

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire



Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences vétérinaires

Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme de Docteur

en

Médecine vétérinaire

THEME

Essai de dosage de l'hémoglobine glyquée « Hb1Ac » afin de diagnostiquer le diabète sucré chez le cheval dans le club équestre de Bordj ELBAHRI.

Présenté par :
Mr FETHA Aymen

Soutenu publiquement, le : **06 juillet 2023.** Devant le jury :

Dr GUESSOUM Meryem	MCB (ENSV)	Présidente
Dr AOUANE Nedjma	MCB (ENSV)	Examinatrice
Dr GHAOUI Hichem	MCB (ENSV)	Promoteur

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire



Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences vétérinaires

Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme de Docteur

en

Médecine vétérinaire

THEME

Essai de dosage de l'hémoglobine glyquée « Hb1Ac » afin de diagnostiquer le diabète sucré chez le cheval dans le club équestre de Bordj ELBAHRI.

Présenté par :
Mr FETHA Aymen

Soutenu publiquement, le : **06 juillet 2023.** Devant le jury :

Dr GUESSOUM Meryem	MCB (ENSV)	Présidente
Dr AOUANE Nedjma	MCB (ENSV)	Examinatrice
Dr GHAOUI Hichem	MCB (ENSV)	Promoteur

Remerciement...

Je remercie en premier lieu, dieu le clément et miséricordieux, qui par sa grâce, j'ai permis de réaliser ce modeste travail.

J'adresse mes remerciements à mon cher promoteur Dr GHAOUI Hichem, pour avoir dirigé mon travail, pour son aide, ses conseils, ses orientations ainsi que son soutien moral et ses encouragements.

*Je tiens à remercier vivement : Dr. Guessoum Meryem qui a accepté de présider notre jury ;
Dr. Aouane Nedjma pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail.*

Mes profonds remerciements vont également à toutes les personnes qui m'ont aidée dans mon travail.

Dédicace...

*Je dédié ce modeste travail
A mes chers parents, aucune dédicace ne saurait
exprimer mon respect et mon amour éternel.*

*A mon cher frère Saber & ma soeur Chahinez que
j'aiment infiniment.*

*A mes grands parents et toute ma famille.
A Dr Guessoum Belkacem qui m'a ouvert à bars ouvert
son cabinet, ainsi Dr Mokhnache Messaouda, et toute
l'équipe de HBVET*

*Ainsi à tous mes amis plus particulièrement Amdjed, Riad,
Marouane, Chouaib, Rafik, Charaf, Lagrinda, Islem,
Yakoub, Hamma, Abdessalem...et tous ceux qui me sont
chers .*

Ainsi à tous mes amies ; Ryhane, Ferial, Nouha.

*Et enfin à toute personne m'ayant aidé à réaliser ce
travail.*

Aymen

Liste des figures

Figure1 : Représentation schématique d'une hémoglobine	05
Figure 2 : Contacts entre les chaînes d'hémoglobine	06
Figure 3 : Etapes de formation d'une protéine glyquée (exemple de l'Hb1Ac).....	09
Figure 4 : L'hémoglobine glyquée : <u>a</u>: représentation schématique; <u>b</u>: structure.....	10
Figure 5 : Représentation schématique de la fixation de glucose sure les globules rouges.....	11
Figure 6 : Processus de glycation de l'hémoglobine	12
Figure 7 : Principe de base de la technique(HPLC).....	22
Figure 8 : La localisation géographique du Club Equestre de Bordj El Bahri.....	25
Figure 9 : Prise de sang après ponction jugulaire. (Clichés personnels).....	29
Figure10 : Enregistrement des échantillons et leurs identifications par le code à barre.(Clichés personnels).....	30
Figure 11 : Analyseur HbA1c automatique HLC®-723G8.....	31
Figure 12 : Préparation et mise en place des tubes héparinés dans L'automate G8.....	33
Figure 13 : Impression des résultats sur un analyseur Hb 1Ac automatique HLC® -723G8..	34
Figure 14 Résultat montrant l'absence de la fraction SA1c relative à la fraction Hb1Ac, en pourcentage et graphe aplati.....	36
Figure 15 : Résultat montant la présence des différentes fractions de l'hémoglobine glyquée, en pourcentage et en chiffre.....	37
Figure 16 : Résultat positif pour la fraction SA1c relative à la fraction Hb1Ac traçant un graphe avec un pic qui a permet de mesurer la quantité de la fraction Hb1Ac.....	38

Liste des tableaux

Tableau I : Différentes d'hémoglobines exprimées au cours de la vie	09
Tableau II : Fiche de renseignement des chevaux inclus dans l'étude.....	27

Table de matières

Introduction générale.....	01
Partie Bibliographique.....	
Chapitre I.....	03
I.GENERALITE SUR LE DIABETE SUCRÉ.....	03
I.1.Définition	03
I.1.2. Classification du diabète sucré	03
II. Rappel sur l'hémoglobine	04
II.1. Définition	04
II.2. Structure	05
II.3. Les différents types d'hémoglobine	06
III. L'hémoglobine glyquée.....	08
III.1.Définition.....	08
III.2. Formation de l'HbA1c.....	10
III.3. Hémoglobine A1c et Hémoglobine glyquée.....	14
III.4. Signification pour la clinique.....	15
Chapitre II.....	17
I. Le diabète sucré chez le cheval	17
I.1.Clinique	17
II. Particularité de l'Hb1Ac ducheval	18
III. Insulinorésistance chez le cheval	20
Chapitre III.....	22
I. Méthodes de dosage.....	22
I.1.Méthodes dosant l'hémoglobine glyquée totale	22
I.1.1.Chromatographie d'affinité	22
I.1.1.1. Avantages et inconvénients de la méthode HPLC.....	23
I.1.1.2.Méthodes dosant spécifiquement l'HbA1c	23
I.1.1.2.1. Méthodes immunologiques	23
I.1.1.2.2. Chromatographie d'échange d'ions	24
Partie expérimentale.....	25
I. Matériel & méthodes	25
II.La sélection animale et critères d'inclusion	26
III.Période expérimentale	28
IV.Prise de sang et méthodes de conservation	28
V.Enregistrement des échantillons.....	29
VI.Analyse et dosage de l'Hb 1Ac	30
VI.1. Description de l'analyseur.....	31
VI.2. Colonne et réactifs.....	32
VI.3.La mise en place des échantillons dans l'automate G8	32
Résultats & Discussion.....	35
I.Résultats	35

Table de matières

II.Discussion	40
Conclusion & Perspectives.....	42

Introduction générale

Introduction Générale

L'élevage des chevaux en Algérie est une activité qui possède une longue tradition dans le pays. Les chevaux ont une importance culturelle et historique en Algérie, et l'élevage équin joue un rôle essentiel dans l'agriculture et l'économie rurale.

Les chevaux en Algérie sont élevés principalement pour plusieurs raisons, entre autres pour conserver le patrimoine culturel ; les chevaux ont une signification culturelle profonde en Algérie. Ils sont étroitement liés à l'histoire et à la tradition du pays, notamment dans les régions nomades et rurales. De même pour les chevaux de sports équestres où les chevaux sont utilisés dans différentes disciplines sportives équestres, comme les courses hippiques, le saut d'obstacles, le dressage, l'endurance, etc. L'élevage de chevaux de compétition est donc une activité importante. Par ailleurs, les chevaux sont utilisés au travail agricole : dans certaines régions rurales, les chevaux sont utilisés pour l'agriculture, notamment pour labourer les terres ou pour le transport de marchandises dans des zones difficilement accessibles aux véhicules motorisés.

Le diabète est une maladie métabolique chronique qui affecte de nombreuses espèces animales, y compris le cheval. Bien que le diabète soit plus couramment associé aux humains, il est essentiel de reconnaître et de comprendre cette maladie chez les chevaux, car elle peut avoir des conséquences significatives sur leur santé et leur bien-être. Le diabète équin est une pathologie complexe qui nécessite une attention particulière en matière de diagnostic, de gestion et de recherche. Une meilleure compréhension de cette pathologie permettra d'améliorer le diagnostic précoce, la gestion clinique et les perspectives thérapeutiques pour les chevaux diabétiques.

La recherche sur le diabète chez le cheval est en constante évolution. Les études visent à mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de la maladie, à identifier les facteurs de risque spécifiques et à développer de nouvelles stratégies de traitement et de prévention. De plus, l'établissement de protocoles de gestion et de recommandations basées sur des preuves scientifiques solides est essentiel pour soutenir les vétérinaires dans leur prise en charge des chevaux diabétiques.

Introduction Générale

L'hémoglobine glyquée (HbA1c) est un paramètre utilisé pour évaluer le contrôle de la glycémie chez les humains atteints de diabète. Cependant, peu d'attention a été accordée à l'HbA1c chez les chevaux jusqu'à récemment. En effet, l'HbA1c reflète le taux moyen de glucose dans le sang sur une période prolongée et fournit des informations précieuses sur le contrôle glycémique.

Chez les chevaux, la mesure de l'HbA1c peut être un outil précieux pour les vétérinaires dans la gestion du diabète équin, ainsi que dans la détection précoce de l'hyperglycémie ou de l'insulinorésistance. L'HbA1c peut aider à évaluer l'efficacité du traitement, à ajuster les protocoles de gestion, et à surveiller aussi l'évolution de la maladie. La méthode de référence pour mesurer l'HbA1c chez le cheval est la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Cette technique sépare les différentes fractions d'HbA1c en fonction de leurs caractéristiques chimiques, permettant ainsi une mesure précise de chaque fraction.

Notre étude a pour objectif d'étudier la possibilité de dosage de l'HB1Ac provenant du sang total du cheval afin de pouvoir évaluer le statut glycémique des chevaux inclus dans notre étude en utilisant un analyseur **Hb 1Ac automatique HLC® -723G8**, qui est un automate conçu pour le dosage de l'hémoglobine glyquée chez l'Homme et quelques espèces animales. Pour ce fait, notre travail vise à savoir la fiabilité d'utiliser l'automate G8 pour le dosage de la fraction d'hémoglobine Hb1Ac qui reflète la quantité de l'hémoglobine glyquée chez le cheval.

En effet, notre étude s'articule sur une partie bibliographique traitant le diabète chez l'Homme et l'hémoglobine glyquée, suivie par une étude sur le diabète sucré et l'hémoglobine glyquée chez le cheval et leurs méthodes de dosage respectivement, et aussi une partie expérimentale ayant pour but de doser l'Hb1Ac chez le cheval par un analyseur Hb 1Ac automatique HLC® -723G8, et on finit par exposer nos résultats obtenus et leurs discussion.

