou d'un aldéhyde sur une fonction amine N-terminale (le radical NH<sub>2</sub>) d'une protéine, d'un acide aminé le plus souvent une lysine. Cette réaction appelée "Condensation de Maillard" se déroule sans participation enzymatique et forme un produit appelé "base de Schiff"; cette réaction est très dépendante du temps d'exposition au sucre et de la concentration du sucre. À la suite de cette première étape, un réarrangement moléculaire appelé "Réarrangement d'Amadori" a souvent lieu. Le taux de formation de ces produits d'Amadori est proportionnel à la concentration en sucre. Ce réarrangement est suivi d'une réaction plus complexe appelée "réaction de Maillard" qui aboutit à la formation des AGEs plus connus sous le terme de Produits de Maillard. Le taux de formation de ces composés est indépendant de la concentration en sucre du milieu mais elle est dépendante de la durée de l'hyperglycémie (de l'excès de sucre) et du taux de turn-over protéique. Le point clé est que si les deux premiers stades se stabilisent à un plateau et sont potentiellement réversibles selon la glycémie, le troisième stade est irréversible, progresse quel que soit le niveau ambiant de glycémie.

De plus, les produits ainsi formés ne peuvent plus être détruits, ni libérés de la cellule. En effet les cellules sont dotées d'un petit organite appelé protéasome, qui détruit les protéines en les fragmentant en de nombreux peptides de 9 à 12 acides aminés inoffensifs ; mais le protéasome ne peut détruire les protéines glyquées, si bien que ces produits s'entassent dans la cellule sans qu'elle puisse les éliminer.

### **2 Origine des produits de glycation :**

Une des conséquences essentielles de l'hyperglycémie est la glycation non enzymatique des protéines. En bref, ce processus se déroule selon trois étapes différant selon leur constante d'équilibre :

- formation d'une base de Schiff par combinaison de la fonction aldéhyde du glucose avec les résidus aminés de la protéine, le taux de formation étant égal au taux de dissociation ;
- réarrangement d'Amadori, atteignant un équilibre après quelques semaines, la constante de dissociation ne représentant que 1.6 % de la constante de formation ; ces deux étapes aboutissent aux produits de glycation dits précoces et caractérisent les protéines de demi-vie brèves ou intermédiaires, l'hémoglobine étant l'exemple le mieux décrit ;
- accumulation lente et irréversible, par réarrangements, transferts d'hydrogène et formation d'intermédiaires très réactifs (déoxyglucosones), de produits terminaux de glycation ou produits de **Maillard**, caractérisant les protéines structurales de durée de vie prolongée, et dont les traits biochimiques principaux sont leur pigmentation brune, leur fluorescence, et leur implication dans la formation de liaisons croisées entre protéines (protein crosslinking)

Une seconde voie métabolique aboutissant à la réticulation du collagène fait intervenir l'oxydation des résidus lysine et hydroxylysine par la lysine oxydase.

Cette voie est mise en jeu de façon accrue au cours du diabète , mais les régulations et le site d'intervention du glucose sont encore mal connues.

Si la détection des produits terminaux de glycation (PTG) peut être réalisée indirectement par les techniques de fluorescence, la définition chimique de tels composés isolés in vivo est plus malaisée et ceux caractérisés à ce jour sont peu nombreux : 2-furoyl-4(5)-2-furanyl-1H-imidazole (FFI), carboxy - méthyllysine (CML) et carboxyméthylhydroxylysine (CMhL). La pentosidine est le composé le plus récemment découvert et a fait l'objet de nombreuses communications (Figure3). Les 1-alkyl-2-formyl-3,4-diglycosyl-pyrroles et la pyrrolaline sont des produits intermédiaires très réactifs. La dihydroxylysinonorleucine (DHLNL) est le principal produit de la voie de la lysine oxydase [20]. Des progrès récents ont été présentés à Washington dans la production d'anticorps dirigés contre les produits avancés de la glycation ou de la fructation, qui peuvent s'avérer intéressants dans l'évaluation de thérapeutiques comme l'aminoguanidine

Le point-clé est que si les deux premiers stades se stabilisent à un plateau et ont une réversibilité potentielle selon la glycémie, le troisième stade progresse quel que soit le niveau ambiant de glycémie et génère des composés réactifs responsables du vieillissement tissulaire et dont le taux est proportionnel au niveau de glycémie intégré sur de longues périodes de temps. Lyons a ainsi montré les effets bénéfiques à 4 mois d'un meilleur contrôle glycémique sur les

produits de glycation précoces du collagène cutané (fructoselysine), mais l'absence de réversibilité sur les produits terminaux de glycation (pentosidine, CML et CMhL)

La formation des **produits de Maillard**, outre le cas du diabète, est un phénomène accru dans diverses pathologies dont l'insuffisance rénale terminale, et au cours du vieillissement, comme l'ont montré les travaux de Sell et Monnier sur la pentosidine. Il convient de noter qu'outre le glucose, d'autres oses ou dérivés sont susceptibles de participer à la glycation des protéines, comme le galactose, le fructose, le ribose, l'acide ascorbique. Le pouvoir du fructose dans la formation de **produits de Maillard** est d'ailleurs supérieur à celui du glucose, et cela peut représenter un des facteurs pathogènes de la mise en jeu de la voie des polyols et une des cibles des inhibiteurs de l'aldose réductase. D'autre part, la fluorescence induite par l'acide ascorbique est beaucoup plus nette que celle induite par le glucose et peut représenter un facteur limitant des thérapeutiques antioxydantes utilisant la vitamine C. La découverte récente de la pentosidine a mis l'accent sur le métabolisme peu connu des pentoses, la production accrue de ribose au cours du diabète pouvant être attribuée à un catabolisme accéléré des ribonucléotides, au stress oxydatif ou au shunt des pentoses.

La phosphorylation des sucres augmente leur réactivité vis-à-vis de la **réaction de Maillard**. Enfin les phosphotrioses, générés en excès en cas d'hyperglycémie, sont parmi les composés les plus réactifs.

### 3 **Toxicité des produits de glycation** : Les conséquences fonctionnelles de la glycation protéique :

- Altération d'activités enzymatiques, liées à la présence de résidus lysine au voisinage du site actif ou à des modifications conformationnelles liées à la réticulation. Brownlee a illustré l'effet délétère de la glycation de la laminine de la matrice extracellulaire au niveau d'une séquence riche en lysine nécessaire au processus de régénération neuronale.

- Altération de la liaison de molécules de régulation, telles que le 2,3-diphosphoglycérate sur l'hémoglobine ou l'héparine sur l'antithrombine III. La supplémentation en vitamine B6 paraît corriger les troubles de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène en s'opposant à la glycation de l'hémoglobine.

- Réticulation des protéines et formation d'agrégats: un premier mécanisme en est l'exposition et l'oxydation de groupements sulfhydryl en ponts disulfures. Une seconde modalité est la formation

de liaisons covalentes entre produits terminaux de glycation. Cela explique l'augmentation des espaces intermoléculaires du collagène responsable d'hyperperméabilité, les modifications structurales du cristallin, les défauts de polymérisation de la tubuline axonale. Une troisième voie est le trappage covalent de protéines plasmatiques au niveau de groupements réactifs générés par la glycation, expliquant les dépôts d'albumine, d'IgG et de complément au niveau des membranes basales et de LDL dans les parois artérielles .

- Altération de l'interface endothélium-membrane basale : les modifications structurales au niveau de la membrane basale peuvent masquer les sites de reconnaissance des proteoglycans , expliquant la baisse des charges négatives et l'hyperperméabilité glomérulaire ; l'assemblage plurimoléculaire de la membrane basale est perturbée par la glycation, fragilisant cette dernière et réduisant l'adhésion des cellules endothéliales ; l'influence de la glycation de la matrice sur les capacités prolifératives cellulaires est l'aspect le plus récent.

- Réduction de la susceptibilité à la protéolyse: celle du collagène et de la membrane basale contribue à l'irréversibilité de l'épaississement des basales. Celle du fibrinogène et de la fibrine favorise les dépôts vasculaires de fibrine et la prolifération des fibres musculaires lisses .

- Troubles de la fonction des acides nucléiques, le glucose favorisant la réticulation de protéines au niveau de résidus aminés des nucléotides de l'ADN: un tel phénomène est incriminé dans des cassures chromosomiques, une atteinte des processus de réparation, réplication et transcription, dans la sénescence cellulaire et la génèse des malformations congénitales lors des grossesses diabétiques.

- Défaut de reconnaissance des signaux moléculaires et de l'endocytose: parmi les exemples les plus parlants, la glycation de l'albumine augmente les capacités d'endocytose par la cellule endothéliale et participe à l'hyperperméabilité vasculaire, tandis que la réabsorption tubulaire de l'albumine glyquée est au contraire réduite. La glycation des LDL réduit leur captation par leurs récepteurs normaux. Plus récemment, on a observé une réduction de liaison des HDL glyquées et des particules lipoprotéiques AI (LpAI) glyquées , et de l'efflux de cholestérol qui en découle. Au niveau des macrophages, la glycation des LDL et des HDL3 est responsable d'une synthèse accrue d'esters de cholestérol. Enfin on a observé que la glycation de l'apoprotéine E3 modifiait son point isoélectrique en lui conférant une migration électrophorétique E2 .

- Modification de l'immunogénicité, qui si elle est réduite pour les produits d'Amadori, semble au contraire accrue pour les produits terminaux de glycation, contre lesquels des autoanticorps notamment de titre IgA ont été mis en évidence de façon accrue chez le diabétique, mais dont le rôle pathogène éventuel n'est encore qu'hypothétique. De plus, on observe une réduction du pouvoir anticorps des IgG glyquées.

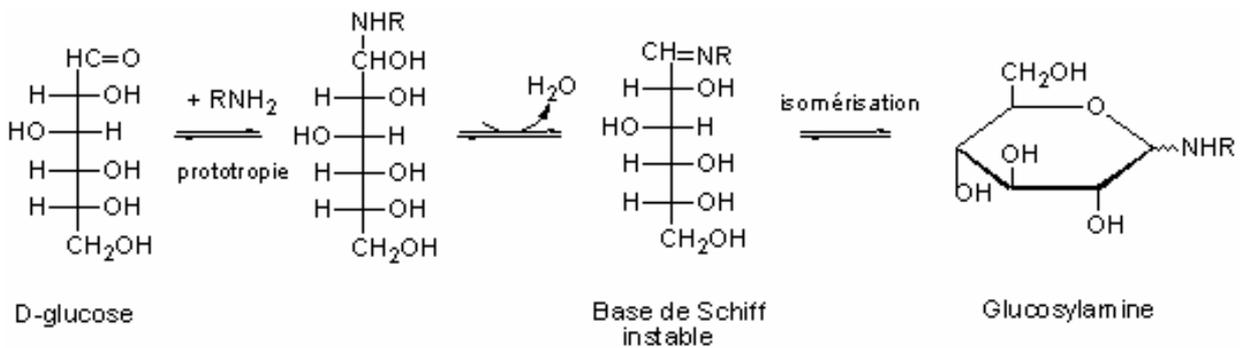
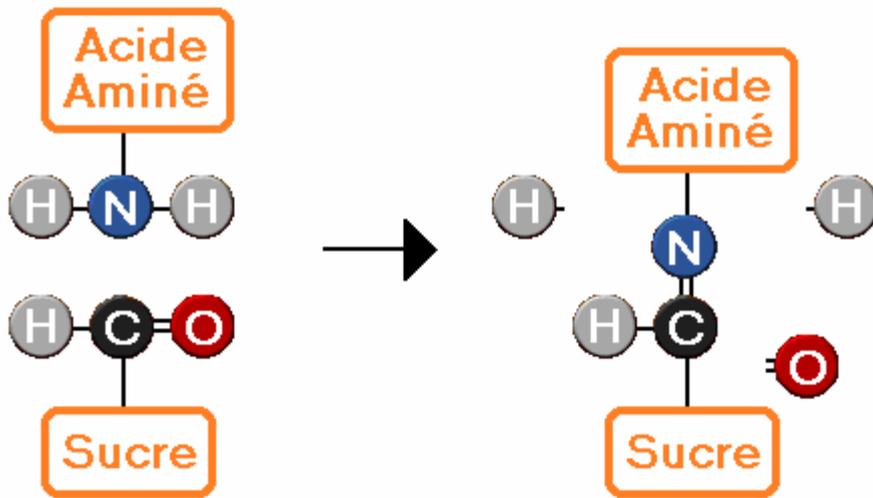
- Induction de de synthèse monokines (TNF $\alpha$ , IL-1) par le biais de la liaison des produits terminaux de glycation sur leur récepteur macrophagique. Vlassara a ainsi montré que l'administration exogène de produits terminaux de glycation chez le rat non-diabétique reproduit l'infiltration monocytaire, l'hyperperméabilité vasculaire et altère le tonus vasculaire en inactivant l'endothelial derived relaxing factor (EDRF).

#### 4 **Etude détaillée des étapes de formation d'une protéine glyquée:**

##### **Condensation de Maillard entre le glucose et une fonction amine:**

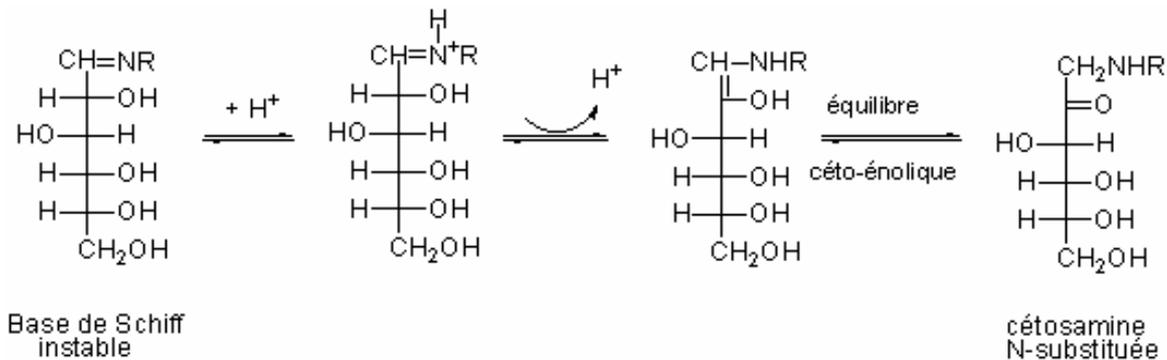
Tout commence par la rencontre entre le glucose et l'acide aminé, l'atome d'azote de la fonction amine de l'acide aminé et l'atome de carbone de la fonction aldéhyde du sucre mettent deux électrons en commun, formant ainsi une double liaison.

