

Rapport des experts de l'ALFEDIAM et de la SFBC

HbA_{1c} : CONCERTATION CLINICO-BIOLOGIQUE POUR LA STANDARDISATION DES MÉTHODES DE DOSAGE

P. GILLERY (1, 4), M. BORDAS-FONFRÈDE (1, 5), J.P. CHAPELLE (1, 6), P. DROUIN (2, 7), G. HUE (1, 8),
C. LÉVY-MARCHAL (2, 9), C. PÉRIER (1, 10), J.L. SÉLAM (3, 11), G. SLAMA (3, 11), C. THIVOLET (2, 12),
B. VIALETES (2, 13)

SUMMARY - HbA_{1c}: Clinical and biological agreement for assay standardization

Glycohaemoglobin, and particularly haemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}), assays have been used for many years to retrospectively evaluate the glycaemic control of diabetic patients. Cut-off values have been established for deciding treatment modifications. The techniques used in the laboratories however exhibit varying quality, and all of them are not yet standardized. The consequence is an under-utilization of this test, especially in non-hospital practice. In this context, working groups of Société Française de Biologie Clinique (SFBC), Association de Langue Française pour l'Etude du Diabète et des Maladies Métaboliques (ALFEDIAM) and Société Française d'Endocrinologie (SFE) have met together, in order to analyze the national status, and to propose practical recommendations for implementing a standardization process on the basis of international experiences. It is recommended to exclusively express results as HbA_{1c} percentage, using methods standardized and certified by comparison to reference methods such as those using Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) values. Simultaneously, contacts have been established with manufacturers, and the realisation of periodic quality control surveys was encouraged.

Key-words: HbA_{1c}, assay, standardization, diabetes mellitus.

RÉSUMÉ - Le dosage de l'hémoglobine glyquée, et principalement de sa fraction majeure l'hémoglobine A_{1c} (HbA_{1c}), est utilisé depuis des années pour évaluer de façon rétrospective l'équilibre glycémique des patients diabétiques. Des seuils de décision thérapeutique ont été définis pour permettre une meilleure adaptation du traitement. Les techniques utilisées par les biologistes restent cependant de qualité très inégale, et ne sont pas toutes standardisées. Il en résulte une sous-utilisation de ce test en pratique médicale, particulièrement en milieu non hospitalier. Dans ce contexte, des groupes de travail de la Société Française de Biologie Clinique (SFBC), de l'Association de Langue Française pour l'Etude du Diabète et des Maladies Métaboliques (ALFEDIAM) et de la Société Française d'Endocrinologie (SFE) se sont réunis afin d'analyser la situation nationale, et de proposer des mesures concrètes permettant de faire évoluer les techniques de dosage vers la standardisation, sur la base d'expériences internationales. Il est recommandé de n'exprimer les résultats que sous la forme d'HbA_{1c}. Le dosage doit être réalisé à l'aide de techniques standardisées et certifiées par rapport à des systèmes de référence, dont par exemple ceux de l'étude du Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) aux Etats-Unis. Des contacts simultanés avec les fabricants, ainsi qu'une incitation au développement de contrôles de qualité réguliers, ont également été entrepris.

Mots-clés : HbA_{1c}, dosage, standardisation, diabète sucré.