Etude bibliographique...

CHAPITRE I....

***Diabète, hémoglobine et hémoglobine glyquée et
méthodes de dosage***

I.GENERALITE SUR LE DIABETE SUCRÉ

I.1.Définition :

Le Diabète est défini comme un : « Groupe de maladies métaboliques caractérisées par une hyperglycémie chronique résultant d'un défaut de la sécrétion de l'insuline ou de l'action de l'insuline ou de ces deux anomalies associées ». Il s'agit donc d'une pathologie chronique liée à des troubles de la régulation de l'équilibre glycémique. Cette hyperglycémie chronique est associée à terme avec des complications organiques spécifiques touchant particulièrement les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux [1].

I.1.2. Classification du diabète sucré :

La classification et le diagnostic du diabète sont complexes et ont fait l'objet de nombreux débats, consultations et révisions au fil des décennies. Il est aujourd'hui généralement admis qu'il existe trois grands types de diabète : le diabète de Type 1, le diabète de Type 2 et le diabète gestationnel (DG).

Diabète de type 1

Anciennement appelée diabète "insulinodépendant" ou diabète "juvénile" est habituellement découvert chez les sujets jeunes : les enfants, les adolescents ou les jeunes adultes. Cette forme qui touche environ 10% des diabétiques, se produit lorsque le pancréas ne produit plus ou pas assez d'insuline pour assurer la régulation de la glycémie. Ceci à cause d'une réaction auto-immune spécifique d'organe, survenant sur un terrain favorable, caractérisé par des gènes de susceptibilité, et provoquée par l'intervention de facteurs liés à l'environnement. L'organe concerné est la cellule β qui est spécifiquement et irrémédiablement détruite par les mécanismes immunologiques. Les autres cellules de l'îlot de Langerhans qui produisent d'autres hormones (glucagon, somatostatine...) restent indemnes de l'infiltration de la structure endocrine par les monocytes [2].

Diabète de Type 2

Le diabète de Type 2 (ou diabète non insulino-dépendant) représente environ 90% de tous les cas du diabète, c'est la forme la plus courante de la maladie. Dans ce type l'hyperglycémie est causée par la production inadéquate de l'insuline et l'incapacité de l'organisme à répondre correctement à l'insuline, on appelle cet état une résistance à l'insuline. Cette résistance à l'insuline, déclenche une hausse de production de l'insuline pour réduire l'augmentation du taux de glycémie. Au fil du temps, une production inadéquate relative d'insuline peut toutefois se développer.

Généralement, le DNID touche les sujets plus âgés, mais est de plus en plus observé chez les enfants, les adolescents et les adultes plus jeunes en raison de l'augmentation des taux d'obésité, de l'inactivité physique et de la mauvaise alimentation [2].

II. Rappel sur l'hémoglobine :

II.1. Définition :

L'hémoglobine est une protéine présente dans les globules rouges (érythrocytes) du sang. Elle joue un rôle essentiel dans le transport de l'oxygène des poumons vers les tissus de l'organisme, ainsi que dans le transport du dioxyde de carbone des tissus vers les poumons pour être éliminé. L'hémoglobine est une chromoprotéine qui a une structure globuleuse hétérotétramérique, d'un poids moléculaire de **64500 Da** faite de 4 sous-unités (S/U) identiques 2 à 2 qui se distinguent en S/U de type α et S/U de type non α , chaque S/U comporte :

- Une partie protéique : la globine qui correspond à une chaîne polypeptidique dont il existe 2

familles : famille α et famille non α .

- Une partie non protéique : l'hème (ou groupement prosthétique), qui est une ferroporphyrine de type IX dont le centre est occupé par un atome de fer ferreux (Fe^{2+}) qui fixe l' O_2 [3].

II.2. Structure :

La structure de l'hémoglobine est complexe. Chez les humains et la plupart des mammifères, l'hémoglobine est un tétramère, ce qui signifie qu'elle est composée de quatre sous-unités polypeptidiques liées entre elles. Chez les adultes, ces sous-unités sont généralement de deux types : deux chaînes d'alpha-globine et deux chaînes de beta-globine. Ainsi, la forme courante de l'hémoglobine chez l'adulte est appelée hémoglobine A (**HbA**). L'hémoglobine présente une structure primaire définie par la séquence en acides aminés des chaînes de globine, une structure secondaire (alternance d'hélices alpha et non-alpha), une structure tertiaire définie par l'arrangement tridimensionnel du monomère de globine qui permet de délimiter une poche à hème, et une structure quaternaire définie par les interactions entre les monomères au sein du tétramère. [4]

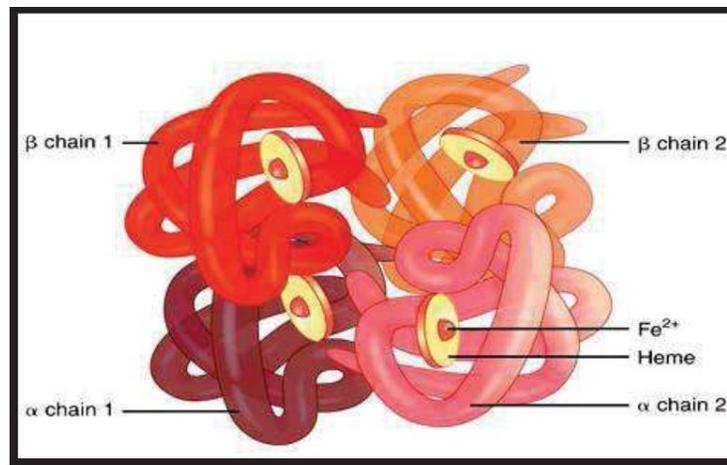


Figure 1 : Représentation schématique d'une hémoglobine [4]

Les chaînes alpha et beta sont assemblées entre elles par des liaisons fortes (liaisons $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 2$) et par des liaisons faibles (liaisons $\alpha 1\beta 2$ et $\alpha 2\beta 1$), les premières jouant un rôle essentiel dans la stabilité de la molécule et les secondes dans le processus de transition allostérique [3].

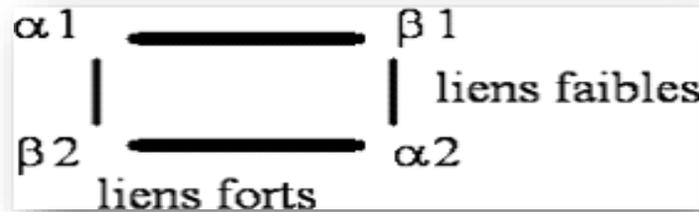


Figure 2: Contacts entre les chaînes d'hémoglobine [3]

II.3. Les différents types d'hémoglobine :

L'hémoglobine est composée de différentes fractions, également appelées chaînes d'hémoglobine, qui peuvent varier en fonction du stade de développement, de l'espèce et de certaines conditions médicales. Voici quelques-unes des fractions couramment rencontrées :

Il est important de comprendre les différentes fractions de l'hémoglobine, car des altérations dans leur composition peuvent avoir des implications cliniques importantes, telles que des troubles de l'hémoglobine ou des maladies génétiques. Des tests spécifiques, tels que l'électrophorèse de l'hémoglobine, peuvent être utilisés pour identifier et quantifier les différentes fractions d'hémoglobine dans le sang.

Il existe différentes variétés d'Hémoglobine synthétisées à des périodes différentes de la vie et dont la composition en hémoglobine n'est pas la même.

1. Hémoglobine A (HbA) : Chez les humains adultes, l'HbA représente environ 95 à 98

% de l'hémoglobine totale. Elle est composée de deux chaînes alpha identiques et de deux chaînes bêta identiques. Les chaînes alpha sont codées par les gènes HBA1 et HBA2, tandis que les chaînes bêta sont codées par le gène HBB.

2. Hémoglobine A2 (HbA2) : L'HbA2 représente environ 2 à 3 % de l'hémoglobine totale chez les adultes humains. Elle est constituée de deux chaînes alpha identiques et de deux chaînes delta identiques. Les chaînes delta sont codées par le gène HBD.

3. Hémoglobine Fœtale (HbF) : L'HbF est prédominante chez les fœtus et diminue progressivement après la naissance. Chez les nouveau-nés à terme, elle représente environ 50 à 80 % de l'hémoglobine totale, mais diminue rapidement au cours des premiers mois de vie. L'HbF est constituée de deux chaînes alpha identiques et de deux chaînes gamma identiques. Les chaînes gamma sont codées par le gène HBG1 et HBG2.

4. Hémoglobine S (HbS) : L'HbS est une variante de l'HbA dans laquelle une substitution d'acide aminé a lieu dans la chaîne bêta. La substitution de l'acide glutamique en position 6 par la valine conduit à la formation d'HbS. Cette mutation est causée par une mutation ponctuelle dans le gène HBB. L'HbS est associée à la drépanocytose, une maladie caractérisée par la déformation des globules rouges en forme de faucille, ce qui entraîne une obstruction des vaisseaux sanguins et une anémie.

5. Hémoglobine C (HbC) : L'HbC est une autre variante de l'HbA dans laquelle une substitution d'acide aminé a lieu dans la chaîne bêta. La substitution de l'acide glutamique en position 6 par la lysine conduit à la formation d'HbC. Cette mutation est également causée par une mutation ponctuelle dans le gène HBB. L'HbC est associée à une forme d'anémie appelée hémoglobinopathie C.

Il est important de noter que différentes espèces peuvent avoir des types d'hémoglobine spécifiques. Par exemple, chez les chevaux, l'HbA est la principale forme d'hémoglobine, composée de deux chaînes alpha et de deux chaînes bêta.

Tableau I : Différentes d'hémoglobines exprimées au cours de la vie [6]

Age	Types d'hémoglobines rencontrées	Proportion des différentes hémoglobines	Chaînes de globine	Lieu de synthèse
Adulte	Hb A	97 %	$\alpha_2\beta_2$	La moelle osseuse.
	Hb A2	2,2 – 3,2 %	$\alpha_2\delta_2$	
	Hb F	< 1 %	$\alpha_2\gamma_2$	
Fœtus	Hb F	80 – 95 %	$\alpha_2\gamma_2$	Le foie et de la rate
	Hb A	5 – 20 %	$\alpha_2\beta_2$	
Embryon	Hb Gower 1		$\xi_2\varepsilon_2$	Le sac vitellin
	Hb Gower 2		$\alpha_2\varepsilon_2$	
	Hb Portland		$\xi_2\gamma_2$	

III. L'hémoglobine glyquée

III.1. Définition

L'Hb1Ac est souvent désignée sous les termes d'hémoglobine glyquée ou glycohémoglobine, qui ne sont pas des synonymes exactes par manque de précision. Le terme d' »hémoglobine glyquée » est totalement impropre et ne doit pas être utilisé ; car la glycosylation est un mécanisme enzymatique de la biosynthèse protéique, à la différence de la glycation qui est un processus non-enzymatique. [7]

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, 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 constituant les produits précoces de glycation.