Les deux atomes d'hydrogène de la même fonction amine et l'oxygène de la fonction aldéhyde, étant de trop, se retirent sous la forme d'une molécule d'eau. Le produit obtenu porte le nom de "Base de Schiff".



### Réarrangement d'Amadori ou de Heynes:

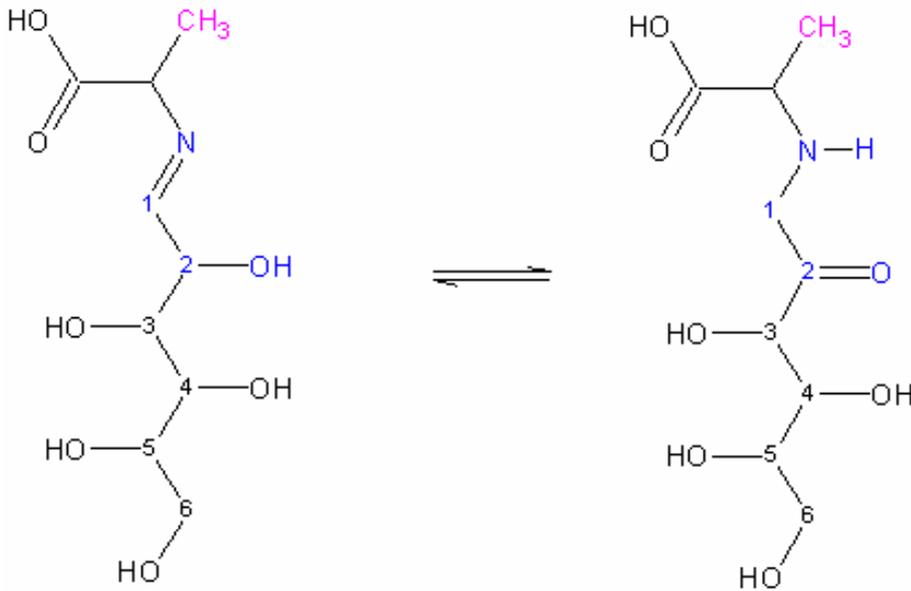
Le produit obtenu par la rencontre précédente ne semble pas très stable puisque la molécule change aussitôt de forme : c'est le réarrangement d'Amadori ou de Heynes, plus stable.



### Déshydratation forte : synthèse d'un furfural:

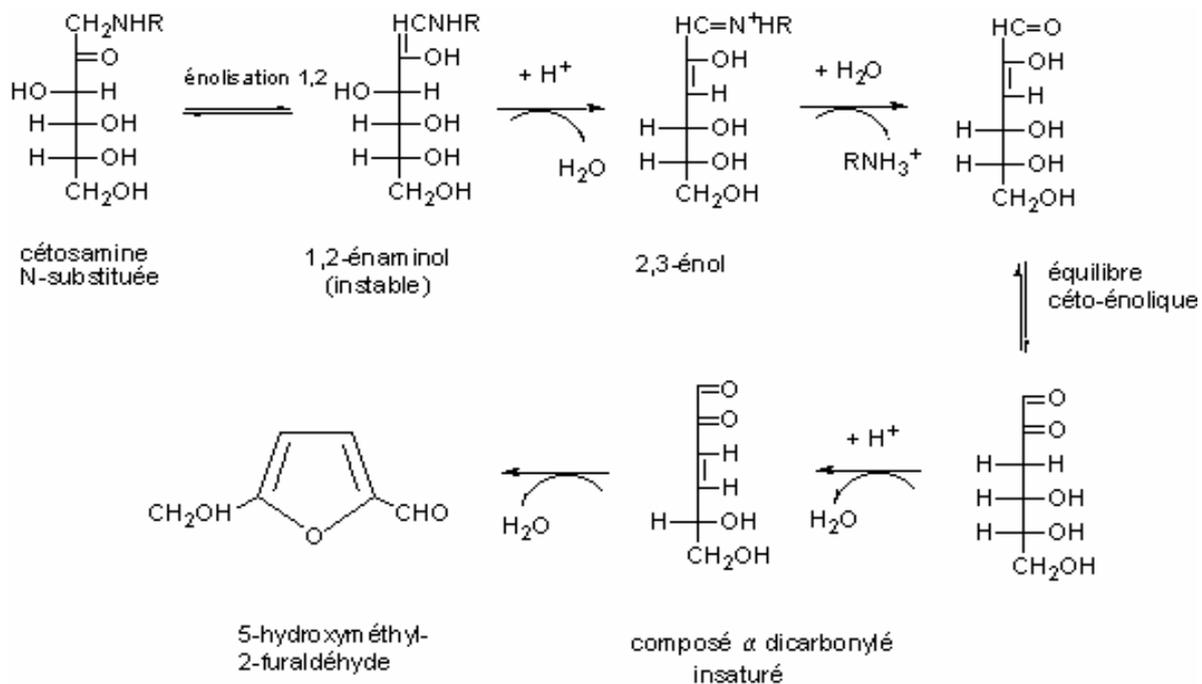
Les deux atomes d'hydrogène du carbone (2) vont se fixer sur le carbone (1) et sur l'atome d'azote.

La liaison azote-carbone (1) ainsi que son oxygène devient simple tandis que le deuxième carbone, ayant perdu une liaison, forme une double liaison. Cette réaction est appelée "équilibre céto-énolique".



En bleu : les modifications

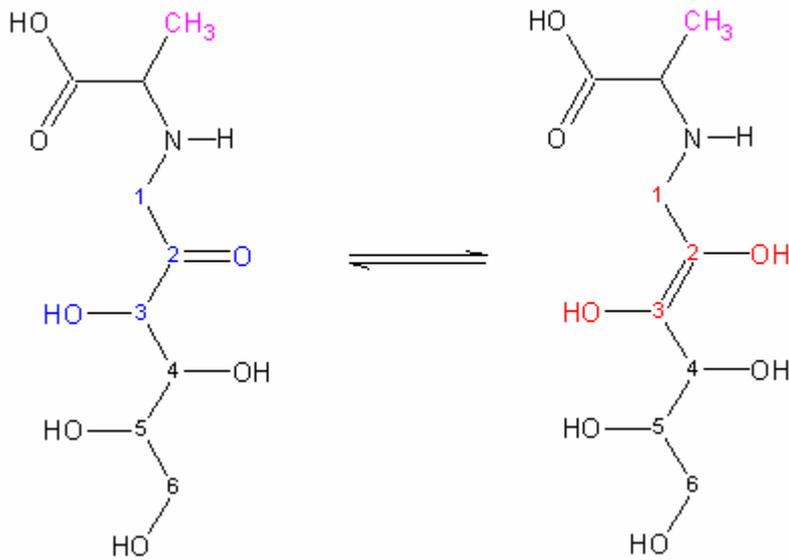
observées.



### Déshydratation modérée :

Le produit obtenu du réarrangement d'Amadori n'est pas au bout de ses transformations. Tout d'abord il subit une énolisation (transformation d'une fonction alcool et d'une fonction carboxyle,

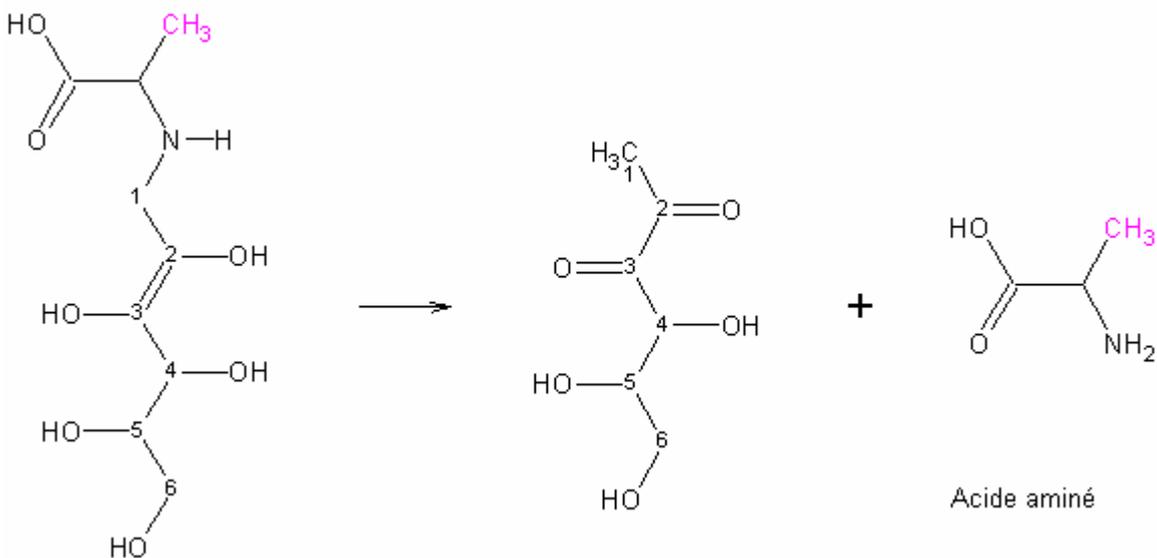
ici cétone, en une fonction énol ( $\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}=\text{C}-\text{OH}$ ).



En bleu : Fonction cétone + fonction

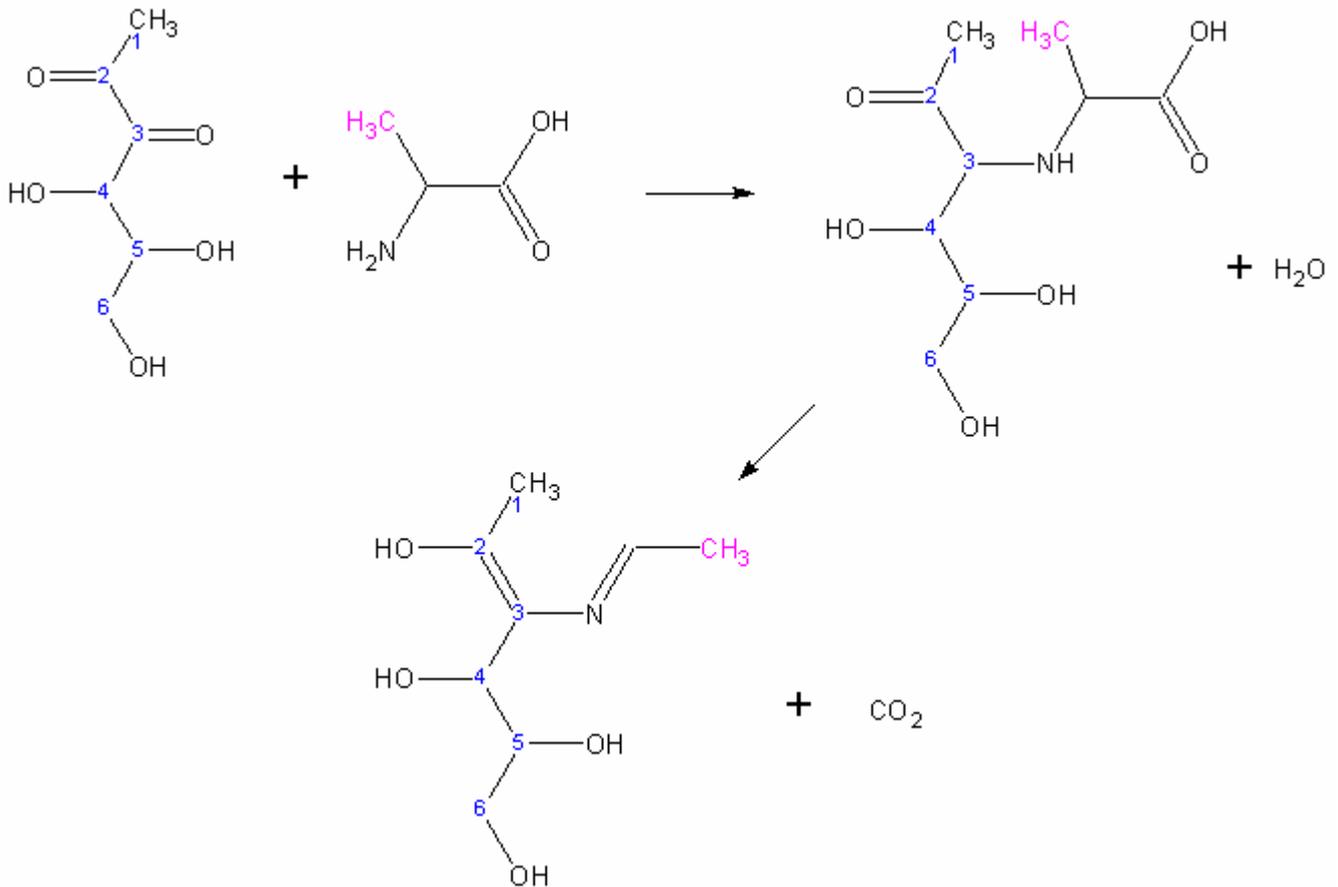
alcool En rouge : Fonction énol

Puis, en milieu basique, l'acide aminé se sépare du reste de la molécule. Le deuxième et le troisième carbone perdent leurs atomes d'hydrogène et leur liaison carbone-carbone devient simple. Ainsi, le liaison avec l'oxygène double.

