

SL Dr. Liviu Tămaş tamas.liviu@umft.ro et tliviu33@yahoo.com

Toutes les questions seront envoyées à SL Dr. Liviu Tămaş aux les adresses de email fournis (**IMPORTANT** – les questions seront envoyées simultanément aux les deux adresses de email fournis et pas seulement a une !!!)

Historique du dosage de l'hémoglobine glyquée.

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

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.

Définition de l'hémoglobine glyquée.

Le dosage de l'hémoglobine glyquée reflète le niveau moyen de la glycémie (taux de sucre dans le sang) au cours des deux derniers mois. Il est obtenu à l'aide d'une prise de sang ou en technique capillaire pour laquelle il n'est pas nécessaire d'être à jeun. C'est le dosage de référence pour juger de l'équilibre du diabète. C'est avec cet indice qu'il a été démontré qu'en améliorant l'équilibre, il était possible de prévenir ou de stopper l'évolution des complications oculaires, rénales et neurologiques.

Un des objectifs du traitement dans le diabète est de normaliser la glycémie.

L'objectif optimal est d'obtenir une HbA_{1c} inférieure à 6,5%. A ce niveau, en l'absence d'effets secondaires le traitement est adapté.

Si sur deux dosages consécutifs l'HbA_{1c} est comprise entre 6,6 et 8% une modification du traitement peut être envisagée. Pour une HbA_{1c} supérieure à 8%, une modification du traitement est recommandée. Ces objectifs doivent être individualisés en fonctions de nombreux facteurs : âge, présence de complications, état psychologique du patient, grossesse en cours.

Plus le niveau de l'HbA_{1c} est élevé, plus le risque de développer des complications est important. Quel que soit le niveau de départ, toute amélioration de l'HbA_{1c}, même minime, réduit le risque de développer ou d'aggraver ces mêmes complications.

La survenue des complications ne dépend pas que du déséquilibre glycémique, d'autres facteurs (tabagisme, pression artérielle, lipides...) ont une grande importance.

Différentes formes de l'hémoglobine A

La molécule d'hémoglobine (MM = 64500 dalton) est composée d'un noyau "l'hème" et de quatre chaînes polypeptidiques. Il existe quatre types de chaînes différentes par leur composition en acides aminés (chaînes α , β , δ , ϵ). Leur combinaison conduit à différentes formes d'hémoglobines, cependant les hémoglobines normales contiennent toujours deux chaînes α . Chez l'adulte sain l'hémoglobine est donc constituée d'un mélange dont la composition moyenne est la suivante

- hémoglobine A ($\alpha_2 \beta_2$) 97 % environ
- hémoglobine A2 ($\alpha_2 \delta_2$) 2,5 % environ

L'hémoglobine A de structure moléculaire ($\alpha_2 \beta_2$) présente une hétérogénéité structurale mise en évidence après séparation chromatographique ou électrophorétique. On distingue :

A. Une forme majeure ou HbA₀. Cette forme comprend également de l'hémoglobine glyquée sur des sites qui ne modifient pas le pHi de la molécule.

B. Plusieurs formes mineures ou "rapides" (fast-haemoglobins) 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 (pHi) des formes rapides (HbA₁) pour permettre leur séparation par chromatographie d'échange cationique ou par isofocalisation :

- Les Hémoglobines A_{1a1} et A_{1a2} qui résultent respectivement de la liaison de fructose-1,6-disphosphate (hexoses diphosphates) et de glucose-6-phosphate (hexoses mono phosphates) sur la valine N-terminale des chaînes β de l'hémoglobine. Ces deux formes représentent en moyenne environ 0,5 % de l'hémoglobine.
- L'hémoglobine A_{1b} qui correspond à la fixation du pyruvate (hexoses nonphosphorylés) à l'extrémité N-terminale des chaînes β de la globine (environ 0,8 % de l'hémoglobine en moyenne).
- L'hémoglobine A_{1c} qui est la fraction la mieux caractérisée et qui constitue la forme majeure de l'hémoglobine A₁ (environ 80 %) soit 4 à 6 % de l'hémoglobine totale. L'hémoglobine A_{1c} résulte de la condensation d'une molécule de glucose avec le groupement N-Terminal de résidus valine de chacune des deux chaînes β de l'hémoglobine A. Elle possède une fonction cétoamine stable, contrairement à l'Hb préA_{1c} qui est une forme labile de l'HbA_{1c} caractérisée par une fonction almidine (base de Schiff).

