



Standardisation des dosages de l'HbA1c et de l'HbA2 : quelles voies d'évolution ?

Atelier EuromedLab 2007 – 5 juin 2007, Amsterdam



Élément clé d'un dialogue clinico-biologique efficace, la standardisation des techniques de biologie clinique participe pleinement à l'amélioration de la prise en charge des patients. Organisé dans le cadre d'EuromedLab 2007 par la société A. Ménarini*, l'atelier « HbA1c and HbA2 standardization : the way forward » a permis de faire un point sur les dernières évolutions et les travaux en cours dans le domaine de l'harmonisation des dosages de l'hémoglobine glyquée et de l'hémoglobine A2.

Actualité

Intervenants

Docteur Cas Weykamp, coordinateur du réseau de laboratoires HbA1c de la Fédération internationale de chimie clinique et de médecine de laboratoire (IFCC, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) – Queen Beatrix Hospital, Winterswijk, Pays-Bas – E-Mail : c.w.weykamp@skbwinterswijk.nl – <http://www.ifcchba1c.net/>

Professeur Renzo Galanello, Département de sciences biomédicales et de biotechnologie, Université de Cagliari, Ospedale Microcitemico, Italie – E-Mail : renzogalanello@mcweb.unica.it

Professeur Andrea Mosca, Coordinateur du groupe de travail HbA2 de l'IFCC – Département de sciences et technologies biomédicales – Université de Milan – E-Mail : andrea.mosca@unimi.it

Modérateurs

Docteur Garry JOHN, Norfolk and Norwich University Hospital, Norwich, Royaume-Uni.

Docteur Piero Giordano, Laboratoire des hémoglobinopathies, département de génétique humaine et clinique, Université de Leyde, Centre médical universitaire, Leyde, Pays-Bas.

Compte-rendu

Jean-Jacques Perrier, journaliste scientifique

* A. Ménarini diagnostics – 16, rue Georges Besse – Silic 46 – 92182 Anthony cedex

La standardisation des dosages de l'hémoglobine A1c

D'après l'intervention du Docteur Cas Weykamp



Depuis le début des années 1980, les médecins peuvent suivre sur le long terme l'évolution du diabète de type 1 et de type 2 grâce au dosage, tous les trois à quatre mois, de la fraction glyquée (ou glycosylée) A1c de l'hémoglobine (HbA1c). De plus, l'hémoglobine glyquée constitue une bonne mesure du risque de développement ou de progression des complications dues au diabète (rétinopathie, albuminurie, troubles cardiovasculaires, etc.), comme l'ont montré deux études épidémiologiques prospectives, l'une sur le diabète de type 1, le « Diabetes Control and Complications Trial » (DCCT, 1983-1993), l'autre sur le diabète de type 2, la « United Kingdom Prospective Diabetes Study » (UKPDS, 1977-1997) (1, 2).

La standardisation des réactifs de dosage (marquage CE) a été mise en place au niveau européen par la directive « IVD » relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* (98/79/CE). En revanche, l'harmonisation mondiale des normes de dosage de l'HbA1c reste à acquérir. Actuellement, la situation est confuse car il existe différentes normes aux Etats-Unis, au Japon, en Suède et dans le reste de l'Europe. Les Etats-Unis utilisent la méthode et les normes issues de l'étude DCCT et du National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP), le Japon les normes de la Société japonaise du diabète (JDS) et de la Société japonaise de chimie clinique (JSCC), et la Suède la référence « mono-S ». Beaucoup de pays n'ont pas de normes du tout. Or, la directive IVD énonce que « la traçabilité des valeurs attribuées aux matériaux d'étalonnage et/ou matériaux de contrôle doit être garantie par des procédures de mesure de référence existantes et/ou des matériaux de référence disponibles de niveau supérieur ». En clair, tous les produits de diagnostic vendus en Europe doivent être « traçables » en fonction d'une méthode de référence unique.