- (1) Groupe de Travail de la Société Française de Biologie Clinique (SFBC) «Standardisation des dosages d'hémoglobine glyquée» (Section «Assurance de Qualité»),
- (2) Membre associé au Groupe de travail SFBC, représentant l'Association de Langue Française pour l'Etude du Diabète et des Maladies Métaboliques (ALFEDIAM),
- (3) Membre associé au groupe de travail SFBC, représentant la Société Française d'Endocrinologie (SFE),
- (4) Laboratoire Central de Biochimie, Hôpital Robert Debré, CHU de Reims.
- (5) Laboratoire Central de Biochimie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris
- (6) Département de Biologie Clinique, Service de Chimie Médicale, CHU de Liège, Belgique
- (7) Service de Médecine G, Hôpital Jeanne d'Arc, CHU de Nancy
- (8) Laboratoire de Biochimie Médicale, Hôpital Charles Nicolle, CHU de Rouen
- (9) Service d'Endocrinologie-Diabétologie Pédiatriques, Hôpital Robert Debré, Paris
- (10) Laboratoire de Biochimie, CHU de Saint-Etienne
- (11) Service de Diabétologie, Hôtel Dieu de Paris
- (12) Service d'Endocrinologie-Diabète-Nutrition, Hôpital Edouard Herriot, Lyon
- (13) Service de Nutrition, Hôpital Sainte Marguerite, CHU de Marseille.

 : Ph. GILLERY, Laboratoire Central de Biochimie, Hôpital Robert Debré, CHU de Reims, 51092 Reims cedex.
E-mail : pgillery@chu-reims.fr
Received : 10 avril 1999

L'intérêt de l'hémoglobine A_{1c} (HbA_{1c}) comme marqueur rétrospectif de l'équilibre glycémique chez le patient diabétique n'est plus à démontrer. Reflet cumulatif de la glycémie moyenne des quatre à six semaines qui précèdent le dosage, il est utilisé en pratique courante pour évaluer de façon rétrospective l'efficacité du traitement, en complément des dosages glycémiques instantanés réalisés quotidiennement. Des objectifs thérapeutiques très précis, déterminés à partir de résultats d'études prospectives ou rétrospectives à grande échelle, ont été fixés à la fois dans le diabète de type 1 et dans le diabète de type 2 [1-4]. Ces études ont permis de définir des objectifs thérapeutiques théoriques pour diminuer raisonnablement les risques de complications spécifiques et d'hypoglycémie. Ainsi, l'ALFEDIAM recommande, dans le diabète de type 1, des valeurs d'HbA_{1c} comprises entre 7 et 7,5 %, et dans le diabète de type 2, un taux d'HbA_{1c} inférieur à 6,5 %, pour un individu d'âge moyen et sans contre-indication au contrôle glycémique strict [5].

Le dosage est par ailleurs inscrit à la nomenclature de la Caisse Nationale d'Assurance Maladie et fait l'objet de Références Médicales Opposables compatibles avec son utilisation en diabétologie. Sur le plan méthodologique, la situation devrait donc être parfaitement claire, et l'utilisation de ce dosage ne poser aucun problème particulier. Cependant, plus de vingt ans après son introduction dans les laboratoires de biologie, il n'en est malheureusement rien. Cet article se propose de faire rapidement l'état des lieux en matière de dosage d'HbA_{1c}, avant de proposer des recommandations concrètes pour l'utilisation standardisée du test.

■ ÉTAT DE LA SITUATION

La difficulté -ou l'ambiguïté- de la situation est bien illustrée par le fait que les recommandations cliniques indiquées plus haut, caractérisées par leur exigence, sont toujours assorties de la restriction suivante : l'HbA_{1c} doit être dosée par une "bonne technique". Ce terme mérite d'être défini. Une bonne technique de dosage de l'HbA_{1c} doit posséder des qualités suffisantes en matière de précision et de justesse, être strictement contrôlée et répondre aux critères de praticabilité adaptés aux besoins du laboratoire [6, 7]. Ces deux derniers points ne devraient pas présenter de difficulté particulière. Le contrôle de qualité est une obligation de tout laboratoire de biologie, et la praticabilité est spécifique à chaque utilisation. En revanche, les deux premiers paramètres doivent faire l'objet d'une évaluation soignée. La précision doit être garantie par des coefficients de variation intra-essais et inter-essais respectivement inférieurs à 3 et 5 %, tant pour des valeurs normales que pathologiques [8].