Phénomène de glycation

La glycation, réaction initialement décrite par L.C.Maillard en 1912, est la condensation de la fonction aldose du glucose (et plus généralement des oses) avec le radical aminé libre des protéines (et plus généralement de macromolécules, acides nucléiques, lipides complexes...). Elle est une réaction chimique survenant *in vitro* et *in vivo*. Elle est une réaction non enzymatique et s'oppose à la "glycosylation" qui correspond à un mécanisme enzymatique de la biosynthèse protéique.

La première étape de la réaction aboutit à la formation d'une base de Schiff instable qui soit se redissocie en amine et en ose, soit subit une translocation de la double liaison (réarrangement d'Amadori) pour aboutir à une cétoamine stable et quasiment irréversible dont la vitesse de formation est 60 fois moins rapide que celle de la première étape. (Figure 1)

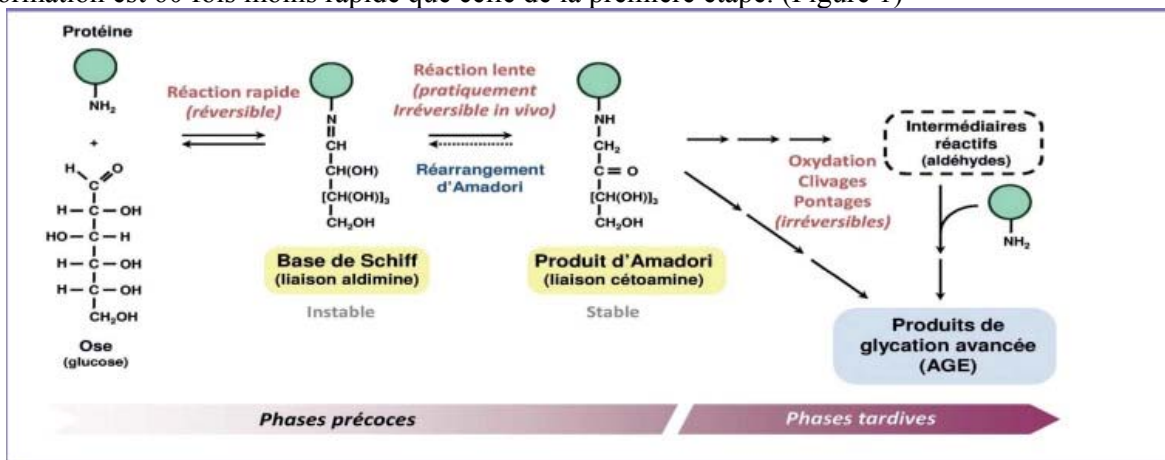


Figure 1: Réaction de glycation non enzymatique des protéines

L'intensité de la glycation est fonction de la protéine (concentration et demi-vie), de la nature et de la concentration de l'ose réactionnel et du temps de contact entre l'ose et la protéine. Le glucose, ose peu réactif mais le plus abondant de l'organisme humain réagit sous sa forme non cyclique, mais c'est la forme cyclique qui est présente dans la cétoamine conférant à la molécule glyquée une fonction cisdiol. Toutes les protéines peuvent être glyquées mais l'exemple le mieux connu est celui de l'hémoglobine. On sait depuis les travaux de Rabhar en 1969 et de Trivelli en 1971 que les sujets diabétiques possèdent une fraction d'hémoglobine migrant plus rapidement que l'hémoglobine A à l'électrophorèse (d'où sa première dénomination de « fast hemoglobin »).

L'hémoglobine glyquée résulte de la fixation d'oses sur les chaînes de globine. Différents sites peuvent être affectés (Valine N - terminale des chaînes α et β groupement ϵ - aminés des résidus lysine intra chaînes) donnant lieu à la formation de plusieurs formes d'hémoglobines glyquées. (Tableau I).

