

CAHIER DE

Formation

Biologie médicale

N° 08

juin 97

HÉMOGLOBINES GLYQUÉES

LIPIDES



CAHIER DE

Formation

Biologie médicale



Ceci est la VERSION NUMERIQUE des CAHIERS BIOFORMA déjà parus et distribués à l'ensemble des LABORATOIRES D'ANALYSES de BIOLOGIE MEDICALE en FRANCE.

▮

TOUT LE CONTENU DE CE FICHER RESTE LA PROPRIETE DE BIOFORMA.
LES DROITS D'AUTEURS SONT PROTEGES A LA B.N.F.

▮

Toute reproduction, toute utilisation, partielle ou totale, des textes, schémas et photos de cet ouvrage, sans l'autorisation écrite de BIOFORMA, seront poursuivies devant les tribunaux compétents.

▮

Seule une impression pour une copie personnelle (étudiant, interne, biologiste de labm) est permise.



HÉMOGLOBINES GLYQUÉES

et

LIPIDES

LISTE DES AUTEURS

- Claudine COSSON
Laboratoire de Biochimie 1
Hôpital Bicêtre, 78, rue du Général Leclerc
94275 LE KREMLIN BICETRE CEDEX
- Rémy COUDERC
Laboratoire de Biochimie
Hôpital Tenon, 4, rue de la Chine
75970 PARIS CEDEX 20
- Philippe GILLERY
Laboratoire de Biochimie
Centre Hospitalier, Rue Alexis Carrel
51092 REIMS CEDEX
- Catherine KINDERMANS
Laboratoire d'Explorations Fonctionnelles
Hôpital Necker, 149, rue de Sèvres
75743 PARIS CEDEX 15
- Alain LEGRAND
Laboratoire de Biochimie 1
Hôpital Bicêtre, 78, rue du Général Leclerc
92475 LE KREMLIN BICETRE CEDEX
- Jean-Marie LEMASSON
Laboratoire, Centre d'Examens de Santé
Caisse Primaire d'Assurance Maladie de la Vienne, 21, rue Saint Louis
86000 POITIERS
- Jean-François MEYER
Laboratoire, Centre d'Examens de Santé
Caisse Primaire d'Assurance Maladie des Côtes d'Armor, 2, rue Notre Dame
22042 SAINT-BRIEUC CEDEX 2
- Jean-Jacques ROBERT
Service de Pédiatrie-Diabétologie
Hôpital Necker-Enfants Malades, 149, rue de Sèvres
75743 PARIS CEDEX 15
- Josiane STEINMETZ
Laboratoire de Biologie Clinique
Centre de Médecine Préventive, 2 rue du Doyen J. Parisot
54501 VANDOEUVRE-LES-NANCY CEDEX
- Anne VASSAULT
Laboratoire de Biochimie A
Hôpital Necker-Enfants Malades, 149, rue de Sèvres
75743 PARIS CEDEX 15

PRÉFACE

Les différents sujets traités dans ce document permettent de rassembler tous les éléments de formation utiles pour effectuer les analyses et interpréter les résultats des dosages de l'hémoglobine glyquée dans la première partie, des explorations du métabolisme des lipides dans la seconde partie.

Ce cahier de formation a été programmé à la suite d'une récente expérience d'évaluation externe de la qualité qui avait été organisée sous l'égide de l'Agence du Médicament, grâce au soutien de Bioforma.

Les résultats obtenus avaient montré, notamment pour le dosage de l'hémoglobine glyquée la nécessité d'une amélioration de la qualité des prestations fournies par les laboratoires.

Dans chaque partie, après une revue du métabolisme, de la structure et les rappels physiopathologiques nécessaires, sont développées les recommandations concernant les prélèvements et les différents facteurs pré-analytiques pouvant influencer la fiabilité des résultats ainsi que les différentes techniques de dosage disponibles, leurs avantages et inconvénients respectifs à la lumière des résultats des enquêtes interlaboratoires. Enfin, l'interprétation des résultats ainsi que les principales sources d'interférence sont précisées. Une étude complémentaire chez le sujet sain est également présentée grâce à l'expérience des laboratoires des centres d'examen de santé pour éclairer l'interprétation des bilans d'exploration du métabolisme lipidique. Le dernier chapitre est consacré aux difficultés soulevées par la standardisation des méthodes de dosage.

Chacun trouvera dans ce cahier sous une forme que nous avons souhaitée, avec les auteurs, attractive et pratique, une aide utile à définir des axes pour une exploration biologique, mieux ciblée et mieux comprise, en un mot plus efficace.

*Anne Vassault
Biologiste des Hôpitaux*

H É M O G L O B I N E S G L Y Q U É E S

| | |
|--|-----------|
| I - STRUCTURE. MÉTABOLISME. NOMEMCLATURE..... | 11 |
| II - FACTEURS PRÉANALYTIQUES. PRÉLÈVEMENTS..... | 15 |
| III - MÉTHODES DE DOSAGE | 19 |
| IV - INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS | 27 |
| V - INTERFÉRENCES..... | 31 |
| VI - STANDARDISATION | 35 |

L I P I D E S

| | |
|---|-----------|
| I - LES LIPOPROTÉINES ET LEUR MÉTABOLISME | 41 |
| II - MÉTHODES D'EXPLORATION DES LIPIDES ET RÉSULTATS DES ÉVALUATIONS EXTERNES DE LA QUALITÉ..... | 49 |
| III - ANALYSE DES RÉSULTATS : DÉPISTAGE ET PRÉVENTION DES TROUBLES LIPIDIQUES..... | 65 |
| IV - STANDARDISATION DU DOSAGE DES APOLIPOPROTÉINES A1 ET B | 77 |

HÉMOGLOBINES GLYQUÉES

I - HÉMOGLOBINES GLYQUÉES : STRUCTURE. MÉTABOLISME. NOMENCLATURE.

P. GILLERY, A. VASSAULT

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

L'hémoglobine présente dans les hématies existe sous plusieurs formes :

- les formes génétiquement déterminées: HbA, HbA₂ et HbF,
- les formes résultant de modifications post-traductionnelles telles que : Hb A_{1a}, Hb A_{1b}, Hb_{1c}.

■ I. STRUCTURE DES HÉMOGLOBINES

La molécule d'hémoglobine (MM = 64 500) est constituée d'un noyau (hème) et de quatre chaînes polypeptidiques (globine). Toutes les hémoglobines normales contiennent toujours deux chaînes identiques de type alpha, composées de 141 acides aminés et deux chaînes, qui peuvent être de type bêta, delta ou gamma, composées de 146 acides aminés. Chez l'adulte, l'hémoglobine est constituée d'hémoglobine A (représentant 97 % de l'hémoglobine totale), d'hémoglobine A₂ (2,5 % environ) et d'hémoglobine F (moins de 0,5 %).

L'hémoglobine A₂ de structure $\alpha_2 \delta_2$ est formée de deux chaînes polypeptidiques α et δ .

L'hémoglobine F de structure $\alpha_2 \gamma_2$ est formée de deux chaînes polypeptidiques α et γ . Elle prédomine pendant la vie fœtale et diminue pendant la première année de vie.

L'hémoglobine A possède la structure moléculaire $\alpha_2 \beta_2$. Cependant, son analyse chromatographique ou électrophorétique permet de mettre en évidence une hétérogénéité structurale : on distingue une forme majeure appelée HbA₀ et plusieurs formes mineures qui sont répertoriées sous le nom d'hémoglobines A₁ ou hémoglobines rapides (elles migrent plus rapidement que HbA₀ sous l'influence d'un champ électrique). Ces dernières représentent 4 à 8 % de l'hémoglobine totale et correspondent à des formes glyquées de l'hémoglobine (voir paragraphe 2). Toutes ces hémoglobines contiennent les mêmes chaînes polypeptidiques α et β et la structure $\alpha_2 \beta_2$. Elles ne se différencient que par la fixation de molécules greffées sur les chaînes polypeptidiques par une réaction dite de glycation non enzymatique.

■ II. LE PHÉNOMÈNE DE GLYCATION

La glycation non enzymatique des protéines correspond à la fixation non enzymatique d'oses simples sur des groupements aminés libres des protéines, et s'oppose à la glycosylation qui est un mécanisme enzymatique de la biosynthèse protéique.

Ce processus comporte plusieurs étapes. Dans un premier temps, la condensation d'une fonction aldéhyde ou d'un groupement cétonique d'un sucre avec un groupement aminé d'une protéine conduit à la formation d'une base de Schiff (aldimine) labile. Cette réaction est rapide et réversible.

Dans un second temps, la base de Schiff subit un réarrangement dit d'Amadori pour former une liaison cétoamine (ou fructosamine) stable (figure 1).

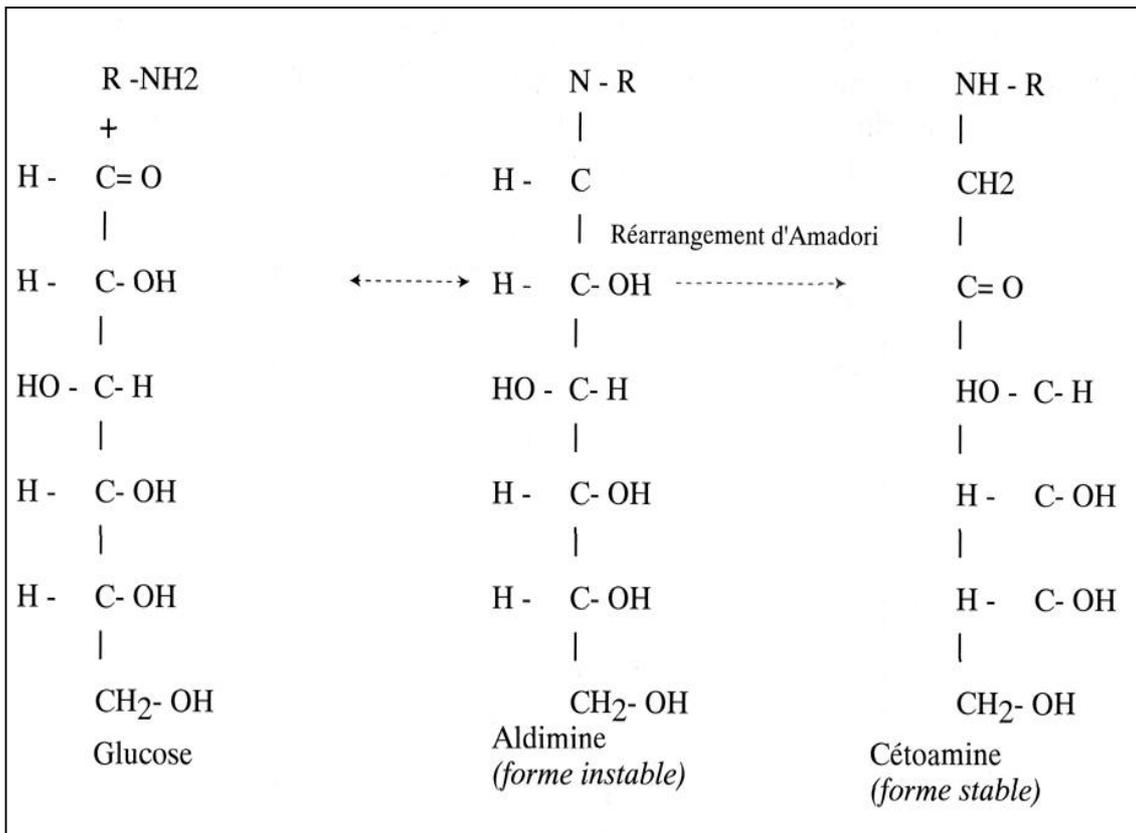


Figure 1 : Les étapes de la glycation

A plus long terme, les protéines glyquées subissent des remaniements (oxydations, clivages protéolytiques, pontages), qui conduisent à la formation de produits complexes fluorescents appelés produits avancés (ou terminaux) de la glycation (généralement désignés par l'abréviation AGE, de l'anglais Advanced glycation end products). Ces produits, dont le dosage n'est pas encore de pratique courant, seraient impliqués dans certaines complications dégénératives du diabète sucré.

Ce phénomène de glycation est général et affecte l'ensemble des protéines de l'organisme, circulantes comme tissulaires. Ainsi, dans le plasma, toutes les protéines peuvent être modifiées par les réactions de glycation et devenir ainsi des protéines glyquées. On les regroupe généralement sous le nom de **fructosamines**, en raison de leur liaison cétoamine (fructosamine) caractéristique. De même, les protéines tissulaires comme le collagène subissent ces modifications. La glycation dépend de différents facteurs, notamment de la durée de vie de chaque protéine et de la concentration en oses.

En raison de son abondance chez l'homme, le glucose est le principal ose simple à se lier à la fonction aminée libre de résidus d'acides aminés.

Sur une protéine, la fixation peut avoir lieu sur deux sites différents :

1. acide aminé N-terminal de la protéine,
2. groupement ε-aminé d'un résidu de lysine de la chaîne protéique.

Suivant le site de glycation affecté, les caractères physico-chimiques de la protéine sont plus ou moins modifiés. Dans le cas de l'hémoglobine, un site majeur de glycation est l'extrémité N-terminale (valine) des chaînes β. Lorsque l'hémoglobine est glyquée à ce niveau, ses propriétés physico-chimiques (pHi) sont suffisamment modifiées pour permettre leur séparation par élec-

trophorèse ou chromatographie : c'est l'hémoglobine A₁. L'hémoglobine peut également être glyquée sur d'autres sites, qui ne modifient alors pas son pHi.