Vers un standard mondial

En 1994, la Fédération internationale de chimie clinique, l'IFCC (aujourd'hui International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine), avait décidé qu'il fallait développer une méthode de référence susceptible de servir de base à une harmonisation mondiale des valeurs de dosage de l'HbA1c. Entre cette volonté affichée et la réalité de terrain, il y avait évidemment un grand pas. Heureusement, lors d'un congrès mondial en Australie, plusieurs scientifiques américains, européens, japonais et australiens se sont concertés afin de « passer à l'offensive ». En 1995, ces chercheurs ont créé, sous l'égide de l'IFCC, un « groupe de travail pour la standardisation de l'HbA1c » qui visait à mettre en place un standard mondial garantissant une chaîne de traçabilité.

La première action de ce groupe de travail a consisté à donner une définition précise de l'HbA1c (l'analyte) : « l'hémoglobine irréversiblement glycosylée à l'une des ou aux deux terminaisons N des valines des chaînes bêta ». Puis, afin de calibrer la méthode de référence recherchée, un matériel primaire de référence a été produit en 1998. Il consistait en un mélange bien défini de fractions d'hémoglobine A1c et d'hémoglobine A0 (non glyquée) purifiées par chromatographie d'échange d'ions et chromatographie d'affinité, puis caractérisées par électrophorèse capillaire et spectrométrie de masse.

Naissance d'une nouvelle méthode de référence

Partant de ce matériel de calibrage, le groupe de travail a ensuite mis au point une méthode de référence pour le dosage de l'HbA1c. Schématiquement, une fois les érythrocytes isolés du sang prélevé, on provoque une hémolyse, puis on clive les chaînes bêta des molécules d'hémoglobine à l'aide d'une enzyme, l'endoprotéinase Glu-C. On obtient ainsi des hexapeptides glycosylés ou non glycosylés qui sont ensuite séparés par chromatographie liquide haute performance (HPLC). La quantité de chaque type d'hexapeptides est alors déterminée par spectrométrie de masse ou électrophorèse capillaire. Le pourcentage d'HbA1c recherché correspond au rapport de la quantité de peptides glyqués et de peptides non glyqués. Cette méthode de référence a été approuvée par l'IFCC en juillet 2001 et publiée en 2002 (3).

A partir de là, l'IFCC a mis en place un réseau de laboratoires destiné à comparer la nouvelle méthode aux modèles standards déjà en place : trois laboratoires aux Etats-Unis, trois au Japon, sept en Europe (Italie, Allemagne, Pays-Bas). Ce réseau a mené douze grandes études cliniques indépendantes en utilisant les systèmes nationaux de référence et a parallèlement recalculé les résultats des études antérieures selon la norme IFCC. Des équations



reliant les différents systèmes ont été établies. Ainsi, la relation entre la norme NGSP et la norme IFCC est :

$$\bullet \text{ NGSP} = (0,915 \times \text{IFCC}) + 2,15$$

Au final, en 2004, le résultat de dix années de travail se révélait pertinent : le nouveau système de référence était satisfaisant et l'on pouvait envisager de le mettre en œuvre partout dans le monde. C'est là que de nouvelles difficultés ont surgi. Car, comme le passage à l'euro l'a fort bien illustré, il n'est pas facile d'oublier un système de référence auquel on s'est habitué. Beaucoup de Français comptent encore en francs, les Américains continuent d'avoir froid ou chaud en degrés Fahrenheit, et les miles et les pouces ont la vie dure en Grande-Bretagne. Pour ne rien arranger, la méthode IFCC fournit des valeurs usuelles d'HbA1c de 1 à 2 % plus basses que celles que l'on obtient avec la standardisation NGSP. Ainsi, la valeur maximale d'HbA1c au-delà de laquelle une modification du traitement doit être envisagée est de 7 % pour le diabète de type 1 selon les normes NGSP ; si l'on utilise la méthode IFCC, cette valeur usuelle devient 5,3 %. Ces différences ont suscité un vaste débat sur la façon dont le dosage de l'hémoglobine glyquée doit être exprimé.