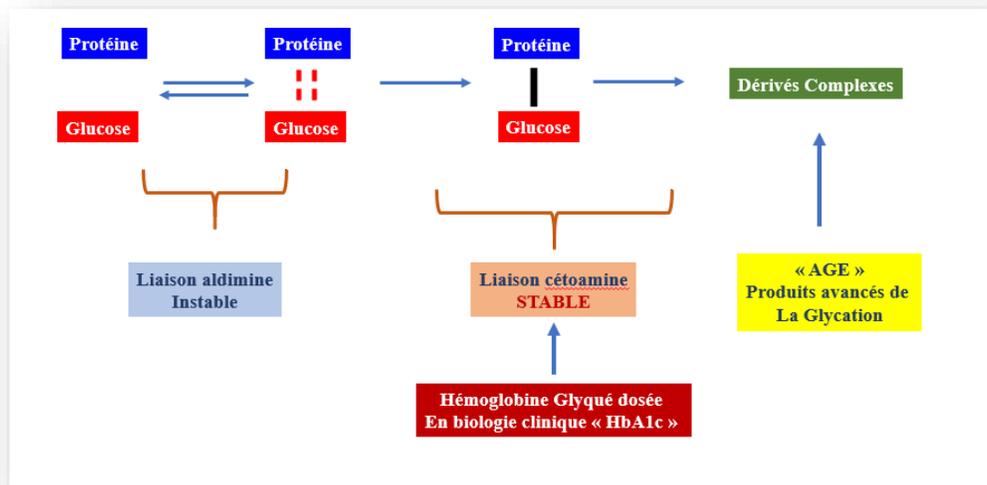


Figure 3. Etapes de formation d'une protéine glyquée (exemple de l'Hb1Ac)

L'intensité de cette glycation dépend du niveau de la glycémie, de la durée de vie de la protéine, de sa structure et de son accessibilité [8].

L'hémoglobine glyquée correspond à l'ensemble des molécules d'hémoglobine modifiées par glycation non enzymatique (Figure 4). Elle est le reflet des glycémies moyennes des 120 jours (2 à 3 mois) précédents, correspondant à la durée de vie des globules rouges. Elle n'est ni un marqueur de dépistage, ni un marqueur diagnostique du diabète ; son utilisation est actuellement réservée à la surveillance du diabète. Son résultat est exprimé en pourcentage de **l'Hb totale** et son dosage est indispensable tous les 3 mois [8].

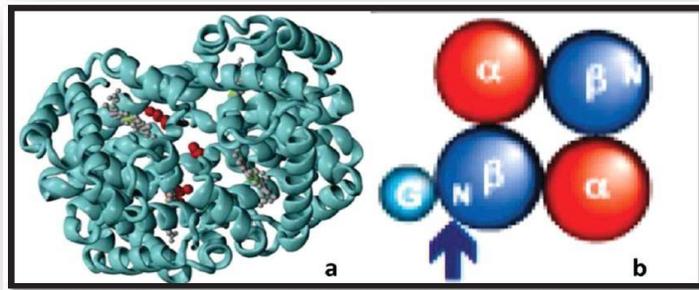


Figure 4 : L'hémoglobine glyquée : **a**: représentation schématique; **b**: structure [7].

III.2. Formation de l'HbA1c

L'HbA1c est une hémoglobine glyquée formée par la fixation d'une molécule de glucose à l'extrémité N- terminale d'au moins une chaîne bêta de l'HbA (fraction majeure des hémoglobines de l'adulte, caractérisée par une structure protéique constituée de deux chaînes alpha et de deux chaînes bêta globine). La concentration de protéines ayant subi ce mécanisme de glycation reflète donc l'équilibre glycémique et ses variations, constituant ainsi une sorte de « mémoire glycémique ».

Elle est le paramètre de référence pour le suivi des patients diabétiques [7] .

La glycation non enzymatique des protéines est un phénomène connu depuis plus de 40 ans. *In vivo*, son intensité est essentiellement déterminée par la concentration de glucose dans le sang. Elle affecte toutes

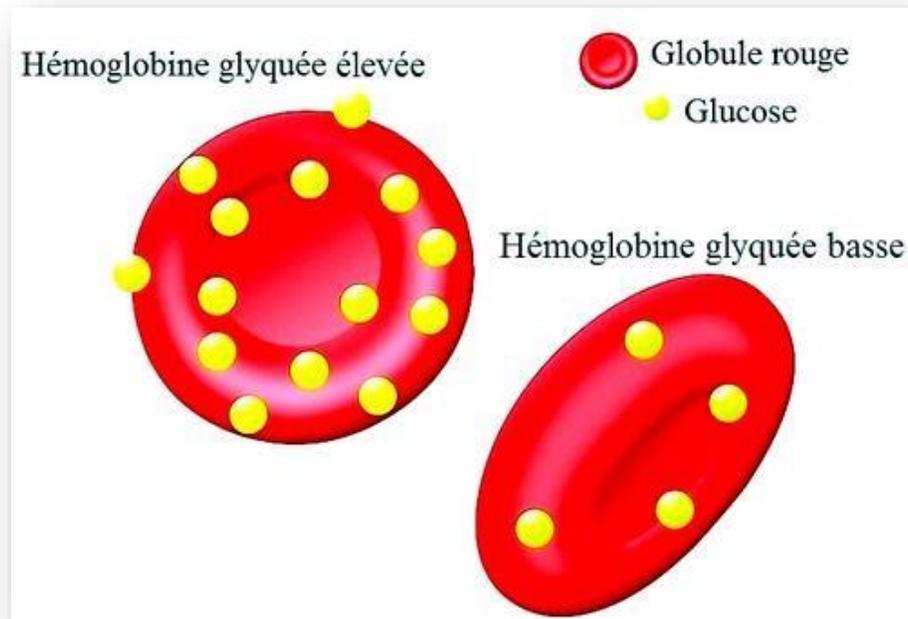


Figure 5 : Représentation schématique de la fixation de glucose sur les globules rouges [10].

les protéines, particulièrement les protéines à demi-vie longue et notamment l'hémoglobine [5]. La glycation est un phénomène physiologique lent dont la première étape réversible correspond à la formation d'une base de Schiff ou Hb glyquée labile. D'autres oses, que le glucose, peuvent se fixer et génèrent une multitude de formes glyquées de l'Hb [10].

Le site principal de glycation est l'Hb majoritaire de l'adulte, l'HbA constituée de 2 chaînes α et 2 chaînes β de globine, se situe sur la valine N-terminale de la chaîne β [9]. Cette fixation est suivie de réarrangements moléculaires conduisant à la formation de produits complexes appelés «Produits de glycation avancée» ou «Advanced Glycation End-products»(AGE) [12].

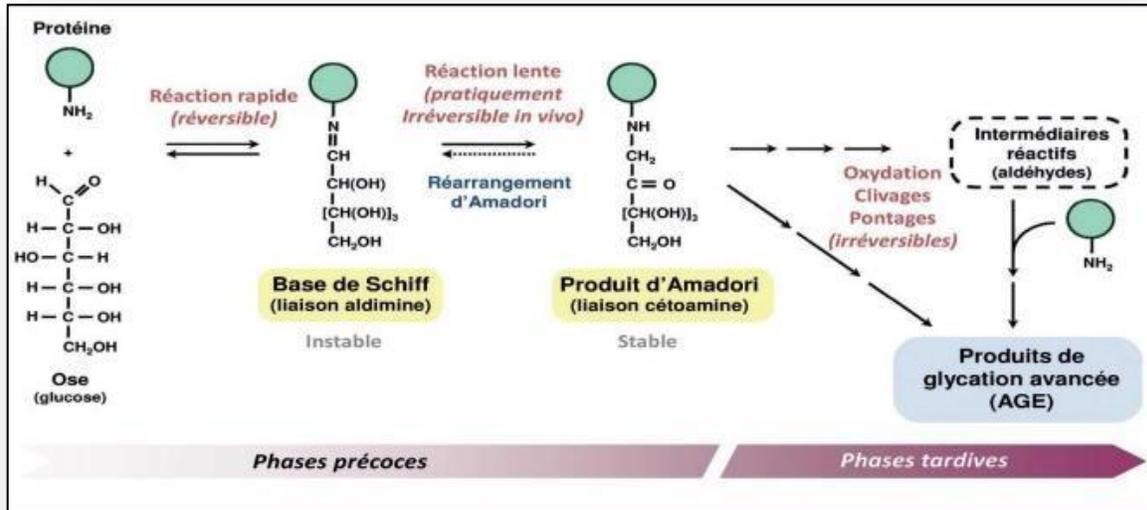


Figure 6 : Processus de glycation de l'hémoglobine [12]

Différents facteurs conditionnent les réactions de glycation : facteurs physico-chimiques (pH, température), facteurs liés aux protéines (concentration, durée de vie, 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. [13]

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 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. [14]

III.3. 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 β 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 α ou β . Même s'il existe des sites préférentiels de glycation (le plus réactif étant la valine N-terminale des chaînes β), 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 [14].

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 β . 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. La molécule d'hémoglobine est composée d'un noyau "thème" et de quatre chaînes polypeptidiques, il existe quatre types de chaînes différentes par leur composition en acides aminés (chaînes α , β , γ , δ). Leur combinaison conduit à différentes formes d'hémoglobine, cependant les hémoglobines normales contiennent toujours deux chaînes α . L'hémoglobine est donc constituée d'un mélange dont la composition moyenne est la suivante :

- **hémoglobine A (2 α 2 β) 97 % environ .**

-**hémoglobine A2 (2 α 2 β) 2,5 % environ.**

- **hémoglobine F (2 α 2 γ) :0,5% environ .**

- **Une forme majeure ou HbA0** qui comprend également de l'hémoglobine glyquée sur des sites qui ne modifient pas le phi de la molécule.

-**Plusieurs formes mineures ou "rapides"(fast hémoglobines) répertoriées sous le terme HbA1.**

Ces dernières formes correspondent à des formes glyquées de l'hémoglobine pour lesquelles la réaction de glycation s'est effectuée sur l'extrémité N-Terminale (valine) des chaînes β . La réaction de glycation, à ce niveau, modifie suffisamment les propriétés physico-chimiques (ϕ) des formes rapides (HbA1) pour permettre leur séparation par chromatographie d'échange

cationique [11]. Le terme 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, 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 pentose 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. 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 [14.15].