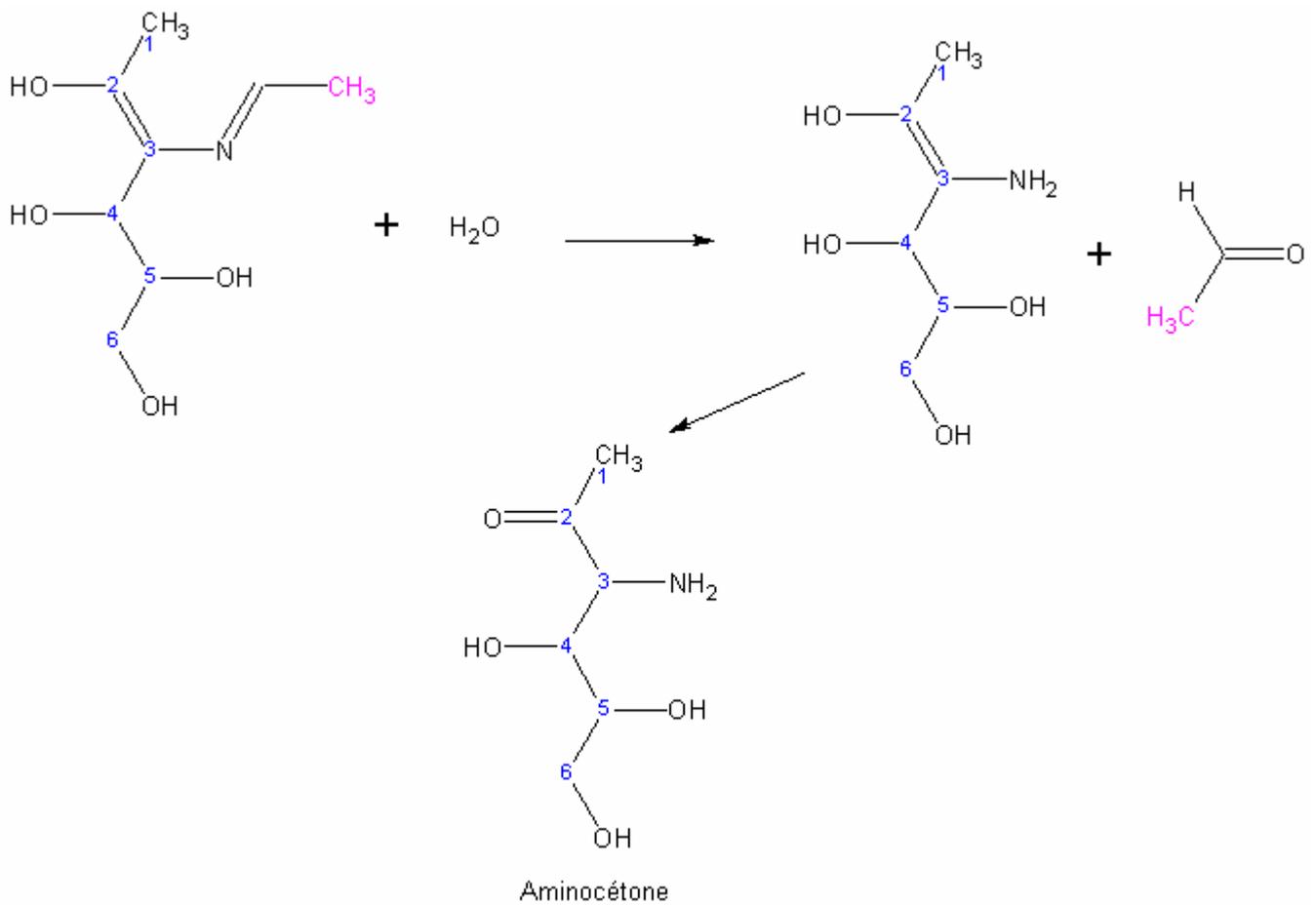


Le produit obtenu n'est pas stable, il s'en suit alors une nouvelle dégradation, dite de Strecker. La molécule et l'acide aminé fusionnent : le carbone (3) perd son atome d'oxygène, remplacée par l'atome d'azote de l'acide aminé, qui perd deux atomes d'hydrogène. On obtient alors une molécule d'eau, c'est donc une déshydratation.

Ensuite, le composé carbonyle de l'ancien acide aminé devient une molécule de dioxyde de carbone, l'atome d'hydrogène restant se fixe sur l'atome d'oxygène du carbone (2). Les liaisons se réarrangent en conséquence.

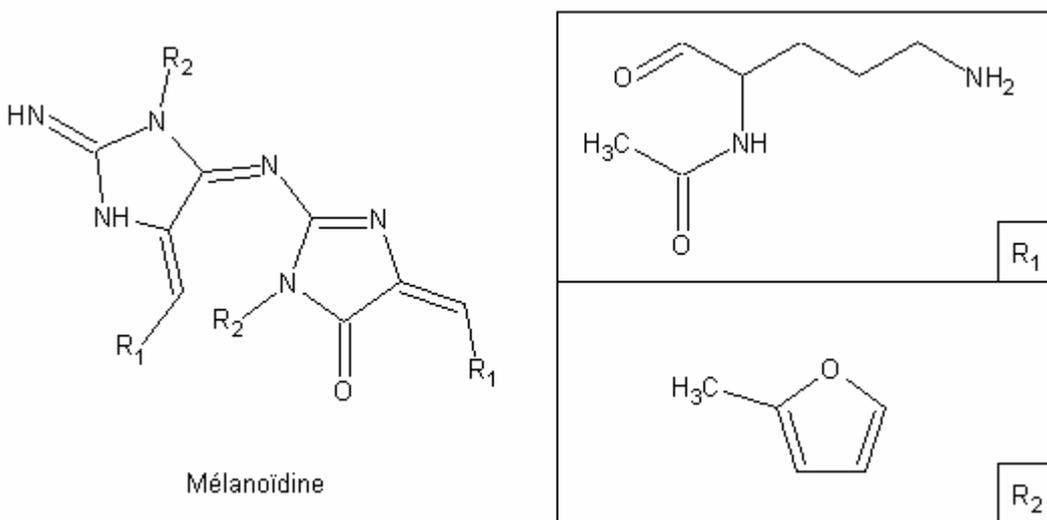


La molécule d'eau perdue plus tôt revient. L'atome de carbone fixé à l'atome d'azote se détache, et forme une fonction aldéhyde avec l'atome d'oxygène de la molécule d'eau. Les deux atomes d'hydrogène restant se fixent alors sur l'atome d'azote. On appelle donc cette suite de réaction une déshydratation modérée puisque aucune molécules d'eau n'a été rejetée réellement. S'en suit alors un réarrangement : l'atome d'hydrogène de la fonction alcool du carbone (2) vient se fixer sur le carbone (3), changeant la place de la double liaison. Le produit obtenu est appelé aminocétone.



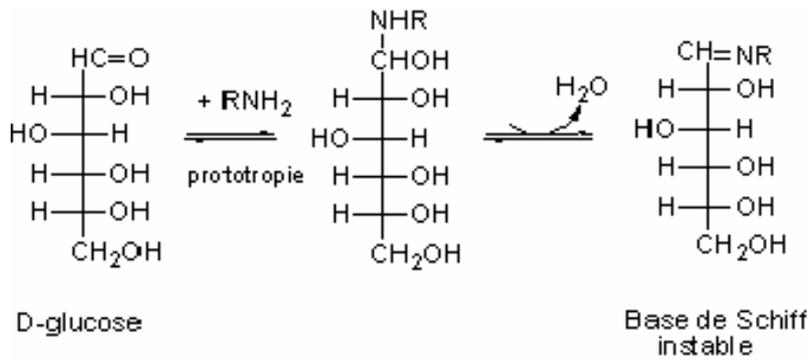
**Polymérisation : synthèse d'une mélanoïdine "produits de Maillard":**

Un grand nombre de ces molécules issues de la dégradation de Strecker peuvent polymériser : elle réagissent entre elles pour former une chaîne de ces molécules. À ce jour, ces réactions ne sont pas encore bien connues. On peut seulement affirmer que la couleur brune vient d'une molécule de mélanoïdine, dérivée d'une chaîne d'aminocétone.

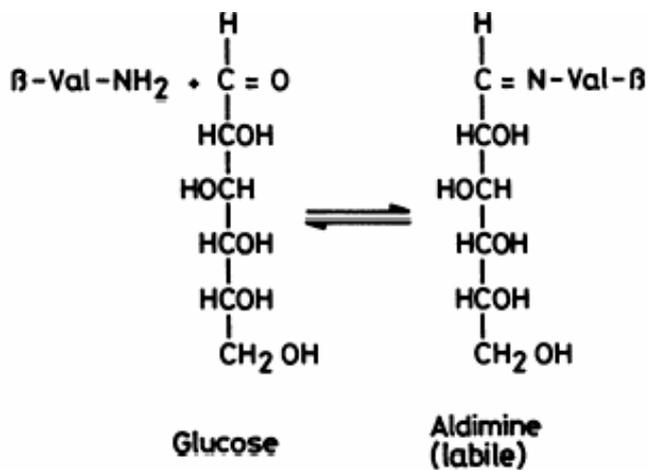


## 5 Etapes spécifiques à la formation de l'hémoglobine glyquée:

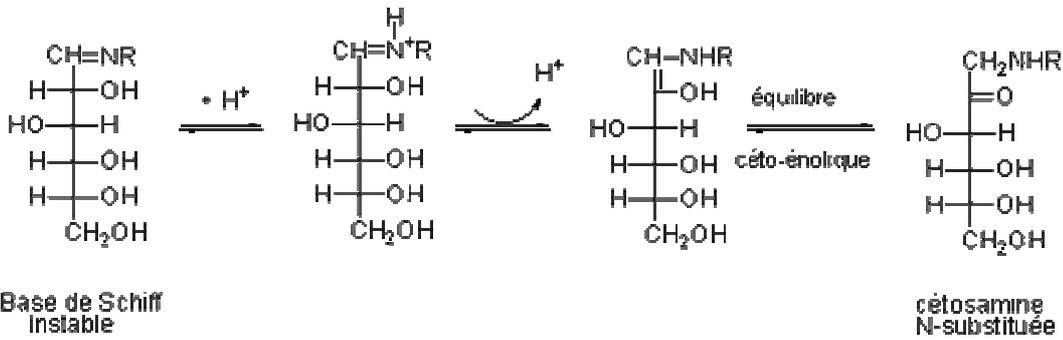
### a-Condensation de Maillard entre le glucose et une fonction amine:



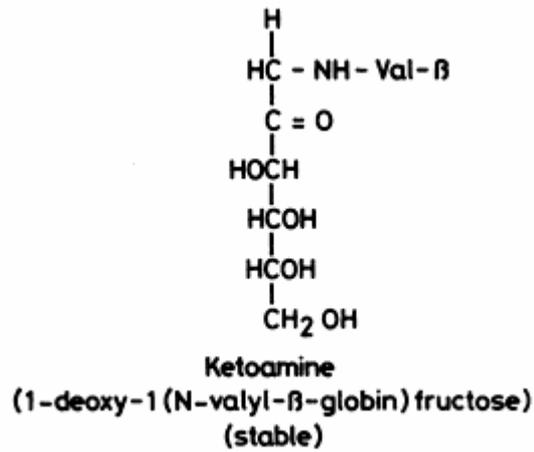
Ce qui correspond pour la formation de l'hémoglobine glyquée à :



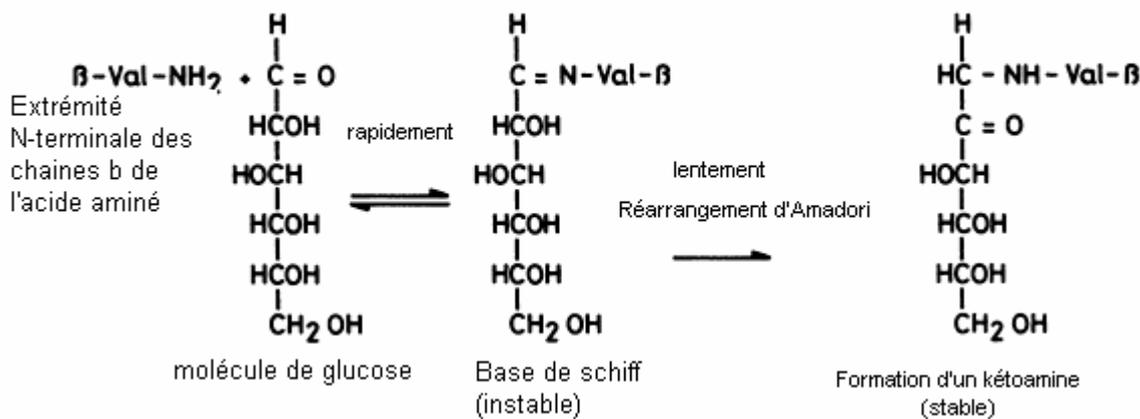
### Réarrangement d'Amadori ou de Heynes:



Ce qui aboutit dans ce cas là, à la formation d'un Kétoamine (Cétosamine) correspondant à l'Hémoglobine glyquée, composé stable contrairement à la base de Schiff :



Donc pour résumer, les étapes de formation de l'hémoglobine glyquée schématiquement donnent :



## 5 Intérêt physiopathologique de l'hémoglobine glyquée:

L'hémoglobine (Hb) glyquée correspond à l'ensemble des molécules d'hémoglobine modifiées par fixation non enzymatique d'oses et principalement de glucose sur des les fonctions aminées de la globine. Cependant, les caractères de l'Hb glyquée changent selon les sites de glycation, et cette notion de l'hétérogénéité de l'Hb glyquée est capitale pour mettre en œuvre une technique de dosage et interpréter un résultat.

