

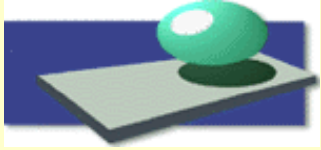
Intérêt du dosage enzymatique d'HbA1c en routine.

CNBH Toulouse 2012

S. Moutereau, Biochimie
CHU H. Mondor, Créteil



ACNBH



Agrément FMC
N° 100 168

**41^{ème} Colloque National
des Biologistes des Hôpitaux
Toulouse, 24-28 septembre 2012**



**DECLARATION D'INTERET
DANS LE CADRE DE MISSIONS DE FORMATION
REALISEES POUR L'ACNBH**

Le Dr Stéphane Moutereau exerçant au CH H. Mondor à Créteil déclare sur l'honneur **ne pas avoir d'intérêt**, direct ou indirect (financier) avec les entreprises pharmaceutiques, du diagnostic ou d'éditions **en relation avec le DMDIV et/ou le sujet présenté.**

Epidémiologie du diabète

- Le diabète est un problème de santé mondial se développant dans tous les pays,
- La prévalence du diabète aux USA (adultes de 20 à 74 ans) était de 4,9% en 1990, de 6,5% en 1998 et de 8,1% en 2009
- Actuellement, au niveau mondial, entre 286 millions de personnes seraient diabétiques,
- A l'horizon 2034, le chiffre US devrait doubler
- Cette « épidémie » est liée au vieillissement de la population, à une mauvaise alimentation, à l'obésité et au manque d'exercice physique.

En France, chiffres 2010

- 2.900.000 de diabétiques (INVS 2010, soit 4,4%; 2,6% en 2000)
 - 15% insulino-dépendants (type I) survenant le plus souvent avant l'âge de 20 ans,
 - 85% non insulino-dépendants (type 2) survenant le plus souvent après 50 ans
- De plus environ 700.000 diabétiques qui s'ignorent.
- Diabète gestationnel: 1 à 4% des grossesses.

Diabète et OMS

Définition en 1985 : le diabète sucré est une élévation plus ou moins importante, plus ou moins permanente, de la glycémie, relevant de causes diverses.

Glycémie à jeun

< 1.26 g/L

< 7 mmol/L

$\text{g/l} \times 5,56 = \text{mmol/l}$

$\text{mmol/l} \times 0.180 = \text{g/l}$

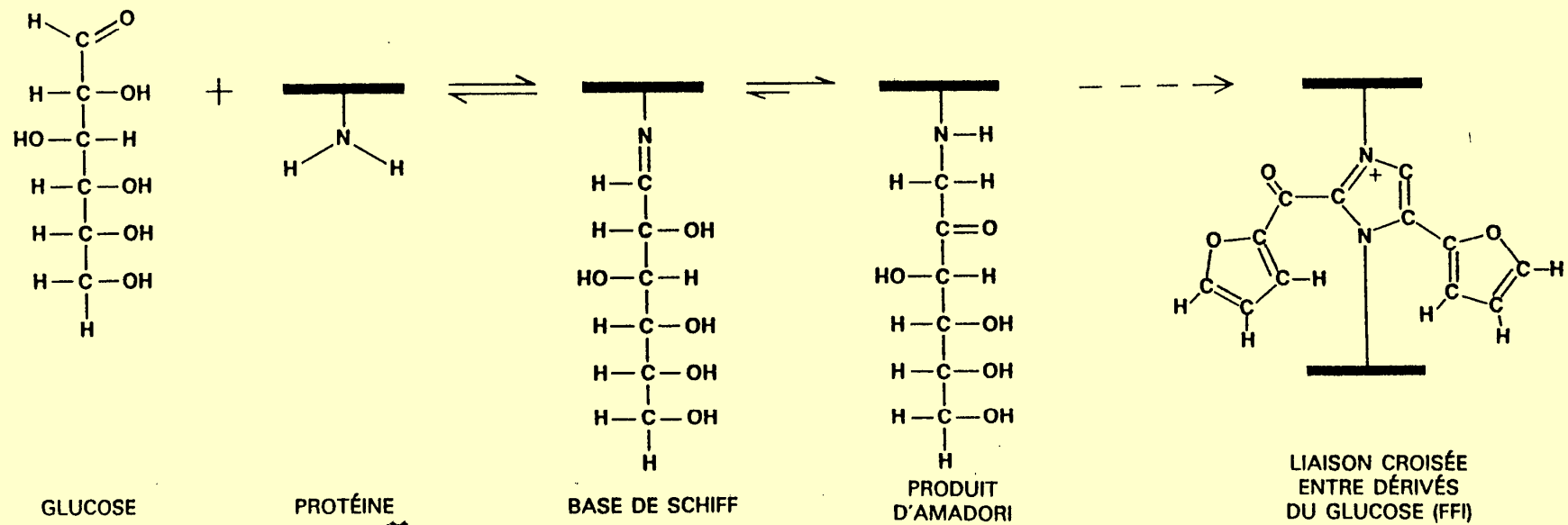
Critères biologiques de diagnostic du diabète

- Le diabète se définit par une hyperglycémie chronique, soit par une glycémie à jeun : **> 7 mmol/l à 2 reprises**
- Glycémie 2h après une charge en glucose: **> 11.1 mmol/l**
- Glycémie ponctuelle: **> 11.1 mmol/L**
- L'HGPO garde une place dans les situations difficiles à interpréter
- **HbA1c**: proposée en 2009 comme critère diagnostic (Seuils 5.7 et 6.5%)
 - **Méthode de mesure standardisée**
 - Plus faible variabilité biologique (2%) que le glucose plasmatique à jeun (12 à 15%)
 - Traduit mieux la glycémie chronique
 - Meilleure corrélation et prédiction de complications secondaires
 - Pré-analyse plus stable et indépendante de l'heure ou du stress
 - Directive pour l'adaptation du traitement

