

FORCES ET LIMITES DU DOSAGE DE L'HbA_{1c}. LE POINT DE VUE DU BIOLOGISTE

par

P. GILLERY*

L'ÉVALUATION DE L'HEMOGLOBINE A_{1c} (HbA_{1c}) est utilisée en pratique quotidienne au cours de la surveillance du diabète sucré [1, 2]. Son caractère indispensable pour le suivi et sa popularité, aussi bien auprès des diabétologues que des patients, ne doivent pas cacher les difficultés qui ont présidé à la mise en place de ce paramètre dans les laboratoires, et qui continuent à se manifester à l'heure actuelle. On accorde, en effet, une grande importance aux modifications des valeurs d'HbA_{1c} pour adapter le traitement, et à un échelon plus large, pour apprécier le risque de survenue de complications dégénératives. Cependant, l'HbA_{1c} est une molécule complexe, dont l'évaluation correcte en pratique quotidienne est délicate, et, pendant longtemps, la réalité technique du dosage n'a pas été en rapport avec l'importance de l'utilisation clinique faite des résultats. Cette discordance s'explique par des raisons historiques, des raisons méthodologiques, et des raisons structurales. Pour mériter sa place d'étalon or dans le suivi du diabète sucré, l'HbA_{1c} doit bénéficier d'une évaluation irréprochable. Quelques progrès restent à faire. Nous passerons en revue les différentes étapes de l'évaluation de l'HbA_{1c} depuis sa découverte, les méthodes disponibles et leurs performances, et les opérations de standardisation.

L'HISTOIRE DE L'HBA_{1c} remonte à la fin des années 60. On a en effet mis en évidence, à cette époque, une hétérogénéité structurale insoupçonnée de l'hémoglobine humaine, due à la fixation de résidus glucidiques simples. Différentes fractions ont été alors isolées, et nommées en fonction de leur comportement en chromatographie d'échange cationique faible. La plus abondante, l'HbA_{1c}, a été isolée et caractérisée. Cette découverte a suscité un intérêt croissant lorsqu'on a démontré un parallélisme entre l'augmentation de cette forme d'hémoglobine dans le sang des patients diabétiques et le degré de l'hyperglycémie [3, 4]. L'hypothèse qu'un dosage d'HbA_{1c} pouvait constituer un marqueur de l'équilibre glycémique a été émise, puis vérifiée. Par la suite, les études cliniques, dont celles du Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) puis celles de l'UKPDS (UK Prospective Diabetes Study), ont confirmé l'intérêt de ce test dans le suivi du diabète, aussi bien de type 1 que de type 2. La corrélation entre la qualité de l'équilibre glycémique, évaluée par l'HbA_{1c}, et l'apparition de diverses complications dégénératives a été établie [5, 6].

Un chemin considérable a été parcouru en trente ans, mais la route a été relativement chaotique. Pour comprendre les difficultés inhérentes à ce paramètre, certaines particularités structurales doivent être soulignées.

L'HBA_{1c} est le résultat d'une réaction générale connue sous le nom de glycation non enzymatique des protéines, qui désigne la fixation post-traductionnelle d'oses simples ou de leurs dérivés sur les fonctions amines des protéines (fig. 1). L'HbA_{1c} n'est qu'un cas particulier de cette réaction, et ne constitue pas la seule forme d'hémoglobine glyquée : l'HbA peut en effet être glyquée sur d'autres sites, notamment sur des résidus lysine des quatre chaînes de globine. De même, l'HbA_{1c} peut exister sous diverses formes, suivant qu'une ou deux extrémités N-terminales des chaînes β de la globine sont glyquées. Ces modifications donnent donc lieu à la formation de nombreuses formes glyquées de l'hémoglobine. On réserve le nom d'HbA_{1c} à l'hémoglobine qui a fixé du glucose à l'extrémité N-terminale des chaînes β . Le groupe des HbA₁ correspondait à l'ensemble des hémoglobines ayant fixé un ose, quel qu'il soit, à la même extrémité. Quant au terme d'HbA₀, il indique qu'aucune glycation n'a eu lieu sur ce site, ce qui n'empêche pas que d'autres sites puissent être glyqués. La notion d'hémoglobine glyquée totale regroupe toutes les formes de l'hémoglobine ayant fixé un résidu de glucose, sur quelque site que ce soit (fig. 2). Il s'applique aussi aux autres formes moléculaires de l'hémoglobine.