Dans le globule rouge, on trouve donc l'hémoglobine glyquée sous différentes formes. On peut en séparer certaines par chromatographie d'échange ionique. La figure 2 montre ces différentes fractions séparées par chromatographie d'échange cationique.

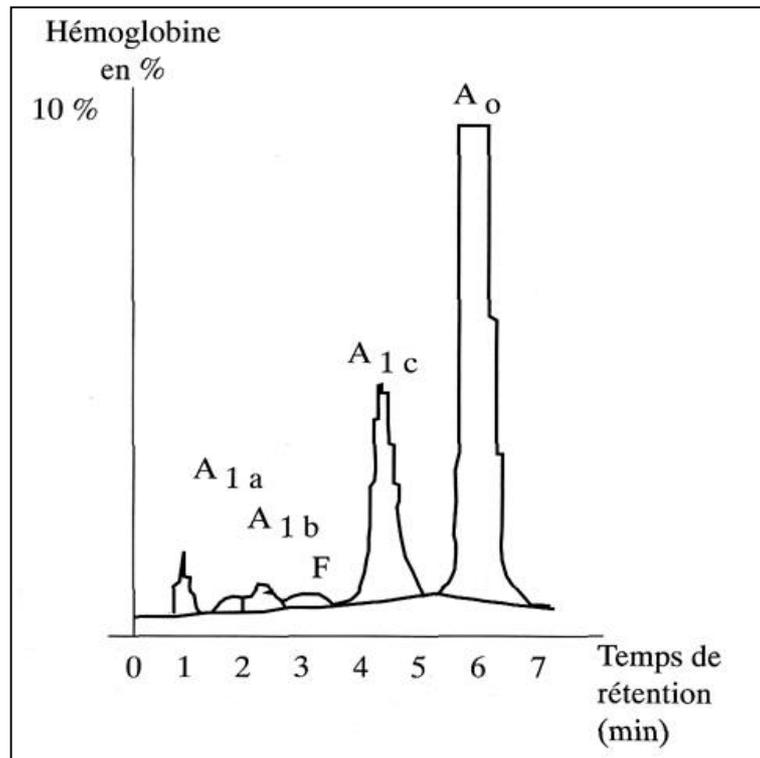


Figure 2 : Les différentes fractions de l'hémoglobine obtenues par chromatographie d'échange cationique dans le sang d'un sujet adulte non diabétique

- **L'hémoglobine A₁** est formée de plusieurs fractions, qui, en fonction de leur ordre d'éluion en chromatographie d'échange cationique faible, ont été nommées Hb A_{1a} (comprenant elle-même deux sous-fractions Hb A_{1a1} et Hb A_{1a2}), Hb A_{1b}, Hb A_{1c}.

- **L'hémoglobine A_{1c}** est la fraction la mieux caractérisée. Elle constitue la forme majeure de l'hémoglobine A_{1c} (80 %), soit 4 à 6 % de l'hémoglobine totale.

L'Hb A_{1c} résulte de la condensation d'une molécule de glucose avec le groupement N terminal de valine de chacune des deux chaînes bêta de l'hémoglobine A.

- **Les hémoglobines A_{1a1} et A_{1a2}** résultent respectivement de la liaison de fructose-1,6-diphosphate et de glucose-6-phosphate sur la valine N-terminale des chaînes bêta de l'hémoglobine. Ces deux formes représentent en moyenne environ 0,5 % de l'hémoglobine. Dans le cas de l'Hb A_{1b} (environ 0,8 % de l'hémoglobine en moyenne), c'est le pyruvate qui est fixé à l'extrémité N-terminale des chaînes β de globine.

Le tableau I résume les termes employés pour désigner les différentes formes d'hémoglobines glyquées.

Lorsque d'autres hémoglobines sont présentes (HbS, HbC par exemple), elles subissent de la même façon le processus de glycation, et dans les globules rouges sont retrouvées des formes glyquées de ces variants (HbS_{1c} ou C_{1c} par exemple), au même titre que les formes glyquées de

Tableau I : Les différentes formes d'hémoglobine glyquée.

| | |
|------------------------|---|
| HbA | Tétramère $\alpha_2 \beta_2$ |
| HbA ₀ | - Composant majeur de l'HbA séparé par chromatographie d'échange ionique ou électrophorèse - Comprend l'Hb glyquée sur des sites ne modifiant pas son pHi |
| HbA ₁ | - Hémoglobine(s) rapide(s) ou fast <i>hémoglobins</i> en chromatographie d'échange d'ions (ou électrophorèse) - Hb glyquées sur des sites modifiant le pHi - HbA _{1a1} + HbA _{1a2} + HbA _{1b} + HbA _{1c} |
| HbA _{1c} | - Hb glyquée formée par fixation de glucose sur l'extrémité N-terminale des chaînes β de l'HbA - Fonction cétoamine stable |
| Hb pré-A _{1c} | - Forme labile de l'HbA _{1c} , caractérisée par une fonction aldimine (base de Schiff) - Ne doit pas être évaluée en même temps que l'HbA _{1c} |
| Hb glyquée | - Synonyme: glycohémoglobine - Remplace le terme impropre « Hb glycosylée » - Caractérisée par toute fixation non enzymatique de glucose (ou d'autres oses) sur l'Hb - Fraction dosée par les méthodes de chromatographie d'affinité, souvent appelée « hémoglobine glyquée totale » ou HbG |

l'HbA. Il faut en tenir compte pour l'interprétation des résultats, car la présence de ces hémoglobines anormales a un effet variable selon les techniques utilisées.

La formation de l'hémoglobine glyquée est irréversible. Elle résulte d'un long processus au cours de la vie du globule rouge. La quantité d'hémoglobine glyquée dans le sang dépend de la durée de vie des hématies (120 jours) et de la glycémie.

■ III. NOMENCLATURE

La nomenclature internationale (IUPAC) recommande d'utiliser le terme de **glycation** pour décrire ce processus. La dénomination d'**hémoglobine glyquée** est couramment utilisée et la mieux adaptée pour désigner les produits formés, alors que celle d'« hémoglobine glycosylée » est impropre (dans la mesure où cette fraction de l'hémoglobine ne résulte pas d'un processus enzymatique) et doit être proscrite.

Cependant, si l'on se réfère à la nomenclature internationale, on devrait utiliser le terme de « **glycohémoglobine** », qui peut malheureusement prêter à confusion. Les anglo-saxons utilisent couramment cette dernière dénomination. Elle devrait progressivement s'imposer en France dans les prochaines années.

BIBLIOGRAPHIE

SCHNEK A.G., SCHROEDER W.A., The relation between the minor components of whole normal human adult hemoglobin as isolated by chromatography and starch block electrophoresis, J. Am. Chem. Soc., 1961, 83, 1472-1478.

IUPAC-IUB, Joint commission Biochemical nomenclature. Nomenclature of glycoproteins, glycopeptides and peptidoglycans (recommendations 1985), Eur. J. Biochem., 1986, 159, 1-6.

BUNN H.F., SHAPIRO R., Mc MANUS M., GARRICK L., Mc DONALD M.J., GALLOP P.M., GABBAY K.H., Structural heterogeneity of human hemoglobin A due to nonenzymatic glycosylation, J. Biol. Chem., 1979, 254, 3892-3298.

GILLERY P., GUILLEMIN, C., DELPECH M., Hémoglobine glyquée : méthodes de dosage et problèmes de standardisation, Ann. Biol. Clin., 1994, 52, 157-163.

II - FACTEURS PRÉANALYTIQUES PRÉLÈVEMENTS

P. GILLERY, A. VASSAULT

CAHIER
DE
Formation
version numérique

L'ensemble des facteurs pré-analytiques à prendre en compte concernent les conditions relatives au patient (son état physio-pathologique, les modalités de son traitement, la prise éventuelle de médicaments associés), celles se rapportant au prélèvement (ponction, anticoagulant), et celles du prétraitement de l'échantillon (conditions de stabilité).

■ I. LE PATIENT

I.1 - Variations physiologiques et alimentation

La valeur de l'hémoglobine glyquée est indépendante des variations journalières de la glycémie et n'est pas affectée par l'exercice ni par l'ingestion récente de sucre. Le jeûne n'a pas d'influence. Il semble que l'hémoglobine A_{1c} augmente régulièrement avec l'âge, de façon modérée (+ 0,6 % de l'hémoglobine totale entre 20 et 70 ans).

I.2- Physiopathologie

- Hémoglobinopathies

Elles peuvent conduire à des résultats erronés, surtout avec les techniques utilisant des microcolonnes de chromatographie d'échange d'ions.

Le diagnostic de ce type d'affection est parfois posé à l'occasion d'une exploration ou d'un dépistage systématique du diabète.

- Hémolyses

Au cours des hémolyses (quelles que soient leurs causes) les résultats sont anormalement abaissés en raison de la destruction prématurée des hématies, quelle que soit la méthode de dosage adoptée.

- Insuffisance rénale

Chez les sujets en état d'insuffisance rénale, la carbamylation de l'hémoglobine peut conduire à des résultats erronés. Les patients non diabétiques en état d'insuffisance rénale présentent des résultats plus élevés que les sujets témoins.

- Dyslipoprotéïnémies

Dans les hyperlipidémies de type I, IV et V, des concentrations de triglycérides supérieures à 19 mmol/l conduisent à des résultats augmentés avec les techniques de dosage des HbA₁ par chromatographie d'échange d'ions sur microcolonnes. Ces techniques devraient progressivement être abandonnées.

Un lavage préalable des globules rouges permet d'éliminer cette interférence. L'hémolysat peut également être clarifié par l'utilisation d'un solvant comme le tétrachlorure ou fluorure de carbone.

1.3 - Prise de médicaments

Toute modification du groupement N-terminale de la chaîne bêta de l'hémoglobine par fixation de molécules comme l'acide acétylsalicylique ou des dérivés de l'éthanol sont responsables d'interférences et conduisent à des résultats anormalement élevés.

Les résultats des techniques chromatographiques et électrophorétiques peuvent donc être par exemple influencés par la prise d'aspirine. Il semble qu'in vivo ces interférences restent minimales.

1.4 - Fréquence des prélèvements

Les références médicales opposables précisent que, dans la surveillance d'un DNID, il n'y a pas lieu de doser l'hémoglobine glyquée plus d'une fois tous les trois mois, sauf cas particulier. Les changements de thérapeutique ou les diabètes instables peuvent transitoirement motiver des prescriptions plus rapprochées.

■ II. LE PRÉLÈVEMENT

II.1- Ponction

On peut utiliser du sang veineux ou, le cas échéant, du sang capillaire. Dans ce dernier cas, le sang capillaire peut être recueilli par l'intermédiaire d'un microcapillaire contenant de l'EDTA (5 µl) ou sur du papier filtre (simple ou préalablement traité par une solution de glucose oxydase pour hydrolyser le glucose).

II.2- Nature de l'anticoagulant

Le sang est recueilli dans un tube contenant de préférence de l'EDTA, ou encore de l'héparine, de l'oxalate/fluorure ou le mélange ACD.

Le dosage doit intervenir dans un délai n'excédant pas 3 jours (plasma + EDTA), 5 jours (ACD), si le sang est placé à + 4 °C. La conservation de l'échantillon conduit à l'apparition sur les pics des chromatogrammes d'épaulements provenant de la dégradation de l'hémoglobine.

Le volume de sang nécessaire varie en fonction des techniques de dosage, de 5 µl à 2 ml.

II.3- Prétraitement

Le prétraitement de l'échantillon comprend la réalisation de l'hémolyse et l'élimination des fractions labiles d'hémoglobine glyquée.

L'étape de formation des protéines glyquées est précédée de celle d'un intermédiaire labile (base de Schiff). Dans le cas de l'HbA, l'intermédiaire de formation de l'HbA_{1c} est l'Hb pré-A_{1c}, dont la quantité est fonction de la glycémie récente et non le reflet d'une glycation cumulative. Cette fraction est éluée par chromatographie d'échange d'ions au niveau de l'HbA_{1c} et interfère ainsi dans la spécificité du dosage. Le problème ne se pose pas avec les techniques de chromatographie d'affinité ni avec les techniques immunologiques spécifiquement dirigées contre l'HbA_{1c} stable. L'électrophorèse pose les mêmes problèmes que la chromatographie. Cette fraction doit donc le plus souvent être éliminée. Pour ce faire, plusieurs techniques sont proposées :

- incubation des érythrocytes dans une solution de NaCl 150 mmol/l (une nuit à température 20-25°C sous agitation douce) ;
- dialyse de l'hémolysat ;

- utilisation de réactifs contenant du semi-carbazide-aniline ou de l'acide borique ou simplement une hémolyse à pH acide.

On trouve également, dans la plupart des coffrets de dosage, un réactif permettant à la fois la lyse des cellules et l'élimination de la fraction labile. Cette opération peut également être effectuée automatiquement sur certains analyseurs.