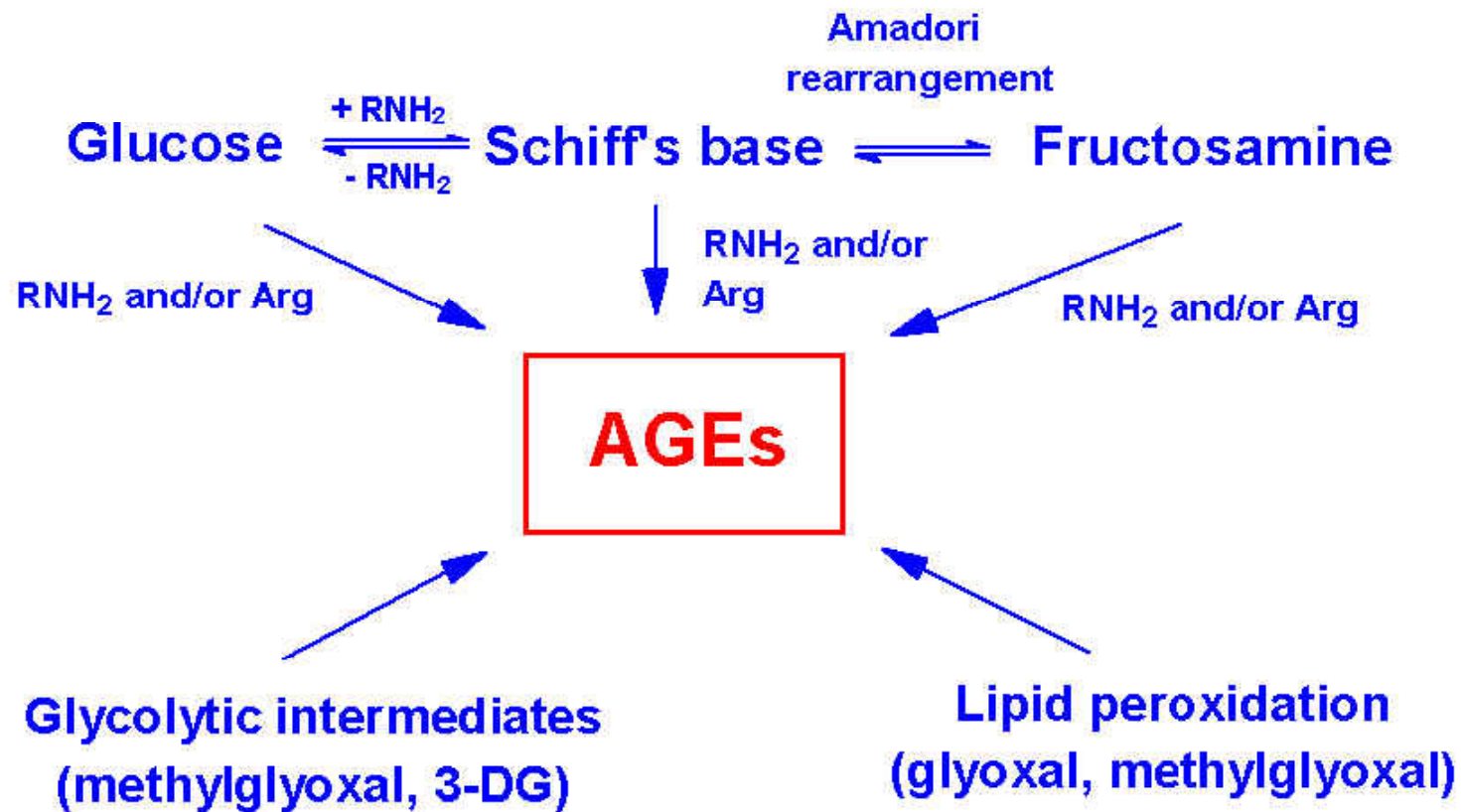
Bases biochimiques de la glycation des protéines

- **1ère étape « l'initiation »** : processus réversible > base de Schiff qui se transforme en cétoamine stable dont l'hb A1c est un exemple. Ce sont les **produits précoces de la glycation**,
- **2ème étape dite «de propagation »** : phase de clivage et d'auto-oxydation conduisant à des produits connus comme la N-carboxyméthyl lysine (CML)
- **l'étape terminale ou « de cyclisation »**: aboutit à des produits caractérisés par leur coloration brune (produits de Maillard) ou leur fluorescence ou des produits de glycation avancée (Advanced Glycation Endproducts =AGE) dont la pentosidine est un exemple.

Advanced Glycosylation End products (AGE)



Early and advanced glycation



Proteins AGEs:

N^ϵ -carboxymethyl-lysine (CML), pentosidine, hydroimidazolones and many others

La glycation des protéines

- résulte de la fixation d'un sucre réducteur (glucose ou fructose) ou d'un aldéhyde sur une fonction amine N-terminale d'une protéine, les acides aminés concernés étant le plus souvent la valine ou la lysine,
- réaction **non enzymatique** : formation d'un composé dit « base de Schiff »,
- réaction dépendante du **temps d'exposition** au sucre et donc du **niveau de la glycémie**,
- réarrangement de la base de Schiff > composé stable dit « d'Amadori ».

Protéines glyquées

- **hémoglobine**
- insuline
- récepteur de l'insuline
- **albumine**
- protéines du plasma
- protéines de la myéline
- **lipoprotéines**
- fibrinogène
- **crystallin**
- protéines des membranes des GR
- collagène

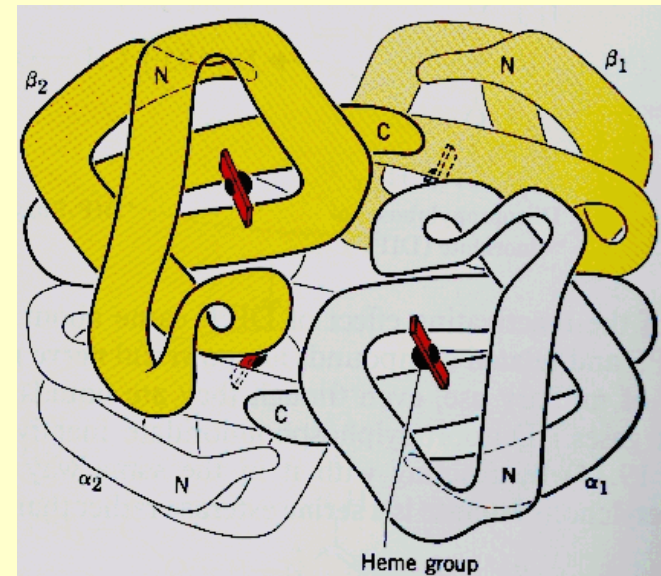


La glycation des protéines

- La glycation dépend :
 - de la durée de vie de chaque protéine,
 - de la concentration en ose,
- Le glucose est le principal ose à se lier,
- La glycation de l'hémoglobine sur le NH_2 terminal de la chaîne béta modifie son pHi → **hémoglobine A1c**
- La concentration de l'hémoglobine A1c dans le sang = « l'historique » de la glycémie durant les 120 jours précédents (moyenne de la durée de vie des GR).

Structure de l'hémoglobine

- hémoglobine (MM = 64 500): constituée d'un noyau (hème) et de 4 chaînes polypeptiques (globine),
- hémoglobines normales: deux chaînes alpha et deux chaînes non alpha,
- formes génétiquement déterminées:
 - Hb A ($\alpha_2 \beta_2$),
 - Hb A2 ($\alpha_2 \delta_2$),
 - Hb F ($\alpha_2 \gamma_2$),
- formes résultant d'une modification post-traductionnelle:
 - Hb A1a,
 - Hb A1b,
 - **Hb A1c.**



Glycation de l'hémoglobine

Les aldimes formées ont des vitesses de réarrangement d'Amadori variables, influencées par leur micro environnement,