* Laboratoire central de biochimie, CHU de Reims, avenue du Général Koenig, 51092 Reims Cedex.

FIG. 1. — LES ETAPES DE LA GLYCATION NON-ENZYMATIQUE DES PROTEINES.

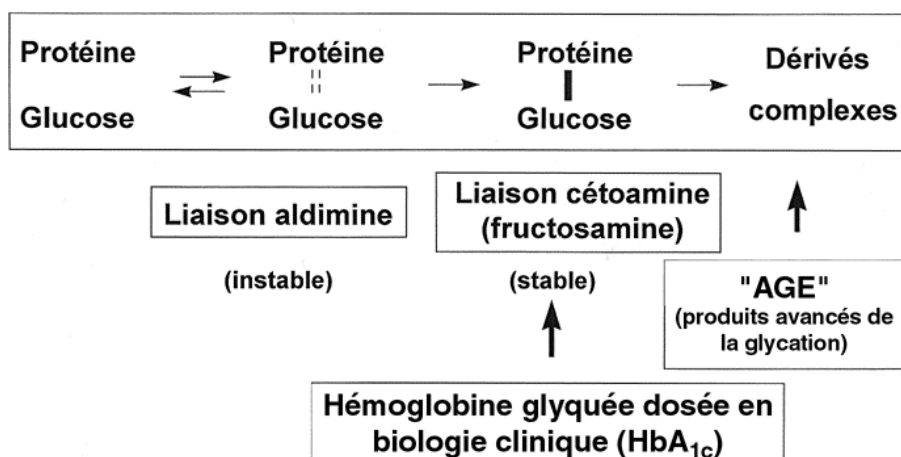
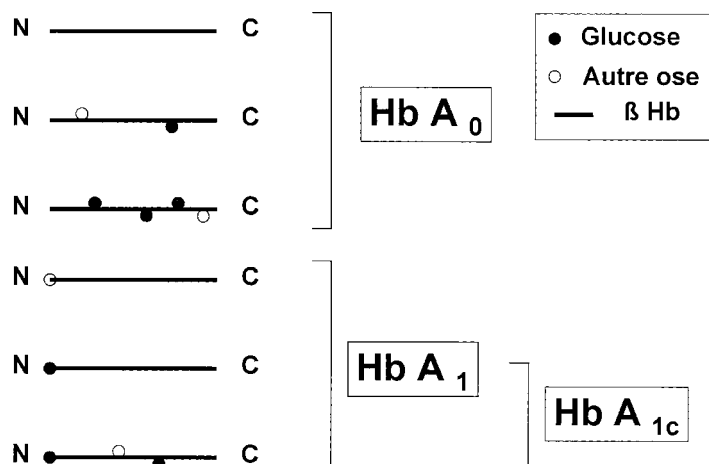


FIG. 2. — HETEROGENEITE DE L'HB GLYQUEE (SEULE UNE CHAINE BETA EST REPRESENTEE).



Ces modifications post-traductionnelles tardives, et en particulier la glycation sur l'extrémité N-terminale des chaînes β , modifient significativement les propriétés physico-chimiques (charge) et immunologiques de l'hémoglobine. Ces particularités ont permis la caractérisation et le dosage de la forme majeure de l'hémoglobine glyquée, l'HbA_{1c}. Malheureusement, les méthodes qui ont été développées en grand nombre au cours des années 70 n'évaluaient pas toutes le même paramètre. Certaines évaluaient l'HbA_{1c} de façon spécifique, d'autres les HbA₁ dans leur ensemble, d'autres encore l'hémoglobine glyquée totale [7]. De cette multiplicité de méthodes, liée elle-même à la multiplicité des formes structurales de l'hémoglobine glyquée, est né un sentiment de confusion, dans la mesure où les chiffres obtenus étaient forcément différents selon les méthodes, puisque le paramètre évalué était variable.

A l'aube de l'an 2000, la situation s'est simplifiée. On peut distinguer deux grands types de méthodes de dosage de l'hémoglobine glyquée : celles qui dosent spécifiquement l'HbA_{1c}, et celles qui évaluent l'hémoglobine glyquée totale (tableau I). Pendant longtemps, on a également utilisé des techniques dosant l'HbA₁ dans son ensemble, fraction hétérogène. Ces méthodes n'ont plus de raison d'être employées, constituant uniquement un facteur de dispersion des résultats.

