

HEMOGLOBINE GLYQUEE

DEFINITION

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 les protéines, particulièrement les protéines à demi-vie longue et notamment l'hémoglobine (Hb). L'hémoglobine glyquée correspond à l'ensemble des molécules d'hémoglobine modifiées par glycation non enzymatique. 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.

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). Elle est le paramètre de référence pour le suivi des patients diabétiques.

L'utilisation de l'HbA1c à visée diagnostique du diabète a été envisagée dès 1988 (R. R. Little, *Diabetes*, 1988) ; cette possibilité est actuellement à l'étude par un comité international d'experts en association avec l'ADA (*American Diabetes Association*), l'EASD (*European Association for the Study of Diabetes*) et l'IDF (*International Diabetes Federation*).

Synonymes : l'HbA1c est souvent désignée sous les termes d'hémoglobine glyquée ou glycohémoglobine qui ne sont pas des synonymes exacts par manque de précision. Le terme d'« hémoglobine glycosylée » est totalement impropre et ne doit pas être utilisé (la glycosylation est un mécanisme enzymatique de la biosynthèse protéique, à la différence de la glycation).

BIOPATHOLOGIE

L'utilisation de l'HbA1c comme marqueur de surveillance du diabète a été validée dans deux grandes études épidémiologiques, l'étude DCCT (*Diabetes Control and Clinical Trial*) et l'étude UKPDS (*United Kingdom Prospective Study of Diabetes*). L'étude DCCT, menée chez des patients diabétiques de type 1, a démontré pour la première fois la relation entre l'équilibre glycémique évalué par l'HbA1c et les complications liées au diabète et a permis de fixer la valeur cible d'HbA1c à atteindre pour l'équilibre (< 7 %).

L'étude UKPDS menée chez des diabétiques de type 2 a confirmé le lien entre équilibre glycémique et complications du diabète, et a montré qu'une diminution de 1 point de l'HbA1c réduisait de 10 à 30 % le risque de complications microangiopathiques et de 15 % environ le risque d'infarctus du myocarde chez ces patients.

Parallèlement, un vaste effort de standardisation des techniques de dosage de l'HbA1c a été entrepris à l'échelle mondiale, ce qui s'est traduit par la définition de normes techniques et la fixation d'objectifs thérapeutiques exprimés en % d'HbA1c (*cf. infra*).

C'est pourquoi actuellement, l'HbA1c est reconnue comme le meilleur marqueur de l'équilibre glycémique au cours du suivi des patients diabétiques.

INDICATIONS DU DOSAGE

Surveillance des patients diabétiques (diabète de type 1 et 2).

Les recommandations pour la pratique clinique de l'ANAES précisent que : « Le suivi du contrôle glycémique du diabète de type 2 doit reposer sur le dosage de l'HbA1c effectué tous les 3 ou 4 mois. Pour un patient donné, le dosage de l'HbA1c doit être pratiqué dans le même laboratoire, pour permettre de comparer les résultats successifs... ».

Le dosage de l'HbA1c complète l'autocontrôle glycémique en reflétant de manière objective l'efficacité thérapeutique. Les modifications de traitement ou les diabètes instables peuvent transitoirement motiver des prescriptions de glycémie dans l'intervalle.

NB : le dosage de l'HbA1c n'est pas actuellement proposé en pratique courante pour le diagnostic du diabète.

RECOMMANDATIONS PREANALYTIQUES

■ PRELEVEMENT - CONSERVATION - TRANSPORT

Se reporter au référentiel des examens de biologie médicale Biomnis en ligne pour les conditions de prélèvement et conservation-transport.

■ QUESTIONS A POSER AU PATIENT

Vérifier l'indication et la fréquence du dosage (suivi du diabète ? Date du dernier dosage ?). Prenez-vous de l'aspirine ? L'acide acétylsalicylique (ainsi que certains dérivés de l'éthanol) peuvent conduire à une surestimation du résultat, mais cette interférence semble négligeable *in vivo*.

Une hémolyse des globules rouges doit être réalisée avant le dosage de l'HbA1c : elle peut être manuelle ou automatique. Le réactif hémolysant permet en outre d'éliminer les formes instables d'HbA1c, non corrélées à l'équilibre glycémique.

METHODES DE DOSAGE

Les premières recommandations datant de 2000, préconisaient d'utiliser des techniques certifiées NGSP ou IFCC, de rendre les résultats en % d'HbA1c et d'interpréter avec les seuils établis dans l'étude DCCT. Après de nouvelles recommandations émises en 2004 et 2007, celles de 2010 préconisent l'utilisation de techniques certifiées IFCC (plus sensibles), de rendre en double unités (mmol/mol Hb et % d'HbA1c) et d'interpréter avec les seuils DCCT (*cf. infra*).

Les méthodes dosant spécifiquement l'HbA1c sont actuellement, soit des méthodes chromatographiques (chromatographie d'affinité au boronate, chromatographie liquide haute performance, chromatographie liquide basse pression), soit des méthodes immunochimiques.