Tableau I. Principales fractions de l'hémoglobine et principaux termes utilisés pour caractériser l'hémoglobine glyquée.

HbA	Tétramère $\alpha_2\beta_2$
HbA0	Composant majeur de l'hémoglobine A séparée par échange d'ions ou électrophorèse Comprend l'hémoglobine glyquée sur les sites ne modifiant pas son pHi
HbA1	Hémoglobine(s) rapides en échange d'ions ou électrophorèse Comprend HbA1a1+HbA1a2+HbA1b+HbA1c
HbA1c	Fraction cétoamine stable formée par fixation du glucose sur la valine N-terminal de la chaîne β de l'HbA
HbpréA1c	Forme labile de l'HbA1c caractérisée par une fonction aldimine (base de Schiff)
Hb glyquée	Hémoglobine formée par fixation du glucose et d'autres oses sur les fonctions amines libres et accessibles des chaînes α et β

La forme la plus abondante est l'hémoglobine A1c définie par la fixation du glucose sur la valine N-terminale de la chaîne β , mais qui ne représente que 60% de l'ensemble des hémoglobines glyquées. Les 40% restant étant répartis entre les formes où le glucose est fixé sur la valine N terminale de la chaîne α et les formes où le glucose est fixé sur les lysines intra chaînes. Le principe de la glycation est utilisé pour mesurer l'imprégnation glucidique chez les diabétiques à l'aide de marqueurs dont la détermination va refléter les moyennes glycémiques selon un temps plus ou moins long en fonction de la protéine étudiée : de quelques jours pour les lipoprotéines à plusieurs années pour les protéines de structure.

Quelques méthodes de dosages de l'HbA1c.

Elles peuvent être réparties en deux groupes : Les méthodes dosant l'hémoglobine glyquée totale et les méthodes dosant spécifiquement l'HbA1c.

Méthodes dosant l'hémoglobine glyquée totale.

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 élue la fraction non glyquée, une deuxième solution contenant du sorbitol ou de l'acide citrique élue la fraction glyquée fixée sur la colonne. Ces techniques peuvent être sensibles à la concentration du ligand d'un lot de colonne à l'autre. Seules les hémoglobines normales ou anormales ayant fixées irréversiblement le glucose sont dosées, la fraction labile d' Hb n'interférant pas. La température et les hémoglobines carbamylées ou acétylées sont sans influence.

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

La détection utilise une réaction d'inhibition par l'hème, de la fluorescence d'un fluorophore. Les résultats sont corrigés par rapport à une courbe d'étalonnage mémorisée qui a été titrée en

HbA1c par une méthode CLHP. Ces techniques qui dosent l'hémoglobine glyquée totale, fournissent des résultats corrigés exprimés en HbA1c.

Méthodes dosant spécifiquement l'HbA1c

Méthodes immunologiques

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

Différents systèmes sont commercialisés

- Techniques immunoturbidimétriques en phase homogène adaptée à différents analyseurs de biochimie.
- Après hémolyse manuelle le pourcentage d'HbA1c est calculé par rapport à l'Hb totale dosée en parallèle.
- Technique d'immunoinhibition.
- 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.

Electrophorèse

- L'électrophorèse en gel d'agarose ou acétate de cellulose (électro-endosmose) permet la migration en bloc de toutes les fractions d'HbA1. Certains systèmes peuvent également séparer spécifiquement la fraction HbA1c. Cette technique permet de mettre en évidence la plupart des Hb anormales sauf les hémoglobines modifiées (Hbcarbamylées). L'obtention de résultats reproductibles exige une transparisation homogène du gel pour permettre une lecture correcte. Ces techniques délicates fournissent en général des résultats plus élevés.
- L'isoélectrofocalisation permet une très bonne séparation des fractions. C'est cependant une technique délicate, qui nécessite un appareillage très spécialisé. Elle n'est pas utilisée en pratique courante.

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'HbA α , 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 : HbA1a, HbA1b, HbA1c puis la fraction principale HbA α .

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

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

Intérêts du dosage de l'hémoglobine glyquée.