TABLEAU I. — METHODES DE DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE GLYQUEE EN 2000

METHODES DOSANT SPECIFIQUEMENT L'HBA _{1c}
PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES
CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE IONIQUE (MINICOLONNES, CLBP, CLHP)
ELECTROPHORESE
PROPRIETES ANTIGENIQUES
DOSAGES IMMUNOCHEMIQUES
METHODES DOSANT L'HB GLYQUEE TOTALE
AFFINITE POUR L'ACIDE BORONIQUE ET DERIVE
CHROMATOGRAPHIE (MINICOLONNES, CLHP*)
DOSAGE AUTOMATISE (CAPTURE D'IONS)
CLBP : CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE BASSE PRESSION ; CLHP : CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE ; * TECHNIQUE NON DISTRIBUEE EN FRANCE.

OUTRE LE FAIT QUE LES METHODES MISES EN ŒUVRE POUR LE DOSAGE DE L'HBA_{1c} utilisaient des principes différents, il s'est vite avéré que ces méthodes n'étaient pas équivalentes. Plusieurs opérations de contrôle de qualité, menées au niveau national par l'Agence du Médicament (ex-Laboratoire National de la Santé, désormais AFSSPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) et la Société Française de Biologie Clinique (SFBC), ont mis en évidence de grandes différences de performance des méthodes. Si certaines étaient parfaitement acceptables pour l'utilisation en biologie clinique, d'autres ne l'étaient absolument pas. Plus encore, dans un même groupe de techniques, le composé évalué et les performances pouvaient être très différentes. Par exemple, les techniques de CLHP, qui éluent des espèces chimiques différentes dans le pic intitulé HbA_{1c} en fonction de leurs caractéristiques propres, peuvent fournir des résultats de qualité très inégales. Ces études ont également montré une confusion dans les valeurs de référence et dans l'interprétation des résultats [8, 9].

Dans ce contexte, il s'est avéré nécessaire de standardiser les dosages d'hémoglobine glyquée en France. Fin 1997, la SFBC a mis en place un groupe de travail, qui a rapidement pris contact avec l'ALFEDIAM et la Société Française d'Endocrinologie, afin d'établir un nécessaire dialogue entre cliniciens et biologistes. La formulation de recommandations a dû prendre en compte la situation internationale. Deux groupes de standardisation travaillent depuis plusieurs années. Le premier est le groupe américain du NGSP (*National Glycohemoglobin Standardization Program*), le second un groupe de l'IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry*, qui regroupe les sociétés de biologie clinique nationales). Malgré une stratégie globale distincte, les deux groupes privilégient la notion de standardisation des méthodes par rapport à des systèmes de référence bien caractérisés. En particulier, il est maintenant parfaitement admis d'effectuer un calcul d'HbA_{1c}, même si la méthode utilisée ne dose pas stricto sensu ce paramètre. Ceci n'est évidemment possible que pour des techniques possédant des caractéristiques analytiques suffisantes en matière de précision, mais c'est l'acceptation théorique préalable de la possibilité de calcul qui a permis les différentes démarches de standardisation.

L'ACCORD A ETE TROUVE RAPIDEMENT POUR LE CONSTITUANT A DOSER, L'HBA_{1c}, définie comme une molécule d'HbA ayant fixé au moins un résidu de glucose à l'extrémité N-terminale d'une chaîne β. Il s'agit en effet d'un composé à structure définie, de métabolisme connu, et dont l'intérêt a été validé par des études cliniques [10].