III.4. Signification pour la clinique :

Puisque les érythrocytes sont relativement bien perméables pour le glucose la vitesse de formation de l'HbA1c (ou hémoglobine glyquée globalement) est proportionnelle à la concentration de glucose dans le sang. La teneur en HbA1c 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 y ont un effet prépondérant [16.17] . Il y a une liaison linéaire entre l'HbA1c et le niveau moyen de glucose une variation de 1% de teneur en HbA1c correspond à une variation de concentration de glucose sérique d'environ 35 mg/dl [16].

L'hémoglobine, est une protéine de demi-vie brève, ainsi elle subira la condensation et le **rearrangement d'Amadori** pour former un produit de glycation précoce : l'hémoglobine glyquée. Ces deux étapes étant dépendantes de la glycémie, le taux d'HbA1c sera plus ou moins important suivant le niveau du diabète et la réversibilité potentielle de ces produits suivant l'évolution de la glycémie ce qui 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 de la glycémie. 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 [18.19].

Le terme **d'hémoglobine glyquée totale** est utilisé lorsque l'on considère les molécules d'hémoglobines glyquées sur tout résidu NH₂, et celui **d'hémoglobine A1** quand la fixation d'ose est localisée à l'extrémité N-terminale des chaînes B, ce qui modifie la charge des

Chapitre I Diabète, hémoglobine et hémoglobine glyquée et méthodes de dosage

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 B 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 [20.21.22].

CHAPITRE II...

Diabète sucré chez le cheval, Hb 1Ac & Insulinorésistance

I. Le diabète sucré chez le cheval :

Le diabète chez le cheval se caractérise par une perturbation du métabolisme du glucose, entraînant une hyperglycémie persistante. Cette condition résulte d'une production insuffisante d'insuline par le pancréas ou d'une résistance à l'action de l'insuline dans les tissus périphériques. L'insuline est une hormone essentielle pour réguler la glycémie, car elle permet aux cellules de capter le glucose présent dans le sang et de le convertir en énergie. La détection précoce et le diagnostic précis du diabète chez le cheval sont cruciaux pour instaurer une gestion adéquate et minimiser les complications associées. Les méthodes de diagnostic incluent des tests sanguins pour mesurer la glycémie et l'insuline, des tests de tolérance au glucose et l'évaluation des marqueurs métaboliques spécifiques. Un suivi régulier et une prise en charge appropriée, comprenant des modifications alimentaires, l'administration d'insuline si nécessaire et l'exercice physique, sont essentiels pour maintenir un contrôle glycémique optimal [23].

Plusieurs facteurs peuvent contribuer au développement du diabète chez les chevaux, notamment des prédispositions génétiques, des déséquilibres hormonaux, une obésité, une alimentation inappropriée et d'autres maladies métaboliques à savoir le syndrome métabolique équin est une maladie endocrinienne favorisée par le surpoids et le manque d'exercice chez le cheval, ce dernier devient alors résistant à l'insuline, une accumulation de glucose et d'insuline dans le sang apparaît. La principale complication mais extrêmement grave, est la fourbure.

Les symptômes courants du diabète équin comprennent une augmentation de la soif et de la miction, une perte de poids malgré un appétit normal, une diminution de la performance physique, des infections récurrentes et une guérison lente des blessures. [23].

Citons pour mémoire les cas relevés à la fin du siècle dernier qui sont les premières traces de la reconnaissance clinique du syndrome diabétique chez le Cheval. Baker en 1974 a publié une revue bibliographique recensant 11 cas dont seuls les 5 derniers furent approfondis. Depuis, Bulgin 1983 et Yovich 1984 ont rapporté 2 cas d'hyperglycémie chez des chevaux se rapprochant du syndrome "diabète sucré" [23].

I.1.Clinique :

Les premiers diagnostics cliniques ont été posés grâce à la communauté symptomatique

du diabète sucré parmi les différentes espèces.

Les symptômes les plus constants sont en effet :

- Perte de poids - fatigabilité Polyuri-polydipsie - Hyperglycémie -glucosurie.

-Par ailleurs, Yovich et al, ne parlent pas de diabète sucré mais d'hyperfonctionnement surrénalien face à un tel tableau. En effet, il s'agit d'une étude sur les pheochromocytomes au cours desquels on note très souvent une hyperglycémie associée à des troubles neuro- logiques et cardiaques [24].

Tout de même, chez les chevaux, le diabète sucré est relativement rare et se manifeste généralement par des symptômes tels qu'une augmentation de la soif, de la miction et de l'appétit, ainsi que par une perte de poids. Le diagnostic du diabète sucré chez les chevaux est généralement basé sur des tests sanguins de glucose et d'insuline, ainsi que sur des évaluations cliniques des symptômes. [25].

En outre, L'HbA1c, ou hémoglobine glyquée, est une mesure utilisée pour évaluer le contrôle du glucose sanguin chez les humains atteints de diabète sucré. Cependant, cette mesure n'est généralement pas utilisée chez les chevaux pour évaluer leur glycémie, on peut recommander des tests spécifiques tel que le test de tolérance au glucose, et développer un plan de traitement approprié, qui peut inclure des modifications alimentaires, des médicaments et d'autres mesures pour contrôler la glycémie, cette mesure est moins couramment utilisée que chez les humains pour évaluer le contrôle du glucose. [26].

II. Particularité de l'Hb1Ac du cheval :

Chez les chevaux, l'HbA1c est généralement utilisée dans le cadre de la recherche et des études cliniques pour évaluer l'équilibre glycémique à long terme. Cependant, il n'existe pas de valeurs de référence bien établies pour l'HbA1c chez les chevaux, contrairement aux humains où une valeur normale est généralement inférieure à 6,5%. [25].

La principale raison pour laquelle l'HbA1c n'est pas largement utilisée chez les chevaux est

que leur métabolisme du glucose diffère de celui des humains. Les chevaux sont des animaux herbivores qui ont un système digestif spécialisé pour traiter les aliments riches en fibres, tels que l'herbe et le foin. Leur métabolisme est adapté à un régime alimentaire à base de fibres et ils ont des variations normales de la glycémie tout au long de la journée. [25].

L'HbA1c (hémoglobine glyquée) est utilisée pour évaluer le contrôle glycémique chez les humains atteints de diabète sucré. Cependant, l'utilisation spécifique de l'HbA1c chez les chevaux est relativement limitée. L'HbA1c n'est pas couramment mesurée dans la pratique vétérinaire, notamment en raison de certaines différences métaboliques entre les humains et les chevaux. [27].

Chez les humains, l'HbA1c est formée lorsque l'hémoglobine se lie de manière irréversible au glucose circulant dans le sang. La mesure de l'HbA1c reflète ainsi les niveaux de glucose moyens sur une période de plusieurs semaines à plusieurs mois. Cependant, chez les chevaux, la formation d'HbA1c est différente en raison de certaines particularités métaboliques. Les chevaux ont une concentration d'hémoglobine plus élevée que les humains, et leur hémoglobine présente une affinité relativement faible pour le glucose. Par conséquent, les chevaux ont naturellement des niveaux d'HbA1c beaucoup plus bas que les humains, ce qui rend difficile son utilisation comme marqueur fiable du contrôle glycémique chez cette espèce.

Dans la pratique vétérinaire, d'autres tests sont généralement utilisés pour évaluer la glycémie chez les chevaux, tels que la mesure directe de la glycémie à l'aide d'un glucomètre, des tests de tolérance au glucose ou des profils de glycémie sérielle. Ces tests permettent d'obtenir des informations plus précises sur le métabolisme glucidique chez les chevaux.

Il est important de noter que les connaissances et les pratiques vétérinaires évoluent constamment. Par conséquent, il est toujours judicieux de se référer à des sources spécialisées, à des études scientifiques récentes et à des recommandations émanant d'organisations vétérinaires pour obtenir les informations les plus à jour sur l'utilisation de l'HbA1c et d'autres marqueurs glycémiques chez les chevaux. [27].

Aussi il est important de noter que les chevaux peuvent également être sujets à d'autres affections métaboliques telles que le syndrome métabolique équin (SME) ou l'insulinorésistance, qui peuvent être liées à l'alimentation et à d'autres facteurs. Ces conditions

peuvent nécessiter une évaluation spécifique de la glycémie et de l'insuline, ainsi qu'une gestion adaptée de l'alimentation et des soins vétérinaires [28].

III. Insulinorésistance chez le cheval :

L'insulinorésistance est un trouble métabolique courant chez les chevaux qui se caractérise par une diminution de la réponse des cellules à l'insuline, une hormone responsable de la régulation de la glycémie. Lorsque les cellules deviennent résistantes à l'insuline, elles ne peuvent pas absorber efficacement le glucose de la circulation sanguine, ce qui entraîne une hyperglycémie (taux élevé de glucose dans le sang) [29].

L'insulinorésistance chez le cheval est souvent associée à l'obésité ou à un excès de graisse corporelle. Cependant, tous les chevaux en surpoids ne développent pas nécessairement une insulinorésistance, et certains chevaux minces peuvent également en souffrir. La race, l'âge, le régime alimentaire et le niveau d'activité physique peuvent également influencer la prédisposition d'un cheval à développer ce trouble. [29].

Les symptômes courants de l'insulinorésistance chez le cheval incluent :

1. Prise de poids excessive ou difficulté à perdre du poids malgré un régime restreint.
2. Accumulation de graisse anormale, en particulier autour du cou, de l'encolure, de la croupe et de la base de la queue.
3. Augmentation de l'appétit et des fringales.
4. Fatigue et intolérance à l'exercice.
5. Augmentation de la susceptibilité aux infections de la peau, aux fourbures et aux problèmes de pieds.
6. Altérations du cycle de reproduction chez les juments. [30].

Le diagnostic de l'insulinorésistance chez le cheval repose généralement sur des tests sanguins, notamment des mesures de la glycémie à jeun et des taux d'insuline. Un test appelé test de tolérance au glucose oral peut également être utilisé pour évaluer la réponse du cheval à une charge de glucose. La gestion de l'insulinorésistance chez le cheval implique généralement des modifications du régime alimentaire et de l'exercice physique. Les chevaux atteints d'insulinorésistance doivent être maintenus à un poids corporel approprié et recevoir une

alimentation pauvre en sucres et en amidon. Cela signifie généralement limiter ou éliminer l'accès à l'herbe riche en sucres, aux aliments concentrés riches en céréales et aux friandises sucrées. L'exercice régulier est également important pour améliorer la sensibilité à l'insuline et favoriser la perte de poids. Les chevaux atteints d'insulinorésistance doivent être progressivement introduits dans un programme d'exercice adapté à leur niveau de condition physique actuel. [31].