L'évaluation de l'hémoglobine A1c (HbA1c) est utilisée en pratique quotidienne au cours de la surveillance du diabète sucré.

Marqueur rétrospectif et objectif de l'équilibre glycémique à moyen terme, l'HbA1c est devenue un paramètre quasiment obligatoire dans le suivi du sujet diabétique quel que soit le type de diabète. Un rapport de la CNAMTS fait ressortir qu'en 1994 seul un diabétique sur trois avait un dosage régulier d'HbA1c et qu'en 1999 il y en avait 41 %. L'objectif pour 2000 étant d'obtenir 61 % de diabétiques de type 2 ayant un contrôle régulier de l'HbA1c. Longtemps sous utilisée par les cliniciens du fait de l'hétérogénéité des formes et des valeurs usuelles, l'HbA1c est devenue un paramètre à prendre en compte dans le suivi du diabétique grâce à deux études prospectives: le Diabetes Control and Clinical Trial(DCCT) portant sur les diabétiques de type 1 et l'United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) portant sur les diabétiques de type 2. Ces deux études ont en effet clairement établi une relation entre l'équilibre glycémique objectivé par l'HbA1c et les cinq complications micro et/ou macro-angiopathiques.

L'étude du DCCT a porté sur 1441 sujets suivis pendant une période moyenne de 6,5 ans et classés en deux groupes, comparables sur le plan de leur HbA1c initiale, selon des critères cliniques basés sur la présence ou non de rétinopathies et/ou néphropathies. La moitié des sujets a reçu un traitement conventionnel alors que les autres ont reçu un traitement intensif soit par pompe à insuline soit par un minimum de trois injections d'insuline par 24 heures.

Parallèlement au contrôle de l'évolution de la rétinopathie et de la néphropathie, l'HbA1c a été mesurée 1 fois par mois. Au terme de cette étude, il a été observé un ralentissement de l'évolution de la rétinopathie et une diminution de la microalbuminurie chez les sujets recevant un traitement intensif par rapport à ceux recevant un traitement conventionnel.

Dans le même temps, l'HbA1c a diminué de façon significative de 3 points passant de 11,6 % à 8,3 % dans le groupe diabétique ayant un traitement intensif alors qu'elle est restée à la même valeur dans l'autre groupe. Les résultats de l'UKPDS, qui ont porté sur des diabétiques de type 2 suivis pendant 15 ans et traités par antidiabétiques oraux associés ou non à l'insuline, ont montré qu'un bénéfice clinique caractérisé par une diminution du nombre d'infarctus du myocarde est corrélée à une diminution de l'HbA1c.

On accorde, en effet, une grande importance aux modifications des valeurs d'HbA1c pour adapter le traitement, et à un échelon plus large, pour apprécier le risque de survenu de complications dégénératives.

Limites du dosage de l'hémoglobine glyquée.

Le glucose se fixe sur l'hémoglobine. La durée de vie d'une hématie est de 120 jours, lors d'une prise de sang il y a un mélange de jeunes et de vieux globules rouges.

Les valeurs de l'hémoglobine glyquée ne sont plus interprétables lorsque la durée de vie des globules rouges est diminuée (< 120 jours) ou que leur ancienneté moyenne chute (< 60 jours). Dans les cas d'anémie, de saignement aigu et de transfusion, la baisse du taux d'HbA1c ne reflète pas celle, éventuelle, de la glycémie.

Le taux baisse naturellement de 1 à 1.5% en début de grossesse sans refléter un meilleur contrôle de la glycémie.

Des affections comme l'anémie hémolytique, la polycémie et les états homozygotes HbS et HbC peuvent entraîner une diminution de la vie des hématies. Les résultats d'hémoglobines A1c obtenus sont alors inférieurs à ceux escomptés et ceux, indépendamment de la méthode de dosage utilisée. Ils ne doivent donc pas être corrélés au contrôle glycémique lors de l'utilisation de plages de référence publiées.

Enfin, la comparaison des résultats successifs nécessite que la technique de dosage utilisée par le laboratoire soit bien identifiée, de telle sorte qu'un éventuel changement de celle-ci, soit intégré dans leur interprétation.