VALEURS DE REFERENCE - STANDARDISATION

Dans les années 1990, une première tentative de standardisation a été apportée par le NGSP (National Glycohemoglobin Standardisation Program), système pragmatique reposant sur une comparaison des méthodes de dosage par rapport à une chromatographie d'échange d'ions sur résine Bio-Rex 70 (HbA1C non pure). Cette méthode a longtemps été reconnue comme méthode de référence car elle avait été utilisée dans les deux grandes études internationales (DCCT et UKPDS). Parallèlement était développée la méthode IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry*) qui a défini l'analyte de référence HbA1c comme l'hexapeptide N-terminal glyqué de la chaîne β de l'hémoglobine, et la méthode de référence (chromatographie liquide haute performance en phase inverse couplée à une spectrométrie de masse ou à une électrophorèse capillaire). Cette technique, lourde, n'est pas adaptée aux dosages de routine, mais permet de calibrer les méthodes destinées à être utilisées dans les laboratoires. Elle est plus spécifique que la méthode NGSP. Toutefois, les valeurs chiffrées obtenues selon la standardisation IFCC sont 1,5 à 2 % plus basses que celles obtenues avec le NGSP/DCCT, la relation entre les deux méthodes de standardisation étant : $NGSP = (0,915 \times IFCC + 2,15)$. De façon à ne pas engendrer de confusion, il a été décidé d'exprimer les résultats obtenus par cette technique en mmol d'HbA1c par mol d'hémoglobine, et non en pourcentage d'HbA1c par rapport à l'hémoglobine totale. Cette expression fournit des résultats qui ne peuvent pas être confondus avec ceux de la méthode NGSP/DCCT, mais qui sont numériquement très différents.

La standardisation du dosage et de l'expression du résultat d'HbA1c a fait l'objet d'un consensus international en 2007. En France, un groupe de travail commun de la Société française de biologie clinique (SFBC) et de la Société francophone de diabétologie

(SFD) a formulé les propositions qui ont été publiées par P. Gillery en 2009. Ainsi, il est recommandé d'exprimer les résultats d'HbA1c en pourcentage de l'hémoglobine totale et en mmol HbA1c/mol Hb, mais il n'est pas nécessaire de les convertir en glycémie moyenne calculée.

En 2010, de nouvelles recommandations ont confirmé l'utilisation des techniques certifiées IFCC (plus sensibles), le rendu des résultats en double unités (mmol/mol Hb et % d'HbA1c) et l'interprétation avec les seuils DCCT. Un tableau de correspondance entre HbA1c et glycémie moyenne calculée peut être fourni avec les résultats, sous réserve de précautions d'interprétation au niveau individuel.

La correspondance entre les différents modes d'expression de l'HbA1c est la suivante pour quelques valeurs clés :

NGSP (%)	IFCC (mmol/mol)	Glycémies moyennes	
		mmol/L	g/L
4,0	20	3,6	59
6,0	42	7,6	129
7,0	53	9,6	164
8,0	64	11,5	200

VALEURS DE REFERENCE

Les valeurs de référence sont : 20 à 42 mmol/mol Hb (IFCC) ou 4 – 6 % de l'Hb totale (NGSP). Un bon équilibre glycémique est obtenu si l'HbA1c est < 53 mmol/mol Hb (7 %).

VARIATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES

■ VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES

L'HbA1C est indépendante des variations journalières de la glycémie et n'est pas affectée par le jeûne, l'exercice physique, ni par l'ingestion récente de sucres. Elle augmente modérément avec l'âge (+ 0,6 % de l'Hb totale entre 20 et 70 ans).

■ VARIATIONS PATHOLOGIQUES

■ Certaines situations pathologiques peuvent conduire à des résultats erronés

Les causes d'erreur non liées à la méthode de dosage sont des modifications de la demi-vie du GR et du métabolisme de l'HbA.

Les hémolyses (quel qu'en soit le mécanisme), les hémorragies, les anomalies quantitatives de l'hémoglobine (thalassémies), les traitements stimulant l'érythropoïèse diminuent l'HbA1c ; à l'inverse, une carence martiale sévère entraîne un vieillissement prolongé des GR et donc une augmentation de l'HbA1c.

■ Les interférences analytiques

- **Les hémoglobines anormales** sont des anomalies génétiques autosomales récessives, le plus souvent dues à des mutations sur une des chaînes de globine (plus de 1000 variants d'Hb sont actuellement décrits). Les variants les plus fréquents sont l'HbS (plutôt d'origine africaine), l'HbE (sud-est asiatique), l'HbC (Afrique) et les Hb de type D (Asie et Afrique). La présence d'un variant à l'état homozygote entraîne l'absence d'HbA et donc d'HbA1c. La présence d'un variant est le plus souvent asymptomatique, donc inconnue et les interférences analytiques diffèrent selon le type de variant présent et selon la méthode de dosage.