CHAPITRE III...

Méthodes de dosage de l'hémoglobine glyquée

I. Méthodes de dosage

I.1.Méthodes dosant l'hémoglobine glyquée totale :

I.1.1.Chromatographie d'affinité :

Les groupements 1-2 cis-diol des molécules d'hexoses fixées sur l'hémoglobine forment un complexe avec l'acide phénylboronique immobilisé sur une matrice d'agarose. Une première solution tampon élué la fraction non glyquée, une deuxième solution contenant du sorbitol ou de l'acide citrique élué la fraction glyquée fixée sur la colonne. Ces techniques peuvent être sensibles à la concentration du ligand d'un lot de colonne à l'autre. Seules les hémoglobines normales ou anormales ayant fixées irréversiblement le glucose sont dosées, la fraction labile d' Hb n'interférant pas. La température et les hémoglobines carbamylées ou acé-tylées sont sans influence [32].

Cette méthode a été appliquée à des techniques automatisées telles que méthode de la chromatographie liquide à haute pression par échange ionique cationique (HPLC). Après hémolyse du sang,l'Hb glyquée est fixée sur un réactif d'affinité polyanionique, puis le complexe est capté par une matrice cationique. Les résultats sont corrigés par rapport à une courbe d'étalonnage mémorisée qui a été titrée en HbA1c par une méthode de la chromatographie (HPLC). Ces techniques qui dosent l'hémoglobine glyquée totale, fournissent des résultats corrigés exprimés en HbA1c [33].

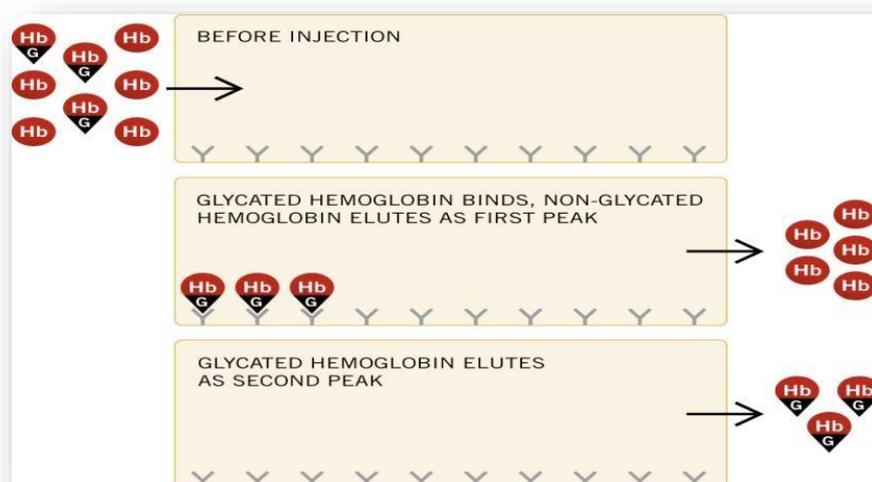


Figure 07 : Principe de base de la technique la chromatographie liquide à haute pression par échange ionique cationique (HPLC).

I.1.1.1. Avantages et inconvénients de la méthode de la chromatographie liquide à haute pression par échange ionique cationique (HPLC) :

L'avantage majeur de cette technique est l'absence d'interférence à savoir :

- De la fraction labile.
- De la température.
- De l'hémoglobine carbamylée.
- De l'hémoglobine acétylée.

Par ailleurs, cette technique ne manque pas d'inconvénients, entre autre qu'il ne présente pas de détection des hémoglobines de structures anormales.

I.1.1.2.Méthodes dosant spécifiquement l'HbA1c :

I.1.1.2.1. Méthodes immunologiques :

Les anticorps monoclonaux ou poly clonaux anti-HbA1c utilisés sont spécifiques à la liaison du glucose avec l'extrémité N terminale de la chaîne β .

Différents systèmes sont commercialisés :

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

La spécificité de ces méthodes dépend de l'épitope reconnu qu'il convient de connaître pour déterminer leurs limites d'utilisation. Les fractions d'hémoglobines labiles ou modifiées ne sont pas dosées, mais les hémoglobines anormales et leurs dérivées glyquées peuvent ou non être pris en compte en fonction de la séquence glyquée reconnue et de sa longueur. En cas de présence d'une HbF ou d'une Hb anormale, la glycation de ces formes n'étant pas reconnue, il s'en suit des résultats par défaut puisque le dosage de l'hémoglobine totale inclut des formes non glyquées. Ce type de méthode ne permet pas d'identifier les hémoglobines anormales. [34]

I.1.1.2.2. Chromatographie d'échange d'ions :

La séparation est fondée sur le fait que la charge nette des hémoglobines glyquées sur l'extrémité N-terminale des chaînes α est plus négative que celle de l'HbA₀, à pH neutre. Cette méthode a été mise au point par Trivelli en 1971. L'hémolysât est déposé sur une colonne remplie de résines chargées négativement. On élue d'abord les hémoglobines rapides : HbA_{1a}, HbA_{1b}, HbA_{1c} puis la fraction principale HbA₀.

Le pourcentage de ces différentes fractions est déterminé par mesure spectrophotométrique [35].

Cette méthode est utilisée dans différentes techniques :

- **Mini colonnes remplies de résines échangeuses d'ions pour les techniques manuelles.**
- **Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) :** De nombreux appareils de CLHP spécialisés pour le dosage de l'HbA_{1c} sont commercialisés. Ils utilisent une colonne d'échange ionique et permettent un dosage automatisé.
- **Chromatographie Liquide Basse Pression (CLBP) :** Des systèmes automatisés de CLBP ont également été proposés par différents industriels. D'utilisation réputée moins coûteuse, ces appareils doivent fournir une bonne séparation HbF/HbA_{1c} [36].

Partie Expérimentale...

Afin d'étudier le diabète chez le cheval, nous avons adopté de travailler sur un paramètre biochimique spécifique qui est le reflet de la glycémie, c'est l'hémoglobine glyquée « Hb1Ac », qui est l'indicateur de la quantité de glucose fixé sur les globules rouges.

Pour réaliser notre partie expérimentale, nous avons travailler sur le Club Equestre Sonatrach de Bordj-El Bahri à Alger, situé sur le Nord-Est d'Alger ; comme mentionné sur la figure.



Figure 08. La localisation géographique du Club Equestre de Bordj El Bahri

I. Matériel & méthodes :

Ce club comprend **47 chevaux** d'âge, sexe et races différents, ces chevaux sont élevés en stabulation en boxes séparés, donc chaque cheval est mis dans son propre box. La ration alimentaire est adaptée en fonction de l'âge, race, efforts physique et l'état général du cheval.

Chaque cheval est consulté régulièrement par le vétérinaire du club équestre pour contrôler l'état de santé de chaque cheval, allant de l'examen général de l'appareil locomoteur, l'auscultation cardio-respiratoire, et aussi l'examen des muqueuses conjonctivales ayant pour objectif de contrôler l'état anémique du cheval. Les chevaux diagnostiqués malades reçoivent

leurs traitements individuellement dans leurs boxes et ils restent sous surveillance jusqu'à leurs guérisons.

Par ailleurs, les chevaux sont faits sortir de leurs boxes dans un terrain d'entraînement par leurs propriétaires ou le personnel du club, cette étape permet aussi d'examiner les chevaux pendant leur entraînement afin de déceler les pathologies locomotrices ou autres.

II.La sélection animale et critères d'inclusion :

Au total, **20 chevaux** ont été inclus dans notre étude, les renseignements relatifs à chaque cheval sont mentionnés dans le tableau. Nous avons sélectionné les chevaux sains sans antécédents pathologiques récentes déclarées, dont la tranche d'âge est entre **5 à 23** ans. Le critère de sélection « Age » est capital dans notre étude car seuls les sujets âgés peuvent développer un diabète où la dysrégulation métabolique des glucides peut avoir lieu.

Tableau 02. Fiche de renseignement des chevaux inclus dans l'étude.

NUM	NOM	AGE	RACE	SEXE	ROBE
001	FAYROUZ	5 ANS	ARABE BARBE	F	BAI
002	AIDA	12 ANS	CHEVAL DE SELLE	F	BAI
003	UTIQUE	17 ANS	PURSANG ARABE	F	ALEZAN
004	WARDA	5 ANS	CHEVAL DE SELLE	F	ALEZAN
005	NADOR	4 ANS	ARABE BARBE	M	BAI
006	NEMS	9 ANS	ARABE BARBE	M	GRISPOMMELE
007	GAMIL	23 ANS	ARABE BARBE	M castré	BAI
008	LIZA	8 ANS	ARABE BARBE	F	BAI BRUNFONCE
009	MONTASSIRA	8 ANS	PURSANG ARABE	F	BAI
010	USHI	15 ANS	CHEVAL DE SELLE	F	GRIS
011	DJANET	6 ANS	ARABE BARBE	F	GRIS
012	VAMPIO2	13 ANS	CHEVAL DE SELLE	M	BAI
013	DERMI	15 ANS	ARABE BARBE	M	ALEZAN
014	ULYSE	15 ANS	S-FR	M	ALEZAN
015	GHADA	23 ANS	PURSANG ARABE	F	ALEZAN
016	HAMIDA	22 ANS	PURSANG ARABE	F	GRIS

017	THAWRA	16 ANS	CHEVAL DE SELLE	F	GRIS
018	ZAHRA	8 ANS	ARABE	F	ALEZAN BRULE
019	AMIRA	4 ANS	CHEVAL DE SELLE	F	GRIS SOURIS
020	VEGA	13 ANS	CHEVAL DE SELLE	F	GRIS

III.Période expérimentale :

Notre étude expérimentale s'est étalée entre **le 21 Février 2023** et **le 14 Juin 2023**. Après avoir nous accordé l'accès de part de la direction du club équestre de Bordj EL Bahri, nous avons commencé notre étude par des visites régulières au club équestre afin de pouvoir observer et connaître le mode d'élevage, le rationnement alimentaire et aussi le profil de santé de chaque cheval afin de pouvoir sélectionner les chevaux vouloir inclure dans notre étude. Les prélèvements sanguins ont été réalisés **le 14 Juin 2023**.

IV.Prise de sang et méthodes de conservation :

Après une bonne contention du cheval par un tord-nez, et une bonne désinfection du sillon jugulaire par un coton imbibé par de l'alcool chirurgical, la prise de sang est effectuée par ponction de la veine jugulaire au moyen d'une aiguille luer-lock montée sur un adaptateur dans lequel est inséré un tube sous-vide Vacutainer (VACUETTE®) qui contient de l'héparine (Tube hépariné).