Un débat stratégique

Comment trancher ? Le débat mettait aux prises trois catégories d'experts : les « puristes », les « conservateurs », et les « stratèges ». Les premiers étaient décidés à supprimer rapidement tous les anciens systèmes et à instaurer partout la norme IFCC. A l'opposé, les conservateurs ne voyaient pas pourquoi « changer une équipe qui gagne » et souhaitaient continuer à recourir aux normes traditionnelles issues du DCCT. Les stratèges, quant à eux, jugeaient le moment venu d'harmoniser les systèmes nationaux ; mais il fallait pour cela trouver une solution consensuelle qui permettrait d'éviter les confusions d'interprétation découlant de la nouvelle norme exprimée en pour-cent.

En 2004, un groupe de travail avait été créé afin d'harmoniser la mesure de l'hémoglobine glyquée. Ce groupe, baptisé « ADA/EASD/IDF Working Group of the HbA1c Assay », comprenait des membres de la Fédération internationale du diabète (FID), de l'Association américaine du diabète (ADA) et de l'Association européenne d'étude du diabète (EASD), ainsi que des représentants du NGSP et de l'IFCC.

Or, à l'issue d'une réunion à Milan, le 4 mai 2007, le groupe a adopté le point de vue des « stratèges » en énonçant une série de recommandations consensuelles qui mettent un point final au débat. Ces recommandations seront publiées dans les mois qui viennent dans plusieurs revues internationales.

Notamment, les parties ont convenu que « le système de référence de l'IFCC pour le dosage de l'HbA1c représente la seule base valide pour mettre en place la standardisation des mesures » ; et « que les résultats du test HbA1c seront rapportés selon l'unité de l'IFCC, la mmol/mol et avec l'unité NGSP (%) dérivée en appliquant l'équation reliant les deux systèmes ». Ce dernier point élimine la confusion liée aux pourcentages voisins exprimés par le système NGSP et la méthode IFCC. En effet, l'unité mmol/mol donne des nombres si différents qu'ils ne peuvent être confondus avec les anciennes valeurs exprimées en pourcentage (voir le tableau I). Autre point convenu à Milan, si l'étude de la glycémie moyenne remplit les critères spécifiés a priori, il sera nécessaire d'indiquer le résultat sous forme de glycémie moyenne (Average plasma glucose, APG) en mmol/L ou en mg/dL, en tant qu'interprétation du dosage de l'HbA1c. Une étude ADA-EASD est aujourd'hui en cours et devrait aboutir à la proposition d'une équation de référence, ses résultats ont fait l'objet d'une présentation ("How do the HbA1c values relate to Mean Blood Glucose Concentrations? Results of the ADA-EASD multicentre study") lors des dernières rencontres de l'EASD à Amsterdam en septembre 2007.

Tableau I

Normes de dosage de l'HbA1c et valeurs. D'après un document de Cas Weykamp. * Extrait de l'étude DCCT.

HbA1c				glycémie moyenne (ou APG)*		Interprétation
Mono-S Suède (%)	JDS/JSCC Japon (%)	NGSP Etats-Unis (%)	IFCC mmol/mol	mmol/L	mg/dL	
7,2	7,6	8,0	64	11,5	200	Valeurs normales et limites d'action
6,1	6,6	7,0	53	9,6	164	Changer de thérapie
5,0	5,6	6,0	42	7,6	129	Cibler la thérapie
2,9	3,6	4,0	20	3,6	59	Limite supérieure de la normale
						Limite inférieure de la normale

Standardisation des dosages de l'HbA1c et de l'HbA2 : quelles voies d'évolution ?

Gérer la transition

Que va-t-il se passer désormais ? Le réseau de l'IFCC aura à coordonner la transition entre la situation actuelle, dans laquelle prévalent encore les modèles nationaux de référence, vers le nouveau système défini à Milan. Il devra assister les fabricants et soutenir également l'évaluation externe de la qualité (External Quality Assessment, EQA) destinée à maintenir la variabilité entre laboratoi-

res dans des limites acceptables. En pratique, la mise en place de la méthode l'IFCC entraînera une réorganisation pour les fabricants et les laboratoires : ils devront adapter les logiciels, recalibrer les kits et les instruments, etc., et aussi communiquer en direction des patients afin de leur expliquer les changements opérés. C'est une fois ces préparatifs achevés que le « jour J » du passage à la nouvelle méthode de référence pourra être annoncé, d'ici 2009 espérons-le.