Le terme *d'hémoglobine glyquée totale* est utilisé lorsque l'on considère les molécules d'hémoglobines glyquées sur tout résidu NH<sub>2</sub>, et celui *d'hémoglobine A1* quand la fixation d'ose est localisée à l'extrémité N-terminale des chaînes  $\beta$ , ce qui modifie la charge des molécules d'Hb. La fraction HbA 1, hétérogène, comprend HbA 1a1 (fixation de-fructose 1-6 diphosphate), HbA 1a2 (glucose-6-phosphate), HbA 1b (pyruvate) et surtout HbA1c, dont la valine N-terminale des chaînes  $\beta$  a fixé une molécule de glucose, et qui a servi de base à la plupart des travaux sur l'intérêt clinique des Hb glyquées au cours du diabète.

La glycation non enzymatique des protéines est un processus physiologique lent qui affecte toutes les protéines de l'organisme et dont l'intensité augmente avec la glycémie. Puisque la durée de vie des hématies est d'environ 120 jours, la concentration d'hémoglobine glyquée renseigne sur la qualité de l'équilibre glycémique des 4 à 8 semaines qui précèdent le dosage. Il s'agit donc d'un index rétrospectif et cumulatif à long terme, utilisé dans la surveillance de routine du diabète sucré. Permettant un meilleur équilibre du diabète, qui constitue l'aspect essentiel du traitement, ce marqueur a un rôle essentiel dans la prévention des complications dégénératives de la maladie

**Diabète sucré chez le chien :**

**Aspect clinique**

## **I. DEFINITION:**

Le diabète sucré est un syndrome caractérisé par un état d'hyperglycémie chronique dû à une mauvaise utilisation du glucose par les cellules en raison d'un déficit absolu ou relatif en insuline. L'organisme d'un animal diabétique est incapable de réguler sa glycémie. Ceci est causé par un défaut de sécrétion ou d'action de l'**insuline** à l'origine d'une hyperglycémie persistante. (20)  
Il existe plusieurs types de diabète sucré, présentés dans le tableau 2.

## **II .SYMPTOMES:**

### **II. 1. COMMUNS A TOUS LES TYPES DE DIABETE :**

- Glycosurie ; si le taux de glucose sanguin excède le seuil de réabsorption rénale, soit 1.8 à 2 g/L, il apparaît une glucosurie.
- L'animal urine de façon excessive et sa consommation d'eau est augmentée, on parle de polyurie polydipsie ;
- Polyphagie

### **II. 2. SYMPTOMES SUPPLEMENTAIRES LORS DE « diabète juvénile » :**

insulinodépendant ou de « diabète maigre » insulino-nécessitant :

- Amaigrissement ;
- Cétonurie.

### **II. 3. SYMPTOMES SUPPLEMENTAIRES LORS DE « diabète gras » non insulinodépendant :**

- Obésité.

**II. 4. COMPLICATIONS A LONG TERME** : le diabète est souvent associé à des complications, dont la gravité varie dans le même sens que la glycémie.

L'identification de complications associées au diabète sucré est importante. En effet, la plupart nécessitent la mise en place d'un traitement spécifique.

- Cataracte bilatérale et rétinopathies ;
- Infections bactériennes (ex : cystites), atteintes rénales et insuffisance rénale ;
- Une altération de l'état général de l'animal se traduisant par une anorexie, des vomissements, une déshydratation et une dépression ;
- Hyperlipémie conséquence de la lipolyse massive ;
- Coma diabétique.

### **III. DIAGNOSTIC:**

#### **III. 1. DU DIABETE :**

- Glycosurie ;
- Hyperglycémie à jeun (> 1.80 g/L) ; entre 1.3 et 1.8 g/L : diabète sucré possible ;
- Dosage sérique des Fructosamines : rend compte de la glycémie moyenne au cours des 1 à 3 semaines précédant le prélèvement.

Normes : 260 à 340  $\mu\text{mol/L}$  chez le chien. (20)

#### **III. 2. DU TYPE DE DIABETE :**

- Prendre en compte l'âge de l'animal, l'état clinique (en particulier d'embonpoint) et la présence de corps cétoniques dans les urines.
- Dosage d'insuline (voir tableau 2).

**Tableau 2 : Classification, Pathogénie et étiologie du diabète sucré (20)**

	Dénomination	Insulinémie	Pathogénie	Causes favorisantes	
<b>Jeune</b>	Diabète juvénile (Type 1) Insulinodépendant	Insulinopénie Taux d'entrée nul ou très diminué	Défaut de sécrétion d'insuline précoce et majeur	La rareté de ce syndrome ne permet pas d'identifier les facteurs étiologiques	
	Diabète « gras » (Type 2) Non insulinodépendant	Taux normal voire augmenté	Défaut d'activité de l'insuline	<b>Sexe :</b> le diabète canin est 2 à 3 fois plus fréquent chez la femelle.  <b>L'obésité :</b> est une cause importante.  <b>Race :</b> Caniche – Teckel – Cairn...  <b>Age :</b> 6-10ans	<b>Médicaments :</b> Progestatifs, corticoïde, œstrogènes <b>Hormones hyperglycémiantes en excès :</b> Cortisol, adrénaline, Progestérone, hormones thyroïdiennes...  <b>Lésions des îlots de Langerhans :</b> Inflammation, tumeur, Amyloïdose...
<b>Adulte</b>	Diabète « maigre » (Type 3) Insulino-nécessitant	Taux abaissé	Evolution du stade 2 vers l'insulinodépendance. (Epuisement progressif des capacités sécrétrices du pancréas)		

### III. 3. DE L'ETAT PRE-DIABETIQUE :

- Le diagnostic de l'état pré-diabétique est difficile. Il repose sur l'épreuve d'hyperglycémie provoquée qui vise à apprécier la capacité de réponse du système insulinaire hypoglycémiant à la suite d'un apport glucidique.
- Doser simultanément la glycémie et l'insulinémie.
- L'épreuve d'hyperglycémie provoquée est dangereuse lors de diabète avéré.
- Injection de 0.6g de glucose par kg, par voie intraveineuse. Glycémie en fin d'injection puis toutes les 30 minutes pendant 3heures.
- **Chien normal :** la glycémie revient au taux initial en moins de 48 minutes, puis après une courte hypoglycémie, la glycémie se régularise entre 60 et 90 minutes.
- **Chien pré-diabétique :** le retour au taux initial se fait en plus d'une heure et l'hypoglycémie secondaire est plus forte et plus prolongée.

### IV. TRAITEMENTS:

#### **IV. 1. Traitement diététique :**

##### **IV. 1. 1. PRINCIPES :**

Le traitement diététique vise à limiter les fluctuations post-prandiales de la glycémie, à maintenir un poids optimal et à prévenir diverses complications (hyperlipidémie, insuffisance rénale chronique).

L'apport glucidique est strictement contrôlé et l'apport énergétique maintenu à un niveau suffisant.

- Chien diabétique, de poids normal : maintien d'un régime d'entretien.
- Chien diabétique obèse : l'apport énergétique est ramené à 80% de l'apport correspondant au poids réel (il faut éviter un amaigrissement trop rapide en raison des risques de lipolyse excessive et d'acidocétose). On retiendra des glucides à métabolisation lente (amidon).
- Chien diabétique maigre : augmenter la richesse calorique de la ration.

Dans la mesure du possible, la ration journalière est distribuée en 2 repas, abreusement à volonté afin d'éviter la déshydratation.

##### **IV. 1. 2. MISE EN ŒUVRE PRATIQUE :**

- ration industrielle (aliments à visées spéciales) : différents produits sont disponibles, à adapter en fonction du type de diabète et de l'état clinique (embonpoint – degré d'exercice musculaire).
- Ration ménagère : l'énergie métabolisable est fournie par les glucides (50 à 60%), par les lipides (20 à 30%) et par la matière protéique brute (10 à 20%). La qualité des protéines est contrôlée : viande blanche, poisson, bœuf maigre. Les glucides sont apportés par du riz, des pâtes ou des légumes (éviter les carottes, riches en « sucres rapides »). (20)



#### IV. 2. Thérapeutique hypoglycémiante orale :

Son intérêt est très limité chez le chien. Cette thérapeutique peut être entreprise lors d'état prédiabétique ou lors de diabète non insulino-dépendant.

Sulfamides hypoglycémiants :

- Carbutamide (*Glucidoral\**), 0.5-1 g/j par voie buccale en deux prises.
- Glipizide (*Glibénèse\**), 0.25 à 0.50 mg/kg/j par voie buccale en deux prises.
- Biguanides : metformine (*Glucophage\**), 0.5-1g/j par voie buccale en deux prises.

#### IV. 3. Insulinothérapie :

L'insulinothérapie est pratiquement le seul traitement efficace du diabète sucré canin. L'insuline ordinaire est à réserver aux diabètes acidocétosiques et aux comas diabétiques. On préférera l'emploi d'une insuline *semi-lente* type *Caninsulin*. Ou *semi-retard* type *NPH* (voir *tableau 3*).

**Tableau3 : Quelques insulines disponibles (20)**

<i>Type d'insuline</i>	Nom commercial	Voie d'injection	Activité (h) DEBUT	Activité (h) PIC	Activité (h) FIN
<b>Insuline cristallisée (rapide)</b>	<i>Actrapid*</i> 100 UI/mL	IV SC	<b>Immédiat</b> 0.2-0.5	<b>0.5-0.2</b> 1-4	<b>1-4</b> 4-8
<b>Insulines intermédiaires :</b>					
<b>NPH</b> (Neutral Protamine Hagedorn)	<i>Insulatard*</i> 100 UI/mL	SC	<b>0.5-3</b>	<b>8</b>	<b>24</b>
<b>LENTE</b>	<i>Monotard*</i> 100 UI/mL <i>Caninsulin*</i> 40 UI/mL	SC	<b>1-3</b>	<b>8</b>	<b>24</b>
<b>Insuline Biphasique</b>	<i>Mixtard 30*</i> 100 UI/mL	SC	<b>0.5-3</b>	<b>2-10</b>	<b>8-24</b>

**V. DIABETE NON CETONURIQUE :**

## **V. 1. Détermination de la dose quotidienne correcte :**

Très variable en fonction des individus qui possèdent une sécrétion résiduelle d'insuline plus ou moins grande et qui métabolisent l'insuline plus ou moins rapidement.

Commencer par l'insuline NPH à la dose d'une unité/kg chez le chien.

Contrôler la glycémie avant injection puis régulièrement pendant 24 heures. L'idéal est t+1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 16h, 20h, 24h.

L'équilibre sera considéré comme satisfaisant si la glycémie demeure supérieure à 0.8 g/L et inférieure à 2 g/L pendant toute la durée de l'activité de l'insuline choisie.

Si la glycémie est supérieure à 2g/L au moment de l'activité maximale de l'insuline, il convient d'augmenter la dose globale de 2 unités et de renouveler les contrôles en se limitant à un prélèvement au moment du pic.

Si le pic d'activité de l'insuline (glycémie la + faible) a lieu au moins 11h après l'injection, on prescrira une seule injection quotidienne. Entre 5 et 8 heures : 2 injections quotidiennes. Si le pic d'activité se situe avant 4h suivant l'injection, prescrire une insuline plus lente.

En règle générale, la dose d'insuline nécessaire ne dépasse pas 2 unités/kg.

## **V. 2. Distribution des repas :**

### **➤ 1 seule injection d'insuline par 24 heures :**

- 1-3 de la ration ½ h après l'injection.
- 2/3 de la ration ½ h après le pic d'activité de l'insuline

### **➤ 2 injections quotidiennes d'insuline :**

- ½ ration ½ h après chaque injection.

## **VI. LA COURBE DE GLYCEMIE :**

Lorsqu'on veut apprécier l'évolution du taux de glucose dans le sang en fonction du temps, on peut avoir recours à une courbe de GLYCEMIE.

Bien que sa réalisation soit fastidieuse, la courbe de glycémie est le moyen le plus fiable d'apprécier l'efficacité du traitement.

#### **VI. 1. Réalisation de la courbe de glycémie :**

La courbe de glycémie doit être réalisée dans des conditions les plus proches possibles du quotidien de l'animal. Le matin, le propriétaire administre l'insuline et distribue le premier repas de la journée à son domicile. L'animal est ensuite hospitalisé jusqu'au soir. Dans certains cas, lorsqu'on veut vérifier la technique d'injection du propriétaire, l'injection matinale peut être effectuée à la clinique ; le repas est alors distribué par le propriétaire dans un lieu calme de la clinique afin de s'assurer que l'animal mange (le stress peut engendrer un refus de s'alimenter). Le deuxième repas de la journée est distribué à l'heure habituelle à la clinique ou au domicile si l'animal est sorti, il en est de même pour la deuxième injection d'insuline dans le cas du protocole à deux injections quotidiennes.

Au cours de cette hospitalisation, on réalise des mesures répétées de glycémie, réparties sur dix à douze heures environ (une mesure toutes les deux heures environ). Ces mesures sont reportées sur une courbe, d'où le nom "courbe de glycémie".

Le retour de l'animal à son domicile peut s'effectuer le plus souvent le soir même. Dans quelques cas, l'hospitalisation doit être prolongée jusqu'au lendemain afin d'accroître les informations apportées par la courbe.

#### **VI. 2. Intérêt de la courbe de glycémie :**

Une courbe de glycémie nous permet de savoir:

- ✓ Si l'insuline administrée au chien donne des résultats et à partir de quel moment ces résultats sont visibles.
- ✓ Quelle dose d'insuline permet de réduire son taux de glycémie.
- ✓ Dans quelle mesure on peut observer une réduction de la glycémie chez le chien et à quel moment elle se produit.
- ✓ Quelle est la durée de l'effet de l'insuline chez le chien.