Un garrot est exercé au niveau de la base du cou. La veine jugulaire se remplit de sang et devient de ce fait turgescente et facile à ponctionner. Une fois l'aiguille est introduite dans la veine, le tube est monté dans l'adaptateur et le sang est aspiré sous l'effet de la pression négative des tubes VACUETTE®. Ensuite, le tube est directement identifié.



Figure 09: Prise de sang après ponction jugulaire. (Clichés personnels)

A l'issue de cette étape, vient celle de dosage de la Hb1Ac, de ce fait les prélèvements obtenus sont mis dans une glacière à environ $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ et acheminés au laboratoire d'analyses médicales de Dr Slimani Idir situé dans la commune de Bechdjerrah à Alger.

V.Enregistrement des échantillons :

Une fois arrivé au laboratoire, les tubes de prélèvements effectués sont enregistrés dans la plate-forme numérique de laboratoire, ainsi chaque échantillon a une étiquette code barre qui lui permet d'être suivi et contrôlé au cours de différentes étapes de la méthode de dosage utilisée. Chaque étiquette est collée sur le long de tube correspondant de sorte que la lecture du code barre sera possible.



Figure 10 : Enregistrement des échantillons et leurs identifications par le code à barre.

(Clichés personnels)

VI. Analyse et dosage de l'Hb 1Ac :

Afin de pouvoir doser la fraction spécifique de l'Hb1 Ac, nous avons utilisé un analyseur Hb 1Ac automatique HLC® -723G8. Cet automate est un système de chromatographie liquide basée sur l'échange des ions de performance automatisée et haute conçu pour mesurer Hb1 Ac avec précision et rapidité.

Chez l'humain, il est généralement connu que l'HbA1c (glyco-hémoglobine) est regroupée en catégories A1a, A1b, L-A1c et sA1c selon le type de glucose ainsi combiné. La mesure de l'HbA1c est largement utilisée aujourd'hui comme indice pour les tests de dépistage du diabète et également comme indice thérapeutique pour le contrôle glycémique à long terme du diabète sucré.



Figure 11 : Analyseur HbA1c automatique HLC®-723G8

VI.1. Description de l'analyseur

Comme l'indique son nom, le G8 constitue la huitième génération d'automates développés par Tosoh Bioscience pour la détermination de l'HbA1c. Il se présente sous un format encore plus compact que les appareils l'ayant précédé (**h: 482 mm, l: 530 mm, p: 515 mm**). Auto- mate de paillasse, cet analyseur nécessite simplement une alimentation électrique, le recueil des déchets se faisant dans un récipient fourni. La programmation se fait par l'intermédiaire d'un écran tactile. Les données peuvent être stockées sur le disque dur ou sur un support mémoire amovible, une smart card. L'analyseur peut également être connecté à un PC indépendant équipé du **logiciel PIANO** afin d'assurer une traçabilité de tous les résultats, chromatogrammes inclus. Ce logiciel permet notamment de rechercher l'historique d'un patient ou d'un contrôle qualité, de **tracer les résultats sous forme graphique**, ou encore de superposer des chromatogrammes afin de faciliter leur interprétation.

Les échantillons sont reconnus et identifiés par un lecteur de code barre susceptible de lire jusqu'à **15 digits**. La séparation se fait en **96 secondes** au terme desquelles les chromatogrammes (**figure 1**,) sont imprimés sur un papier thermosensible sur le G8 ou en format A4 sur l'imprimante reliée à

l'ordinateur sur lequel est installé le logiciel PIANO. Les résultats peuvent être obtenus avec une ou deux décimales.

VI.2.Colonne et réactifs

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

VI.3.La mise en place des échantillons dans l'automate G8 :

Une fois l'automate est lié au courant électrique, l'écran s'allume nous donnant ainsi la main de mettre en place nos échantillons.

Nous commençons par mettre les échantillons par ordre dans un portoire adéquat de l'automate, puis on fixe le portoire sur une raille d'insertion de l'automate afin de s'assurer que le portoire est bien placé on entend un clic. Une fois le portoire est mise en place on appuie sur le bouton start sur l'écran tactile et on attend quelques minutes pour avoir les résultats.

Au fur et à mesure que Les échantillons sont reconnus et identifiés par un lecteur de code barre, les résultats sous forme graphique sortent de le G8 imprimés sur un papier thermosensible. Ces graphes sont caractérisés par des pics, chacun reflète une fraction spécifique de l'hémoglobine glyquée, à savoir ; **FP, A1A, A1B, F, LA, 1C+, SA1C, AO**. Seule la fraction correspondante à l'**Hb 1Ac** est SA1C, donc c'est la valeur de cette fraction qui va être transmise à l'ordinateur et donner à la fin la valeur exacte de l'HbA1c en mmol/mol.

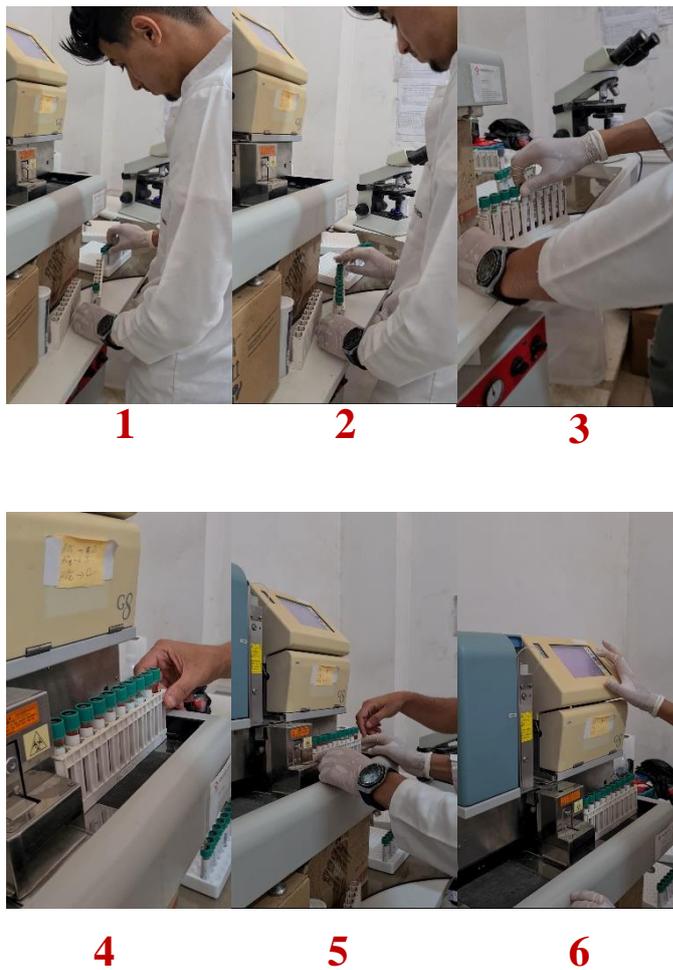


Figure 12 : Préparation et mise en place des tubes héparinés dans
L'automate G8.

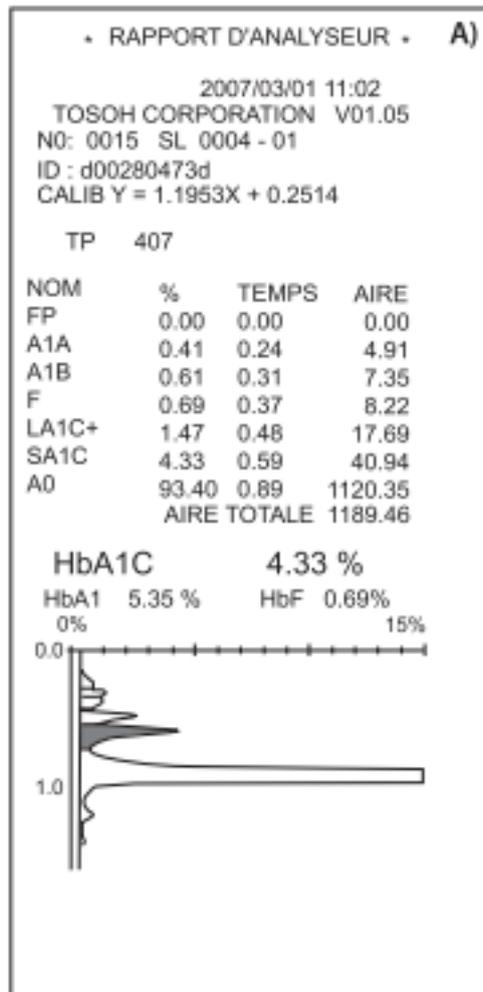


Figure 13. Impression des résultats sur un analyseur Hb 1Ac automatique HLC® - 723G8.

Résultats

&

Discussion

Résultats & Discussion

I.Résultats :

Notre étude vise à mesurer le taux de l'HB 1Ac comme un indicateur du diabète sucré chez le cheval. Pour ce fait, nous avons réalisé notre partie expérimentale sur un Club Equestre de SONATRACH Bordj EL BAHRI à Alger. Un total de **20 chevaux** a été inclus dans notre étude d'où nous avons prélevé du sang jugulaire dans un tube hépariné, les échantillons ont été analysé par un analyseur Hb 1Ac automatique HLC® -723G8.

Sur un total de **20 échantillons de sang total** (hépariné), ont été analysé par un analyseur **G8**.

A la fin de chaque cycle relatif à chaque échantillon, le résultat imprimé sur un papier photosensible fournit des graphes en pics différents dont chacun correspond à une fraction précise de l'hémoglobine glyquée précédés par des pourcentages de chaque fraction.