β -VAL-1

β -LYS-66

α -LYS-61

β -LYS-17

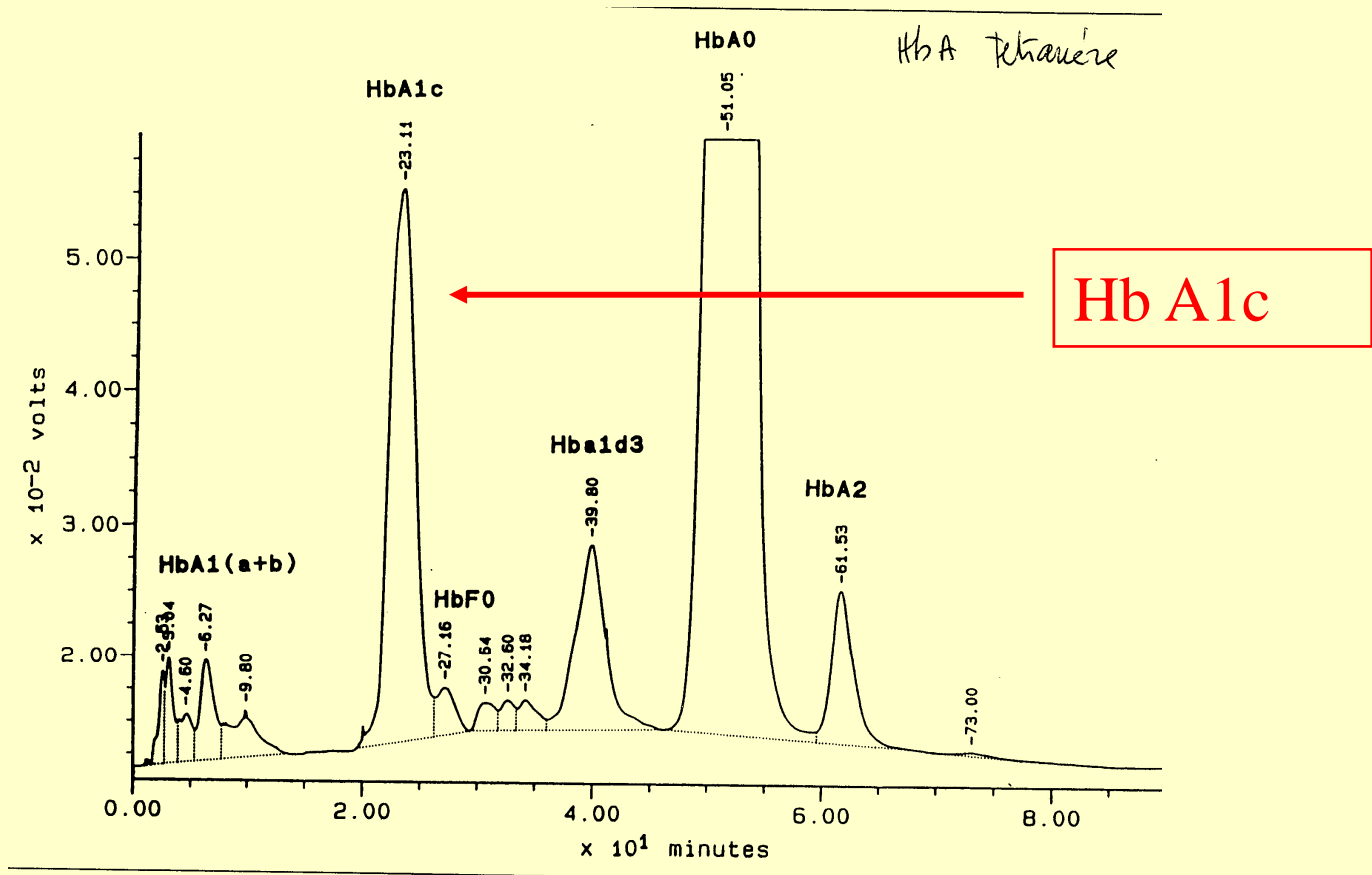
α -VAL-1

α -LYS-7

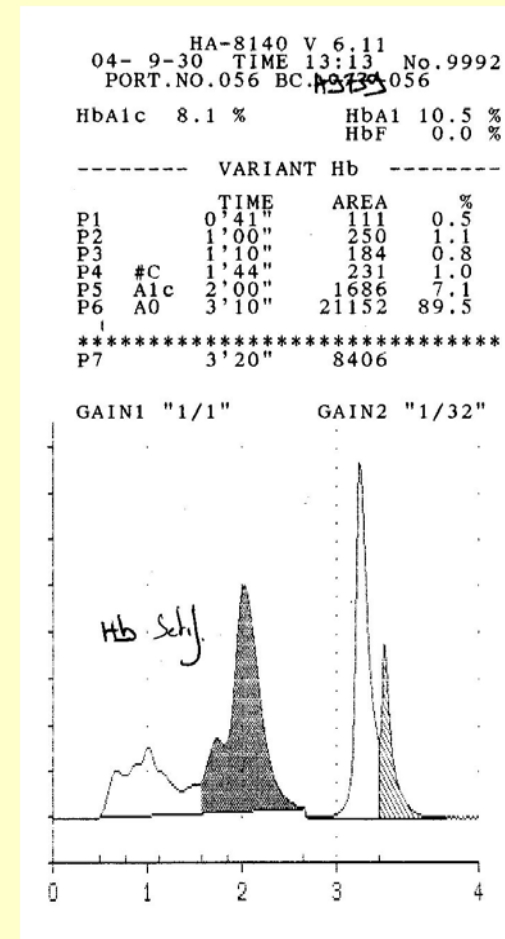
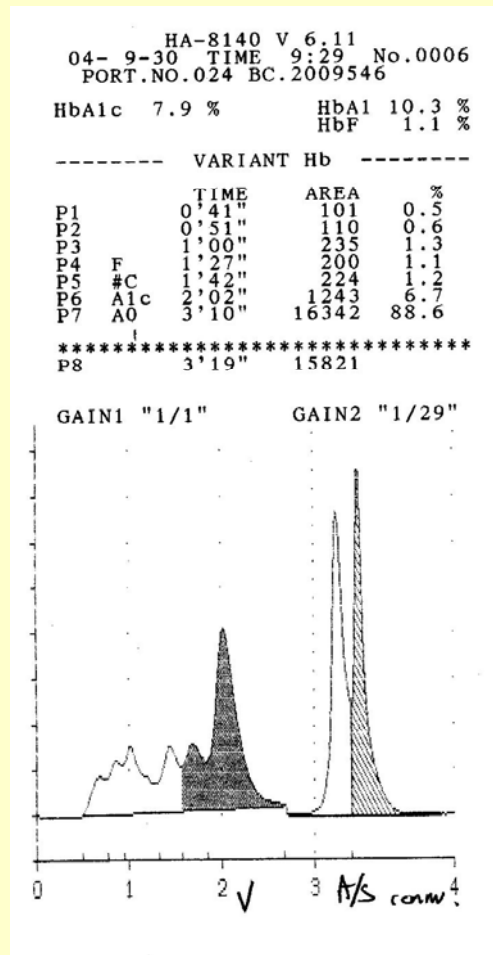
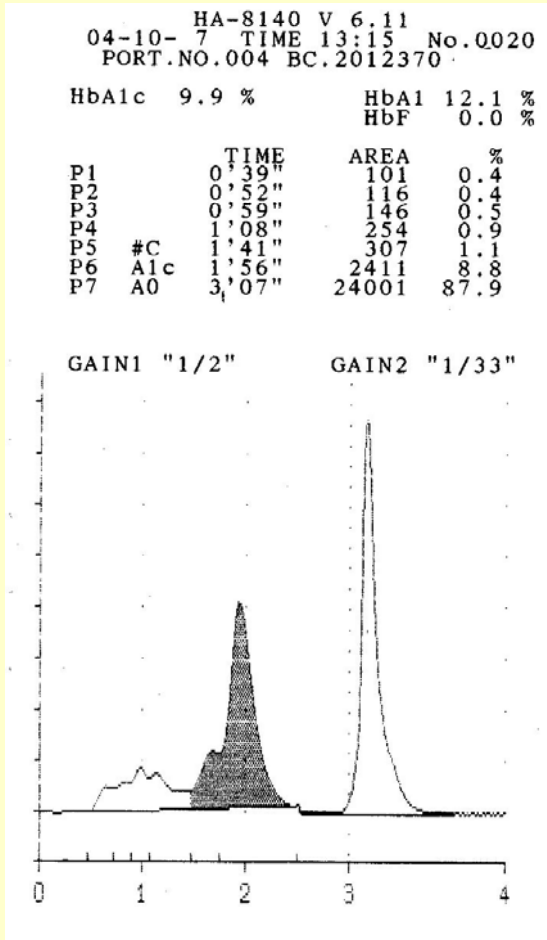
β -LYS-120

- Degré de glycation = $C \times T$ (durée hyperglycémie) $\times t$ $1/2$ (demi vie) $\times F$ (facteur complexe , pH, température, etc.)
- dans l'hémoglobine, lors de la glycation, l'acide aminé le plus réactif est la valine NH₂ terminale de la chaîne bêta,
- les lysines des chaînes α et β et la valine α NH₂ terminale peuvent également être glyquées
- 10 des 50 lysines de la albumine sont glyquées in vivo.