L'exactitude doit être vérifiée régulièrement par l'adéquation des résultats de la technique considérée avec ceux d'une méthode de référence. Les problèmes d'imprécision sont donc liés aux qualités intrinsèques des méthodes et aux modes de réalisation de celles-ci. L'amélioration de la situation passe par l'abandon pur et simple des méthodes trop imprécises. En revanche, les défauts de justesse sont également dus à l'absence d'un étalon reconnu de façon universelle, et de calibration dans le cas de certaines techniques pour lesquelles cette opération n'est pas considérée comme nécessaire. L'ensemble de ces problèmes est provoqué et entretenu par l'absence de standardisation.

Les opérations de contrôle de qualité menées en France depuis 1991 par la Société Française de Biologie Clinique (SFBC) et l'Agence du Médicament ont montré une grande inégalité de performance des méthodes, certaines étant compatibles avec leur usage en biologie clinique, d'autres absolument pas. Ces enquêtes ont également révélé une grande dispersion des valeurs de référence indiquées par les laboratoires, génératrice de possibles erreurs d'interprétation des résultats [9, 10]. On peut ajouter à cela que, même si l'HbA_{1c} doit être dosée spécifiquement, d'autres formes d'hémoglobine glyquée sont encore mesurées par certaines méthodes, ce qui engendre une confusion supplémentaire [11]. Il en résulte que la plupart des diabétologues et des médecins prescripteurs n'accordent crédit qu'aux résultats d'un seul laboratoire, dont ils connaissent la technique et les valeurs de référence. Il existe donc un réel contraste entre les valeurs très exactes demandées par les diabétologues et la qualité réelle des résultats. Cette situation est difficilement acceptable car elle conduit à une utilisation incorrecte de ce test effectué par plus de 2000 laboratoires en France, dont les résultats ne sont ni comparables, ni de valeur équivalente.

L'amélioration de l'utilisation de ce dosage nécessite plusieurs niveaux d'intervention portant sur la terminologie, la standardisation des dosages, les critères de contrôle des méthodes et d'interprétation des résultats.

■ TERMINOLOGIE

La glycation non enzymatique désigne la fixation lente et irréversible d'oses (ou de leur dérivés) sur les groupements aminés libres des protéines. Dans l'HbA_{1c}, la réaction est caractérisée par la fixation de glucose à l'extrémité N-terminale des chaînes β de l'hémoglobine A. Cette forme d'hémoglobine n'est pas la seule à résulter du processus de glycation, pas plus que l'hémoglobine n'est la seule protéine cible. Il en est de même pour toutes les protéines de l'organisme, circulantes ("fructosamines") aussi bien que tissulaires. Ce processus, qui est essentiellement dépendant de l'hyperglycémie et de la durée d'exposi-

tion des protéines, est augmenté dans le diabète sucré. Il diffère des réactions de glycosylation, phénomène enzymatique de la post-traduction immédiate de la synthèse des protéines. Les protéines modifiées par réaction non enzymatique avec le glucose ne sont pas glycosylées, mais glyquées. Le terme d'hémoglobine glycosylée, impropre, doit donc être proscrit, même si les biochimistes ont été les premiers à l'employer à tort lors de la mise au point des techniques dans les années 70. En fait, les mauvaises habitudes de langage ont persisté, et le néologisme scientifiquement correct mais parfois considéré comme peu harmonieux "hémoglobine glyquée" ne rencontre pas l'adhésion évidente de la communauté médicale. Il nous apparaît cependant capital de s'accorder sur un terme. Compte tenu de l'évolution actuelle de la standardisation, il peut être proposé de n'utiliser que le terme d'HbA_{1c}, connu et accepté par tous, et correspondant au composant le mieux caractérisé et le plus abondant de l'hémoglobine glyquée [12, 13].

■ STANDARDISATION DES MÉTHODES DE DOSAGE D'HÉMOGLOBINE A_{1c}

Le deuxième problème à prendre en compte est celui de la méthode et des matériaux de référence. La communauté scientifique reste divisée sur cette question. Deux groupes sont impliqués dans les travaux internationaux de standardisation. Ils devraient à terme arriver à une solution commune, mais leurs efforts actuels sont encore orientés de façon légèrement divergente.