Ces renseignements nous aident à:

- ✓ Surveiller la réponse de l'animal à une dose d'insuline spécifique: en particulier chez les chiens diabétiques en début de traitement ou chez ceux dont la dose d'insuline vient d'être modifiée.
- ✓ Savoir si un traitement une fois par jour est suffisant ou s'il est nécessaire d'adopter un traitement deux fois par jour.
- ✓ Repérer les chiens qui ne semblent pas répondre au traitement par insuline.

Cette courbe nous permet de savoir quelles sont les différences de concentration de glucose dans le sang de l'animal après injection de son insuline.

## **VI. 3. Interprétation de la courbe de glycémie :**

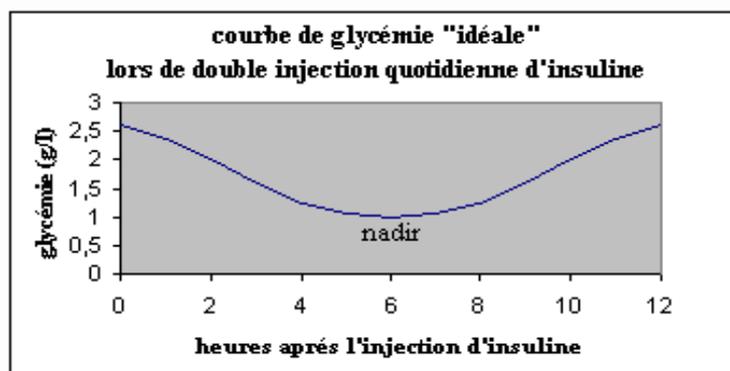
## VI. 3. 1. Analyse de la courbe de glycémie

Tout d'abord, rappelons que l'insuline entraîne une baisse de la glycémie. Suite à une injection d'insuline, la glycémie diminue régulièrement jusqu'à une valeur minimale appelée le "nadir", puis augmente progressivement jusqu'à l'injection suivante.

L'analyse de la courbe permet d'identifier les paramètres suivants :

- ✓ **Le temps écoulé entre l'injection matinale d'insuline et le nadir** : cette valeur indique le pic d'action d'insuline, c'est à dire le moment où son action est maximale. Cette valeur permet de vérifier si le type d'insuline et la fréquence des injections sont adaptés.
- ✓ **La valeur du nadir** : cette valeur est comprise idéalement entre deux limites, si la valeur du nadir est trop basse, le risque d'hypoglycémie est important, si cette valeur est trop haute, une HYPERGLYCEMIE persiste. La connaissance de cette valeur permet de déterminer la dose d'insuline administrée.
- ✓ **Le temps passé où la glycémie se situe entre deux valeurs seuils** (seuils délimitants l'intervalle où la glycémie doit être maintenue pour obtenir un contrôle raisonnable du diabète) : cette valeur permet de juger de l'activité de l'insuline sur la journée. (23).

Ces trois points permettent **d'apprécier la réponse de l'organisme** à l'administration de l'insuline et ainsi de déterminer les caractéristiques du traitement dans son ensemble.

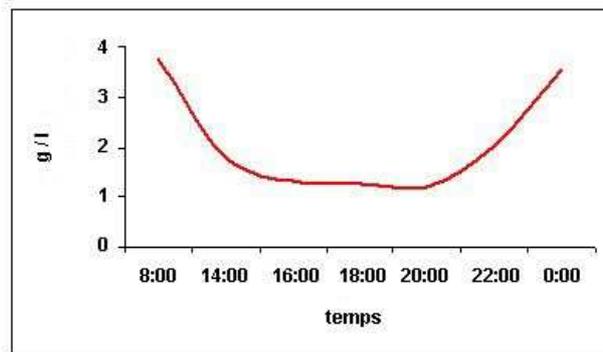


**Figure 7** : Aspect d'une courbe de glycémie idéale (23)

L'interprétation de la courbe peut conduire le vétérinaire à proposer une ou plusieurs modifications afin d'améliorer l'INSULINOTHERAPIE. Si le vétérinaire juge la qualité du traitement satisfaisante, le protocole est conservé tel quel.

### VI. 3. 2. Courbe de glycémie idéale (g/l)

Courbe idéale représentant la glycémie d'un chien diabétique sous traitement. L'insuline a été administrée à 8 heures du matin. (2)



**Figure 8 : Aspect d'une courbe de glycémie idéale chez un chien diabétique sous traitement (2)**

Sur 24 heures, un chien diabétique stable est capable de maintenir un taux de glucose sanguin compris entre 0.9 et 2.1g/l pendant la majeure partie du temps.

### VI. 3. 3. Limites de cette analyse :

La décision d'une modification du traitement ne dépend pas uniquement de l'interprétation d'une courbe de glycémie ; elle repose essentiellement sur **l'état de santé** de l'animal : si l'animal ne présente aucun symptôme en rapport avec un mauvais équilibre du diabète, on fait souvent le choix de ne pas modifier le traitement. Le stress engendré par l'hospitalisation conduit à des difficultés d'interprétation des courbes de glycémie. On ne tient alors pas compte des anomalies de la courbe si l'animal est "en forme".

La capacité d'une courbe de glycémie à refléter l'évolution de la glycémie au domicile de l'animal reste très imparfaite. Il est désormais possible de faire effectuer les **courbes de glycémie à domicile** par le propriétaire lui-même après une phase de formation par le vétérinaire, grâce à l'utilisation d'un **glucomètre**. Les informations offertes par les courbes de glycémie à domicile sont probablement de meilleure qualité que celles apportées par les courbes réalisées au cours d'une

hospitalisation. L'objectif de la courbe de glycémie est d'**ajuster le traitement de façon individuelle à l'animal.**

#### **VI. 3. 4. Intérêt dans de la mise au point du protocole d'insulinothérapie :**

Une à deux semaines après la mise en place du traitement, une première courbe de glycémie est généralement réalisée. Lors de la mise en place du traitement, on décide d'un protocole d'insulinothérapie standard : le type et la dose d'insuline, la fréquence des injections sont déterminés sans savoir si ces choix vont être parfaitement adaptés à l'animal. Seule une courbe de glycémie permet de juger du choix initial de ces paramètres et autorise leur modification exacte. (20).

Si une modification du traitement initial est nécessaire, une deuxième courbe doit être réalisée une à deux semaines plus tard.

Il se peut que le diabète de certains animaux soit difficile à équilibrer. Cette situation peut exiger l'essai de plusieurs protocoles avec la réalisation de plusieurs courbes, ceci jusqu'à l'obtention d'une réponse convenable de l'organisme de l'animal diabétique aux injections d'insuline. L'équilibrage du diabète dure généralement un à deux mois chez les chiens.

#### **VI. 3. 5. Intérêt lors du suivi à long terme :**

Une courbe de glycémie peut être effectuée périodiquement lors des contrôles de routine.

La réalisation d'une courbe de glycémie se justifie particulièrement lors de modifications de l'état de santé de l'animal (en cas de réapparition des signes cliniques du diabète sucré, d'apparition de complications ou lors de suspicion d'hypoglycémie).

Lors de l'apparition d'un événement indésirable ou de suspicion d'un déséquilibre par des examens sanguins et/ou urinaires, seule la réalisation d'une courbe de glycémie permet de déterminer avec certitude les caractéristiques de ce déséquilibre et permet d'ajuster le traitement.

## **VII. CAUSES D'ECHECS DE L'INSULINOTHERAPIE :**

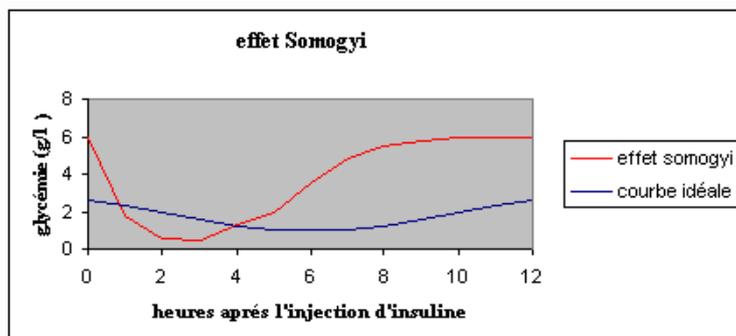
### **VII. 1. Echechs immédiats :**

#### **VII. 1. 1. L'effet Somogyi :**

Il se définit comme étant une chute rapide et très importante de la glycémie caractérisée par une hypoglycémie inférieure à 0.8 g/L.

Il résulte de l'utilisation d'une dose trop élevée d'une insuline de durée d'action trop brève, suivie par une remontée tout aussi rapide de la glycémie à des valeurs très élevées qu'on attribue à une hypersécrétion des hormones antagonistes (glucagon, glucocorticoïdes...). Cette hyperglycémie entraîne une glycosurie abondante.

Par conséquent, toute persistance des symptômes du diabète associée à des mesures de glycémie très élevées, alors que les doses d'insuline utilisées sont importantes, doit conduire à une suspicion d'effet Somogyi. (20-23).



**Figure 9 : Aspect de l'effet Somogyi sur la courbe glycémique (23)**

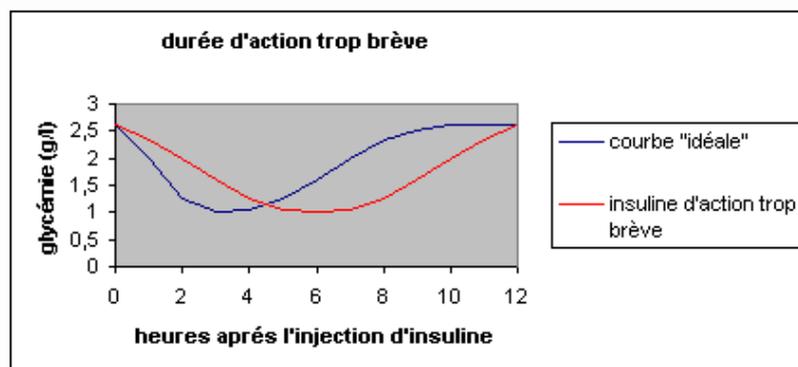
On constate bien la nécessité d'une courbe de glycémie afin de diagnostiquer l'effet Somogyi. Un simple dosage du taux de glucose dans le sang ou dans les urines ne permet pas de faire la différence entre une hyperglycémie due à un effet Somogyi ou une hyperglycémie due à un sous dosage de l'insuline.

Afin de corriger cet effet, il convient de diminuer la dose d'insuline. Une modification du type d'insuline ou de la fréquence des injections doit en général également être envisagée. La correction consiste à réduire la dose d'insuline de 50 à 75% et non pas à tenter de diminuer la glycémie en augmentant une dose déjà excessive. (20)

### **VII. 1. 2. Insuline de durée d'action trop courte :**

En cas de métabolisme trop rapide de l'insuline (c'est à dire lorsque l'organisme dégrade rapidement l'insuline), la durée d'action de l'insuline est très inférieure à la période qui sépare deux injections. On constate sur la courbe une chute assez rapide de la glycémie, suivie d'une remontée à un niveau élevé tôt dans la journée. Cette hyperglycémie est persistante durant le reste de la journée jusqu'à l'injection suivante. Par conséquent, les symptômes du diabète sucré sont présents et il existe un risque important de complications.

Afin de corriger ce problème, il est possible de modifier la fréquence des injections en passant de une à deux injections quotidiennes, ou de modifier le type d'insuline par l'utilisation d'une insuline de durée d'action plus lente. (20-23)



**Figure 10 : Aspect de la courbe de glycémie lors d'utilisation d'une insuline d'action trop brève (23)**

Si la durée d'action de l'insuline NPH est inférieure à 14h il est préférable de pratiquer deux injections quotidiennes ; si la durée d'action est comprise entre 14 et 18h, on peut soit pratiquer deux injections quotidiennes, soit passer à l'insuline protamine zinc en augmentant la dose de 25%. (20)

**VII. 2. Echecs au cours du traitement :**

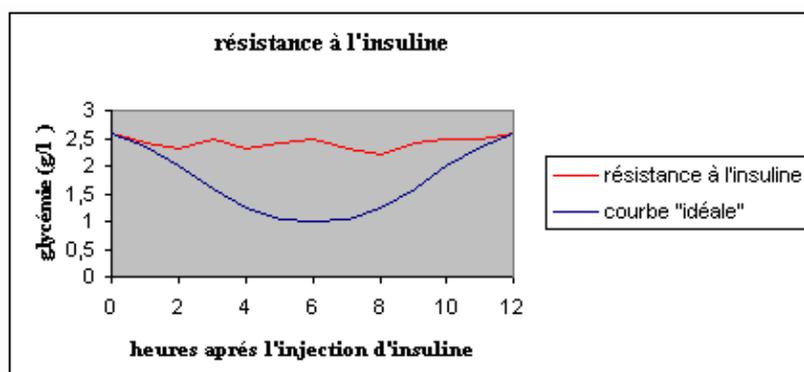
**VII. 2. 1. Fautes techniques :**

Insuline périmée ou mal stockée ; repas et activité physique trop variés ; thérapeutique hyperglycémiant (corticoïdes) ou encore mauvaise technique d'injection.

**VII. 2. 2. Insulino-résistance :**

On parle d'insulino-résistance lorsque l'insuline a une action médiocre sur l'organisme alors qu'elle est présente à une concentration normale grâce aux injections, On constate sur la courbe des mesures très élevées de glycémie tout au long de la journée.