II.4 - Transport

Le transport doit être réalisé en boîte isotherme simple. Si le délai de transport est supérieur à 3 jours, le prélèvement peut être congelé après prétraitement

■ III. LE SPÉCIMEN

Le stockage du sang total à + 4 °C pendant 3 jours ne semble pas modifier les résultats obtenus par les différentes techniques. La conservation à + 20 °C du sang total et des hémolysats affecte les résultats obtenus par chromatographie d'échange d'ions et électrophorèse : la fraction HbA_{1a+b} augmente rapidement au cours du temps, inconvénient contourné par les méthodes de dosages spécifique de l'HbA_{1c}, et l'apparition d'un pic anormal d'Hb vieillie (HbA_{1d}) entre l'HbA_{1c} et HbA₀ rend difficile l'intégration de l'HbA_{1c}. Le problème est majoré quand les pics ne sont pas visualisés, comme par exemple dans les techniques utilisant des minicolonnes. En revanche, la conservation à + 20 °C pendant 10 jours n'affecterait pas les résultats des dosages effectués par chromatographie d'affinité.

Les hémolysats peuvent être conservés à + 4 °C pendant au maximum 7 jours, avec cependant possibilité de dégradation. Il est préférable pour des conservations à long terme de congeler les échantillons à - 80 °C. Ils peuvent être conservés à cette température pendant plusieurs mois.

Des hémolysats préparés aussitôt après le prélèvement et conservés de cette façon peuvent valablement être utilisés pour contrôler la reproductibilité des techniques.

■ IV. RÉFÉRENCES

LITTLE R.R., ENGLAND J.D., WIEDMEYER H., GOLSTEIN D.E., Effects of blood storage on results for glycosylated hemoglobins as measured by ion-exchange chromatography, affinity chromatography, and colorimetry, *Clin. Chem.*, 1983, 29, 1113-1115.

KILPATRICK E.S., DOMINICZAK M.H., SMALL M., The Effects of ageing on glycation and the interprétation of glycaemic control in type 2 diabetes, *Q.J. Med.*, 1996, 89, 307-312.

GILLERY P., GUILLEMIN C., DELPECH M., Hémoglobine glyquée : méthodes de dosage et problèmes de standardisation, *Ann. Biol. Clin.*, 1994, 52, 157-163.

WEYKAMP C.W., PENDERS T.J., SIEBELDER C.W.M., MUSKIET F.A.J., VAN DER SLIK W., Interférence of carbamylated and acetylated hemoglobins in assays of glycohemoglobin by HPLC, electrophoresis, affinity chromatography and enzyme immunoassay, *Clin. Chem.*, 1993, 39, 138-142.

III - MÉTHODES DE DOSAGE

P. GILLERY, A. VASSAULT

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

Le dosage de l'hémoglobine glyquée est pratiqué en France depuis 25 ans pour le contrôle de l'équilibre glycémique des patients diabétiques (1). L'intérêt suscité par cette détermination est à l'origine d'une multiplication des techniques de dosage adoptées.

Cependant, les moyens mis en œuvre ne sont pas équivalents et varient en fonction des laboratoires. En particulier, la diversité des techniques est souvent responsable de discordances importantes entre les résultats provenant de laboratoires différents.

Par ailleurs, le terme d'hémoglobine glyquée désigne plusieurs espèces chimiques différentes qui ne sont pas évaluées de la même façon par les diverses techniques utilisées. L'Hb A_{1c}, constituant majeur de l'hémoglobine glyquée possède une structure définie. Elle est souvent considérée comme la fraction la plus fiable, sans être à ce jour acceptée comme référence.

Les méthodes de dosage de l'hémoglobine glyquée peuvent être réparties en deux groupes (2) :

- celles qui dosent spécifiquement l'HbA_{1c} (soit en exploitant la modification de la charge de l'hémoglobine, soit par une méthode immunochimique)
- celles qui évaluent la glycation globale de la molécule, donc tous les sites glyqués sur les deux chaînes. La glycation de la fraction A_{1c} étant proportionnelle à celle de l'Hb totale, l'application d'un facteur de correction permet à ce type de technique de fournir des résultats équivalents à ceux obtenus avec une technique de mesure spécifique de l'A_{1c}.

Diverses méthodes permettent par ailleurs d'effectuer le dosage global des hémoglobines rapides HbA₁. Il s'agit alors d'un dosage moins spécifique que celui de l'HbA_{1c}, et soumis à diverses interférences analytiques (3). Dans la mesure où les principes utilisés pour ces méthodes (chromatographie, électrophorèse) permettent également le dosage spécifique de l'HbA_{1c}, ces techniques devraient être abandonnées au profit de ces dernières.

Enfin les méthodes chimiques (comme celles utilisant l'acide thiobarbiturique après hydrolyse et cyclisation en 5-hydrométhylfurfural) ne sont plus employées.

■ I. MÉTHODES DOSANT SPÉCIFIQUEMENT L'HbA_{1c}

1.1- Chromatographie d'échange d'ions

C'est la technique la plus répandue. Le principe est fondé sur le fait que la charge nette des Hb glyquées sur l'extrémité N-terminale des chaînes β est plus négative que celle de l'HbA₀ à pH neutre. L'hémolysat est déposé sur une colonne remplie de résine chargée négativement. On élue d'abord les hémoglobines rapides : HbA_{1a}, HbA_{1b}, HbA_{1c} puis la fraction principale HbA₀. Le pourcentage des différentes fractions est déterminé par mesure spectrophotométrique.

Cette méthode a subi depuis sa mise au point par Trivelli en 1971 (4) de nombreuses améliorations concernant le support chromatographique, qui ont permis des applications à la pratique clinique en utilisant des minicolonnes ou des systèmes automatisés en chromatographie liquide haute performance [CLHP] ou chromatographie liquide basse pression [CLBP].

Minicolonnes

Les principaux réactifs commercialisés sur ce principe sont rapportés dans le tableau I. Leur emploi est apparemment facile et permet la mesure de la fraction HbA₁, ou HbA_{1c},

Tableau I : Réactifs prêts à l'emploi utilisant des minicolonnes (chromatographie d'échange d'ions).

| | |
|--------------------|---|
| BIO-ADVANCE | Glyco-sep/A_{1c} |
| BIOCADE | HbA_{1c} |
| BIOMIDI | HBA_{1c} |
| BIODIRECT | A1 RC 1245-01/02 |
| BIO-RAD | A_{1c} minicolonnes /microtech |
| CHIRON | Glycomat 745/765 |
| REALEF | Chembio Glyco-sep A_{1c} |
| EUROBIO | HbA₁ rapides |
| FUMOUIZE | Hémoglobines glycosylées |
| HELENA | GlycoHb Quick colonnes |
| REALEF | Hb A₁ totales Eagle |

L'utilisation de deux tampons permet de séparer un premier éluat contenant l'HbA_{1a+b} d'un deuxième contenant l'HbA_{1c}. L'Hb totale est quantifiée soit après élution d'une troisième fraction, ce qui permet de récupérer la totalité de l'Hb déposée, soit par mesure de l'absorbance d'une dilution de l'hémolysat. Cette dernière solution est moins performante car elle ne tient pas compte du rendement de la chromatographie.

La reproductibilité interlaboratoire est peu performante avec les minicolonnes d'échange ionique (coefficients de variation interlaboratoire de 15 à 29 %).

Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

L'utilisation d'autres supports de chromatographie d'échange d'ions apporte une amélioration à la séparation des différentes hémoglobines glyquées et permet l'emploi de CLHP. Plusieurs analyseurs de ce type sont commercialisés (tableau II) en France. Le principal inconvénient de ce type de méthode est de nécessiter un investissement assez lourd.

Lors d'un récent échange interlaboratoire, les CV interlaboratoire observés pour ces techniques sont compris entre 4 et 16 %, ce qui met en évidence de grandes différences de performances en fonction des systèmes.

Tableau II : Appareils spécialisés (CLHP) pour le dosage de l'HbA_{1c}.

| | |
|---------------------------|--|
| BIO-RAD | A_{1c} Diamat |
| BIO-RAD | A_{1c} chaîne modulaire |
| BIO-RAD | Varian |
| EUROGENETICS TOSOH | A_{1c} : 2.2 |
| MENARINI | HA 8110 |
| MERCK-BIOTROL | Hb glyquée |

Chromatographie liquide basse pression (CLBP)

Des systèmes automatisés de CLBP ont été introduits sur le marché français (Chiron-Glycomat 745/765 ; Instrument Laboratory-Glycolab). Réputés plus faciles à utiliser et moins coûteux que les systèmes CLHP, leur capacité de résolution doit systématiquement être évaluée, notamment pour ce qui concerne la séparation HbA_{1c}/HbF.

Ces différentes techniques sont fondées sur le même principe. Les techniques automatisées permettent cependant une meilleure performance en matière de précision et d'exactitude, dans la mesure où les paramètres techniques et environnementaux sont mieux contrôlés. De plus, l'enregistrement d'un graphique permet l'identification objective des différentes fractions et la mise en évidence de leur éventuelle mauvaise séparation, ou de fractions d'hémoglobines anormales.

Malgré leur fréquente utilisation, les techniques chromatographiques d'échange d'ions restent délicates et doivent être entourées de nombreuses précautions pour assurer la qualité des résultats. Différents facteurs, liés soit aux caractéristiques de la technique soit aux caractéristiques de l'échantillon sanguin, peuvent être en cause.

On citera avant tout les paramètres physico-chimiques : le pH, la température, la force ionique, la taille de la colonne sont des paramètres critiques de la chromatographie d'échange d'ions (5). Les variations de conditions d'utilisation des minicolonnes, avec la température, entraînent des différences notables dans l'expression des résultats d'HbA_{1c} d'un laboratoire à l'autre. Par ailleurs, comme on l'a déjà signalé, la plupart des techniques utilisant des minicolonnes ne tiennent pas compte du rendement de la chromatographie. En CLHP, des variations, même minimes, dans la composition et la stabilité des tampons peuvent affecter la résolution du chromatogramme. Certains systèmes automatisés ne sont pas thermostatés. L'absence d'effet de la température doit être vérifiée pour chaque technique. Par ailleurs, l'hémoglobine pré-A_{1c}, doit être totalement éliminée, soit au cours d'une préincubation manuelle, soit automatiquement.

D'autres facteurs, liés aux caractéristiques de l'échantillon lui-même, peuvent interférer. Si les triglycérides et la bilirubine sont capables d'interférer sur des dosages d'HbA₁ dans son ensemble (3), le dosage spécifique de l'HbA_{1c} est peu sensible à ces facteurs. Les interférences provoquées par certaines molécules non glucidiques, qui peuvent se fixer à l'hémoglobine et entraîner une différence de charge, sont à considérer. C'est le cas de l'urée, de l'éthanol, de l'acide acétylsalicylique. Les hémoglobines carbamylées, acétylées, ainsi que celles combinées à l'acétaldéhyde, sont alors éluées au niveau des hémoglobines rapides. Même les dosages par CLHP peuvent être affectés. Il semble cependant qu'in vivo les différences observées entre différentes techniques dans ces situations pathologiques ne sont pas uniquement liées à ces hémoglobines modifiées (6).

Les interférences liées à la présence de variants de l'hémoglobine restent un problème plus préoccupant (7, 8). Sur le plan analytique, les perturbations varient selon la charge du composé présent. L'HbF est éluée avec les hémoglobines rapides et peut être confondue dans certaines techniques avec l'HbA_{1c}. Les Hb C et S sont elles aussi glyquées et donnent naissance à des dérivés glyqués, l'HbC_{1c} et l'HbS_{1c}. D'autres variants peuvent migrer avec différents pics, et, dans certains cas, ne pas être ou être mal détectés, même en CLHP. Il est évident que le problème se pose avec encore plus d'acuité pour les techniques de minicolonnes, qui ne permettent pas la visualisation de l'élution des différentes fractions.

Tous ces éléments impliquent qu'une attention particulière soit portée aux élévations et aux diminutions non attendues de l'HbA_{1c} avec les techniques de chromatographie d'échange d'ions. Par ailleurs, chaque technique doit être évaluée en fonction de ses performances propres, et on ne saurait considérer comme équivalentes toutes les techniques basées sur une même technologie, comme par exemple la CLHP.

I.2- Electrophorèse

L'électrophorèse réalisée en gel d'agarose ou acétate de cellulose (électroendosmose) permet la migration en bloc de toutes les fractions rapides HbA₁. Ces méthodes, qui pendant longtemps n'ont pas permis d'en séparer les divers constituants, ont bénéficié de récents progrès conduisant à la séparation spécifique de l'HbA_{1c}. Ces derniers systèmes doivent être préférés.

Représentant une alternative à l'utilisation des microcolonnes, l'électrophorèse est une technique simple, nécessitant un matériel spécialisé, et permet le dosage simultané de plusieurs échantillons.

Ce type de technique permet la mise en évidence de la plupart des Hb anormales, mais elle ne permet pas celle des hémoglobines modifiées comme les hémoglobines carbamylées.

L'obtention de résultats reproductibles exige une transparisation homogène du gel pour ne pas entraîner de variations lors de l'intégration, car les signaux à mesurer sont faibles et nécessitent donc un système d'intégration performant. La pratique de cette technique est très dépendante de la rigueur avec laquelle elle est mise en œuvre et de la qualité de l'équipement utilisé.

Deux systèmes d'électrophorèse en agarose dosant spécifiquement l'HbA_{1c} ont été commercialisés. En dehors de ces techniques spécifiques, les techniques électrophorétiques fournissent des résultats plus élevés que les techniques de dosage de l'Hb A₁ ou Hb A_{1c} (valeurs normales inférieures à 9 %) et restent assez imprécises (CV interlaboratoire de 14 à 26 %).

Les différents systèmes disponibles sur le marché français sont présentés dans le tableau III.