Le premier groupe est le groupe américain du NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program), qui utilise comme système de référence une chromatographie liquide haute performance (CLHP) d'échange cationique et des étalons d'HbA_{1c} purifiée. Il dispose d'un réseau de laboratoires de référence et propose dès maintenant un protocole de certification des méthodes. L'atout majeur de ce groupe est de s'appuyer sur les travaux menés depuis plusieurs années par le DCCT (Diabetes Control and Complications Trial), qui ont permis de définir un intervalle de référence pour l'HbA_{1c}, ainsi que les seuils de décision évoqués plus haut [1, 3, 4, 14].

Le deuxième groupe a été créé il y a environ cinq ans par l'IFCC (International Federation of Clinical Chemistry), et regroupe des biologistes des différentes sociétés nationales de biologie. Ce groupe de travail, dont le réseau est en cours de constitution, a adopté une définition plus restrictive de l'HbA_{1c}, en considérant comme structure de référence l'hexapeptide N-terminal glyqué des chaînes β de la globine. Il a par ailleurs proposé une méthode de référence associant une CLHP en phase inverse et une détection par spectrométrie de masse-électrospray ou par électrophorèse capillaire, après digestion enzymatique de l'hémoglo-

bine. Cette mesure, spécifique d'une forme d'HbA_{1c} chimiquement définie, est sans doute plus satisfaisante, sur le plan scientifique, que la mesure par CLHP en échange ionique du NGSP, qui peut prendre en compte d'autres composés élués à ce niveau, comme l'hémoglobine carbamylée. Cependant, il n'est pas évident que les résultats obtenus depuis 20 ans par le DCCT puissent être directement transposables aux résultats obtenus par cette nouvelle technique, qui paraît fournir des valeurs plus basses, à moins qu'un facteur de correction ne soit appliqué. On ne dispose pas encore, à l'heure actuelle, d'études cliniques prospectives permettant de valider les résultats obtenus avec cette méthode [15-17].

Dans cette période transitoire, en accord avec les représentants des Sociétés médicales savantes impliquées en Diabétologie, le groupe de travail de la SFBC a décidé d'émettre des recommandations afin d'initier dès maintenant le processus de standardisation en France, tout en tenant compte des incertitudes qui existent encore au niveau international. Ces recommandations sont les suivantes [18] :

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

2) Les méthodes utilisées doivent soit doser directement l'HbA_{1c}, soit pouvoir être reliées à une méthode de référence dosant l'HbA_{1c} afin de corriger les valeurs brutes.

Ceci inclut par exemple les méthodes par chromatographie d'affinité, qui dosent l'ensemble des hémoglobines glyquées [19].

3) Les techniques utilisées par les laboratoires doivent faire la preuve de leur traçabilité à une méthode de référence recommandée par les sociétés scientifiques déjà citées : NGSP/DCCT ou IFCC. Il appartient aux biologistes de s'informer auprès des fournisseurs des conditions d'étalonnage de leurs méthodes, 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 certifications garantissent que la méthode répond à des critères minimaux en matière de justesse et de précision.

Il faut insister sur le fait qu'il n'existe pas de méthode de référence disponible sur le marché qui soit utilisable pour les dosages courants, mais uniquement des méthodes ayant fait la preuve de leur traçabilité aux méthodes de référence proposées. Il est par ailleurs possible, pour tout laboratoire qui utiliserait une technique propre, de la faire certifier directement par ces groupes, selon les procédures recommandées par ceux-ci.

Les fabricants doivent, quant à eux, s'assurer de l'étalonnage de leurs méthodes par rapport aux méthodes de référence, et fournir aux biologistes, en plus des moyens matériels nécessaires à la concrétisation

de cet étalonnage, tous documents de certification relatifs à la standardisation des techniques qu'ils proposent.