Les principales divergences portent sur le choix du système de référence. Le groupe NGSP utilise un système de référence en CLHP, et des préparations d'hémoglobine purifiée. Grâce à celui-ci, il a déjà certifié un grand nombre de méthodes via un réseau de laboratoires agréés. Il préconise des résultats chiffrés étayés par les études cliniques du DCCT, avec un intervalle de référence compris entre 4 à 6 p. 100 de l'hémoglobine totale, et des seuils décisionnels définis. On a reproché à cette démarche l'utilisation d'une technique de référence qui ne dosait pas spécifiquement l'HbA_{1c}. Le pic chromatographique obtenu par la méthode de référence n'est en effet pas pur à 100 p. 100 [11]. C'est cette raison qui a conduit le groupe IFCC à adopter un système de référence plus élaboré, utilisant une méthode de CLHP en phase inverse couplée à une détection par spectrométrie de masse ou par électrophorèse capillaire. La structure dosée est l'hexapeptide N-terminal de la chaîne β de la globine, obtenu par digestion enzymatique de préparations d'hémoglobine purifiée. La validation de cette technique et la constitution d'un réseau de laboratoires sont en cours [12-14]. Le problème majeur lié à cette approche, cependant plus internationale que la précédente, est que les valeurs obtenues sont plus basses que les valeurs des études du DCCT. Si ce système de standardisation était retenu dans l'avenir, il faudrait qu'un facteur de correction soit appliqué, afin que les limites actuellement admises puissent continuer à être appliquées. Dans le cas contraire, une nouvelle confusion s'ajouterait aux précédentes.

Compte tenu de ces données, des recommandations concernant le dosage de l'HbA_{1c} ont été émises par le groupe de

travail de la SFBC [15], et leur pertinence discutée avec les sociétés savantes de Diabétologie [16].

1) Tous les résultats d'hémoglobine glyquée doivent être rendus sous forme de taux d'HbA_{1c}, exprimé en pourcentage d'hémoglobine totale, à l'exclusion de tout autre mode d'expression.

2) LES METHODES UTILISEES DOIVENT SOIT DOSER DIRECTEMENT L'HBA_{1c}, soit pouvoir être corrélées à une méthode de référence dosant l'HbA_{1c}, afin de corriger les valeurs brutes.

3) Les techniques utilisées dans les laboratoires doivent être reliées à une méthode de référence recommandée par les sociétés scientifiques internationales : NGSP - DCCT ou IFCC. Il appartient aux biologistes de s'informer auprès des fournisseurs des conditions d'étalonnage de leur méthode, et d'exiger de ceux-ci un document de certification, qui leur aura été fourni soit par le NGSP -DCCT soit par l'IFCC.

Ces recommandations avaient pour but de favoriser l'utilisation de méthodes fiables, et reliées à un système de référence, et ont fait l'objet d'informations auprès des biologistes et des fournisseurs. De fait, et même si on ne dispose pas de chiffres récents à l'échelle nationale, on a pu constater, au travers de contrôles de qualité ou d'enquêtes régionales, que l'utilisation des techniques se modifiait fortement depuis quelques mois. On assiste à un abandon progressif des techniques manuelles, utilisant par exemple les minicolonnes d'échange ionique ou l'électrophorèse, qui, dans les précédents contrôles, donnaient des coefficients de variation extrêmement élevés. On note parallèlement l'augmentation des techniques immunologiques et les techniques de CLHP.

Lorsque la notion de standardisation sera bien ancrée dans l'esprit des biologistes et des cliniciens comme préalable indispensable à tout dosage, on pourra s'orienter vers les méthodes les plus performantes en matière de précision [17]. Il n'est en effet pas anodin d'utiliser une technique possédant un coefficient de variation de 2 p. 100 ou de 5 p. 100. On peut donc penser que, prochainement, le dosage de l'HbA_{1c} sera réalisé par des techniques standardisées, avec une bonne cohérence des valeurs de référence et des résultats rendus entre les laboratoires. Ce point est indispensable à l'utilisation correcte du test, d'ores et déjà proposé comme indicateur de choix de l'hémoglobine glyquée au cours du suivi du diabète de type 2 par les recommandations de l'ANAES [18].

ENFIN, MEME SI LE TEST HBA_{1c} répond à tous les prérequis et toutes les conditions mentionnées, il ne faudra pas lui demander plus qu'il ne peut donner. Certaines circonstances physiopathologiques peuvent affecter les résultats obtenus, en particulier les anomalies du métabolisme de l'hémoglobine, tant qualitatives que quantitatives (hémoglobinopathies, anémie), ou la formation d'autres produits d'addition (Hb carbamylée). Ces pathologies associées posent des problèmes spécifiques qui diminueront toujours le champ d'application des dosages d'HbA_{1c}. De la même façon, la nécessité de disposer de dosages rapides d'HbA_{1c} au cours de la consultation spécialisée de diabétologie devra être abordée afin de trouver les meilleures solutions, aussi bien pour les biologistes que pour les cliniciens.