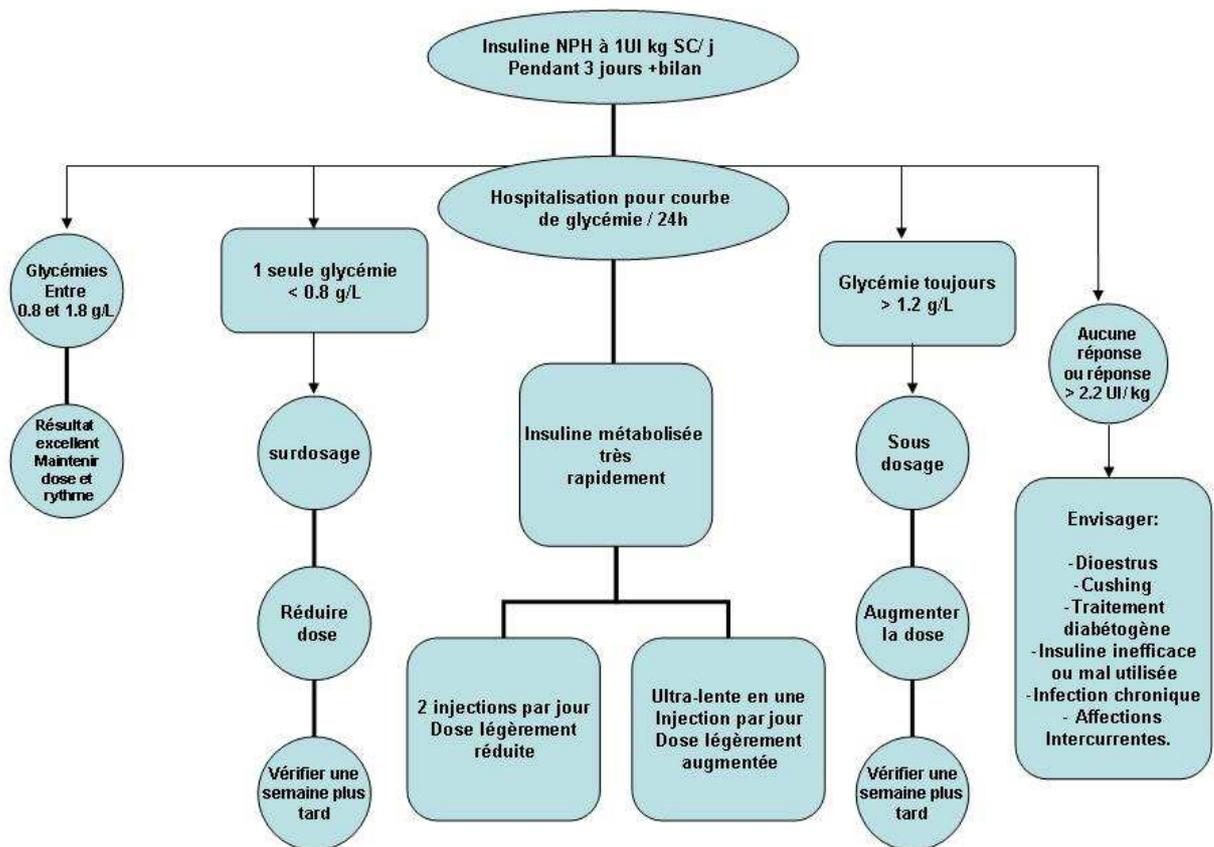
Par conséquent, toute persistance des symptômes du diabète associée à une augmentation progressive des doses d'insuline au cours des différents contrôles jusqu'à des valeurs très élevées supérieures à 2.2 UI/ kg, doit conduire à une suspicion d'insulino-résistance. (20)



**Figure 11 : Aspect de la courbe glycémique lors d'insulino-résistance (23)**

Il convient de rechercher l'origine de la résistance et de la traiter. Après exclusion d'une erreur de conservation ou d'administration de l'insuline, il faut envisager le plus souvent l'existence d'affections coexistantes responsables d'une mauvaise réponse aux injections d'insuline telle qu'une infection bactérienne entraînant une hyperglucagonémie (en particulier les infections urinaires), chienne non castrée : variation de la progestéronémie (l'ovariohystérectomie est conseillée chez la chienne diabétique). Dans des cas plus rares, ce défaut d'activité de l'insuline peut être du à une mauvaise absorption de l'insuline ou à la présence d'ANTICORPS dirigés contre l'insuline injectée.

### VIII. DEMARCHE THERAPEUTIQUE : (20)



**Figure 12 : Traitement du diabète sucré non cétonurique (20)**

**Tableau 4 : Correction de l'insulinothérapie (20)**

	10h-12h	23-24h	Conduite à tenir
<b>Glycosurie</b>	+	+	<b>Augmenter la dose globale de 2UI</b>
<b>Glycosurie</b>	-	+	<b>Maintenir la première dose</b>
<b>Glycosurie</b>	-	-	<b>Diminuer la dose globale d' 1UI</b>

## **IX. DIABETE ACIDOCETOSIQUE ET COMA DIABETIQUE :**

### **IX. 1. ACIDOCETOSE BENIGNE :** (cétonurie mais animal en bon état).

- Insuline cristallisée 0.3-0.5 UI/ kg par voie IM toutes les 6h.
- Glycémie à t 0, t 0+3h, t 0+ 6h. Lorsque la glycémie est inférieure à 2g /L réduire la dose de 50% et passer à l'insuline NPH. (20)

### **IX. 2. ACIDOCETOSE GRAVE :** (cétonurie avec déshydratation, prostration et vomissements) :

- Réhydrater l'animal
  - Insuline cristallisée 0.2 UI/ kg/ IM puis 0.1 UI/kg/h.
- Suivre la réduction de la glycémie avant chaque injection.
- Si la réduction est comprise entre 0.5 et 1g/L maintenir la dose.
- Si la réduction est inférieure à 0.5 g/L, injecter 0.2 UI/kg.
- Si la réduction est supérieure à 1g/ L, injecter 0.05 UI/kg.

Lorsque la glycémie est inférieure à 2g/L, passer à NPH sans attendre la disparition de la cétonurie qui peut persister pendant 48 heures.

- Traitement de l'acidose : si la réserve alcaline est < 15 mEq/L.  
Bicarbonate en mEq = Poids kg x 0.4 x (15 – réserve alcaline mesurée) x 0.5.
- Traitement de l'hypokaliémie si elle existe. (20)

## **X.COMPLICATIONS DE L'INSULINOTHERAPIE :**

**X. 1. Hypoglycémie :** (asthénie, parésie, crises convulsives, coma) : faire absorber du sirop d'érable ou sirop de sucre.

### **X. 2. Traitement d'urgence :**

- Glucagon (*Glucagen\* 1 mg*) : 1 à 2 mg par voie parentérale (SC, IM, IV) à renouveler si nécessaire 30 minutes plus tard.
- Glucocorticoïdes : dexaméthasone : 0.1 mg/kg, prednisolone : 2mg/ kg. (20)
- Soluté glucosé hypertonique à 30% : 1g de glucose par kg par voie intraveineuse ou à défaut soluté glucosé isotonique (200 à 500 mL en perfusion).

✚ Le diabète sucré chez le chien est une pathologie fréquemment associées à des complications graves imposants un respect avec rigoureux du traitement médicamenteux et hygiénique.

✚ Le diabète étant une maladie évolutive, des ajustements seront probablement nécessaires tout au long de la vie de l'animal, le suivi de la maladie est donc primordial.

✚ L'utilisation de l'hémoglobine glyquée pour le suivi de cette maladie peut réellement aider à évaluer la réussite du traitement et donc à limiter les complications car le diabète sucré reste une maladie dont l'évolution est parfois imprévisible.

***Evaluation de l'HbA1c :***

***Aspect expérimental***

## **I. INTRODUCTION:**

Dans ce chapitre nous nous intéresserons à l'aspect pratique de notre travail, commençant d'abord par un rappel des différentes techniques de dosage de l'hémoglobine glyquée puis par une explication notre démarche expérimentale dans l'évaluation de ce paramètre, le but étant d'obtenir une valeur moyenne d'HbA1c exprimée en pourcentage de l'hémoglobine totale.

## **II. TECHNIQUES DE DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE**

### **GLYQUEE:**

Les techniques de dosage de l'Hémoglobine glyquée sont très nombreuses. Faisant appel à des principes différents, elles évaluent selon les cas l'hémoglobine glyquée totale, l'hémoglobine A1 ou la fraction A1c de l'hémoglobine (26).

Les techniques peuvent être réparties en deux groupes: Celles qui dosent spécifiquement l'HbA1c (ou éventuellement l'HbA1 dans son ensemble), et celles qui mesurent la glycation totale des molécules d'hémoglobine.

## **III. 1. Les techniques qui dosent spécifiquement l'HbA1c (ou l'HbA1)**

### **II. 1. 1. Les techniques chromatographiques :**

utilisent généralement des résines d'échange cationique faible et des tampons de force ionique et/ou de pH différents qui permettent de séparer les fractions glyquées de l'hémoglobine dont la charge est modifiée.

Les chromatographies sur colonne peuvent être soit:

### **II. 1. 1. 1 Des chromatographies sur microcolonnes :**

En fonction du type de résine et de tampon utilisés, ces méthodes dosent soit l'HbA1c, soit l'HbA1 totale. Les méthodes d'échange ionique utilisant des résines en suspension ("en batch") ne permettent que de doser l'HbA1 totale. Le pourcentage d'hémoglobine A1c ou d'hémoglobine A1 par rapport à l'hémoglobine totale est calculé après mesure spectrophotométrique de l'absorbance des différentes fractions

Les méthodes basées sur l'échange ionique sont multiples (commercialisées par les firmes Bio-Rad, Biodirect, Biosystems, Boehringer, Eurobio, Fumouze, Hélène, Realef, Sigma, Sobioda).

### **II. 1. 1. 2. Des chromatographies automatisées :**

Elles permettent de contrôler l'élution des différents pics d'hémoglobine et sont de deux types:

#### **➤ Chromatographie liquide haute performance (CLHP) :**

Ces automates utilisent des supports de chromatographie d'échange d'ions adaptés à la CLHP et permettent une bonne séparation des différentes formes de l'hémoglobine dont l'HbA1c (Diamat (Bio-Rad), Daiichi (Ménarini) et Shimadzu (Touzart et Matignon).

#### **➤ Chromatographie liquide basse pression (CLBP) :**

Ces systèmes automatiques, comme les appareils GlycoILab (Instrumentation Laboratory) et Glycomat MCT (Corning), sont d'introduction récente. Réputés

plus faciles à utiliser et moins coûteux que les systèmes HPLC, ils doivent être en mesure, pour donner des résultats fiables, de séparer spécifiquement l'HbA1c des fractions de migration proche.

Les méthodes automatisées ont l'avantage de fournir un graphique d'élution qui permet l'identification objective des différentes fractions et la mise en évidence de leur mauvaise séparation éventuelle, ou de la présence d'hémoglobines anormales. Les techniques de chromatographie d'échange ionique sont très sensibles aux conditions techniques (température, pH, dilution de l'échantillon).

## **II. 1. 2. Les techniques électrophorétiques :**

La séparation des fractions selon leur charge s'effectue sur un gel d'agarose et leur quantification est densitométrique.

Jusqu'à récemment, ces méthodes ne permettaient que le dosage de l'hémoglobine A1 dans son ensemble (trousses Corning, Hélène, Sebia). L'évolution des techniques permet maintenant d'appliquer ce principe au dosage spécifique de l'HbA1c (trousse Diatrac, Beckman). Il est aussi possible de doser l'HbA1c par isoélectrofocalisation, technique précise et reproductible, mais qui n'est pratiquement utilisée que dans le domaine de la recherche.

## **II. 1. 3. Les techniques immunologiques :**

Si les premières tentatives menées il y a une quinzaine d'années pour doser l'HbA1c par radioimmunologie avaient échoué, le récent développement de nouvelles technologies, et notamment de production d'anticorps monoclonaux, a permis la description de nouvelles techniques immunologiques pour le dosage de l'HbA1c.

## **II. 2. Les techniques procédant à la mesure de la glycation globale des molécules d'hémoglobine :**

Ce principe, longtemps appliqué à des techniques de chromatographie manuelles, a depuis peu fait l'objet d'adaptations automatiques

### **II. 2. 1. Minicolonnes :**

Différentes firmes commercialisent, sous forme de trousseaux des colonnes prêtes à l'emploi.

Deux tampons sont utilisés: le premier élue la fraction non glyquée, le deuxième élue la fraction glyquée fixée à la colonne. Le pourcentage d'hémoglobine glyquée est calculé par rapport à l'Hb totale après densitométrie des différentes fractions comme dans le cas de la chromatographie d'échange ionique. Ce type de méthode est commercialisé par plusieurs sociétés parmi lesquelles Eurobio, Merck et Biosystems.

### **II. 2. 2. Méthodes automatisées :**

Parmi les techniques qui dosent spécifiquement l'HbA1c, nous nous intéresseront à la technique que nous avons utilisée dans notre évaluation de l'HbA1c chez le chien, qui est la technique de chromatographie d'échange ionique, les techniques chromatographiques utilisent généralement des résines d'échange cationique faible et des tampons de force ionique et/ou de pH différents qui permettent de séparer les fractions glyquées de l'hémoglobine dont la charge est modifiée

Il est recommandé de n'exprimer les résultats que sous forme d'HbA1c, exprimée en pourcentage de l'hémoglobine totale, à l'exclusion de

tout autre mode d'expression.

Il faut insister sur le fait qu'il n'existe pas de méthode de référence disponible sur le marché qui soit utilisable pour les dosages courants, mais uniquement des méthodes ayant fait la preuve de leur traçabilité aux méthodes de référence proposées.

### **III. INTERFERENCES POSSIBLES :**

Des interférences sur le dosage de l'hémoglobine A1c existent et varient selon la méthode utilisée. Les plus sensibles aux interférences sont les méthodes chromatographiques.