BIBLIOGRAPHIE

(1) The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) 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.

(2) UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*, 1998, 352, 837-853.

(3) JEPPSSON JO, KOBOLD U., BARR J., FINKE A., HOELZEL W., HOSHINO T., MIEDEMA K., MOSCA A., MAURI P., PARONI R., THIENPONT L., UMEMOTO M., WEYKAMP C., Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood., *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2002, 40, 78-89. Disponible en ligne (http://www.ifcchba1c.net/files/ClinChemLabMed2002_40_78_89.pdf)

POUR EN SAVOIR PLUS

• Groupe de travail de l'IFCC

<http://www.ifcchba1c.net/>

• NGSP

<http://www.ngsp.org/prog/index.html>

• GOODALL I., HbA1c Standardisation Destination – Global IFCC Standardisation How, Why, Where and When. *Clin. Biochem. Rev.*, 2005, 26(1):5-19.

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=16278773>

• SACKS DB, Global Harmonization of Hemoglobin A1c., *Clin. Chem.*, 2005, 51(4):681-683

<http://www.clinchem.org/cgi/content/full/51/4/681>

Les thalassémies et l'hémoglobine A2

1. Adapter les résultats de laboratoire à la pratique clinique

D'après l'intervention du Professeur Renzo Galanello

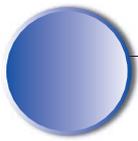


Les liens étroits existant entre laboratoires de diagnostic et pratique clinique sont particulièrement évidents dans le cas des maladies génétiques. La prévention de la mortalité et de la morbidité découlant de telles maladies est en effet un objectif majeur de santé publique.

Le cas des hémoglobinopathies

Les maladies de l'hémoglobine (hémoglobinopathies) constituent une excellente illustration de ce point de vue. Maladies monogéniques les plus fréquentes dans le monde, elles sont dues à des mutations affectant les gènes responsables de la synthèse des chaînes protéiques de l'hémoglobine. Les mutations qui provoquent un arrêt partiel ou total de la synthèse d'une chaîne sont responsables des « syndromes thalassémiques », tandis que celles qui entraînent la formation de chaînes de structure anormale sont appelées les « variants Hb ». Parmi les premiers, se trouvent l'alpha-thalassémie, la bêta-thalassémie, la delta-thalassémie et la delta-bêta-thalassémie (caractérisée par un taux élevé d'hémoglobine fœtale, HbF) ; parmi les pathologies liées à des « variants Hb », la plus connue et la plus fréquente est l'anémie falciforme (ou drépanocytose, variant HbS), suivie de l'hémoglobinosose E (variant HbE). L'hémoglobinopathie la plus grave est la bêta-thalassémie homozygote (thalassémie dite majeure), qui se révèle mortelle chez l'enfant par suite d'une anémie intense.

Certaines thalassémies peuvent être asymptomatiques et il est donc indispensable de disposer de méthodes diagnostiques fiables. Fort heureusement, le diagnostic d'hémoglobinopathie est facilité par le fait que presque toutes les mutations affectant l'hémoglobine accroissent le taux de sa



forme A2 (HbA2), composée de deux chaînes alpha et de deux chaînes delta et qui est produite à un taux d'environ 2,5 % à partir de la période néonatale. Il est aujourd'hui recommandé de réaliser le dosage de l'HbA2 par des méthodes de chromatographie liquide haute performance (HPLC), seule technique fiable qui a en outre l'avantage de permettre de doser l'HbF.

Microcytose et taux d'HbA2

La caractéristique première des thalassémies, quelle que soit leur forme, est une microcytose (diminution de la taille des hématies) définie par un volume corpusculaire moyen (VCM) bas ou une teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (HCM) faible. La microcytose est généralement associée à une augmentation du taux d'HbA2 au-dessus de 4 %. Toutefois, il existe des pathologies où elle s'accompagne d'un taux normal d'HbA2 : formes rares hétérozygotes de la bêta-thalassémie, anémie hémolytique par déficience en fer, alpha-thalassémie, bêta-delta thalassémie.