Dans l'attente de l'examen de ces problèmes, il convient de poursuivre le travail actuel de standardisation, en relation avec les organismes internationaux, les sociétés savantes de cliniciens et les fournisseurs, d'intensifier l'information de tous les professionnels de santé (encore loin d'être complète), et de renforcer la politique de contrôle de qualité, tant au niveau national que régional.

BIBLIOGRAPHIE

1. BERNARD M, BORDAS-FONFREDE M, GRIMALDI A ET AL. INTERETS RESPECTIFS DES DOSAGES D'HEMOGLOBINE GLYQUEE ET DE FRUCTOSAMINES DANS LA SURVEILLANCE DU DIABETE SUCRE. ANN BIOL CLIN, 1995, 53 : 321-327.
2. GOLDSTEIN DE, LITTLE RR. MONITORING GLYCEMIA IN DIABETES. SHORT TERM ASSESSMENT. CURR THERAP DIAB, 1997, 26 : 475-486.
3. RAHBAR S. AN ABNORMAL HEMOGLOBIN IN RED CELLS OF DIABETICS. CLIN CHIM ACTA, 1968, 22 : 296-300.
4. BUNN HF, SHAPIRO R, MCMANUS M ET AL. STRUCTURAL HETEROGENEITY OF HUMAN HEMOGLOBIN A DUE TO NONENZYMATIC GLYCOSYLATION. J BIOL CHEM, 1979, 254 : 3892-3898.
5. THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. 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, 1993, 329 : 977-986.
6. UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. Lancet, 1998, 352 : 837-853.
7. GILLERY P, GUILLEMIN C, DELPECH M. Hémoglobine glyquée : méthodes de dosage et problèmes de standardisation. Ann Biol Clin, 1994, 52 : 157-163
8. GILLERY P, LABBE D, DUMONT G et al. Glycohemoglobin assays evaluated in a large-scale quality-control survey. Clin Chem, 1995, 41 : 1644-1648.
9. GILLERY P, DUMONT G, VASSAULT A. Evaluation of GHb assays in France by national quality control surveys. Diabetes Care, 1998, 21 : 265-270.
10. ECKFELDT JH, BRUNS DE. Another step toward standardization of methods for measuring hemoglobin A_{1c}. Clin Chem, 1997, 43 : 1811-1813.
11. PETERSON KP, PAVLOVICH JG, GOLDSTEIN D et al. What is hemoglobin A_{1c} ? An analysis of glycated hemoglobins by electrospray ionization mass spectrometry. Clin Chem, 1998, 44 : 1951-1958.
12. HOELZEL W, MIEDEMA K. Development of a reference system for the international standardization of HbA_{1c}/glycohemoglobin determinations. JIFCC, 1996, 9 : 62-67.

- 13 KOBOLD U, JEPSON JO, DÜLFFER T et al. Candidate reference methods for hemoglobin A_{1c} based on peptide mapping. *Clin Chem*, 1997, 43 : 1944-1951.
- 14 FINKE A, KOBOLD U, HOELZEL W et al. Preparation of a candidate primary reference material for the international standardisation of HbA_{1c} determinations. *Clin Chem Lab Med*, 1998, 36 : 299-308.
- 15 GILLERY P, BORDAS-FONFREDE M, CHAPELLE JP et al. Hémoglobine glyquée : le temps de la standardisation est venu. *Ann Biol Clin*, 1998, 56 : 249-251.
- 16 GILLERY P, BORDAS-FONFREDE M, CHAPELLE JP et al. HbA_{1c} : Concertation clinico-biologique pour la standardisation des méthodes de dosage. *Diabetes Metab*, 1999, 25 : 283-287.
- 17 LYTKEN-LARSEN M, BLAABJERG O, HYLTOFT-PETERSEN P et al. Analytical goal setting prior to selection of a method for glycosylated haemoglobin. *Scand J Clin Lab Invest*, 1990, 50 : 715-721.
- 18 GROUPE DE TRAVAIL ANAES. Suivi du patient diabétique de type 2 à l'exclusion du suivi des complications. Recommandations de l'ANAES. *Diabetes Metab*, 1999, 25 : S1-S64.