Profil obtenu par chromatographie d'échange cationique d'une hémoglobine adulte non diabétique



Profils chromatographiques sur résine échangeuse d'ions



Nomenclature des hémoglobines glyquées

Hb A : Tétramère $\alpha_2\beta_2$

Hb A0 : composant majeur de l 'Hb A. Hb glyquée sur des sites ne modifiant pas son pHi

Hb A1 : hémoglobines rapides glyquées sur des sites modifiant leurs pHi: Hb A1a1, A1a2, A1b, A1c, A1d

Hb A1c : hémoglobine glyquée formée par fixation de glucose sur l 'extrémité N terminale des chaînes bêta de l 'hémoglobine A. Fonction cétoamine stable

Hb pré-A1c : forme labile de l'Hb A1c caractérisée par une fonction aldimine (base de Schiff). Ne doit pas être évaluée en même temps que l 'Hb A1c

Glycation des hémoglobines

Observed Molecular Masses of Glycated Hbs Produced by In Vitro Nonenzymatic Interaction with Glucose at Various Conditions

Hb	Observed masses (m/z)	No. of glucose attached
Hb A (α -globin)	15288, 15450, 15612, 15774, 15936, 16098, 16260, 16422	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
Hb A (β -globin)	16029, 16191, 16353, 16515, 16677, 16839, 17001, 17163	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
Hb C (α -globin)	15288, 15450, 15612, 15774	1, 2, 3, 4
Hb C (β -globin)	16028, 16190, 16352, 16514, 16676, 16838	1, 2, 3, 4, 5, 6
Hb E (α -globin)	15288, 15450, 15612, 15774	1, 2, 3, 4
Hb E (β -globin)	16028, 16190, 16352, 16514, 16676, 16838	1, 2, 3, 4, 5, 6
Hb F (α -globin)	15288, 15450, 15612, 15774, 15936	1, 2, 3, 4, 5
Hb F (γ -globin)	16157, 16319, 16481, 16643, 16805	1, 2, 3, 4, 5
Hb Leiden (α -globin)	15288, 15450, 15612, 15774	1, 2, 3, 4
Hb Leiden (β -globin)	15900, 16062, 16224, 16386, 16548, 16710	1, 2, 3, 4, 5, 6
Hb San Diego (α -globin)	15288, 15450	1, 2
Hb San Diego (β -globin)	16061, 16223	1, 2

Numbers of glucose molecules attached to the Hbs are shown.

Composition des hémoglobines de l'adulte normal

Hémoglobine	Structure	Hydrate de carbone	Concentration
Hb A0	$\alpha_2 \beta_2$	----	> 90%
Hb A2	$\alpha_2 \delta_2$	----	< 1,5 %
Hb F	$\alpha_2 \gamma_2$	----	< 0,8%
A1 a1	$\alpha_2 (\beta \text{ F-D-P})_2$	Fructose 1-6 di P	
A1 a2	$\alpha_2 (\beta \text{ G-6-P})_2$	Glucose 6 P	
A1 b	?	?	
A1 c	$\alpha_2 (\beta \text{ -G})_2$	Glucose	4 - 6 %
A1 d	?	?	Trace
A1 e	?	?	?

Méthodes de dosage

- 1) **basées sur un changement de charge** : mise en évidence de HbA0, HbA1a, HbA1b, HbA1c
 - 1-1) chromatographie sur résine échangeuse d'ions (CLHP ou HPLC)
 - 1-2) électrophorèse
- 2) **basées sur l'affinité du glucose pour l'acide phényl-boronique** :
 - 2-1) dosage de l'hémoglobine glyquée totale (GHb)
- 3) **basées sur des méthodes immunologiques** : mise en évidence de HbA1c
 - 3-1) immuno turbidimétrie
 - 3-2) immuno inhibition
- 4) **basée sur la reconnaissance enzymatique** d'un site spécifique (GHb)

Comment interpréter le taux d'Hb A1c ?

- indication sur la concentration moyenne de la glycémie durant les 6 ou 8 semaines précédant le dosage (**glycémie = ponctuel vs Hb A1c= cumulatif**),
- concentration de l'Hb A1c dépend de :
 - la glycémie,
 - de la durée de vie des globules rouges,
 - de la concentration totale de l'hémoglobine
 - de la méthode de dosage
- interférences possibles gênant l'interprétation :
 - **technique,**
 - **hémoglobinopathies,**
 - **anémies,**
 - **hémorragies, etc.,**

Relation entre glycémie moyenne et HbA1c

Plusieurs formules établissant la relation entre l'hémoglobine glyquée et la glycémie moyenne ont été publiées.

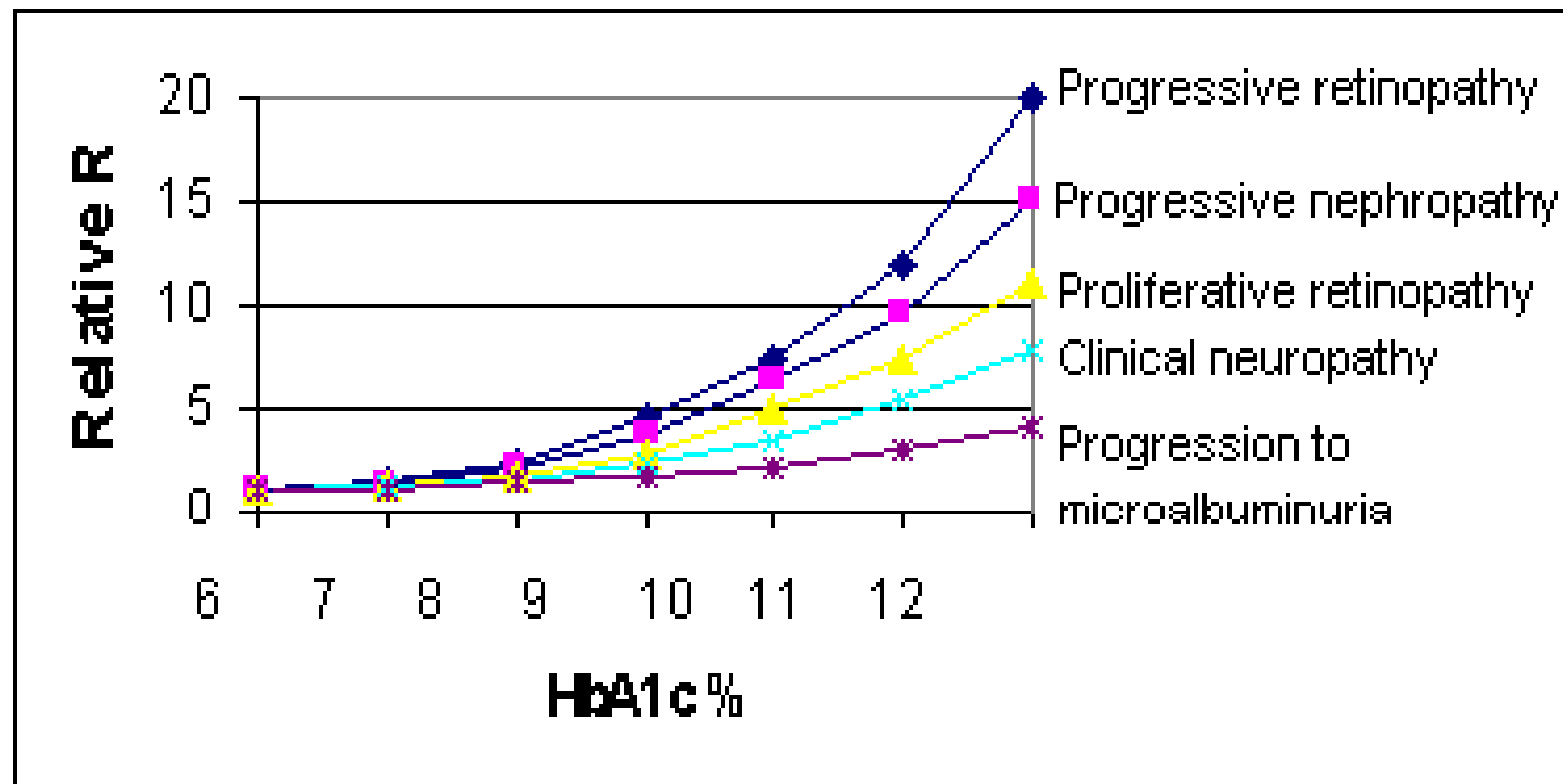
Une excellente corrélation ($r = 0,82$) a été obtenue avec la formule :

$$\text{Glycémie moyenne (mmol /l)} = (1,98 \times \text{HbA1c}) - 4,29$$

Diabetes Care.