Tableau III : Différents systèmes de mesure de l'Hb glyquée par électrophorèse.

| | |
|----------------|---|
| BECKMAN | Diatrac HB A_{1c} |
| HELENA | Hb glyquée Rep |
| HELENA | Hb glyquée Titan (Hb A_{1c}) |
| SEBIA | Hb A₁ |

Les méthodes basées sur l'isoelectrofocalisation, performante et résolutive, nécessitent un appareillage coûteux et une expérience suffisante. Elle n'est pas utilisée en pratique courante.

I.3- Méthodes immunologiques

Le récent développement de nouvelles technologies, et notamment la production d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux contre l'HbA_{1c}, a permis la mise au point de techniques immunologiques pour le dosage de l'HbA_{1c}.

Les anticorps sont spécifiques de la liaison du glucose avec l'extrémité N terminale de la chaîne β.

Différents systèmes ont été proposés

- un dosage immunoturbidimétrique en phase homogène (Boehringer Tinaquant ; Roche Unimat HbA_{1c}) adapté à divers analyseurs automatiques de Biochimie Clinique (9), effectué après hémolyse préalable manuelle d'une aliquote de sang. Le pourcentage d'HbA_{1c} est calculé par rapport à l'Hb totale dosée en parallèle, à l'aide d'une gamme d'étalonnage titrée avec un système de CLHP.

La reproductibilité interlaboratoire estimée par le CV interlaboratoire observée lors d'un récent échange interlaboratoire est de 10 %.

- un dosage d'immunoinhibition sur latex, effectué sur sang capillaire, requiert l'utilisation d'un analyseur spécialisé. Son utilisation simple et rapide le destine à être utilisé hors du laboratoire (Bayer DCA 2000). Les résultats obtenus présentent une reproductibilité interlaboratoire très performante (CV = 3,2 %).

- un dosage ELISA sur microplaques automatisé utilisant un anticorps monoclonal.

La spécificité de ces méthodes dépend de l'épitope reconnu. En l'absence de variants de l'hémoglobine, ces techniques fournissent des résultats exacts. Les fractions d'hémoglobine labile ou d'hémoglobines modifiées par d'autres agents ne sont pas prises en compte, mais les hémoglobines anormales et leurs dérivés glyqués peuvent être mesurés ou ne pas l'être suivant la place de la substitution par rapport au déterminant antigénique. Le problème est identique dans le cas de la présence d'une Hb F élevée. Il conviendra toujours de bien connaître la séquence glyquée reconnue et sa longueur. Dans le cas de la présence d'une HbF ou d'une Hb anormale, la glycation de ces formes n'est pas reconnue, ce qui entraîne des résultats par défaut puisque le dosage, de l'hémoglobine totale inclut des formes non glyquées.

Ce type de méthode ne permet pas de toute façon, d'identifier des hémoglobines anormales. Ces techniques fournissent des valeurs proches des valeurs CLHP.

Enfin, les techniques immunologiques ont présenté une reproductibilité interlaboratoire variable en fonction des systèmes lors d'un récent échange interlaboratoire effectué sur le plan national (CV de 2,4 et 8,7 %).

■ II. MÉTHODES DOSANT L'HÉMOGLOBINE GLYQUÉE TOTALE

Les méthodes chimiques, dosant les fonctions cétoamines par colorimétrie, ne sont plus utilisées et ne sont citées que pour mémoire.

Les méthodes basées sur la glycation globale de la molécule, dosant donc l'hémoglobine glyquée totale, se résument actuellement aux techniques de chromatographie d'affinité. Ce principe, longtemps appliqué à des techniques de chromatographie manuelles, a depuis peu fait l'objet d'adaptations automatiques.

II.1- Minicolonnes

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. Différentes firmes commercialisent, sous forme de trousse (tableau IV), des colonnes prêtes à l'emploi qui peuvent être régénérées jusqu'à 10 fois. Deux tampons sont utilisés : le premier élue la fraction non glyquée, le deuxième, contenant du sorbitol ou de l'acide citrique, élue la fraction glyquée fixée dans la colonne.

Ces techniques dosent les hémoglobines normales ou anormales ayant fixé irréversiblement le glucose. La température et la fraction labile d'Hb n'interfèrent pas, de même que les hémoglobines carbamylées ou acétylées (6).

Elles sont cependant sensibles aux variations de concentration du ligand d'un lot de gel à l'autre et peut varier selon les trousse (10). Les échantillons sanguins peuvent être conservés à température ambiante ou à + 4°C plus longtemps que dans le cas des techniques chromatographiques et électrophorétiques.

La reproductibilité interlaboratoire des résultats obtenus avec les techniques d'affinité sur colonne estimée par le CV, varie de 15 à 20 %.

Tableau IV : Différents systèmes de mesure de l'Hémoglobine glyquée. (microcolonnes affinité).

| | |
|----------------------|---------------------------|
| Eurobio | Glyctotest III, Glycation |
| Héléna | Glycoteck Affinity |
| Merck Biotrol | Hb glyquée |
| Sigma | Hb glyquée totale |

II.2- Méthodes automatisées

Le principe de la chromatographie d'affinité a été appliqué à des dosages automatisés (11). Le sang est hémolysé et le pourcentage d'hémoglobine glyquée est calculé par rapport à l'hémoglobine totale. La méthode la plus utilisée conduit à la fixation de l'Hb glyquée sur un réactif d'affinité polyanionique et au captage du complexe par une matrice cationique (12). La détection utilise une réaction d'inhibition par l'hème de la fluorescence d'un fluorophore ajouté (Abbott IMX, VISION).

Les résultats sont corrigés par rapport à une courbe d'étalonnage mémorisée qui a été titrée en HbA_{1c} par une méthode CLHP. Ces techniques, qui dosent l'hémoglobine glyquée totale, fournissent des résultats corrigés exprimés en HbA_{1c}. Si le principe de ce calcul peut être discuté, il apparaît que, dans la pratique, les résultats sont utilisables (6). Les résultats d'HbA_{1c} obtenus avec ces techniques sont proches de ceux observés en CLHP et leur reproductibilité interlaboratoire est satisfaisante (CV = 11,3 % lors d'un récent échange interlaboratoire).

■ III. RÉPARTITION DES TECHNIQUES

Lors d'un récent échange interlaboratoire effectué sur le plan national dans le cadre du contrôle de qualité national, les différentes méthodes utilisées par les 2 674 laboratoires qui ont fourni des réponses sont présentées dans le tableau V.

Tableau V : Répartition dans le choix (CN 0395) des méthodes de dosage (n = 2 674 laboratoires).

| Méthodes | Pourcentage d'utilisateurs |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| Chromatographie d'échange d'ion | 37% |
| Chromatographie d'affinité | 35% |
| Méthode immunologique | 15% |
| Électrophorèse | 7 % |
| Non identifié | 6 % |

La répartition des techniques est modifiée par rapport à celle des échanges interlaboratoires effectués (13) ces dernières années (1991 et 1993), comme le montre la figure 1.

Les techniques immunologiques ont significativement progressé, aux dépens des techniques électrophorétique et de chromatographie d'échange ionique (surtout par minicolonnes).

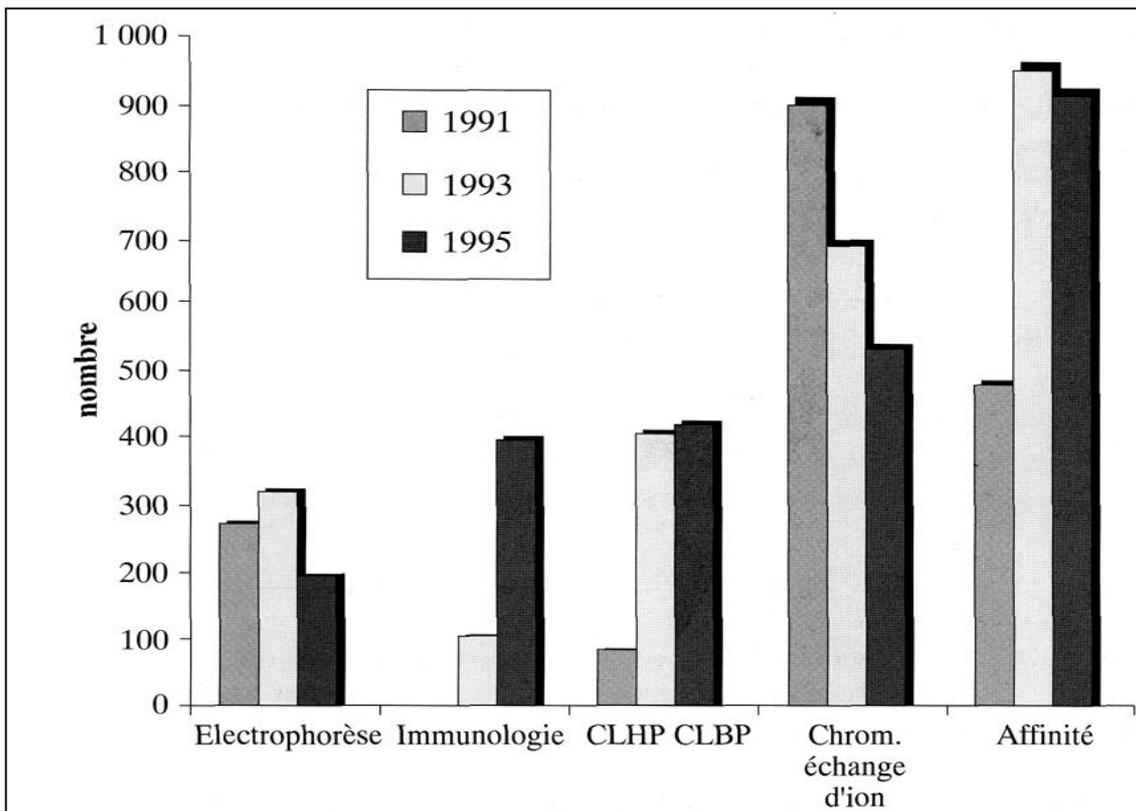


Figure 1 : Evolution depuis 1991 du nombre de participants par méthode.

■ IV. CONCLUSION

L'évolution ces dernières années vers le choix des techniques basées sur l'immunologie ou l'affinité, s'est opérée au détriment des techniques manuelles de type électrophorèse ou minicolonnes.

Le développement de ces nouvelles techniques, combiné à une standardisation au niveau international devrait contribuer à une meilleure comparaison des résultats d'un laboratoire à l'autre. C'est encore loin d'être le cas à l'heure actuelle, car les performances des techniques les plus répandues sont insuffisantes. Il convient que les exigences des biologistes soient précisément définies pour le choix des systèmes analytiques et qu'un programme de contrôle de qualité des résultats soit effectivement mis en place.

De nombreux laboratoires fournissent des résultats exprimés en HbA₁ ou Hb glyquée totale en fonction des techniques utilisées. Le dosage effectif de la fraction A_{1c} et l'expression en HbA_{1c}, permettraient une avancée significative.

Les laboratoires fournissent encore trop souvent une valeur de référence inexacte ou inadaptée. Le dosage de l'HbA_{1c} ayant des implications directes sur la conduite thérapeutique, son expression doit faire l'objet d'un soin tout particulier.

Au total, on ne peut que reprendre l'énoncé de recommandations élémentaires :

- connaissance des méthodes et exigence technique
- contrôle strict de la qualité des résultats par la pratique d'un contrôle de qualité intralaboratoire et la participation à des circuits interlaboratoires
- compétence dans l'interprétation des résultats et développement de la relation clinicobiologique.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) LARSEN M.T., HORDER M., MOGENSEN E.F. (1990) Effect of long-term monitoring of glycosylated hemoglobin levels in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 323, 1021-1025
- (2) GILLERY P., GUILLEMIN C., DELPECH M. (1994) Hemoglobine glyquée : méthodes de dosage et problèmes de standardisation. *Ann Biol Clin* 52, 157-163
- (3) GOLDSTEIN D.E., LITTLE R.R., WIEDMEYER H.M., ENGLAND J.D., MCKENZIE E.M. (1986) Glycated hemoglobin : methodologies and clinical applications. *Clin Chem* 32, B64-B70
- (4) TRIVELLI L.A., RANNEY H.M., LAI H.T. (1971) Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* 284, 353-357
- (5) PEACOCK I (1984) Glycosylated haemoglobin : measurement and clinical use. *J Clin Pathol* 37, 841-851
- (6) WEYKAMP C.S., PENDERS T.J., SIEBELDER CWM, MUSKIET FAJ, VAN DER SLIK W. (1993) Interference of carbamylated and acetylated hemoglobins in assays of glycohemoglobin by HPLC, electrophoresis, affinity chromatography and enzyme immunoassay. *Clin Chem* 39,138-142
- (7) WEYKAMP C.W., PENDERS T.J., MUSKIET FAJ, VAN DER SLIK W. (1993) Influence of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations, as investigated by 102 laboratories using 16 methods. *Clin Chem* 39, 1717-1723
- (8) WEYKAMP C.W., MARTINA W.V., VAN DER DUS FPL, PENDERS T.J., VAN DER SLIK W., MUSKIET FAJ (1994) Hemoglobins S and C : reference values for glycohemoglobin in heterozygous, double-heterozygous and homozygous subjects as established by 13 methods. *Clin Chim Acta* 231, 161-171
- (9) HOLOWNIA P., BISHOP E., NEWMAN D.J., JOHN W.J., PRICE C.P. Adaptation of latex-enhanced assay for percent glycohemoglobin to a Dade Dimension analyzer. *Clin chem*, 1997, 43, 76-84
- (10) WETTRE S., VON SCHENCK H. (1986) Batch to batch imprecision in the affinity chromatography assay of glycated hemoglobin. *Clin Biochem* 19, 364-366
- (11) FIECHTNER M., RAMP J., ENGLAND B., KNUDSON M.A., LITTLE R.R., ENGLAND J.D., GOLDSTEIN D.E., WYNN A. (1992) Affinity binding assay of glycohemoglobin to two-dimensional centrifugation referenced to hemoglobin A1c. *Clin Chem* 38, 2372-2379
- (12) WILSON D.H., BOGACZ J.P., FORSYTHE C.M., TURK P.J., LANE T.L., GATES R.C., BRANDT D.R. Fully automated assay of glycohemoglobin with the Abbott IMx analyzer : normal approaches for separation and detection. *Clin. Chem.*, 1993, 39, 2090-2097.
- (13) GILLERY P., GUILLEMIN C., VASSAULT M., LABBÉ D., DUMONT G., BAILLY M. - SFBC / LNS (1991) Hémoglobine glyquée. *Annales du Contrôle de Qualité National en Biochimie (LNS 91 / 08 / BIO 49)*,32-43

IV - INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

C. KINDERMANS, A. VASSAULT, J.-J. ROBERT

CAHIER
DE
Formation
version numérique

La glycation de l'hémoglobine étant à son terme quasiment irréversible, elle constitue une véritable mémoire des taux cumulés de glucose circulant, liée à la durée de vie des globules rouges (120 jours), La quantité d'hémoglobine glyquée représente la valeur intégrée de la glycémie des 6 à 8 semaines précédentes et constitue un élément objectif du contrôle glycémique chez le diabétique.