Des tests diagnostiques dosant précisément l'HbA2 permettraient donc de distinguer les différentes formes de thalassémie et seraient d'une grande utilité dans une perspective de prise en charge clinique et de conseil génétique. Mais, en pratique, peu de laboratoires peuvent accomplir ce dosage avec fiabilité et les risques d'erreur demeurent, notamment en cas d'utilisation de techniques de dosage inadéquates.

2. Les implications cliniques de la standardisation du dosage de l'hémoglobine A2

D'après l'intervention du Professeur Andrea Mosca



L'augmentation du taux de l'hémoglobine A2 (HbA2) est l'un des marqueurs caractéristiques de la bêta-thalassémie, maladie génétique très fréquente caractérisée par une forte anémie liée à une réduction de la synthèse des chaînes bêta de globine. Le dosage de l'HbA2 est donc considéré comme particulièrement important pour le diagnostic de cette pathologie. Celle-ci est cependant très hétérogène et le taux d'HbA2

peut être extrêmement variable selon les patients. De plus, la différence entre des valeurs normales et pathologiques est faible (quelques pour-cent). On conçoit donc que des dosages d'une grande précision soient indispensables pour un bon diagnostic.

Peptides delta et alpha

La standardisation du dosage l'HbA2 a commencé en 2004 au niveau de la Fédération internationale de chimie clinique et de médecine de laboratoire (IFCC) sous la responsabilité d'un groupe de travail similaire à celui qui travaille sur l'HbA1c. Première tâche : préparer du « matériel primaire de référence » en liaison avec l'Institut pour les matériels et mesures de référence (IRMM), et définir une chaîne de traçabilité.

Dans un premier temps, nous avons donc purifié du matériel de référence primaire dans notre laboratoire de l'Université de Milan. Ce matériel était constitué de trois mélanges d'hémoglobine A2 et d'hémoglobine A0 purifiées par chromatographie, puis caractérisées par spectrométrie de masse et électrophorèse capillaire.

De là, une procédure de référence pour le dosage de l'HbA2 a été mise au point. Partant du sang total, un hémolysat est traité par de la trypsine, et les peptides résultants sont séparés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) et quantifiés par spectrométrie de masse. Deux types de peptides, provenant des chaînes delta et alpha de la molécule d'hémoglobine nous intéressent. Le pourcentage d'HbA2 dans l'hémoglobine totale est alors défini comme le rapport entre la quantité de peptides spécifiques de la chaîne delta (delta T12 ou delta T14) et d'un peptide spécifique de la chaîne alpha (alpha T11).

Cette méthode a pu être optimisée au niveau de ses différentes étapes : digestion par la trypsine, séparation des peptides par HPLC, quantification fine par spectrométrie de masse. Une comparaison entre les résultats obtenus dans deux laboratoires de spectrométrie de masse a conduit à définir une procédure opératoire standardisée (SOP) qui a été validée par deux laboratoires, à Milan et à Strasbourg. La méthode candidate devrait dès lors faire l'objet d'une publication fin 2007.

Notre groupe de travail vise également à préparer un matériel de référence secondaire sous forme d'hémolysats lyophilisés, selon une procédure développée voilà plusieurs années et testée pour sa stabilité et la possibilité d'utiliser alternativement trois différentes méthodes d'HPLC. L'opération a débuté en mai 2007 et nous espérons diffuser ce matériel secondaire dès septembre 2007. Toutes les sociétés majeures de diagnostic (Analisis, Bio-Rad, Drew, Helena, A. Ménarini, Sebia, Tosoh Bioscience) ont manifesté leur intérêt pour cette méthode, qui pourrait être disponible commercialement en 2008.

Standardisation des dosages de l'HbA1c et de l'HbA2 : quelles voies d'évolution ?

Quelles conséquences cliniques ?