Dans tous les cas, la présence d'un variant peut poser des problèmes physiopathologiques (modification de la glycation de l'HbA) et des problèmes analytiques liés à la méthode de dosage. Dès lors, les seuils décisionnels DCCT ne sont plus applicables (les auteurs ayant mené leur étude chez des sujets homozygotes A/A) et il convient de signaler leur présence au clinicien.

Les techniques HPLC détectent les variants les plus fréquents, mais leur séparation et leur identification est variable selon les méthodes. Les interférences dépendent de la charge du composé présent : élution de l'HbF avec les Hb rapides pouvant entraîner une confusion avec l'HbA1c ou co-élution de certains variants ou de leurs formes glyquées avec les fractions normales.

Les techniques immunologiques mesurent les hémoglobines anormales glyquées ou non selon le site de la substitution par rapport à l'épitope reconnu, mais elles ne détectent pas les variants ; le calcul de l'HbA1c ne tient pas compte de la part du variant.

La chromatographie d'affinité au boronate n'est pas affectée méthodologiquement. Toutes les fonctions amines glyquées sont reconnues (chaînes de globine normales et mutées) ; mais les variants ne sont pas détectés et les algorithmes de calcul utilisés pour exprimer le résultat en % d'HbA1c (valables si l'Hb est normale) sont pris en défaut.

- L'HbA1c labile

Elle est formée par la liaison instable d'un glucose à la valine N-terminale de l'une ou des deux chaînes globine de l'Hb. Elle est le reflet de situations hyperglycémiques récentes. C'est une fraction très instable puisque l'HbA1c labile peut rapidement revenir à un état « HbA0 » après relargage du glucose. Elle interfère surtout avec les techniques en CLHP car son élution est proche de celle de l'HbA1c et sa séparation est parfois incomplète (à évaluer par le biologiste). Elle n'interfère pas avec les techniques immunologiques ou de chromatographie d'affinité.

- L'Hb carbamylée

La carbamylation de l'Hb se produit chez les patients insuffisants rénaux par fixation d'acide isocyanique provenant du catabolisme de l'urée à la valine N-terminale de l'une ou des deux chaînes β -globine de l'Hb. Cette interférence existe avec les techniques de CLHP, car son élution est proche de celle de l'HbA1c et entraîne une séparation parfois incomplète (à évaluer). L'Hb carbamylée n'interfère pas avec les techniques immunologiques ou de chromatographie d'affinité.

Dans toutes les situations d'interférence, le dosage des fructosamines qui rend compte de l'équilibre glycémique des 2 à 3 semaines précédant le dosage, peut être une alternative.

■ Les objectifs thérapeutique au cours du diabète de type 2 : recommandations de l'ADA (*American Diabetes Association*) et de l'EADS (*European Association for the Study of Diabetes*), 2012

Les objectifs glycémiques doivent être individualisés. Les recommandations en termes d'HbA1c sont :

- diminuer l'HbA1c à < 7 % pour réduire l'incidence des complications microvasculaires ;
- cibler une HbA1c à 6 ou 6,5 % chez certains patients sélectionnés (faible durée de diabète, patient ayant une espérance de vie longue, sans maladie cardiovasculaire significative), si cette cible peut être atteinte sans hypoglycémie significative ou autre effet indésirable du traitement ;
- des objectifs moins stricts d'HbA1c (7,5 - 8 %, voire plus) sont appropriés pour des patients ayant des antécédents d'hypoglycémies sévères, une espérance de vie limitée, d'importantes co-morbidités et chez ceux dont la cible est difficile à atteindre en dépit d'une éducation intensive, de conseils répétés et de doses efficaces de plusieurs agents d'anti-hyperglycémiant y compris l'insuline.

POUR EN SAVOIR PLUS

- 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.
- Gillery P., *Hémoglobine glyquée*, Encycl Med Biol, Elsevier Ed, 2003.
- De Graeve J., Daunizeau A., Dumont G., Hattchouel J.-M., Contrôle national de qualité: dosage de l'hémoglobine glyquée (HbA1c). AFSSAPS/CQN 99BIO3/HbA1c, 2000 :1-6.
- Traitement médicamenteux du diabète de type 2 (actualisation novembre 2006). Recommandation professionnelle Afssaps/HAS. www.has.fr
- Diabète de type 2 – Guide affection longue durée, juillet 2007. www.has.fr
- Gillery P., Périé C., Bordas-Fonfrède M., Hue G., Chapelle J.-P., Propositions pour l'expression standardisée des

résultats d'HbA1c. Ann Biol Clin, 2009 :669-671.

■ Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, Peters AL, Tsapas A, Wender R, Matthews DR. *Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes: a patient centered approach. Position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD)*. Diabetologia 2012;55:1577-96 et Diabetes Care 2012;35:1364-137979.