Il existe de nombreuses méthodes de dosages des hémoglobines glyquées auxquelles correspondent des valeurs de référence et des causes d'erreur différentes, C'est pourquoi, il est hasardeux d'interpréter des résultats d'hémoglobine glyquée sans connaître exactement la méthode utilisée.

■ I. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

Le compte rendu doit spécifier :

- la nature de la technique utilisée ;
- la fraction d'hémoglobine glyquée effectivement dosée .
 - . HbA_{1c},
 - . HbA₁,
 - . Hb glyquée totale ;
- l'intervalle des valeurs de référence et les conditions dans lesquelles elles ont été établies,

Les résultats sont exprimés en pourcentage de la fraction d'hémoglobine glyquée par rapport à la concentration de l'hémoglobine totale.

■ II. VALEURS USUELLES

Elles varient en fonction de la technique de dosage adoptée dans la mesure où, selon le principe de dosage adopté, la forme d'hémoglobine mesurée correspond à l'hémoglobine glyquée totale, à l'hémoglobine HbA₁ ou à l'hémoglobine HbA_{1c}.

Les formes labiles de l'hémoglobine glyquée ne doivent évidemment jamais être dosées en même temps que l'hémoglobine glyquée stable.

Les différentes valeurs usuelles, en fonction des techniques de mesure, parmi les plus utilisées, sont regroupées dans le tableau I.

Tableau I : Valeurs usuelles en fonction du type de technique et donc du type d'hémoglobine glyquée mesurée.

| Méthodes | Forme d'hémoglobine mesurée | Valeurs normales |
|---|-----------------------------|------------------|
| Électrophorèse HbA _{1c} | HbA ₁ | 6 – 9 % |
| | HbA _{1c} | 4 – 6 % |
| Echange d'ions. CLHP | HbA _{1c} | 4,3 - 6,1 % |
| Echange d'ions (microcolonne) | HbA _{1c} | 4 – 6 % |
| Chromatographie d'affinité (microcolonne) | Hb glyquée totale | 5,3 - 7,5 % |
| Immunodosage | HbA _{1c} | 4 – 6 % |
| Isofocalisation | HbA _{1c} | 4 – 5 % |

■ III. VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES

Le taux d'hémoglobine A_{1c} est indépendant du sexe et de l'âge, chez le sujet sain, les variations observées étant négligeables.

Les taux sont légèrement modifiés pendant la grossesse, physiologiquement plus bas pendant le premier trimestre et plus élevés pendant le dernier trimestre.

Chez le sujet sain, les variations intra-individuelles sont faibles. Une étude conduite chez 10 sujets sains volontaires, prélevés une fois par semaine pendant une période de 11 à 27 semaines a montré un CV moyen de 1,8 %.

Chez des patients diabétiques, on observe que les variations intra-individuelles sont moins importantes chez les sujets bien équilibrés (de l'ordre de 4 à 5 %) que chez les patients mal équilibrés, où des coefficients de variation supérieurs à 10 % peuvent être observés.

■ IV. CAUSES D'ERREURS

- Un raccourcissement de la durée de vie du globule rouge (anémie hémolytique) peut artificiellement abaisser le pourcentage d'hémoglobine glyquée de la même façon qu'un allongement de la durée de vie de l'hématie (splénectomie) l'augmente, quelle que soit la méthode de mesure.

- Les différentes hémoglobinopathies affectent la plupart des techniques.

La présence d'hémoglobine C ou S et leur glycation peuvent être responsables de résultats discordants entre les méthodes mesurant l'HbA_{1c} et celles mesurant l'Hb glyquée totale.

- L'hémoglobine carbamylée en quantité importante chez les insuffisants rénaux peut augmenter sensiblement les valeurs observées de l'hémoglobine glyquée A_{1c}.

- L'hémoglobine fœtale peut être à l'origine de résultats erronés avec les techniques qui ne permettent pas de l'identifier ou de reconnaître spécifiquement la fraction HbA_{1c}.

■ V. INTÉRÊT DU DOSAGE DE L'HÉMOGLOBINE GLYQUÉE

Surveillance des maladies diabétiques

- L'hémoglobine glyquée est indispensable pour surveiller un diabète de type I traité par l'insuline, dans lequel les glycémies observées sont extrêmement variables. Un dosage tous les 2 à 3 mois semble être un rythme de contrôle adapté. Le dosage régulièrement effectué représente un réel marqueur prédictif des complications du diabète (micro angiopathie, rétinopathie, néphropathie, neuropathie,...). Cependant, il ne dispense pas de la détermination pluriquotidienne des glycémies. En effet, un dosage d'Hb glyquée permet l'intégration des variations glycémiques et les ajustements thérapeutiques (insulinothérapie, alimentation) dépendent des mesures glycémiques effectuées à deux différentes périodes de la journée (pré- et postprandiales, matin et soir, jour et nuit) peut correspondre à un diabète bien stabilisé, ou à un diabète instable avec alternance d'hypoglycémie et d'hyperglycémie.

En fait, l'Hb glyquée peut estimer le risque à long terme (micro angiopathies diabétiques) mais ne reflète pas le risque à court terme (instabilité glycémique et hypoglycémie).

- Dans le diabète de type II, les glycémies sont généralement moins variables d'un jour à l'autre, mais peuvent varier au cours de la journée. L'Hb glyquée, index cumulatif des glycémies des 2 mois précédents est tout aussi indispensable en suivi dans ce cas que dans celui du diabète de type I.

■ VI. PRESCRIPTION

- 2 à 3 fois par an chez le sujet diabétique bien équilibré.
- Lors de chaque consultation à la fréquence maximale d'un dosage tous les 2 mois.
- Lors d'une consultation pour suspicion de diabète, notamment chez un sujet appartenant à une population à risque, la découverte d'une augmentation de l'hémoglobine glyquée conduira à une investigation approfondie (sujets présentant une intolérance au glucose, une glycémie normale comme dans le cas d'un prédiabète de type I, d'une mucoviscidose...).

Dans la grossesse, la relative inertie de ses variations fait souvent préférer le dosage des fructosamines.

■ VII. INTERPRÉTATION

L'interprétation doit tenir compte de la technique utilisée et de ses valeurs de référence. La définition d'un seuil est rendue délicate par la multiplicité des méthodes et des valeurs usuelles associées

Des valeurs seuils ont été proposées par différentes organisations de cliniciens traitant des patients diabétiques

- Pour l'« American Diabetes Association », un contrôle est jugé satisfaisant pour des valeurs d'hémoglobine A_{1c} inférieures à 7 %. Il est conseillé d'intervenir sur le plan thérapeutique pour des valeurs supérieures à 8 %. (En CLHP, valeurs usuelles : $5,0 \pm 0,5$ %.)

- Le groupe européen pour le traitement du diabète insulino dépendant (« European IDDM policy group ») a défini une stratégie applicable à tous les laboratoires quelles que soient les techniques de dosage utilisées. Il recommande à chaque laboratoire de définir ses propres valeurs de référence à partir d'une population témoin de sujets non diabétiques, de calculer une valeur moyenne et un écart type pour évaluer la dispersion des valeurs. Le contrôle glycémique est jugé insuffisant chez les patients présentant des valeurs d'hémoglobine A_{1c} supérieures à la moyenne observée + 5 écarts type. L'intervalle de référence utilisé pour l'HbA_{1c} au Danemark est pour des sujets non diabétiques compris entre 3,6 et 5,4 % (CV = 4,9 %). La valeur moyenne des valeurs observées chez des sujets diabétiques est de 7,8 %. Il est recommandé sur le plan national (Danish Health Authorities) : l'obtention de résultats inférieurs à 6,3 %.

■ VIII. CONCLUSION

Le dosage régulier de l'Hb glyquée, marqueur du contrôle glycémique, permet la surveillance du diabète aussi bien de type I que de type II, et représente un réel marqueur prédictif des complications diabétiques. De plus, de réalisation simple, cette estimation rétrospective, permet d'améliorer la communication avec le patient qui réalise mieux les bénéfices de son traitement et/ou de son régime grâce au caractère objectif de cette détermination.

BIBLIOGRAPHIE

PHILLIPON G., PHILIPPS P.J., Intraindividual variation of glycohemoglobin: implications for interpretation and analytical goals, *Clin. Chem.*, 1993, 39, 2305-2308.

BENJAMIN R., SACKS D.B., Glycated protein update: implications of recent studies, including the Diabetes control and complications trial, *Clin. Chem.*, 1994, 40, 683-687.

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. England J. Med.*, 1993, 977-986.

GODSLAND I., Intraindividual variation significant changes in parameters of lipid and carbohydrates metabolism in the individual and intraindividual variation in different test population, *Ann. Clin. Biochem.*, 1986, 22, 618-624.

FLÜCKINGER R., HARMON W., MEIER W., LOO S., GABBAY K.H., Hemoglobin carbamylation in uremia, *N. Engl. J. Med.*, 1981, 14, 823-827.

BORDAS-FONFREDE M., SAUSER E., JARDEL C., JAUDON M.-C., THERVET F., ROTTEBOURG J., DELATTRE J., Protéines glyquées plasmatiques dans l'insuffisance rénale chronique, *Ann. Biol. Clin.*, 1990, 48, 717-720.

European IDDM Policy Group: Consensus Guidelines for the Management of Insulin-Dependent (Type I) Diabetes, Bussom, The Netherlands, Medicom Europe BV, 1993.

American Diabetes Association: Standards of medical care for patients with Diabetes mellitus, *Diabetes Care*, 1994, 17, 616-623

Les interférences rencontrées au cours des dosages d'hémoglobine glyquée sont très dépendantes de la technique utilisée. Suivant le principe de la méthode, celle-ci peut être ou non sujette à des interférences particulières.

On distingue trois grandes causes d'interférences :

- celles qui tiennent à la présence dans le sérum de substances gênantes pour le dosage (comme les lipides par exemple). Elles ont déjà été en partie évoquées dans le chapitre 2 ;
- celles qui sont liées à la fixation sur l'hémoglobine de substances non glucidiques (réactions d'acétylation ou de carbamylation) ;
- celles qui sont liées à des modifications de la nature de l'hémoglobine (hémoglobinopathies) ou de son métabolisme (diminution de la durée de vie en cas d'hémolyse).

Souvent, ces causes sont intriquées (anémie et urémie, par exemple, au cours de l'insuffisance rénale).

■ I. LIPÉMIE

Lorsque la triglycémie est élevée, certaines techniques peuvent être affectées comme l'électrophorèse, ou encore la chromatographie par minocolonnes d'échange ionique appliquée au cours de l'HbA_{1c} dans son ensemble. Dans ces cas, les résultats peuvent être faussement élevés ou l'interprétation délicate (mauvaise séparation des bandes en électrophorèse). Un prétraitement de l'échantillon peut être nécessaire: par exemple, l'élimination du sérum lipémique, après centrifugation du sang total, et son remplacement par un volume égal de solution saline avant le traitement de l'échantillon, permettent d'améliorer les résultats du dosage d'HbA_{1c} par électrophorèse.

■ II. BILIRUBINE

Aucun effet n'est décrit.

■ III. MÉDICAMENTS ET ALCOOL

La fixation de médicaments ou de métabolites divers sur l'hémoglobine est susceptible de modifier ses propriétés physico-chimiques et donc d'interférer avec certains dosages d'Hb glyquée.

L'une des modifications les plus fréquentes est l'acétylation de l'hémoglobine, qui peut être provoquée par l'acide acétylsalicylique (aspirine) ou l'acétyl-CoA d'origine endogène.