■ CONTRÔLE DES MÉTHODES

L'utilisation de méthodes standardisées ne dispense pas les biologistes du respect constant des bonnes pratiques de laboratoire. Ainsi, si la méthode comporte un calibrage obligatoire des séries, celui-ci ne doit jamais être omis. De même, le contrôle de qualité doit être une préoccupation constante, surtout si la technique utilisée ne permet pas la visualisation objective de la fraction HbA_{1c}. Un contrôle de qualité interne, nécessité préalable à la validation du résultat, doit être instauré et concerne chaque série d'analyses. Les laboratoires doivent également participer à des contrôles externes, plus efficaces pour tester l'exactitude, notamment par le biais de contrôles de qualité régionaux procédant à des vérifications ponctuelles. Enfin, les opérations menées au niveau national doivent être encouragées et devenir systématiques malgré leur lourdeur et leur coût. Le groupe de standardisation SFBC, appuyé par les associations de diabétologues, a récemment sensibilisé l'Agence du Médicament à cet important problème.

En tout état de cause, le clinicien doit pouvoir, à tout moment, avoir connaissance des données du contrôle de qualité du laboratoire qui lui a fourni les résultats, et en discuter avec le biologiste.

■ INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les données obtenues au cours du DCCT font actuellement référence. Ainsi, il est admis que la valeur de référence de l'HbA_{1c} chez le sujet sain est de 4 à 6 % de l'hémoglobine totale. Chez le patient diabétique, le but est d'obtenir des chiffres d'HbA_{1c} aussi proches que possible des chiffres normaux, témoins du bon équilibre glycémique, en se méfiant des hypoglycémies, passant souvent inaperçues. Les objectifs thérapeutiques varient suivant le type de diabète et doivent tenir compte des autres moyens objectifs de surveillance.

Dans le diabète de type 1, l'objectif thérapeutique qui cumule les risques minimaux spécifiques et d'hypoglycémies sévères est représenté par des concentrations d'HbA_{1c} comprises entre 7,0 et 7,5 %. Cependant, cette règle peut avoir des exceptions. Chez les sujets âgés ou les patients pour qui des hypoglycémies peuvent avoir des conséquences graves, des taux d'HbA_{1c} plus élevés peuvent être tolérés. Au contraire, chez la femme enceinte, les objectifs thérapeutiques sont encore plus rigoureux. Dans le diabète de type 2, les données de l'étude de UKPDS permettent de fixer une valeur optimale de l'HbA_{1c} sous le

seuil de 6,5 % [4-5]. Les résultats ponctuels permettent d'évaluer l'équilibre récent (deux à trois derniers mois), et la valeur moyenne des résultats disponibles sur plusieurs années d'évaluer, au moins sous l'angle glycémique, le risque micro et macrovasculaire.

Les opérations actuelles ne doivent pas remettre en cause ces valeurs bien établies. Si le consensus des groupes internationaux se faisait sur le système IFCC, il conviendrait si possible d'adopter un facteur de correction permettant de cibler les valeurs par rapport à celles du DCCT.

Il existe donc un consensus actuel des cliniciens, biologistes et fournisseurs pour adopter une position commune vis-à-vis de la standardisation des dosages d'HbA_{1c}. Les recommandations formulées ici devraient permettre d'abandonner rapidement les méthodes non standardisables, et de rendre plus comparables les résultats obtenus d'un laboratoire à l'autre. Il conviendra ensuite de privilégier la qualité intrinsèque des méthodes, non seulement en matière de justesse, mais aussi de précision, afin de recommander l'utilisation des techniques les plus performantes. Ces mesures devraient permettre dès maintenant une amélioration de l'utilisation du dosage de l'HbA_{1c} en terme de santé publique, en attendant la mise en place des mesures internationales définitives de standardisation.