Si les triglycérides et la bilirubine ont été signalés comme capable d'interférer avec les dosages d'hémoglobine glyquée (15), il semble que le dosage spécifique de l'HbA1c soit peu sensible à ces facteurs.

Les interférences provoquées par certaines molécules non glucidiques qui peuvent se fixer à l'hémoglobine et entraîner une différence de charge sont à considérer. C'est le cas de l'urée, de l'éthanol, de l'acide acétylsalicylique. Les hémoglobines carbamylées, acétylées, combinées à l'acétaldéhyde, sont alors éluées au niveau des hémoglobines rapides. Même les dosages par CLHP peuvent être affectés. Il semble cependant qu'in vivo les différences observées entre différentes techniques dans ces situations pathologiques ne sont pas uniquement liées à ces hémoglobines modifiées. (28).

Les interférences liées à la présence de variantes de l'hémoglobine restent un problème plus préoccupant. Sur le plan analytique, les perturbations varient selon la charge du composé présent. L'HbF est éluée avec les hémoglobines rapides et peut être confondue dans

certaines techniques avec l'HbA1c. Les Hb C et S sont elles aussi glyquées et donnent naissance aux dérivés HbC1c et HbS 1c D'autres variantes peuvent migrer avec différents pics, et, dans certains cas, ne pas être ou être mal détectés, même en CLHP.

Les mêmes considérations que pour les techniques de chromatographie d'échange ionique s'appliquent aux techniques électrophorétiques, qui font également intervenir la charge de la molécule. Les interférences sont plus marquées dans les systèmes qui dosent l'HbA 1 globalement. (26)

#### **IV. ETUDE EXPERIMENTALE :**

##### **IV. 1. Patients et méthodes :**

###### **IV. 1. 1. Patients :**

L'étude a porté sur des prélèvements provenant des services suivants :

- Clinique ENV
- Fourrière canine (Boumati)
- Centres de gardiennage et de dressage (Boumati, Blida, Bab el oued, Bousmaïl...)
- Particuliers

###### **IV. 1. 2. Evaluation de la glycémie :**

La glycémie fut évaluée sur place à l'aide d'un glucomètre automatique avec bandelettes réactives correspondantes (Modèle ACCU-CHEK Active- Laboratoire Roche diagnostic- voir photo)

Le principe de mesure de cet appareil est par réflectométrie du glucose dans le sang, l'appareil est calibré automatiquement à l'aide d'une puce électronique fournie avec les bandelettes réactives.

L'imprécision moyenne est  $< 2\%$  et sa sensibilité avoisine les 87,6%.



**Photo 1 : Glucomètre Accu-Chek**

#### **IV. 1. 3. Choix de la méthode et principe du dosage:**

Méthode chromatographique-spectrophotométrique  
interchangeur ionique

(Kit BioSystems COD11045 100 tests).

L'hémolysât est déposé sur une colonne remplie de résine d'interchange cationique, après élimination de la fraction labile, les hémoglobines sont retenues sur la résine, puis l'hémoglobine A1c (HbA1c) est éluée de manière spécifique après avoir éliminer par lavage

l'hémoglobine A1a+b (HbA1a+b), l'estimation du pourcentage de l'HbA1c est obtenue par lecture de l'absorbance (A) à 415nm.



Photo 2 : Kit Biosystems

#### **IV. 2. Démarche Expérimentale**

**IV. 2. 1. Etape pré-analytique:** Le stockage et la préparation des échantillons sanguins sont importants dans la détermination de l'Hb glyquée. (15).

#### **IV. 2. 2. Prélèvements et conservation:**

Par ponction de sang total par les procédures standards (le sang peut être prélevé indifféremment sur héparine ou EDTA (les prélèvements de sang capillaire sont également possibles).

l'hémoglobine A1c est stable 7 jours à 2-8° sur prélèvements, des hémolysats préparés aussitôt après le prélèvement peuvent être conservés à -80 °C pendant plusieurs mois.

#### **IV. 2. 3. Pré-traitement de l'échantillon et**

### **élimination de la fraction labile :**

La formation de l'HbA<sub>1c</sub> passe par un intermédiaire labile, l'Hb pré A<sub>1c</sub>, dont la quantité est fonction de la glycémie récente et non le reflet d'une glycation cumulative. Cette fraction est éluée par chromatographie d'échange d'ions au même moment que l'HbA<sub>1c</sub> et interfère ainsi dans la spécificité du dosage, Il convient d'éliminer cette fraction par hémolyse avec des réactifs contenant du semi-carbazide-aniline ou de l'acide borique, ou simplement à pH acide. (Réactif -1- du kit Biosystems pH=5.0)

On trouve actuellement, dans la plupart des coffrets de dosage, un réactif permettant à la fois la lyse des cellules et l'élimination de la fraction labile. Cette opération peut également être effectuée automatiquement sur certains analyseurs.

### **IV. 2. 4. Procédure :**

Le principe de la chromatographie d'échange d'ions est simple : une colonne est composée d'une résine chargée soit positivement (pour séparer des anions) soit négativement (pour séparer des cations). L'éluant emporte les anions ou les cations à séparer. Selon que l'interaction électrostatique entre la résine de la colonne et les ions à séparer est plus ou moins forte, la séparation se fera plus ou moins facilement.

#### **IV. 2. 4. 1. Préparation de l'hémolysat et élimination de la fraction labile :**

On commencera par laisser quelques minutes les réactifs et les colonnes à température ambiante puis préparer un hémolysat à l'aide du premier réactif, une fois préparé et agité, il sera laisser pendant 10-15min à température ambiante et utilisé un peu plus tard. (Voir schéma 1)

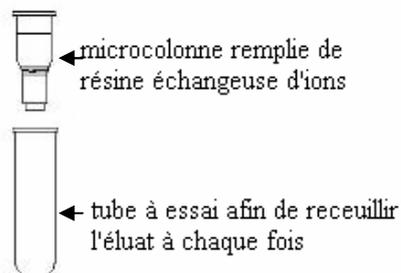
pipeter 50  $\mu$ L de sang  
+ 200  $\mu$ L du Réactif (1)



**Schéma 1 : Préparation de l'hémolysat**

#### **IV. 2. 4. 2. Présentation du dispositif :**

Les ions sont entraînés par une *phase mobile* (éluant, solvant ou encore un des réactifs fournis) et séparés par l'action de la *phase stationnaire* (résine échangeuse d'ions présente dans la colonne - voir Schéma (2)). Dans le cas d'une résine échangeuse de cations, la phase stationnaire porte des groupements anioniques.

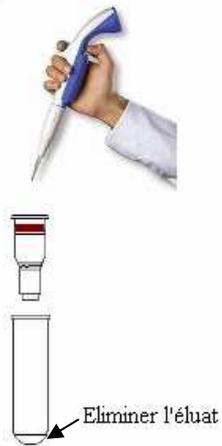


**Schéma 2 : Microcolonne d'échange d'ions**

#### **IV. 2. 4. 3. Séparation des différentes fractions d'hémoglobine glyquée :**

Application de l'hémolysat sur le disque supérieur de la colonne (Schéma (3)).

Appliquer 50  $\mu$ L de l'hémolysat sur le disque supérieur de la colonne



**Schéma 3 : Application de l'hémolysat sur la résine d'échange d'ions**

Quand l'hémolysat a entièrement pénétré le disque, ajouter le Réactif (2) à raison de 200 $\mu$ L, (Voir schéma (4)) puis éliminer l'éluat contenant HbA1a.

Ajouter 200  $\mu$ L du Réactif (2).

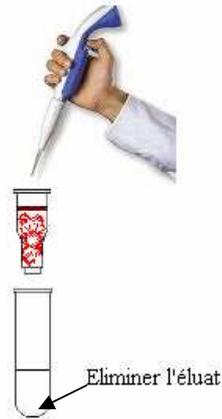


**Schéma 4 : Elimination de la fraction HbA1a après son élution**

Puis ajouter 2mL du Réactif (2) puis éliminer l'éluat contenant HbA1b. ) (Voir schéma (5))

Ajouter 2 mL du Réactif (2)

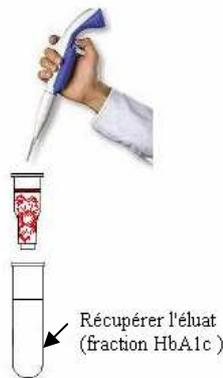
**Schéma 5 : Elimination  
de la fraction HbA1b  
après son élution.**



Placer la colonne sur un tube à essai bien propre et ajouter 4mL du Réactif (3) avec récupération de l'éluat contenant l'HbA1c. (Voir schéma (6)).

Ajouter 4 mL du Réactif (3)

**Schéma 6 :  
Elution de l'HbA1c.**



Bien agiter et lire l'absorbance de la fraction HbA1c à 415 nm par rapport à de l'eau distillée (A HbA1c), l'absorbance est stable pendant au moins une heure.

**IV. 2. 4. 4. Préparation de la HbTOTALE :**

Pipeter dans un tube à essai 12mL du Réactif (3) ainsi que 50  $\mu$ L de l'hémolysat (Voir schéma (7)).

Pipeter 12 mL du Réactif (3)  
+ 50 $\mu$ L de l'Hémolysat

**Schéma 7 : Préparation  
de l'Hb TOTALE.**



Bien agiter et lire l'absorbance de l'HbTOTALE à 415nm face à de l'eau distillée

(A HbTOTALE), l'absorbance est stable pendant au moins une heure.

#### **IV. 2. 4. 5. Estimation du taux d'HbA1c% :**

L'HbA1c est exprimée en pourcentage de l'hémoglobine totale selon la formule suivante :

$$\text{HbA1c \%} = \frac{\text{A HbA1c} \times \text{V HbA1c}}{\text{A Hb total} \times \text{V HbA1c totale}} \times 100 =$$

Le volume recueilli après élution de l'HbA1c (V HbA1c) est de 4ml, le volume de Hb totale (V Hb totale) est de 12 ml. La formule suivante permet le calcul de la concentration :

$$\frac{\text{A HbA1c}}{\text{A Hb totale}} \times \frac{100}{3} = \text{HbA1c \%}$$

#### **V. RESULTATS:**

Sur les 94 prélèvements effectués, 19 ont été éliminés pour les raisons suivantes :

- Nous avons doublé certains échantillons afin de vérifier la qualité de nos résultats
- Certaines valeurs étaient inférieures à la limite de détection de la méthode Biosystems. (Valeurs inférieures à 4.3%).
- Prélèvements hémolysés ou insuffisants ainsi qu'erreurs de manipulations et incidents.

Nous avons donc retenus les valeurs suivantes : les 75

résultats ont été classés selon la glycémie par ordre croissant :

**Tableau 5 : Evaluation de l'HbA1c%**

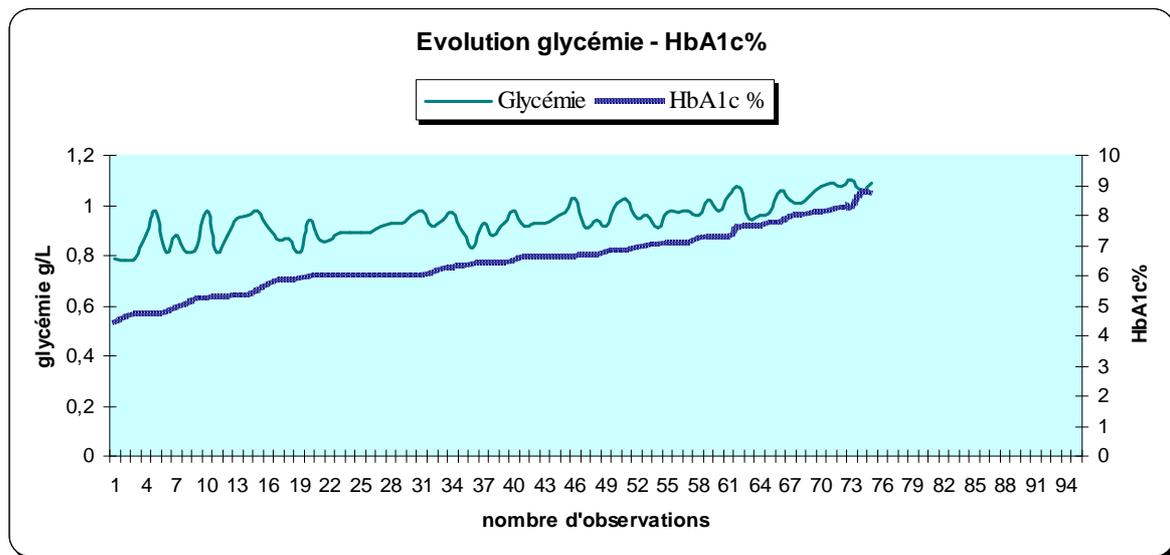
N°	Glycémie g/L	Absorbance (A) HbA1c	Absorbance (A) Hb totale	Pourcentage HbA1c%
1	0,78	0,06	0,43	4,65
2	0,79	0,04	0,3	4,44
3	0,79	0,03	0,21	4,76
4	0,81	0,08	0,5	4,84
5	0,81	0,07	0,46	5,07
6	0,81	0,04	0,25	5,33
7	0,81	0,05	0,28	5,95
8	0,83	0,06	0,38	5,26
9	0,83	0,1	0,52	6,41
10	0,86	0,09	0,51	5,88
11	0,86	0,08	0,44	6,06
12	0,86	0,06	0,33	6,06
13	0,87	0,06	0,34	5,88
14	0,88	0,05	0,34	4,76
15	0,88	0,07	0,47	4,96
16	0,88	0,08	0,5	5,33
17	0,88	0,07	0,36	6,48
18	0,89	0,1	0,55	6,06
19	0,89	0,08	0,44	6,06
20	0,89	0,06	0,33	6,06
21	0,89	0,02	0,11	6,06
22	0,89	0,08	0,42	6,34
23	0,91	0,05	0,29	5,74
24	0,91	0,09	0,45	6,71
25	0,91	0,07	0,33	7,07
26	0,92	0,06	0,33	6,06
27	0,92	0,09	0,49	6,12
28	0,92	0,08	0,4	6,66
29	0,92	0,09	0,47	6,84
30	0,93	0,06	0,33	6,06
31	0,93	0,06	0,33	6,06
32	0,93	0,06	0,31	6,45
33	0,93	0,07	0,36	6,48
34	0,93	0,02	0,1	6,66
35	0,93	0,06	0,3	6,66
36	0,94	0,09	0,5	6
37	0,94	0,06	0,33	6,25
38	0,94	0,09	0,45	6,71
39	0,95	0,1	0,62	5,37
40	0,95	0,08	0,4	6,66
41	0,95	0,07	0,31	6,98
42	0,95	0,12	0,52	7,69