Ainsi, l'acide acétylsalicylique, lorsqu'il est préalablement incubé avec l'hémoglobine *in vitro*, provoque des interférences avec le dosage de l'HbA_{1c} effectué par chromatographie d'échange d'ions ou électrophorèse. Cependant, *in vivo*, ces interférences paraissent minimales : dans l'étude de Weykamp, la prise d'acide acétylsalicylique, à petites doses, d'une manière chronique (200-300 mg/j pendant 3 mois) ne provoquait pas d'interférence de l'hémoglobine acétylée formée avec le dosage de l'HbA_{1c}. De la même façon, un traitement par l'aspirine à raison de 2 g/j ne modifiait pas les résultats obtenus par CLHP. Une étude plus ancienne de Nathan montrait au contraire que la prise d'aspirine pouvait faussement augmenter les résultats d'HbA_{1c} obtenus par chromatographie d'échange ionique.

Cependant, l'effet de molécules comme l'acide acétylsalicylique *in vivo* peut être complexe. Des expériences menées *in vitro* ont montré que l'acide acétylsalicylique diminuait la glycation des protéines. Là encore, l'effet *in vivo* ne paraît pas d'importance physiologique.

Au cours de l'éthylisme chronique, une acétylation de l'hémoglobine est également observée, avec les mêmes conséquences sur son comportement en électrophorèse et chromatographie d'échange cationique: Des valeurs relativement élevées d'hémoglobine acétylée ont été trouvées chez des patients éthyliques (2 à 3 %), mais on ne possède pas vraiment de résultats d'études à grande échelle qui puissent affirmer le rôle réel de cette interférence dans les dosages d'HbA_{1c}.

■ IV. HÉMOGLOBINES GLYQUÉES DANS L'INSUFFISANCE RÉNALE

Au cours de l'insuffisance rénale, et notamment de l'insuffisance rénale chronique, que le patient soit ou non soumis à un traitement par hémodialyse, l'hémoglobine, comme toutes les protéines circulantes, subit un autre type de modification post-traductionnelle que la glycation, la carbamylation. Celle-ci est due à la décomposition lente et spontanée de l'urée en ammoniacque et cyanate, et à la fixation de son dérivé réactif en milieu aqueux, l'isocyanate, sur les fonctions α -aminées N-terminales et ϵ -aminées des lysines des protéines. On obtient ainsi de l'hémoglobine carbamylée, au même titre qu'on obtient de l'hémoglobine glyquée par fixation de glucose. La carbamylation peut, comme la glycation, modifier les propriétés physicochimiques de l'hémoglobine, et donc interférer dans les techniques de dosage de l'hémoglobine glyquée basées sur ce principe (chromatographie d'échange d'ions et électrophorèse), alors que les méthodes utilisant un anticorps spécifique ou les méthodes basées sur la chromatographie d'affinité ne sont pas sensibles à l'interférence de ces formes d'hémoglobines modifiées.

L'influence de la présence d'hémoglobine carbamylée sur les dosages d'hémoglobine A_{1c} par chromatographie d'échange ionique (HPLC ou minicolonnes) n'est pas négligeable. Weykamp et coll. ont montré que l'augmentation de l'urée sérique de 1 mmol/l provoquait la formation de 0,063 % d'hémoglobine carbamylée. Des données comparables (0,35 % pour 10 mmol/l d'urée sérique) ont été rapportés par Flory et coll.

Ces résultats peuvent conduire à préférer, chez les insuffisants rénaux, des techniques non sensibles à cette interférence (immunologie, affinité), ou à associer le dosage des fructosamines (lui-même à considérer avec précaution). De plus, l'insuffisance rénale s'accompagne souvent d'anémie, ce qui rend encore plus aléatoire l'interprétation (voir ci-dessous).

■ V. ANÉMIE ET HÉMOLYSE

Dans toutes les pathologies qui modifient la durée de vie des globules rouges, donc de l'hémoglobine qu'ils contiennent, le temps de contact entre hémoglobine et glucose est diminué. La valeur sémiologique de l'hémoglobine glyquée est donc très diminuée, puisque sa mesure ne correspond plus à l'intégration d'une durée constante d'exposition de l'hémoglobine au glucose.

Ces conditions pathologiques, quelles qu'en soient les étiologies, rendent donc le dosage de l'hémoglobine glyquée sans intérêt, ou au moins à considérer très prudemment. Cette remarque s'applique à tous les principes de dosage.

■ VI. HÉMOGLOBINES ANORMALES

La présence d'une hémoglobine anormale pose deux types de problèmes pour le dosage de l'hémoglobine glyquée, l'un d'ordre technique, l'autre lié à la durée de vie des globules rouges.

La plupart des mutations de l'hémoglobine modifient la charge de celle-ci. En conséquence, son comportement dans les systèmes qui utilisent cette caractéristique pour la séparation (électrophorèse, chromatographie d'échange ionique) est modifié. Ceci s'applique aussi bien à l'hémoglobine native, non glyquée, qu'à ses formes glyquées. Les hémoglobines anormales subissent le phénomène de glycation au même titre que l'HbA. Ainsi l'HbS et l'HbC, par exemple, génèrent-elles des formes glyquées S_{1c} et C_{1c} . On peut généraliser en utilisant la notion d'HbX et HbX_{1c} .

Très souvent, le pic correspondant à l'hémoglobine anormale glyquée X_{1c} est difficile à séparer de l'HbA_{1c} ou de l'HbA₀. Parfois, l'HbX marque le pic d'HbA_{1c} habituel. L'identification des fractions est donc très difficile, et l'interprétation délicate, notamment en CLHP.

Différentes attitudes sont possibles dans les hémoglobinopathies hétérozygotes. Certains proposent d'exprimer l'HbA_{1c} par rapport à l'ensemble $HbA_{1c} + HbA_0$, d'autres l'HbX_{1c} par rapport à l'ensemble $X_0 + X_{1c}$. D'autres encore expriment l'HbA_{1c} par rapport à l'Hb totale, considérant que cette expression est suffisante pour suivre l'équilibre d'un patient donné. En tout état de cause, les valeurs obtenues sont éminemment dépendantes du système analytique utilisé. Par ailleurs, la chromatographie d'échange ionique et l'électrophorèse sont inopérantes chez les patients homozygotes.

Bien entendu, les techniques utilisant des minicolonnes d'échange ionique ne sont pas utilisables puisqu'elles ne permettent pas de visualiser les fractions éluées.

Les méthodes basées sur l'affinité ou l'immunologie (sous réserve que le point de mutation ne soit pas situé au niveau de l'épitope reconnu par l'anticorps utilisé) ne sont pas affectées par ces interférences. Cependant, elles ne permettent pas de mettre en évidence la présence des hémoglobines anormales, et peuvent donc conduire à des résultats erronés.

En effet, au problème technique se superpose le problème de la durée de vie des globules rouges. La présence d'une hémoglobine anormale entraîne toujours un certain degré d'hémolyse, variable selon le type d'hémoglobine anormale et le patient, donc impossible à quantifier. Le problème est plus aigu chez les patient homozygotes, mais se pose également chez les hétérozygotes, comme dans le cas évoqué dans le paragraphe précédent.

Il faut donc retenir que les hémoglobinopathies constituent un réel problème pour l'évaluation de l'hémoglobine glyquée, et que toute interprétation doit être très prudente. Dans ces situations, le dosage des fructosamines plasmatiques constitue une excellente alternative.

BIBLIOGRAPHIE

FLORY E., MARZULLO C., BOURRERONT D., GENESTIER S., MARICHAL B., PARENT X., Dosage de l'HbA_{1c} chez l'insuffisant rénal chronique. Apport des nouvelles méthodologies, *Ann. Biol. Clin.*, 1996, 54, 211-214.

FRAZAO J.M., BARTH R.H., BERLYNE G.M., Carbamylated hemoglobin in prerenal azotemia, *Nephron*, 1995, 71, 153-155.

KLENK D.C., HERMANSON G.T., KROHN R.I., FUJIMOTO E.K., MALLIA A.K., SMITH P.K., ENGLAND J.D., WIEDMEYER H.S., LITTLE R.R., GOLSTEIN D.E., Determination of glycosylated hemoglobin by affinity chromatography: comparison with colorimetric and ion-exchange methods, and effects of common interferences, *Clin. Chem.*, 1982, 28, 2088-2094.

KWAN J.T.C., CARR E.C., BENDING M.R., BARRON J.L., Determination of carbamylated hemoglobin by high performance liquid chromatography, *Clin. Chem.*, 1990, 36, 607-610.

MARTINA W.V., MARTUN E.G., VAN DER MOLEN M., SCHERMER J.G., MUSKIET F.A.J., β -N-terminal glycohemoglobins in subjects with common hemoglobinopathies: relation with fructosamine and mean erythrocyte age, *Clin. Chem.*, 1993, 39, 2259-2265.

NATHAN D.M., FRANCIS T.B., PALMER J.L., Effect of aspirin on determinations of glycated hemoglobin, *Clin. Chem.*, 1983, 29, 466-469.

SMITH W.G.J., HOLDEN M., BENTON M., BROWN C.B., Carbamylated haemoglobin in chronic renal failure, *Clin. Chim. Acta*, 1988, 178, 297-304.

TURPEINEN U., STENMAN U.H., ROINE R., Liquid-chromatographic determination of acetylated hemoglobin, *Clin. Chem.*, 1989, 35, 33-36.

WEYKAMP C.W., PENDERS T.J., SIEBELDER C.W.M., MUSKIET F.A.J., VAN DER SLIK W., Interference of carbamylated and acetylated hemoglobins in assays of glycohemoglobin by HPLC, electrophoresis, affinity chromatography and enzyme immunoassay, *Clin. Chem.*, 1993, 39, 138-142.

WEYKAMP C.W., PENDERS T.J., MUSKIET F.A.J., VAN DER SLIK W., Influence of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations, as investigated by 102 laboratories using 16 methods, *Clin. Chem.*, 1993, 39, 1717-1723.

YARRISON G., ALLEN L., KING L., MOSELY R., SENN J., SNYDER R., VICTOR J., Lipemia interference in Beckman Diatrac Hemoglobin A_{1c} procedure removed, *Clin. Chem.*, 1993, 39, 2351-2352.

Malgré l'intérêt démontré de la détermination de l'hémoglobine glyquée, son exploitation clinique est parfois diminuée en raison des difficultés d'interprétation rencontrées par les cliniciens, directement liées aux performances du laboratoire et de la technique utilisée. Les critères de choix des biologistes dépendent d'arguments objectifs généraux (évaluation des techniques), mais aussi d'arguments particuliers à chaque laboratoire (équipements, recrutement : fréquence des hémoglobinopathies par exemple).

Comme on l'a exposé dans les précédents chapitres, les méthodes de dosage de l'hémoglobine glyquée sont très variées, et cette diversité des techniques, aussi bien dans leur principe que dans leurs résultats, rend difficile les opérations de standardisation. Les résultats obtenus d'un laboratoire à l'autre sont difficiles à comparer, pour deux types de raisons :

- **Les méthodes de dosage n'évaluent pas toutes la même structure chimique.** Certaines techniques mesurent la totalité des formes glyquées de l'hémoglobine (méthodes par affinité utilisant l'acide boronique ou ses dérivés), d'autres une forme glyquée de l'hémoglobine bien définie comme l'HbA_{1c} (CLHP par exemple).

- **En l'absence d'étalon de référence, des techniques reposant sur des principes identiques fournissent des résultats différents.**

Ces deux raisons expliquent que les résultats provenant de multiples techniques sont difficilement transposables.

Par ailleurs, **les performances analytiques des techniques restent très variables.** Les différentes opérations de contrôle de qualité conduites en France ont mis en évidence de grandes disparités dans la qualité des méthodes. De plus, les différentes techniques ne présentent pas la même sensibilité aux interférences (voir chapitre précédent).

Ces différentes données mettent l'accent sur la nécessité d'une standardisation internationale des dosages d'hémoglobine glyquée. Celle-ci est très longue à mettre en place, notamment parce qu'aucun consensus ne s'était jamais réellement dégagé quant à la nature du constituant à mesurer et à la méthode de référence. Cependant, l'évolution des travaux depuis plus de dix ans a permis de définir de grandes orientations et de proposer des perspectives à moyen terme.

La standardisation des dosages d'hémoglobine glyquée, pour aboutir à un résultat probant, doit résoudre les problèmes suivants :

1. Choix du marqueur (forme d'hémoglobine glyquée) à doser.
2. Choix de la méthode de référence.
2. Préparation de matériels de référence et de contrôle présentant les caractéristiques nécessaires (caractérisation chimique, stabilité, comportement).

Ces différents problèmes ne sont pas totalement résolus. Deux approches différentes ont été proposées.

La première, la plus avancée, a été menée par FAACC (American Association for Clinical Chemistry), au sein d'un groupe dirigé par D. Goldstein, de l'Université du Missouri à Columbia (USA). Elle est mise en route aux USA depuis le milieu de l'année 1996.

La seconde, en cours d'expérimentation, est initiée par un groupe de l'IFCC (International Federation of Clinical Chemistry). Elle diffère de la démarche américaine par le choix de la méthode de référence et se veut plus spécifique.

L'état des différentes étapes de la standardisation peut être résumé de la façon suivante

■ I. CHOIX DU MARQUEUR

Parmi les différentes formes d'Hb glyquée, l'HbA_{1c} s'est imposée comme le constituant de référence. Sa structure est connue, et son métabolisme a fait l'objet d'études fondamentales, notamment en matière de cinétique de formation. Elle peut être séparée et dosée quantitativement par des méthodes spécifiques et fiables. Elle est l'indicateur le mieux adapté pour l'évaluation de l'équilibre glycémique sur une période précise. Utilisé en routine dans de nombreux centres, il a la confiance des cliniciens.