Le dosage de l'hémoglobine A2 est utilisé dans le diagnostic de la bêta-thalassémie, dans laquelle son taux est plus élevé que la normale. Une particularité intéressante est l'existence de « cas limites », c'est-à-dire de patients thalassémiques dont les valeurs d'HbA2 sont atypiques, proches du taux normal le plus élevé (3,3 % de l'hémoglobine totale). Les raisons de ce décalage peuvent être génétiques et environnementales.

Pour tenter de mieux les comprendre, nous avons mené une analyse rétrospective dans deux centres situés dans des zones de haute prévalence de la bêta-thalassémie en Italie : à Cagliari (Sardaigne), et à Palerme (Sicile). Nous avons recueilli les données de deux années de dosage d'HbA2 réalisé avec les mêmes méthodes analytiques.

Les données de Cagliari 2003-2004 montrent, sur 8 520 tests réalisés, une proportion de cas limites (HbA2 entre 3,3 et 3,7 % de l'hémoglobine totale) située entre 1,7 et 3,6 % chez les femmes et entre 0,5 % et 1,9 % chez les hommes. Les taux limites concernaient 194 sujets soit 2,3 %. A Palerme, sur 1 848 tests effectués, la prévalence des valeurs limites s'est révélée plus grande : entre 2,7 et 7,8 % chez les femmes, entre 4 et 5,7 % chez les hommes.

En caractérisant les génotypes d'un sous-groupe de 234 personnes ayant des valeurs limites d'HbA2, nous avons identifié un certain nombre de mutations génétiques qui ne concernaient toutefois que 25,6 % du sous-groupe des cas limites. Certaines mutations prédisposant à une plus grande sévérité de la bêta-thalassémie pourraient être cachées sous ces valeurs limites. Nous préconisons donc qu'elles soient systématiquement recherchées dans les couples à risque.

Le contrôle qualité

Un autre aspect crucial que nous avons étudié est le contrôle qualité. Afin d'évaluer la variation de qualité des dosages de l'HbA2 entre laboratoires, nous avons conduit en 2005 une étude pilote auprès de quarante-huit laboratoires italiens mesurant en routine cette fraction de l'hémoglobine. Les prélèvements donnés à tester avec le même instrument d'HPLC comportaient trois échantillons ayant des valeurs d'HbA2 normales, pathologiques ou limites. Résultat : tous les laboratoires ont différencié les échantillons normaux et pathologiques tandis que les données de l'échantillon « cas limites » était en partie interprétées comme normales ou comme pathologiques. La variation globale enregistrée entre laboratoires était respectivement de 8 %, 6 % et 7,9 % pour les échantillons de taux bas, haut et intermédiaire d'HbA2. Mais près de 20 % des laboratoires étaient encore loin du meilleur standard de l'analyse de l'HbA2, ce qui tend à montrer qu'une amélioration des dosages d'HbA2 doit être réalisée.

La standardisation du dosage de l'hémoglobine A2 passera par une meilleure performance des analyses – certains laboratoires continuant à utiliser des méthodes imprécises (électrophorèse sur acétate de cellulose, chromatographie sur microcolonnes...) – mais aussi, comme dans le cas de l'hémoglobine A1c, par une unification mondiale des unités de mesure utilisées pour rapporter les taux d'HbA2, qui pourraient être exprimés en mmol/mol. Un renforcement du conseil génétique est également souhaitable. C'est à ces conditions que les services offerts aux cliniciens et aux patients atteints de bêta-thalassémie pourront trouver toute leur efficacité.

POUR EN SAVOIR PLUS

• PALEARI R. *et al.* External quality assessment of hemoglobin A2 measurement: data from an Italian pilot study with fresh whole blood samples and commercial HPLC systems, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2007, 45(1), 88-92.

• MOSCA A. *et al.* Inter-method differences and commutability of control materials for HbA2 measurement, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2000, 38(10), 997-1002.

http://www.andreamosca.it/mgr_articoli/UploadAllegati/tsoofrrsbbfs.2000%20CCLM%20commutab%20HbA2.pdf

• MOSCA A. *et al.* New analytical tools and epidemiological data for the identification of HbA2 borderline subjects in the screening for beta-thalassemia, *Bioelectrochemistry*, 2007, à paraître.