Remerciements – Les auteurs remercient le Pr G. Férard (coordonnateur de la section "Assurance de Qualité" de la SFBC) pour sa relecture attentive du manuscrit.

RÉFÉRENCES

- 1 Goldstein DE, Little RR. Monitoring glycemia in diabetes, Short term assessment. *Curr Therap Diab*, 1997, 26,475-86.
- 2 Bernard M, Bordas-Fonfrède M, Grimaldi A, et al. Intérêts respectifs des dosages d'hémoglobine glyquée et de fructosamines dans la surveillance du diabète sucré. *Ann Biol Clin*, 1995, 53,321-7.
- 3 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, 329,977-86.
- 4 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, 837-53.
- 5 Drouin P, Blicke JF, Charbonnel B, et al. Diagnostic et classification du diabète sucré. Les nouveaux critères. *Diabetes Metab*, 1999, 25,72-83.
- 6 Gillery P, Delpech M, Garcia I, Vague P, Dezier JF, Périer C. Evaluation des méthodes de dosage de l'hémoglobine glyquée : méthode et paramètre de référence. *Ann Biol Clin*, 1995, 53,395-8.
- 7 Gillery P, Endler AT, Rubik K, Scheuermann T. Determination of HbA_{1c} on routine clinical chemistry analyzers. *Clin Lab*, 1993, 39,1076-9.
- 8 Larsen ML, Blaaber O, Petersen PH, Hansen H, Horder M. Analytical goal setting prior to selection of a method for glycated haemoglobin. *Scand J Clin Lab Invest*, 1990, 50,715-21.
- 9 Gillery P, Labbé D, Dumont G, Vassault A. Glycohemoglobin assays evaluated in a large-scale quality-control survey. *Clin Chem*, 1995, 41,1644-8.

-
- 10 Gillery P, Dumont G, Vassault A. Evaluation of GHb assays in France by national quality control surveys. *Diabetes Care*, 1998, 21,265-70.
 - 11 Gillery P, Guillemin C, Delpech M. Hémoglobine glyquée : méthodes de dosage et problèmes de standardisation. *Ann Biol Clin*, 1994, 52,157-63.
 - 12 Bunn HF, Haney DN, Kamin S, Gabbay KH, Gallop PM. The biosynthesis of human hemoglobin A_{1c}. Slow glycosylation of hemoglobin *in vivo*. *J Clin Invest*, 1976, 57,1652-9.
 - 13 Peterson KP, Pavlovich JG, Goldstein D, Little R, England J, Peterson CM. What is hemoglobin A_{1c} ? An analysis of glycosylated hemoglobins by electrospray ionization mass spectrometry. *Clin Chem*, 1998, 44,1951-8.
 - 14 Eckfeldt JH, Bruns DE. Another step toward standardization of methods for measuring hemoglobin A_{1c}. *Clin Chem*, 1997, 43,1811-3.
 - 15 Hoelzel W, Miedema K. Development of a reference system for the international standardization of HbA_{1c}/glycohemoglobin determinations. *JIFCC*, 1996, 9, 62-7.
 - 16 Kobold U, Jeppson JO, Dülffer T, Finke A, Hoelzel W, Miedema K. Candidate reference methods for hemoglobin A_{1c} based on peptide mapping. *Clin Chem*, 1997, 43,1944-51.
 - 17 Finke A, Kobold U, Hoelzel W, Weykamp C, Miedema K, Jeppson JO. Preparation of a candidate primary reference material for the international standardisation of HbA_{1c} determinations. *Clin Chem Lab Med*, 1998, 36,299-308.
 - 18 Gillery P, Bordas-Fonfrède M, Chapelle J.P, Hue G, Périer C. Hémoglobine glyquée : le temps de la standardisation est venu. *Ann Biol Clin*, 1998, 56,249-51.
 - 19 Nuttall FQ. Comparison of percent total GHb with percent HbA_{1c} in people with and without known diabetes. *Diabetes Care*, 1998, 21,1475-80.
-