Nous avons constaté que tous les échantillons ont donné un pic faible voire aplati de la fraction **SA1C** qui correspond à celle de **l'Hb A1c** ayant un pourcentage **0.00%** pour les 20 échantillons sanguins, comme se figure dans les clichés suivants :

Résultats & Discussion

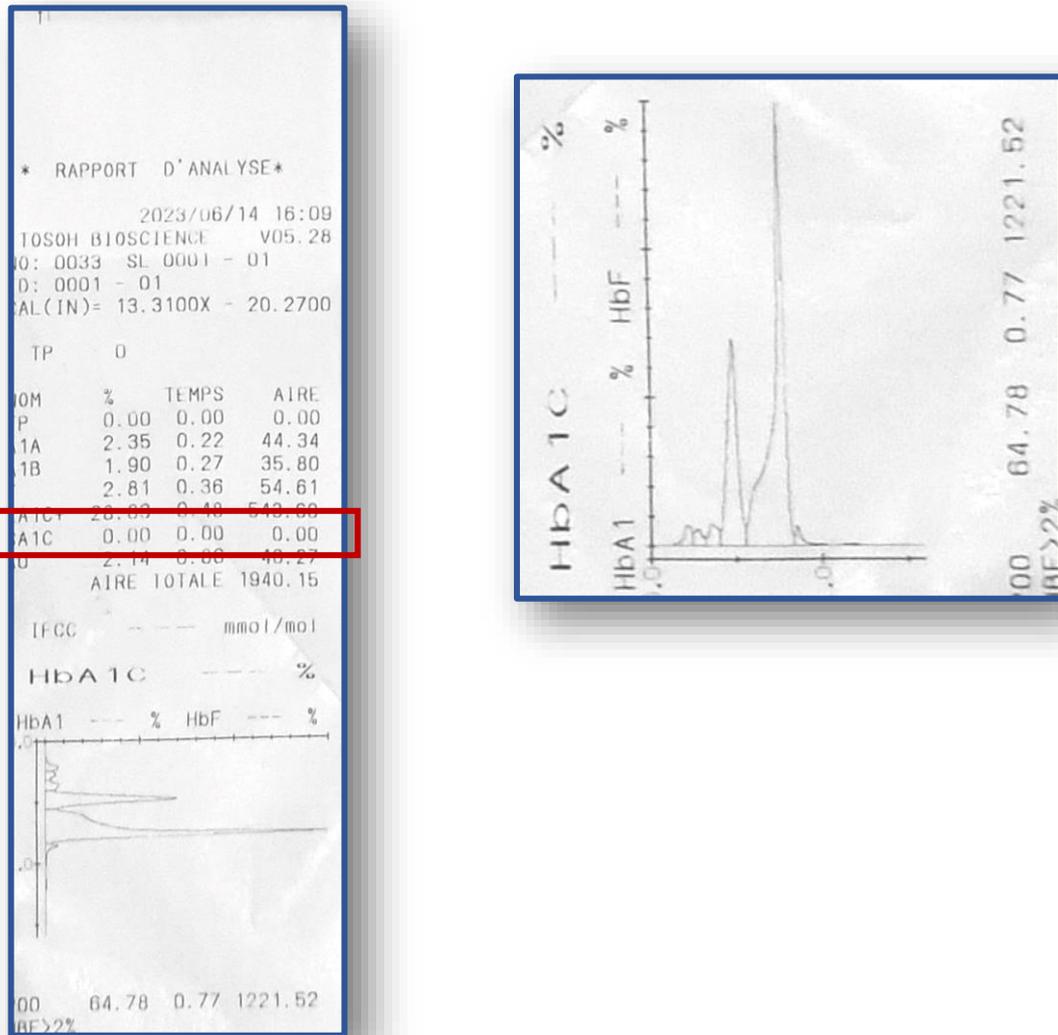


Figure 14 : Résultat montrant l'absence de la fraction **SA1c** relative à la fraction **Hb1Ac**, en pourcentage et graphe aplati.

Par ailleurs, nous avons conclu que les autres fractions de l'hémoglobine glyquée peuvent donner des chiffres et tracer des graphes variables d'un échantillon à autre, comme illustré sur la figure suivante :

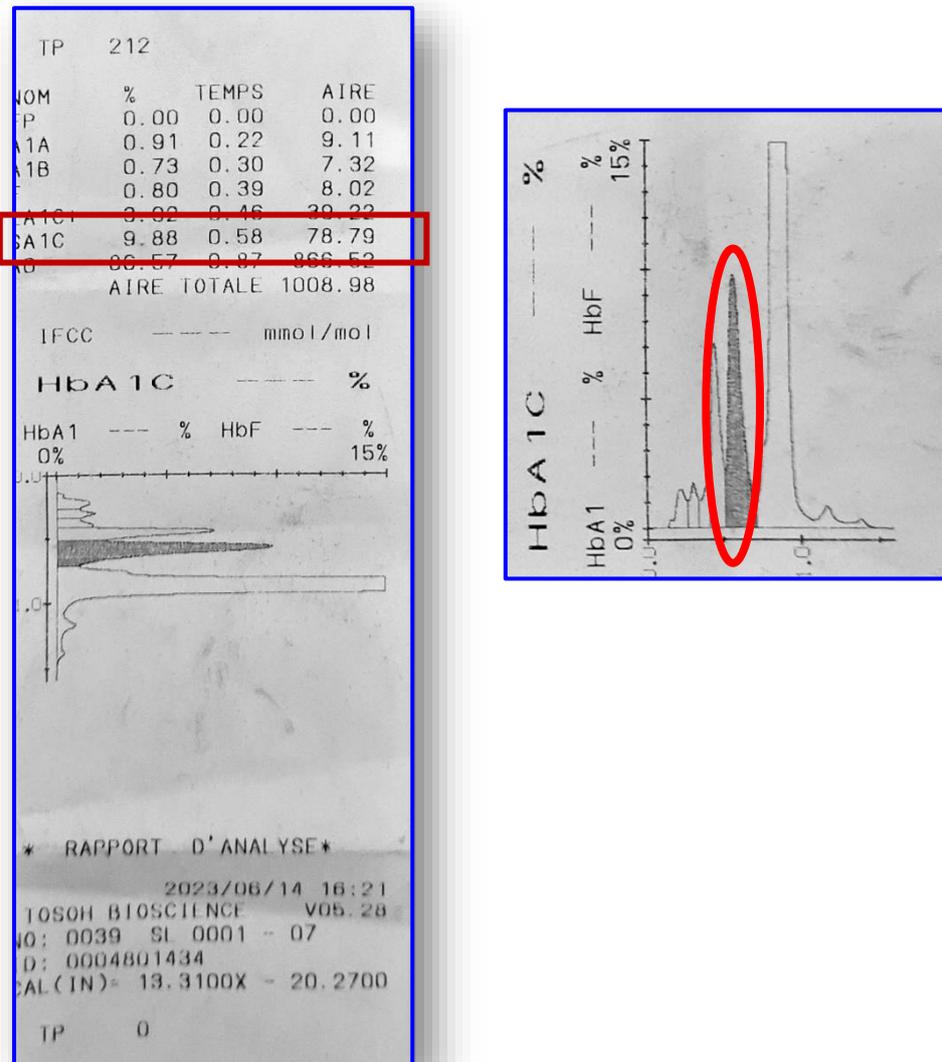
Résultats & Discussion



Figure 15 : Résultat montrant la présence des différentes fractions de l'hémoglobine glyquée, en pourcentage et en chiffre.

Résultats & Discussion

D'autre part, et pour avoir une vision comparative avec un résultat positif donnant un pourcentage de la fraction SA1c relative la fraction Hb1Ac, et aussi traçant un graphe typique de cette fraction, nous avons utilisé un témoin Positif provenant d'un sujet humain diabétique, le résultat obtenu est comme suit :



Résultats & Discussion

Suite à cette comparaison entre un échantillon témoin positif humain à une fraction Hb1Ac positive et nos échantillons sanguins des chevaux qui sont revenus tous négatifs et sans graphes, on peut en déduire que l'analyseur Hb 1Ac automatique HLC® -723G8 a été conçu pour doser des fractions précises de l'Hb1Ac ayant une structure bien définie et un poids moléculaire adéquat. Le cas des échantillons sanguins des chevaux nous laisse à supposer que la fraction Hb1Ac des chevaux ne peut être mesurer par cet analyseur Hb 1Ac automatique HLC® -723G8.

Résultats & Discussion

II. Discussion :

A l'issue de notre analyse par l'automate cité au-dessus, nous avons constaté que les chiffres donnés et les graphes tracés relatifs à la fraction **SA1Ac** (**Hb1Ac**) sont indétectables donnant ainsi un pourcentage de 00.00% pour la fraction SA1Ac et un graphe aplati qui a rendu incalculable la valeur de la fraction HB 1Ac par l'automate G8. Tout de même et pour confirmer ces résultats, nous avons analysé un échantillon sanguin humain diabétique comme un témoin positif sur le même automate ; ce dernier a donné un résultat chiffré et un graphe explicatif comme est montré dans la figure 16.

Il faut savoir que L'HbA1c, ou hémoglobine glyquée, est une mesure utilisée pour évaluer le contrôle du glucose sanguin chez les humains atteints de diabète sucré. Cependant, cette mesure n'est généralement pas utilisée chez les chevaux pour évaluer leur glycémie, on peut recommander des tests spécifiques et développer un plan de traitement approprié, qui peut inclure des modifications alimentaires, des médicaments et d'autres mesures pour contrôler la glycémie.

Nos résultats concordent avec les données de la littérature où ils considèrent le dosage de l'Hb1Ac comme un indicateur non-spécifique pour diagnostiquer le diabète sucré chez le cheval, tandis qu'elle est généralement utilisée dans le cadre de la recherche et des études cliniques pour évaluer l'équilibre glycémique à long terme. Par conséquent, il n'existe pas de valeurs de référence bien établies pour l'HbA1c chez les chevaux. Ce dernier est du au métabolisme des chevaux est adapté à un régime alimentaire à base de fibres d'où une glycémie presque normale le long de la journée. Chez les chevaux, nous observons que la formation d'HbA1c est différente due à une concentration d'hémoglobine plus élevée, ainsi leur hémoglobine présente une affinité relativement faible pour le glucose. Pour cette raison, les chevaux ont naturellement des niveaux d'HbA1c beaucoup plus bas que les humains, ce qui rend difficile son utilisation comme un marqueur fiable du contrôle glycémique chez cette espèce.

Nous pouvons constater aussi que même d'autres paramètres comme l'âge, sexe, et race du cheval ; n'ont eu aucune influence sur le dosage de la fraction Hb1Ac des chevaux inclus dans cette étude.

Résultats & Discussion

La différence structurale entre l'HbA1c de l'homme et celle du cheval réside dans leurs sous-unités d'hémoglobine. L'hémoglobine est composée de quatre sous-unités, chacune contenant un polypeptide appelé globine et un groupe hème qui contient un atome de fer. Toutefois, chez l'homme, l'HbA1c est principalement constituée de deux types de sous-unités : deux sous-unités alpha (α) et deux sous-unités bêta (β). La glycation se produit principalement sur les résidus d'acides aminés spécifiques situés sur les sous-unités bêta de l'hémoglobine. Tandis que chez le cheval, l'hémoglobine est constituée de différentes sous-unités. L'hémoglobine dominante chez le cheval est appelée hémoglobine A (HbA), qui est composée de deux sous-unités alpha (α) et de deux sous-unités bêta (β) similaires à celles de l'homme. Cependant, le cheval possède également d'autres types d'hémoglobine, tels que l'hémoglobine F (HbF) et l'hémoglobine A1 (HbA1), qui peuvent varier dans leurs compositions structurales.