Cette glycémie moyenne est mieux corrélée avec les glycémies de fin d'après midi et de soirée qu'avec la glycémie à jeun, celle de la matinée ou du début d'après midi.

Hb A1c et complications du diabète



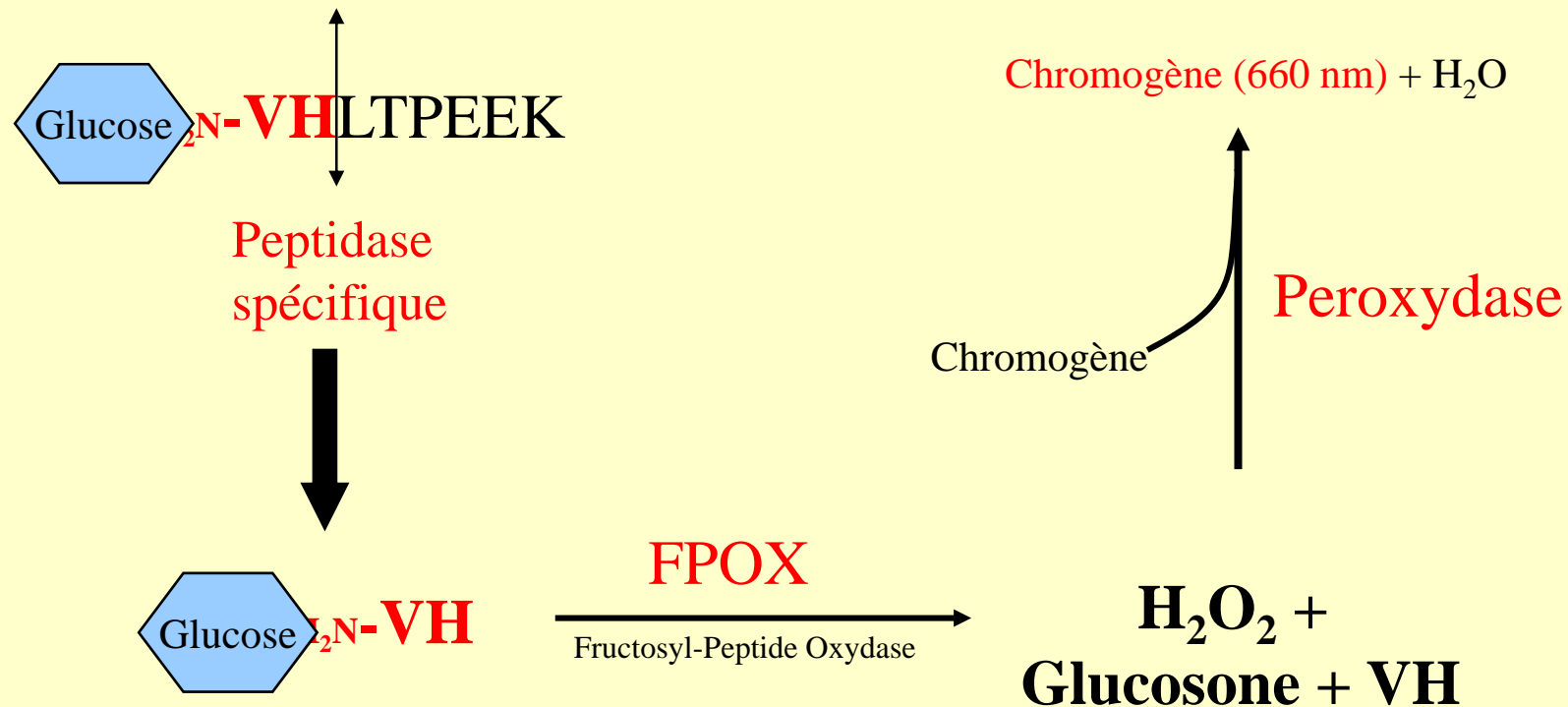
La méthode enzymatique proposée:

HbA1cnetFS par Diasys®

- Mesure dans un hémolysat
- Mesure pondérale:
 1. de l'hémoglobine totale
 2. de la fraction glyquée de l'hémoglobine
Cette mesure repose sur la reconnaissance spécifique de l'extrémité NH₂ glyquée de la chaîne bêta de l'hémoglobine
 3. Calcul du ratio et application d'un modèle mathématique de standardisation.

La méthode enzymatique proposée

Les étapes de la mesure de l'hémoglobine glyquée



La méthode enzymatique proposée

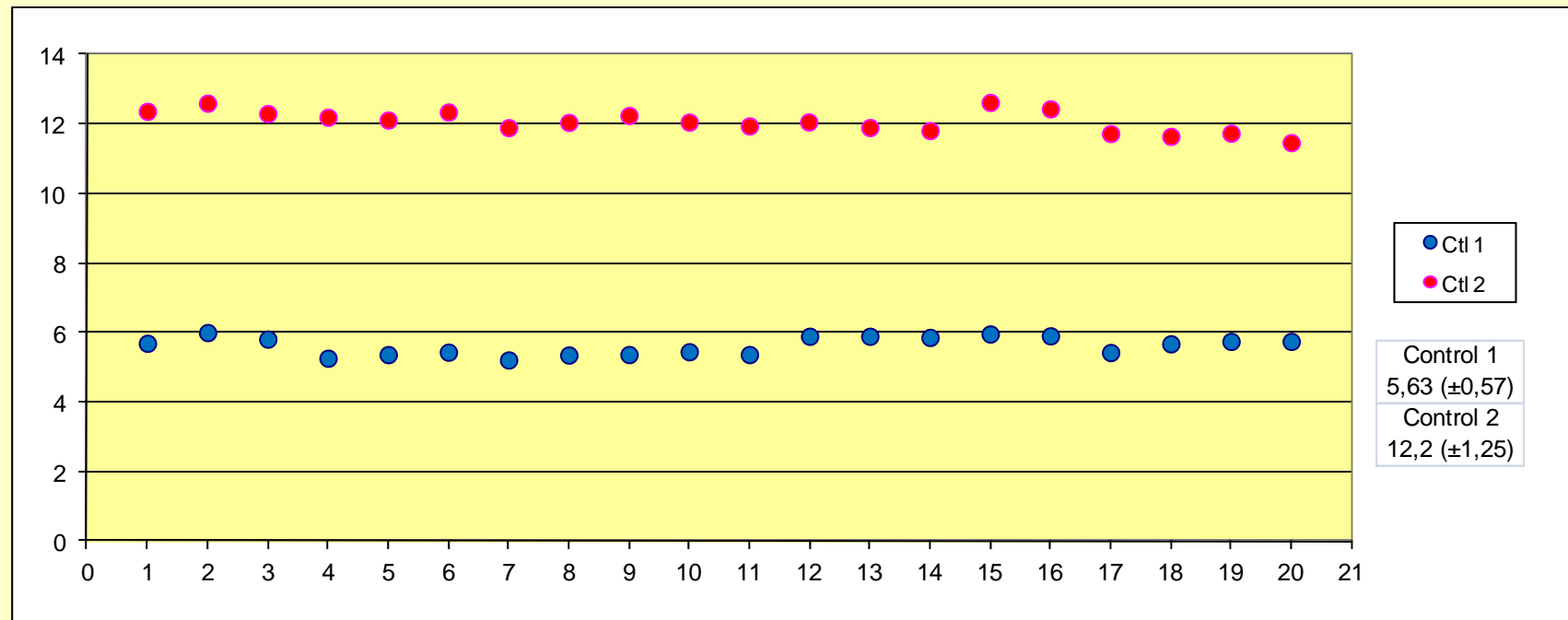
Adaptation sur automate (Hitachi 917, Cobas E)