Par ailleurs, les études effectuées par différentes équipes et pendant plusieurs années ont montré que la plupart des techniques, dosant soit l'HbA_{1c}, soit l'Hb glyquée totale, soit l'HbA₁ globalement, pouvaient être calibrées à l'aide de matériels titrés en HbA_{1c}, et les résultats exprimés en pourcentages d'HbA_{1c} (quels qu'aient été les composants dosés par ces différentes techniques). Malgré les objections que cette idée avait soulevées, il est maintenant admis que les résultats de corrélations entre techniques obtenus selon ce protocole sont convaincants. Cette perspective est acceptée aussi bien par les équipes spécialisées travaillant sur l'hémoglobine glyquée que par les fabricants.

On remarquera que cette approche nécessitera de la part des laboratoires un calibrage systématique de chaque série et un contrôle strict des techniques, ne considérant comme acceptables que des méthodes dont la précision est suffisante, c'est-à-dire avec des coefficients de variation intra et inter-séries inférieurs à 5 % par exemple. Ces critères satisfaits, toute technique dosant l'HbA_{1c} ou l'Hb glyquée totale calibrée de cette façon devrait pouvoir fournir des résultats comparables.

■ II. CHOIX DE LA MÉTHODE DE RÉFÉRENCE

L'HbA_{1c} étant retenue comme constituant de référence, la méthode de référence doit permettre la séparation spécifique, contrôlée, de l'HbA_{1c}, et son dosage quantitatif. Dans cet esprit, les techniques de CLHP ont longtemps été considérées comme les plus performantes.

Le fait de considérer la CLHP comme méthode de référence a d'ailleurs été plus ou moins implicitement accepté par de nombreuses firmes. En effet, proposant un dosage d'HbA_{1c} par immunoanalyse ou d'Hb glyquée par méthode d'affinité par exemple, plusieurs sociétés fournissent un matériel de calibrage titré en HbA_{1c} par CLHP (la méthode prise comme référence variant selon le cas).

Cette analyse correspond à celle de l'AACC, qui utilise comme méthode de référence une méthode CLHP d'échange ionique, réalisée au Laboratoire de Recherche sur le Diabète de Columbia. Cependant, toutes les méthodes CLHP ne sont pas équivalentes, et ce choix, même si l'on ne peut douter de son caractère parfaitement motivé, comporte un certain caractère de postulat. Ainsi, des différences de l'ordre de 20 % peuvent être obtenues entre deux techniques d'échange ionique en CLHP parfaitement contrôlées et considérées toutes deux comme spécifiques de l'HbA_{1c} (colonne de résine BioRex 70 à Columbia et MonoS en Suède). Ceci tient en fait que la séparation par CLHP de l'HbA_{1c} n'est pas totalement spécifique : en réalité, le pic d'HbA_{1c} contient une certaine proportion de substances non-HbA_{1c} et une certaine proportion d'HbA_{1c} est évaluée avec le pic d'HbA₀.

Ces constatations ont conduit le groupe de travail IFCC à proposer une méthode de référence plus spécifique, basée sur le clivage enzymatique de l'HbA_{1c} et de l'HbA₀ purifiées, la séparation en CLHP ou électrophorèse capillaire des peptides obtenus, et la quantification finale de ces peptides spécifiques par spectrométrie de masse ou méthode équivalente.

Cette méthode est en cours de mise au point et devrait constituer la méthode de référence au niveau international. Elle serait utilisée uniquement par quelques laboratoires spécialisés chargés d'établir les valeurs d'HbA_{1c} des matériaux de référence.

■ III. PRÉPARATION DE MATÉRIELS DE RÉFÉRENCE ET DE CONTRÔLE

On s'est longtemps heurté à des problèmes de préparation de formes non dénaturées d'HbA_{1c} et d'HbA₀ pour préparer le matériel de référence primaire. Il semble qu'actuellement la combinaison de méthodes de chromatographie d'échange cationique et de chromatographie d'affinité permette d'obtenir ces deux fractions purifiées. Le mélange en proportions connues d'HbA_{1c} et d'HbA₀ devrait alors permettre de produire un étalon primaire stable et certifié. Ce matériel ne serait utilisé que pour calibrer la méthode de référence.

Les étalons secondaires seront titrés en HbA_{1c} à l'aide de la méthode de référence. Les travaux actuels s'orientent vers la préparation d'échantillons de sang humain lyophilisé contenant des quantités variables d'HbA_{1c}, couvrant la zone de concentration trouvée en pathologie humaine. Des études préliminaires effectuées au niveau européen ont montré qu'un tel matériel pourrait servir de calibrant pour la plupart des méthodes. Le calibrage des différentes méthodes commerciales serait réalisé par les différents industriels acceptant ce protocole de standardisation.

Aux États-Unis, les étalons secondaires sont titrés par rapport à la méthode CLHP dite de référence dans un réseau de laboratoires agréés (coordonnés par l'équipe de Columbia) et reçoivent une « certification » de l'AACC pourvu qu'ils répondent aux critères de qualité définis par le groupe d'experts de l'AACC.

Les matériels de contrôle devraient être préparés selon les mêmes bases et adaptés aux différentes méthodes.

Après ces étapes se posera la question de l'utilisation de ces matériels dans les laboratoires de biologie clinique. On peut s'attendre à ce que la méthode IFCC, en théorie plus spécifique, fournisse des résultats d'HbA_{1c} plus bas que ceux actuellement considérés comme référence. En l'occurrence, l'habitude est prise de se baser sur les travaux du DCCT (Diabetes Control and Complications Trial), qui donnent comme valeur de référence chez le sujet non diabétique 4 à

6 % d'HbA_{1c}. Dans la mesure où la plupart des études actuelles sont poursuivies sur ces bases, il conviendra, au niveau du groupe IFCC, d'homogénéiser les résultats obtenus avec la méthode et les étalons de référence pour se situer dans cet intervalle. Ceci devrait permettre de ne pas modifier la conduite des cliniciens en matière de surveillance et de traitement du diabète.

Au niveau national, la SFBC est associée depuis un an aux travaux de l'AACC et de l'IFCC. Compte-tenu de l'incertitude en matière de choix des méthodes et matériaux de référence, il est prématuré d'envisager une certification SFBC des méthodes standardisées.

BIBLIOGRAPHIE

BRUNS D.E., Standardisation, calibration, and the Care of diabetic patients, *Clin. Chem.*, 1992, 38, 2363-2364.

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.

GILLERY P., GUILLEMIN C., DELPECH M., Hémoglobine glyquée : méthodes de dosage et problèmes de standardisation, *Ann. Biol. Clin.*, 1994, 52, 157-163.

HOELZEL W., MIEDEMA K., Development of a reference system for the international standardization of HbA_{1c}/ glycohemoglobin determinations, *J.I.F.C.C.*, 1996, 9, 62-68.

LITTLE R.R., WIEDMEYER H.M., ENGLAND J.D., WILKE A.L., ROHLFING C.L., WIANS F.H., JACOBSON J.M., ZELLMER V., GOLDSTEIN D.E., Interlaboratory standardization of measurements of glycohemoglobins, *Clin. Chem.*, 1992, 38, 2472-2478.

WEYKAMP C.W., PENDERS T.J., MUSKIET F.A.J., VAN DER SLIK W., Evaluation of a reference material for glycated haemoglobin, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1996, 34, 67-72.

LIPIDES

I - LES LIPOPROTÉINES ET LEUR MÉTABOLISME

A. LEGRAND, R. COUDERC

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

I. LES LIPOPROTÉINES

I.1 - Définition et structure

Les lipides sont véhiculés dans le sang grâce à leur association à des protéines (apolipoprotéines) pour constituer des formes solubles, les lipoprotéines.

Les lipoprotéines plasmatiques ont une structure sphérique dans laquelle le *noyau* renferme les lipides hydrophobes, les triglycérides (TG) et le cholestérol estérifié (CE), et *l'enveloppe* est constituée des apolipoprotéines et des lipides les plus hydrophiles (phospholipides (PL) et cholestérol non estérifié (CNE)) avec leur partie polaire orientée vers l'extérieur (figure 1).

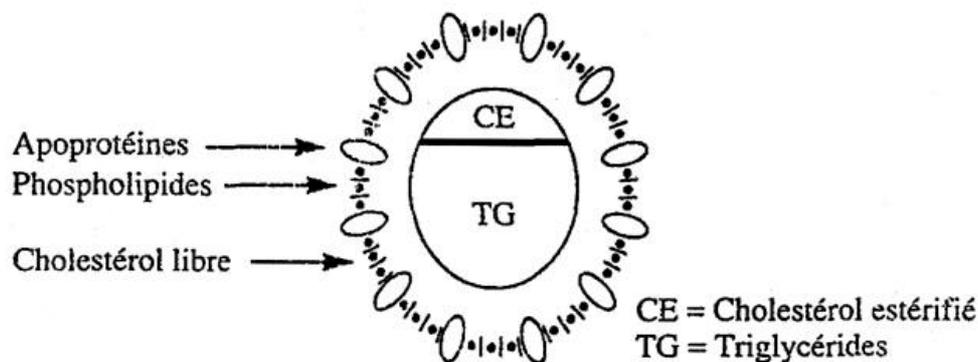


Figure 1 : Structure générale des lipoprotéines - Représentation schématique

I.2- Les différents constituants des lipoprotéines

- Les lipides

Les lipides circulent dans le sang en association avec des protéines spécifiques appelées apolipoprotéines, sous forme de complexes appelés lipoprotéines. Les lipoprotéines plasmatiques ont généralement une structure sphérique dans laquelle le noyau est constitué de lipides très hydrophobes : triglycérides (TG) et cholestérol estérifié (CE). L'enveloppe est constituée de phospholipides (PL) choliniques, de cholestérol non estérifié (CNE) et d'apolipoprotéines (Apo).

- Les apolipoprotéines

Les apolipoprotéines participent à la structure et aux différents processus du métabolisme des lipoprotéines. Il y a dix apolipoprotéines principales bien caractérisées et classées selon une nomenclature alphabétique. Parmi les principales fonctions des apolipoprotéines on peut citer :

- Un rôle de structure
- Un rôle d'activation des enzymes du métabolisme des lipoprotéines : Lecithine Cholesterol Acyltransferase (LCAT) et Lipoprotéine Lipase (LPL)
- Un rôle de reconnaissance des lipoprotéines par les récepteurs cellulaires.

Les principales caractéristiques des apolipoprotéines sont rappelées dans le tableau I.

Tableau I : Principales caractéristiques des apolipoprotéines

| Apolipoprotéine | Concentration plasmatique g/l | Lieu de synthèse | Fonction | Association aux lipoprotéines |
|-----------------|-------------------------------|--|--|-------------------------------------|
| A I | 1,0 - 1,2 | Foie, Intestin | Activateur de la LCAT, Efflux de cholestérol | <i>HDL, Chylomicrons</i> |
| AII | 0,3 - 0,5 | Foie, Intestin | Transport... ? | <i>HDL, Chylomicrons</i> |
| A IV | 0,16 | Intestin | Efflux de cholestérol | <i>Chylomicrons, HDL</i> |
| B 100 | 0,7 - 1,00 | Foie | Sécrétion des VLDL, Ligand du récepteur LDL | <i>VLDL, IDL, LDL</i> |
| B 48 | 0,03 - 0,05 | Intestin | Sécrétion des chylomicrons | <i>Chylomicrons</i> |
| C I | 0,04 - 0,06 | Foie | Activateur de la LCAT (in vitro) | <i>Chylomicrons, VLDL, HDL</i> |
| C II | 0,03 - 0,05 | Foie | Activateur LPL | <i>Chylomicrons, VLDL, HDL</i> |
| C III | 0,12 - 0,14 | Foie | Inhibiteur LPL | <i>Chylomicrons, VLDL, HDL</i> |
| D | 0,06 - 0,07 | Foie | Transport du cholestérol | <i>Chylomicrons, HDL</i> |
| E | 0,03 - 0,05 | Foie, Intestin, Surrénale, Macrophages | Ligand du récepteur LDL et du récepteur des chylomicrons résiduels | <i>IDL, Chylomicrons, VLDL, HDL</i> |
| (a) | < 0,01 | Foie | Transport Réparation des brèches vasculaires ? | <i>Lp(a)</i> |

I.3- Les différentes lipoprotéines et leur composition

Il existe plusieurs types de lipoprotéines qui contiennent toutes tous les constituants lipidiques et qui renferment une ou plusieurs apolipoprotéines : on observe pour les lipides une *spécialisation* de répartition (chaque lipoprotéine transporte majoritairement un constituant lipidique) et pour les apolipoprotéines une *spécificité* de répartition (les différentes apolipoprotéines ne sont pas présentes dans toutes les lipoprotéines). Différentes classifications des lipoprotéines sont proposées en fonction de la densité, de la mobilité électrophorétique ou de la composition en apolipoprotéines. Le tableau II donne la composition et les principales caractéristiques des lipoprotéines séparées par ultracentrifugation ou électrophorèse.