En raison de ces différences structurales, il est important de noter que les méthodes de mesure et d'interprétation de l'HbA1c peuvent varier entre les espèces. Les tests de dépistage de l'HbA1c sont spécifiquement développés et validés pour chaque espèce, afin de garantir des résultats précis et significatifs pour l'évaluation du contrôle glycémique.

CONCLUSION

&

PERSPECTIVES

Conclusion & Perspectives

En conclusion de notre étude menée sur 20 chevaux du club équestre SONATRACH de Bordj El Bahri-Alger-, ayant pour objectif d'évaluer la fiabilité du dosage de l'Hb1Ac chez le cheval ; nous avons pu constater que le dosage de la fraction Hb1Ac chez le cheval n'a pas un intérêt diagnostique du diabète sucré chez cette espèce.

L'hémoglobine Glyquée (HbA1c) est un paramètre essentiel pour évaluer le contrôle glycémique à long terme et faciliter la gestion du diabète . Bien que les recherches sur l'HbA1c chez le cheval soient encore limitées, son utilisation offre de grandes perspectives pour améliorer le diagnostic précoce, le suivi et l'évaluation de l'efficacité des traitements.

D'autre part, l'utilisation d'un analyseur Hb 1Ac automatique HLC® -723G8 nous a pas permis de doser la fraction Hb1Ac chez le cheval et ceci est du à la différence des unités structurales des fraction de l'hémoglobine glyquée entre l'Homme et le cheval.

La recherche continue dans ce domaine est cruciale pour mieux comprendre les variations de l'HbA1c chez les chevaux en fonction des différentes conditions physiologiques et pathologiques. Cela permettra de développer des méthodes de dosage spécifiques pour les chevaux, ainsi que d'établir des normes de référence adaptées à cette espèce.

Comme perspectives de notre étude, nous souhaiterons élargir cette étude sur d'autre espèces animales en utilisant la même méthode chromatographique à échange d'ions automatisée au biais de l'analyseur Hb 1Ac automatique HLC® -723G8, afin de connaître la compatibilité entre la structure de la fraction Hb1Ac humaine et celle des autres espèces animales et la fiabilité de dosage de la fraction Hb1Ac chez d'autres espèces animales.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

1. American Diabetes Association. (2008) Standards of Medical Care in Diabetes; Diabetes; 31 (1); S12-S54.
2. Bertin, F. R. (2017). Clinical signs and diagnosis of insulin dysregulation in horses. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 33(2), 265-279. doi: 10.1016/j.cveq.2017.02.007.
3. C Marzullo et M Minery. Évaluation de l'analyseur D10® pour le dosage de l'hémoglobine A1C. In : *Annales de Biologie Clinique*. 2008. p. 95-99.
4. DB Sacks., Carbohydrates. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. *Textbook of clinical*.
5. 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.
6. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. American diabetes association. *Diabetes Care* 2011;34 (Suppl. 1):S62-9.
7. DM Nathan, J Kuenen, R Borg, H Zheng, et al. Translating the A1C assay into estimated average glucose values. *Diabetes Care*. 2008; 31: 1473–8.
8. Durham, A. E., Frank, N., McGowan, C. M., Menzies-Gow, N. J., Roelfsema, E., & Vervuert, I. (2019). ECEIM consensus statement on equine metabolic syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(2), 335-349. doi: 10.1111/jvim.15437.
9. Équilibre, n°310, septembre-octobre 2010, Hémoglobine glyquée ou HbA1c.
10. Frank, N., & Tadros, E. M. (2014). Insulin dysregulation. *Equine Veterinary Journal*, 46(2), 103-112. doi: 10.1111/evj.12192.
11. Gerlo E., 2003 La détermination de l'hémoglobine A1c *Revue Folia diagnostica* 12 année. Pages 38.
12. Gerlo E., 2003 La détermination de l'hémoglobine A1c. *Revue Folia diagnostica* 12 année Pages 33-34.
13. Gillery P. 2001 Faut-il délocaliser les dosages d'hémoglobine glyquée *Annales de Biologie Clinique*, Volume 59, Numéro 1, Pages 8-9.
14. Gillery P., 2001 L'HbA1c une protéine "glyquée" Fiche technique UniBioReims CHU de Reims - Laboratoire de Biochimie.
15. Gillery P. – L'hémoglobine A1c. – *Biotribune* 2002 ; No 2 : p. 23.
16. 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.

Références Bibliographiques

17. Gillery P., Vassault A., Kindermans C., Robert J.-J., Hémoglobines glyquées, Cahier de formation Biologie médicale n° 8: Hémoglobines glyquées et lipides. Bioforma, Paris, 1997 :11-38.
18. Johnson, P. J. (2010). The equine metabolic syndrome peripheral Cushing's syndrome. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 26(2), 215-224. doi: 10.1016/j.cveq.2010.03.002.
19. Marca M C., Loste A., 2000 Blood glycated hemoglobin evaluation in sick dogs *Canadian Journal of Veterinary Research* Volume 64 Page141.
20. MF Rossier. Nature et dosage de l'HbA1c Formation ICHV ; 2014.
21. MONNIER L., COLLETE C. (2017). Discordance entre l.Hba1c et résultat de l.auto surveillance glycémique. Elsevier Masson.
22. Nathan, D. M., Kuenen, J., Borg, R., Zheng, H., Schoenfeld, D., & Heine, R. J. (2008). Translating the A1C assay into estimated average glucose values. *Diabetes Care*, 31(8), 1473-1478. doi: 10.2337/dc08-0545.
23. PARISI, J-M. 2001 Réaction de Maillard Chimie et gastronomie Manuel de Chimie 1 S. Page198.
24. Peacock L., 1984 Glycosylated haemoglobin: measurement and clinical use. *J Clin Pathol*. 37 Pages 841-851.
25. PROCOPIOU M. (2006). Hémoglobine glyquée : mise au point et nouveautés. *Revue Médicale Suisse*. 31392.
26. QIRAOUANI-BOUCETTA H. (2015). Dosage de l'Hémoglobine glyquée (HbA1c). Mémoire de Licence, université Sidi Mohamed Ben Abdallah – FES, Maroc. Pp 1-9.
27. **R Hanas, G John**. International HbA(1c) Consensus Committee. 2010 consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A1c measurement. *Clin Chem*. 2010; 56 :1362–4.
28. RAZZOUKIL. (2016). Étude de la corrélation entre la glycémie postprandiale et la glycémie moyenne calculée à partir de l.HbA1c chez une population de diabétiques. Thèse de doctorat en médecine. Université Cadi Ayyad Marrakech, Maroc. Pp 30.32.
29. *Revue Francophone des Laboratoires*, volume 2018, Issue 502, Pages 48-55. Les produits de glycation avancée des protéines. Bunn et ses collaborateurs en 1975.
30. SOBHANIFAR S. (2015). Blood Substitute Anyone. Faculty of medicine-Centre for Blood Research (CRB), Canada.
31. Standards of medical care in diabetes-2011 *Diabetes Care* 2011;34(Suppl. 1):S11-61.
32. Vassault A., Gillery P., 1992 Hémoglobine glyquée Cahier de Formation Biochimie Assurance de qualité Page 171.

Références Bibliographiques

33. WAJCMAN H. Hémoglobines : structure et fonction. EMC (Elsevier SAS, Paris), Hématologie (2005), 13-000-R-60.
34. WAJCMAN H. Hémoglobines : structure et fonction. EMC (Elsevier SAS, Paris), Hématologie (2005), 13-000-R-60.
35. Wémeau J.L.2014. Chapitre 15- Le diabète de type 1. Endocrinologie, Diabète, Métabolisme et Nutrition pour le Praticien ; pp 215-225.
36. Zhu, L., Feng, X., Liu, H., Xu, X., & Ma, M. (2015). Affinity chromatography using boronic acid-based ligands for separation and analysis of glycated hemoglobin. *Journal of Chromatography A*, 1418, 122-129. doi: 10.1016/j.chroma.2015.09.012.

Résumé :

L'objectif de notre travail est d'évaluer la fiabilité de dosage de la fraction Hb1Ac du cheval comme un paramètre de diagnostic et de suivi du diabète sucré chez le cheval, en utilisant un analyseur Hb 1Ac automatique HLC® -723G8. Nos résultats confirment la différence structurale de la fraction de l'Hb1Ac du cheval à celle humaine ce qui a été traduite par une inadaptation de dosage de la fraction Hb1Ac (0.00 mml/ml) et aussi un graphe aplati. Nous souhaiterions que d'autres études se porteront sur d'autres espèces animales afin de confirmer la similarité structurale ou non de la fraction Hb1Ac de ces espèces animales à celle humaine et la capacité de leurs dosage par l'automate G8.

Mots clé : Diabète, Hb1Ac, Cheval, Automate G8

Abstract :

The objective of our work is to evaluate the reliability of the dosage of the Hb1Ac fraction of the horse as a parameter for the diagnosis and monitoring of diabetes mellitus in the horse, using an automatic Hb 1Ac analyzer HLC® -723G8. Our results confirm the structural difference of the Hb1Ac fraction of the horse to that of the human, which was reflected by an inappropriate dosage of the Hb1Ac fraction (0.00 mml/ml) and also a flattened graph. We would like other studies to focus on other animal species in order to confirm the structural similarity or not of the Hb1Ac fraction of these animal species to that of humans and the capacity of their assay by the G8 automaton.

Key words : Diabetes, Hb1Ac, Horse, Automate G8.

الملخص

الهدف من عملنا هو تقييم موثوقية جرعة جزء Hb1Ac من الحصان كمعامل لتشخيص ومراقبة داء السكري في الحصان ، باستخدام محلل Hb 1Ac التلقائي

Hb1Ac HLC® -723G8. تؤكد نتائجنا الاختلاف الهيكلي لجزء Hb1Ac للحصان عن الإنسان ، والذي انعكس من خلال عدم تطابق جرعة جزء Hb1Ac

(0.00 ملمول / مل) وأيضاً رسم بياني مسطح. نود أن تركز دراسات أخرى على الأنواع الحيوانية الأخرى من أجل تأكيد التشابه الهيكلي أو عدم التشابه الهيكلي

لجزء Hb1Ac لهذه الأنواع الحيوانية مع البشر وقدرة اختبارهم بواسطة إنسان G8.

الكلمات الدالة السكري . هيموغلوبين 1. Ac الحصان. جهاز أوتوماتيكي G8.