1. Hémolyse du sang total : 1/20^{ème}
2. Dilution de l'hémolysât dans le réactif R1 au 1/7^{ème}
3. Puis lecture à 570/800 nm à T0 + 300 sec
Calcul de [Hbtotale] en g/dl
4. Puis ajout de R2 (env 1/4^{ème})
5. Deux lectures à 660/800 à T=360 puis T=680 sec
Calcul de [HbA1c] en g/dl
6. Application du modèle et calcul:

$$\text{HbA1c \%} = \left[91,5 \times \frac{\text{HbA1c (g/dl)}}{\text{Hbtot (g/dl)}} \right] + 2.15$$

La méthode enzymatique proposée

Quelques résultats: les contrôles



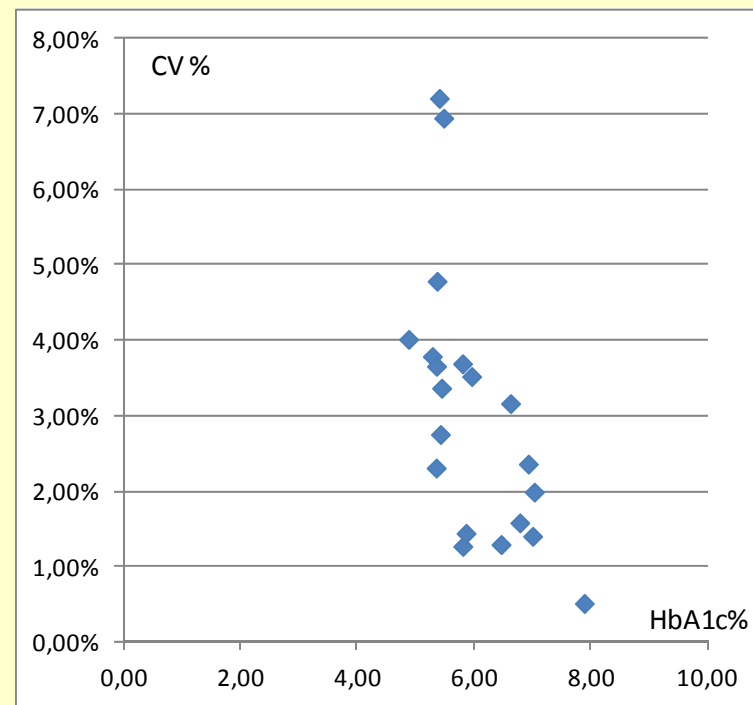
Valeurs obtenues
(n = 20)

	Ctl 1	Ctl 2
Moyenne	5,63	12,08
Ecart type	0,26	0,32
CV %	4,62%	2,62%

La méthode enzymatique proposée

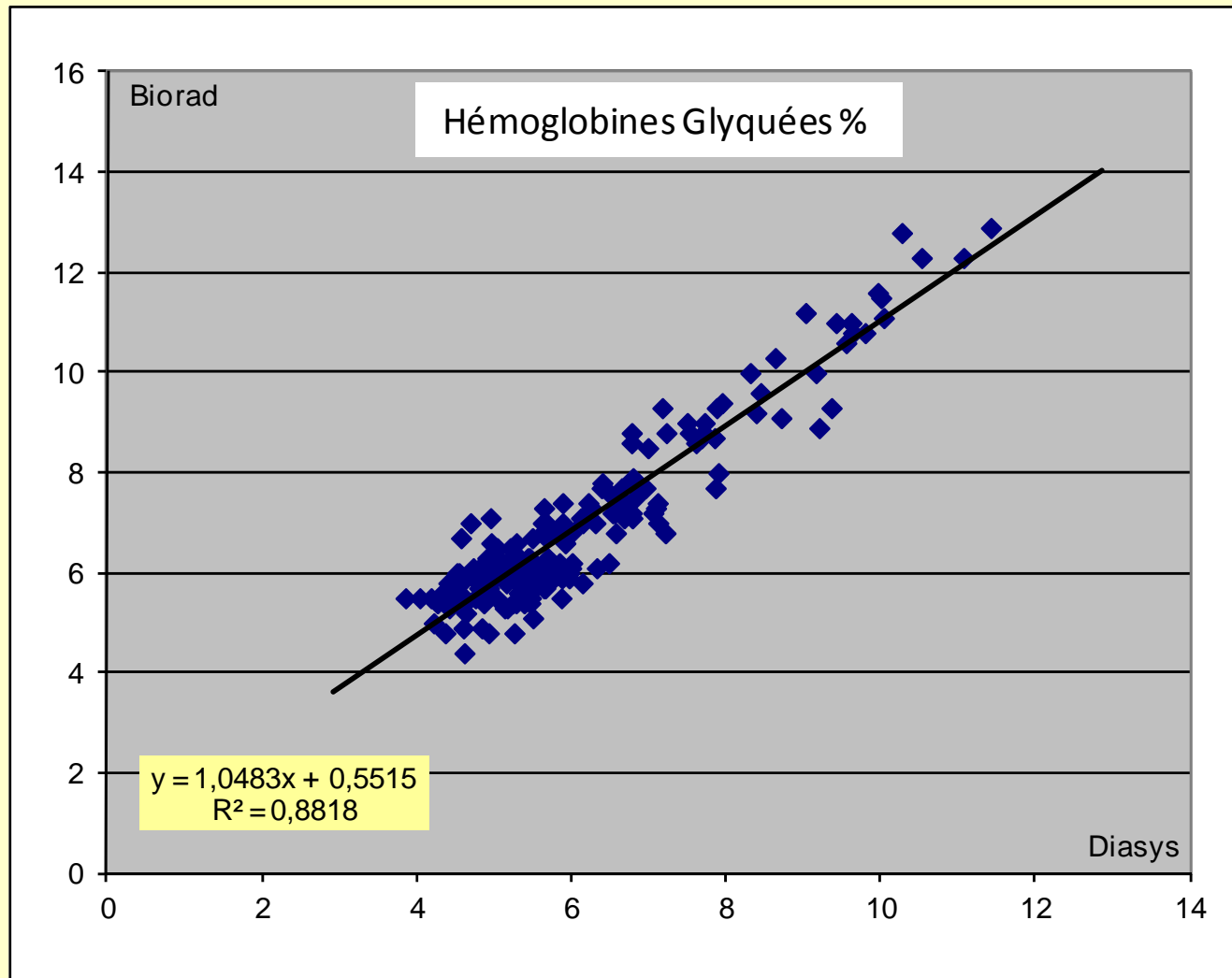
Quelques résultats: Répétabilité sur des échantillons patients