43	0,96	0,07	0,4	5,41
44	0,96	0,06	0,33	6,06
45	0,96	0,08	0,38	7,01
46	0,96	0,07	0,32	7,29
47	0,96	0,07	0,39	7,69
48	0,97	0,07	0,37	6,3
49	0,97	0,07	0,35	6,66
50	0,97	0,09	0,42	7,14
51	0,97	0,09	0,42	7,14
52	0,97	0,07	0,3	7,77
53	0,98	0,05	0,34	4,76
54	0,98	0,06	0,38	5,26
55	0,98	0,08	0,48	5,55
56	0,98	0,06	0,33	6,06
57	0,98	0,08	0,41	6,5
58	0,98	0,09	0,42	7,14
59	0,98	0,11	0,5	7,33
60	1,01	0,06	0,29	6,89
61	1,01	0,08	0,33	8,07
62	1,02	0,06	0,29	6,89
63	1,02	0,09	0,41	7,31
64	1,02	0,12	0,5	8
65	1,03	0,09	0,45	6,66
66	1,04	0,11	0,5	7,33
67	1,04	0,08	0,33	8,08
68	1,06	0,07	0,3	7,77
69	1,06	0,21	0,8	8,75
70	1,07	0,08	0,35	7,62
71	1,08	0,20	0,82	8,13
72	1,08	0,12	0,48	8,33
73	1,09	0,22	0,89	8,23
74	1,09	0,1	0,38	8,77
75	1,1	0,23	0,92	8,33

Nous avons obtenu au terme de cette évaluation :

Une moyenne d'HbA1c% = 6.50 ± 1.03% avec un  
facteur de corrélation entre l'HbA1c% et la glycémie  $r$   
= 0.78 (n = 75)

Nous pouvons voir sur le graph. l'évolution conjointe  
de la glycémie et du taux d'HbA1c % :



**Figure 13 : Evolution du taux d'hémoglobine glyquée en fonction de la glycémie**

**Remarque :**

La glycémie fut évaluée dans l'unique but d'écarter la possibilité d'une hyperglycémie pouvant faire penser à un diabète sucré sous-jacent, nos but étant d'avoir une valeur moyenne d'HbA1c% normale, la présence d'un diabète sucré aurait pu fausser nos résultats.

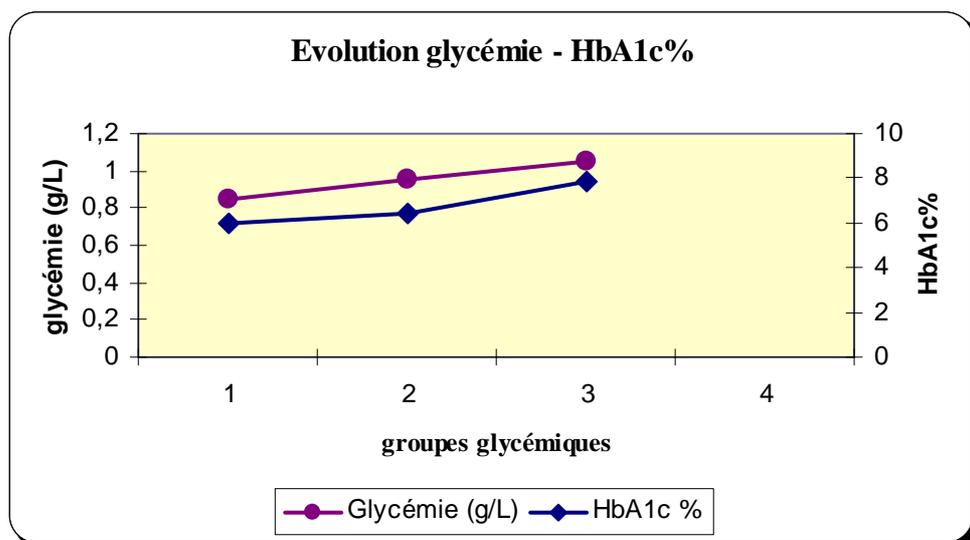
## VI. DISCUSSION:

Notre étude a démontré la relation étroite entre la glycémie et le taux d'HbA1c % ainsi qu'un facteur de corrélation significatif entre ces deux paramètres ( $r = 0.78$ ).

Nous avons par la suite répartis les résultats en trois groupes classés par tranche glycémique croissante, les résultats étaient les suivants :

**Tableau 6 : Moyennes d'HbA1c% obtenues chez 3 groupes glycémiques croissants**

Groupes glycémiques g/L	Nombre d'animaux	Pourcentage d'HbA1c %
0.78-0.89	22	$5.958 \pm 0.79^{***}$
0.90-1.00	37	$6.462 \pm 0.72^{***}$
1.01-1.10	16	$7.822 \pm 0.64^{***}$



**Figure 14 : Evolution de l'hémoglobine glyquée en fonction de la glycémie.**

Nous observons aisément l'augmentation de l'HbA1c% en fonction de la glycémie et cela de manière proportionnelle

## **VII. VALEUR SEMIOLOGIQUE :**

L'hémoglobine glyquée, et plus particulièrement sa fraction HbA1c constitue le paramètre de référence dans la surveillance de l'équilibre glycémique au cours du diabète sucré (17).

Elle reflète la qualité de l'équilibre glycémique durant les 4 à 8 semaines qui précèdent le dosage. Il s'agit d'un indicateur objectif et sans complaisance de l'équilibre glycémique, qui permet de mieux identifier les patients mal équilibrés et donc de revoir efficacement la démarche thérapeutique.

En fonction des problèmes analytiques et physiopathologiques évoqués précédemment, l'interprétation des résultats du dosage de l'HbA1c doit être discutée dans certaines situations:

- elle doit être prudente au cours de l'insuffisance rénale, surtout quand on utilise des techniques basées sur la charge de la molécule, en raison de la présence d'hémoglobine carbamylée,
- elle doit être réservée, voire abandonnée, quand le dosage est pris en défaut par des situations pathologiques qui modifient la durée de vie des hématies. Le renseignement fourni perd alors toute valeur sémiologique. C'est le cas des hémolyses, des

anémies, et lorsque des hémoglobines anormales sont présentes. Dans cette dernière situation, on a vu que la plupart des techniques étaient également inadéquates sur le plan analytique.

Enfin, l'HbA1c n'est pas utilisable pour le dépistage du diabète. On peut, par ailleurs, lui préférer dans certaines situations (évolution de l'équilibre à court terme, hémoglobinopathies) le dosage des Fructosamines qui reflètent la glycémie sur une période de 1 à 3 semaines alors que l'HbA1c couvre une période de 4 à 8 semaines précédents le dosage.

## **VIII. CONCLUSION**

La détermination du taux de l'HbA1c peut révolutionner la pratique diabétologique en médecine vétérinaire et permet la définition d'objectifs concrets en terme de contrôle métabolique de la maladie diabétique. Effectué en Laboratoire, le dosage permettrait d'ajuster le traitement du patient au fil des mois, constatation dont l'importance peut être déterminante pour les suites thérapeutiques.

Le dosage de l'HbA1c permet de repérer les erreurs dans le contrôle glycémique quotidien du chien diabétique.

Si le dosage de l'HbA1c est essentiel pour assurer le suivi des chiens diabétiques, cette détermination ne

peut être effectuée pour diagnostiquer de manière routinière un diabète sucré, pour des raisons évidentes de coût élevé et de non standardisation des méthodes proposées.

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- 1) Anonyme 1. 2001 : LA GLYCATION (article du 1er décembre) : [http://www.nutranews.org/article.php3?id\\_rubrique=24&id\\_article=571](http://www.nutranews.org/article.php3?id_rubrique=24&id_article=571)
- 2) Anonyme 2 : Intervet SA : <http://www.diabete-chien-chat.com.fr>
- 3) Baynes J W., Monnier VM., 2005: Compte rendu du 8ème symposium de Charleston “The Maillard Reaction”: Chemistry at the Interface of Nutrition, Aging, and Disease Proceedings of the Eighth International Symposium on the Maillard Reaction. Pages 2-7.
- 4) Bunn HF., Gabbay KH., 1978: The glycosylation of haemoglobin: Relevance to diabetes mellitus; 200. Pages21-27.

- 5) BUNN HF, SHAPIRO R, MCMANUS M ET AL. 1979: STRUCTURAL HETEROGENEITY OF HUMAN HEMOGLOBIN A DUE TO NONENZYMATIC GLYCOSYLATION. J BIOL CHEM, 254 : Pages 3892-3898.
- 6) CUVELIER Isabelle., HUCHET François-Xavier, 2003 : LES DIABETES GLUCIDIQUES : Apport du laboratoire dans le diagnostic et le suivi. Lettre N°59 Dec2003 Laboratoire Pasteur Cerba. Pages 7-8
- 7) Desch G., 2001 : Aspects biochimiques et analytiques du diagnostic et de la surveillance du diabète. Revue de Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique. Volume 25. Pages 61-72.
- 8) Gerlo E., 2003 : La détermination de l'hémoglobine A1c. Revue Folia diagnostica 12<sup>ème</sup> année. Pages 33-34.
- 9) Gerlo E., 2003 : La détermination de l'hémoglobine A1c. Revue Folia diagnostica 12<sup>ème</sup> année. Pages 38.
- 10) Gillery P., 1999 : Hémoglobine A1C : quoi de neuf. Annales de Biologie Clinique. Volume 57, Numéro 4, pages 455-457.
- 11) Gillery P., Bordas-Fondrède M., Chapelle JP., 1999 : Hémoglobine glyquée : le temps de la standardisation est venu. Annales de Biologie Clinique; Volume 56.  
Pages 249-251.
- 12) Gillery P., 2000 : FORCES ET LIMITES DU DOSAGE DE L'HbA1C. LE POINT DE VUE DU BIOLOGISTE. Textes des Journées annuelles de Diabétologie de l'Hôtel-Dieu. [http://journees.hotel-dieu.com/medias/diabet\\_18.pdf](http://journees.hotel-dieu.com/medias/diabet_18.pdf)
- 13) Gillery P., 2001 : L'HbA1c : une protéine "glyquée". Fiche technique UniBioReims CHU de Reims - Laboratoire de Biochimie.
- 14) Gillery P., 2001 : Faut-il délocaliser les dosages d'hémoglobine glyquée. **Annales de Biologie Clinique. Volume 59, Numéro 1, Pages 8-9.**
- 15) Goldstein DE., Little RR., 1986: Glycated hemoglobin: methodologies and clinical applications. *Clin Chem* 32. Pages 23-29.
- 16) Krishnamurti U, Steffes MW. 2001: Glycohemoglobin: A Primary Predictor of the Development or Reversal of Complications of Diabetes Mellitus. *Clinical Chemistry* 47. Pages 1157-1165.
- 17) Leutenegger M., 1991 : L'hémoglobine glyquée est-elle toujours un bon marqueur du contrôle glycémique au long cours chez les patients diabétiques ? *Journal du diabète* Volume 17. Pages 424-427.

- 18) Marca M C., Loste A., 2000: Blood glycated hemoglobin evaluation in sick dogs. Canadian Journal of Veterinary Research Volume 64. Page141.
- 19) Mastrocola D., Munari M., 2000: Progress of the Maillard Reaction and Antioxidant Action of Maillard Reaction Products in Preheated Model Systems during Storage, J. Agric. Food Chemistry., 48, Pages 3555-3559.
- 20) Moraillon R., Legeay Y., 2005: Diabète sucré. Dictionnaire pratique de thérapeutique canine et féline 5<sup>ème</sup> édition. Pages 205-209.
- 21) Parisi, J-M ., 2001 : Réaction de Maillard : Chimie et gastronomie. Manuel de Chimie 1<sup>ère</sup> S. Page198.
- 22) Peacock I., 1984: Glycosylated haemoglobin: measurement and clinical use. J Clin Pathol. 37. Pages 841–851.
- 23) Seguin A., LE DIABETE SUCRE CHEZ LES CHIENS ET LES CHATS : <http://diabete.vet-alfort.fr>
- 24) Tahara Y., Shima K., 1995: Kinetics of HbA1c, glycated albumin and fructosamine and analysis of their weight functions against preceding plasma glucose levels. Journal of diabetes care 18. Pages 440-447.
- 25) THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. 1993: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med, 329: Pages 977-986.
- 26) Vassault A., Gillery P., 1992: Hémoglobine glyquée. Cahier de Fomation Biochimie Assurance de qualité Page 171.
- 27) WAUTIER J-L., 1998 : Les produits de glycation avancée ou produits de Maillard. La Revue du Praticien 48. Pages 15-18.
- 28) Weykamp CS., Penders TJ., 1993: Interference of carbamylated and acetylated hemoglobins in assays of glycohemoglobin by HPLC, electrophoresis, affinity chromatography and enzyme immunoassay. Clin Chem 39. Pages138-142.