Moyenne	4,88	5,28	5,35	5,35	5,36	5,40	5,42	5,44	5,48	5,80	5,80	5,86	5,96	6,46	6,62	6,78	6,93	7,00	7,03	7,89		Moyenne
Ecart type	0,20	0,20	0,12	0,20	0,26	0,39	0,15	0,18	0,38	0,21	0,07	0,08	0,21	0,08	0,21	0,11	0,16	0,10	0,14	0,04		0,18
CV %	4,02%	3,79%	2,31%	3,66%	4,79%	7,21%	2,76%	3,37%	6,95%	3,69%	1,27%	1,45%	3,52%	1,30%	3,17%	1,59%	2,36%	1,41%	1,99%	0,52%		3,06%



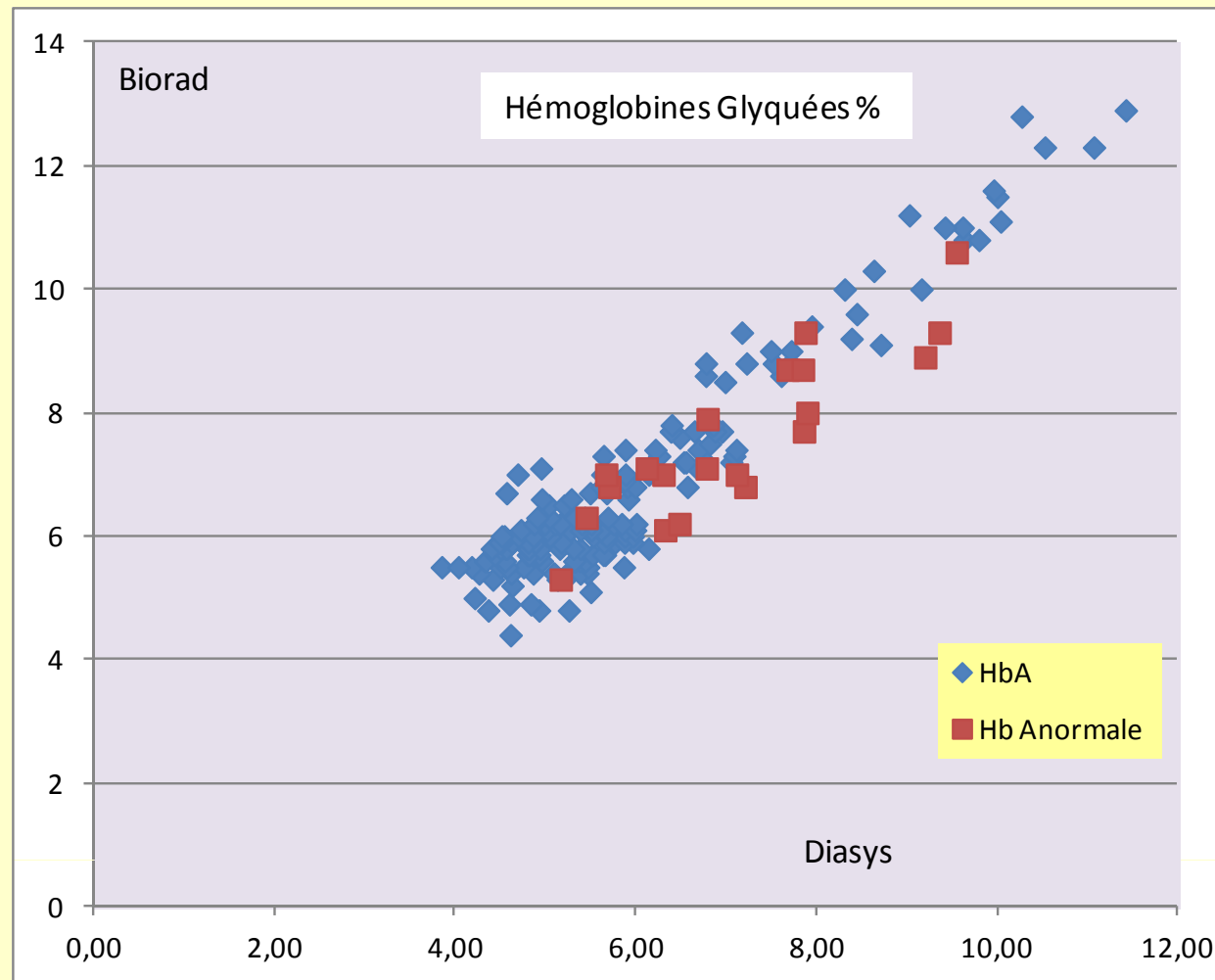
La méthode enzymatique proposée

Quelques résultats: Corrélation-1



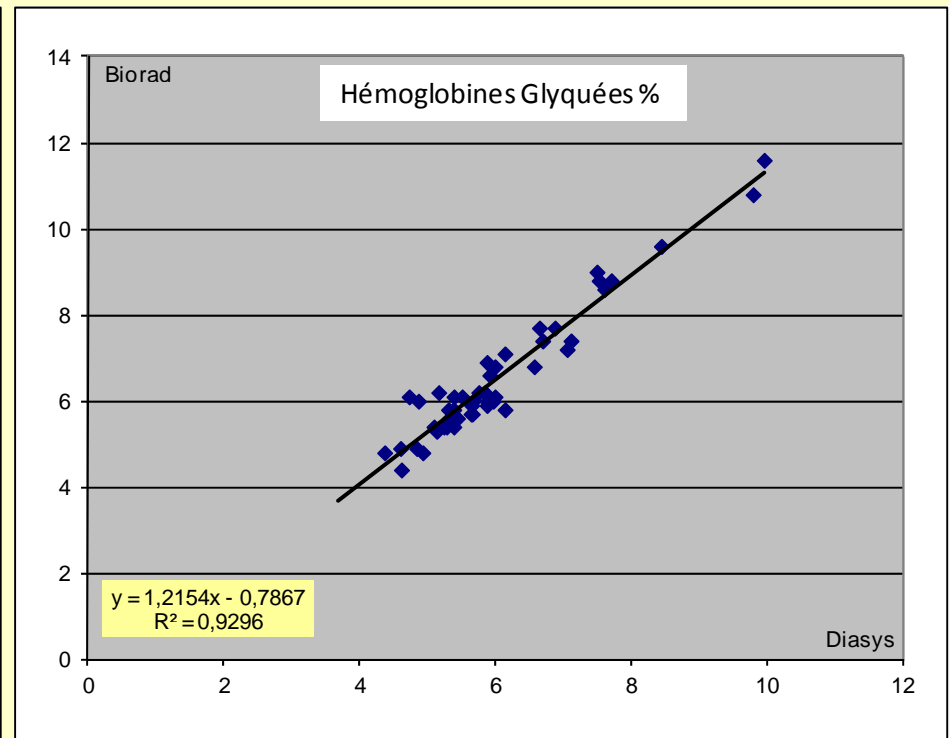
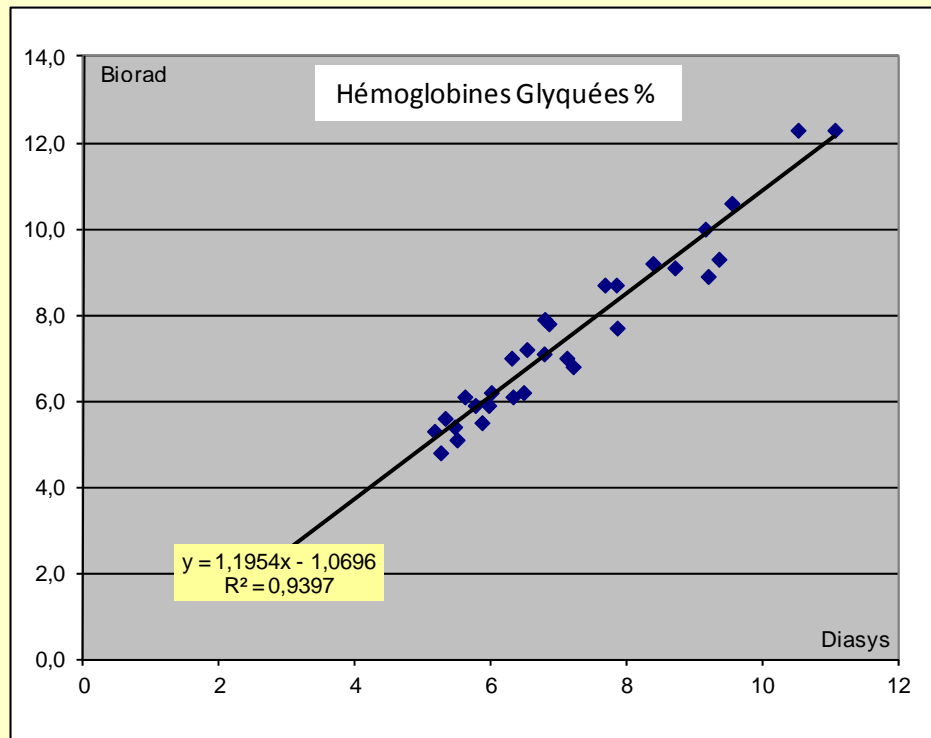
La méthode enzymatique proposée

Quelques résultats: Corrélation-2



La méthode enzymatique proposée

Quelques résultats: Corrélation-3



La méthode enzymatique proposée: interprétation

Quel est l'objet du dosage:

- Mesure d'un peptide glyqué particulier: Glucose-Val-His
- On mesure l'HbA1c et plus...
- Tous les variants de l'Hb- β (ou presque)
- Les autres Hb avec une séquence NH₂ terminale identique

Séquences peptidiques des globines humaines

Alignement réalisé avec CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

Beta	M VH LTPEEKSAVTALWGKVN-VDEVGGEALGRLLVVYPWTQRFFESFGDLSTPDAVMGN
Delta	M VH LTPEEKTAVNALWGKVN--VDAVGGEALGRLLVVYPWTQRFFESFGDLSSPDAVMGN
gammaG	MGHFTEEDKATITSLWGKVN--VEDAGGETLGRLLVVYPWTQRFFDSFGNLSSASAIMGN
gammaA	MGHFTEEDKATITSLWGKVN--VEDAGGETLGRLLVVYPWTQRFFDSFGNLSSASAIMGN
Epsilon	M VH FTAEEKAAVTSLWSKMN--VEEAGGEALGRLLVVYPWTQRFFDSFGNLSSPSAILGN
Alpha1	MVLSPADKTNVKAANGKVGAGHAGEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHF-DLSH-----GS
Alpha2	MVLSPADKTNVKAANGKVGAGHAGEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHF-DLSH-----GS
Theta	MALSAEDRALVRALWKKLGSNMGVYTTTEALERTFLAFPATKTYFPHF-DLSP-----GS
Zeta	MSLTKTERTIIVSMWAKISTQADTIGTETLERLFLSHPQTKTYFPHF-DLHP-----GS
Myoglobin	MGLSDGEWQLVLNVWVKVEADIPGHGQEVLIIRLFKGHPEPTELEKFDKFKHLKSEDEMKA
HbS	M VH LTP V EKSAVTALWGKVN-VDEVGGEALGRLLVVYPWTQRFFESFGDLSTPDAVMGN
HbC	M VH LTP K EKSAVTALWGKVN-VDEVGGEALGRLLVVYPWTQRFFESFGDLSTPDAVMGN
HbE	M VH LTPEEKSAVTALWGKVN-VDEVGKALGRLLVVYPWTQRFFRSFGDLSTPDAVMGN

Composition des hémoglobines de l'adulte normal

Hémoglobine	Structure	Hydrate de carbone	Concentration
Hb A0	$\alpha_2 \beta_2$	----	> 90%
Hb A2	$\alpha_2 \delta_2$	----	< 1,5 %
Hb F	$\alpha_2 \gamma_2$	----	< 0,8%
A1 a1	$\alpha_2 (\beta \text{ F-D-P})_2$	Fructose 1-6 di P	
A1 a2	$\alpha_2 (\beta \text{ G-6-P})_2$	Glucose 6 P	
A1 b	?	?	
A1 c	$\alpha_2 (\beta \text{ -G})_2$	Glucose	4 - 6 %
A1 d	?	?	Trace
A1 e	?	?	?

La méthode enzymatique proposée: interprétation

Quelles conséquences pour les variants ?

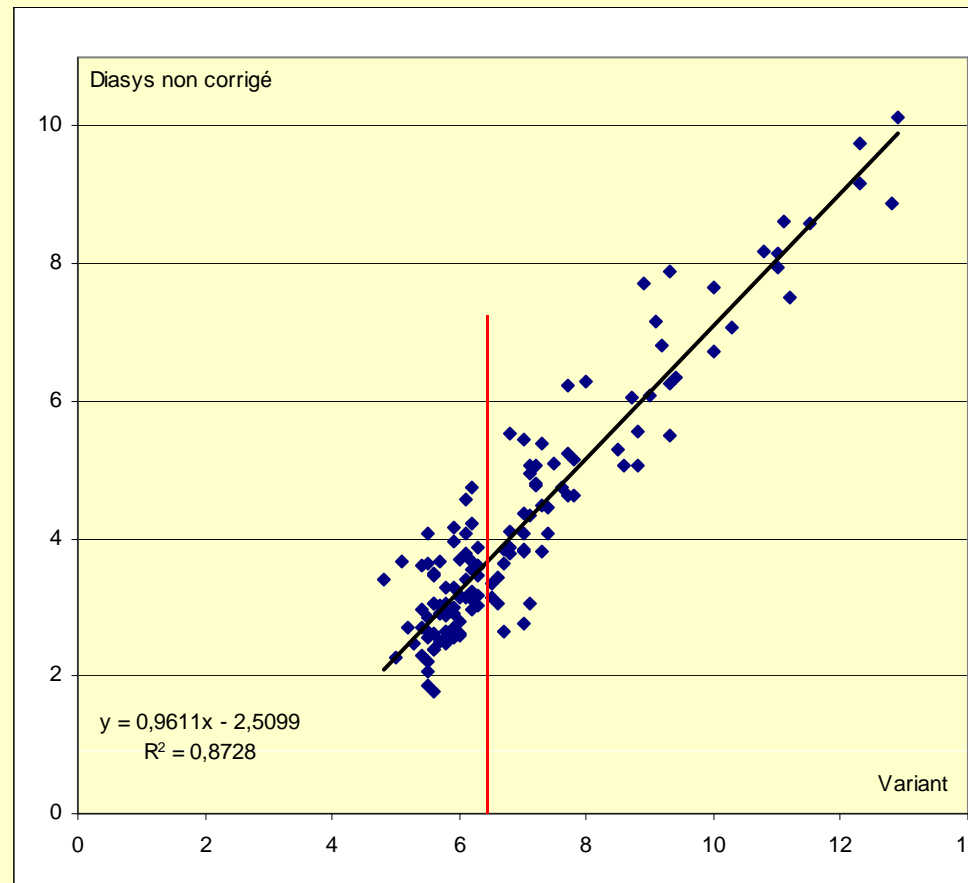
Variants de patients connus

- Variants béta: hétéro , homozygote.
- Variant d'expression (Beta-thalassémie...)
- Variants non béta

Variants de patients non connus

- On aura un chiffre.....→ regarder les composantes
- Cas de l'HbF
- Les variants beta: hetero, homozygote
- Hémolyse chronique

La méthode enzymatique proposée: un essai



Conclusion

- Facilement automatisable
- Méthode Standardisée
- Permet de répondre à la question posée du suivi diabétique
- Une autre façon de voir la glycation de l'hémoglobine
- Complémentaire des profils classiques dans des laboratoires spécialisés.