Tableau II: Composition et principales caractéristiques des lipoprotéines

| Lipoprotéine | Densité (kg/l) | Migration Electro-phorétique en agarose | Apos majeures | Cholestérol estérifié (%) | Cholestérol non estérifié (%) | Triglycérides (%) | Phospho-lipides (%) | Protéines (%) |
|--------------|----------------|---|---------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------|---------------------|---------------|
| CM | < 0,94 | Dépôt | B48 | 2 - 4 | 1 - 3 | 80 - 95 | 3 - 6 | 1 - 2 |
| VLDL | 0,94 - 1,006 | Pré-β | B 100, CII | 15 | 5 | 50 - 60 | 15 - 20 | 10 |
| LDL | 1,019 - 1,063 | B | B 100 | 37 | 8 | 10 | 22 | 23 |
| HDL | 1,063 - 1,21 | A | AI, AII | 14 | 3 | 8 | 22 | 53 |
| Lp(a) | 1,05 - 1,08 | entre pré-β et β | B 100, (a) | 32 | 7 | 9 | 23 | 29 |

CM : chylomicrons
VLDL : lipoprotéines de très faible densité
Lp(a)L : lipoprotéines « petit » a

LDL : lipoprotéine de faible densité
HDL : lipoprotéine de forte densité

■ II. LE MÉTABOLISME DES LIPOPROTÉINES

Le métabolisme des lipoprotéines est réalisé par un ensemble de réactions nombreuses et complexes qui contrôlent la synthèse des constituants lipidiques et apolipoprotéiniques, l'assemblage des lipoprotéines, leur sécrétion hors des cellules et leur dégradation plasmatique ou tissulaire.

Les grandes étapes du métabolisme des lipoprotéines sont sous la dépendance d'enzymes assurant la transformation ou la dégradation des lipoprotéines, de protéines de transfert qui accélèrent l'échange de lipides entre les lipoprotéines et de récepteurs qui assurent le captage cellulaire des lipoprotéines.

Il existe *deux types d'enzymes* intervenant dans le métabolisme des lipoprotéines : les *lipoprotéine lipases* (Lipoprotéine Lipase LPL et Triglycéride Lipase Hépatique TGLH) qui assurent l'hydrolyse des triglycérides des lipoprotéines qui en sont riches et la *Lécithine Cholestérol Acyltransférase (LCAT)* qui permet l'estérification du cholestérol.

Différents récepteurs cellulaires permettant le captage des lipoprotéines ont été mis en évidence : il s'agit des récepteurs E, B/E et AI reconnaissant spécifiquement les apolipoprotéines des lipoprotéines.

Les concentrations plasmatiques des lipoprotéines dépendent du bon équilibre métabolique entre les différentes lipoprotéines permanentes qui est régulièrement modifié par les apports cycliques des lipides alimentaires.

II.1 - Lipoprotéines transportant les lipides alimentaires : chylomicrons

Les chylomicrons constituent les formes de transport des lipides alimentaires (100 g de triglycérides et 0,3 g de cholestérol par jour en moyenne). Ils sont synthétisés par les *entérocytes* pendant des périodes de digestion ; après sécrétion dans les capillaires lymphatiques, ils gagnent la circulation sanguine par le canal lymphatique.

Ces lipoprotéines subissent alors rapidement une hydrolyse de leurs triglycérides par les *lipoprotéines lipases* synthétisées par les tissus adipeux et musculaires. Au cours de cette hydrolyse, des éléments de l'enveloppe des chylomicrons se détachent et rejoignent le pool des HDL.

Les *acides gras libérés* sont utilisés comme élément énergétique (muscle) ou recombinaés sous forme de *triglycérides de réserve* (tissu adipeux). Ce catabolisme est « explosif » (durée de demi-vie de 10 à 20 mn). Il explique que les chylomicrons soient normalement absents de la circulation sanguine après 12 heures de jeûne lipidique ; il conduit à la libération d'édifices résiduels (*remnants*) qui, pour certains, participeront à la formation des HDL et pour d'autres, seront captés par le foie (récepteurs E).

II.2- Lipoprotéines légères contenant l'apolipoprotéine B100 : VLDL-LDL

La *synthèse des VLDL*, lipoprotéines riches en triglycérides (endogènes) est réalisée de façon continue par les *cellules hépatiques*.

La dégradation plasmatique des *VLDL* est identique à celle des chylomicrons, sous l'influence des lipoprotéines lipases adipocytaires ou musculaires. Elle aboutit après hydrolyse des triglycérides à la formation d'IDL (Intermediary Density Lipoprotein) qui sont, pour une partie, internalisées par les récepteurs hépatiques E et B/E (reconnaissance de l'Apo E) et pour le reste, dégradées par la Triglycéride Lipase Hépatique (TGLH) aboutissant à la formation de *LDL*,

lipoprotéines riches en cholestérol et ne renfermant au point de vue protéique que l'apolipoprotéine B.

Les *LDL* ainsi formées ont pour rôle de transporter aux tissus périphériques les constituants lipidiques (cholestérol) dont ils ont besoin. Les *LDL* sont reconnues par leur Apo B (récepteur B/E) et après endocytose, sont dégradées en tous leurs constituants moléculaires.

L'augmentation du cholestérol intracellulaire déclenche les mécanismes régulant la concentration des *LDL* circulantes : rétro-inhibition de la biosynthèse du cholestérol au niveau de l'HMG CoA réductase, enzyme clé de la biosynthèse du cholestérol, et de la synthèse des récepteurs des *LDL*. Si les *VLDL* sont rapidement catabolisées (durée de demi-vie de 4 à 6 heures), il n'en est pas de même des *LDL* dont la durée de vie dépasse plusieurs jours. La majorité des *LDL* est captée par le foie qui est le seul organe capable d'éliminer du cholestérol (sous forme de sels biliaires).

Lorsque la persistance des *LDL* dans la circulation se prolonge (endocytose ralentie), ces lipoprotéines peuvent subir diverses modifications (oxydation, glycation...) rendant impossible leur reconnaissance par les récepteurs B/E. Les *LDL* modifiées sont alors reconnues et internalisées par des récepteurs spécifiques au niveau des macrophages qui se transforment alors en cellules spumeuses à l'origine des plaques d'athérome. Cet aspect est d'autant plus important que la concentration des *LDL* plasmatiques est augmentée.

II.3- Lipoprotéines impliquées dans l'épuration en cholestérol des tissus périphériques HDL

Les *HDL* naissantes, d'origine hépatique ou provenant du catabolisme des chylomicrons contiennent du cholestérol très peu estérifié et ont une structure discoïdale.

Sous l'influence de la Lécithine Cholestérol Acyltransférase (LCAT), les esters de cholestérol formés migrent au centre des édifices et transforment les *HDL* discoïdales en *HDL* sphériques. Les sites de surface du cholestérol non estérifié étant ainsi libérés grâce à l'action de la LCAT, la particule peut à nouveau accepter du CNE à partir des lipoprotéines à Apo B (*CM*, *VLDL*, *LDL*) et des membranes cellulaires des tissus périphériques.

Une fois estérifié, le cholestérol des *HDL* est en partie échangé avec des triglycérides des chylomicrons et des *VLDL*. Cet échange est facilité par une protéine spécifique : la CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein).

La figure 2 résume le métabolisme des lipoprotéines chez l'homme.

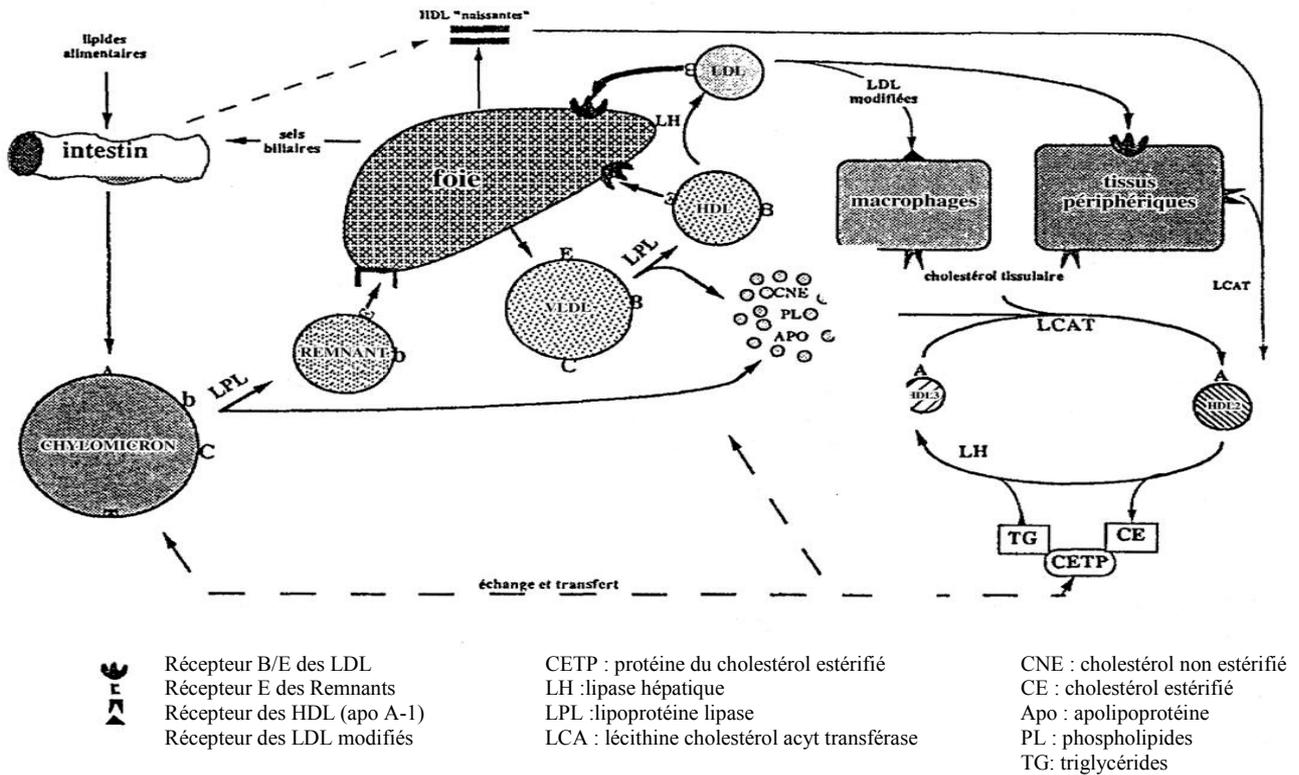


Figure 2 : Métabolisme normal des lipoprotéines chez l'homme

III. LES HYPERLIPOPROTÉINÉMIES

Les modifications de concentration, plus ou moins importantes par rapport aux valeurs usuelles, des constituants lipidiques (cholestérol et triglycérides) et des apolipoprotéines correspondent à des anomalies que l'on regroupe sous le terme de DYSLIPOPROTEINEMIES. Parmi ces dyslipoprotéinémies, les plus importantes, de par leur fréquence et leur incidence dans de grandes pathologies telles que les maladies cardio-vasculaires, sont constituées par le groupe des hyperlipoprotéinémies.

Les Hyperlipoprotéinémies (HLP) regroupent l'ensemble des augmentations d'une ou de plusieurs classes de lipoprotéines plasmatiques. Les HLP peuvent être d'origine génétique (HLP primitives) ou induites par une maladie ou un agent pharmacologique (HLP secondaires).

La fréquence des HLP primitives est de l'ordre de 2 %. Cette fréquence peut être augmentée lorsque les erreurs de mode de vie sont manifestes : régime alimentaire, consommation excessive d'alcool, de graisses, de sucre et sédentarité.

L'Organisation Mondiale de la Santé a proposé en 1970 une classification des HLP tirée des travaux de FREDRICKSON qui indique la (les) fraction(s) lipoprotéinique(s) augmentée(s), sans

Tableau III : Classification et caractéristiques des hyperlipoprotéinémies primitives devant être traitées

| Type selon Fredrickson | Aspect du plasma - frais - repos 12 h | Cholestérol | Triglycérides | Fraction lipoprotéinique | Génétique Biologie | Fréquence et mode de transmission | * Signes cliniques . Pathologies associées | * Athérogénicité . Dépendance alimentaire |
|---|---|--|-------------------------|--|---|--|---|---|
| I Hypertriglycéridémie exogène | - Lactescent - Gâteau crémeux et sous-nageant clair | N ou + | ++++ 50 à 100 mmol/l | CM | Déficit en LPL ou apo C II | | * Xanthomes éruptifs * Douleurs abdominales * Hépatosplénomégalie | * Non athérogène, risque de pancréatite si TG > 10 mmol/l) . Lipides |
| II a Hypercholestérolémie essentielle | - Clair - Clair | +++ Homozygote : 20 mmol/l Hétérozygote : 10 mmol/l Polygénique : 7,5 mmol/l | N | LDL | - Déficit en récepteurs des LDL ou - Mutation de l'apo B ou - Polygénique | | * Xanthomes cutanés tendineux * Xanthélasma * Arc cornéen | * Très athérogène . Lipides |
| II b Hyperlipidémie combinée familiale | - Clair ou opalescent - Clair ou opalescent | + | + ou ++ | VLDL et LDL | - ? - Augmentation de synthèses d'apo B, petite VLDL - Déficit partiel en LPL | - Fréquence (0,3 à 2 %) - Autosomique dominant ? | * Xanthomes cutanés * Xanthélasma | * Très athérogène . Glucides, alcool |
| III Dys b lipoprotéinémie | - Opalescent ou lactescent - Opalescent ou lactescent | ++ 10 mmol/l | ++ 10 mmol/l | Particules résiduelles de CM et VLDL (bande β large) | - Homozygotie - apo E2 | - Rare (10 ⁻⁴) - Autosomique récessif | - Xanthomes tubéreux et éruptifs, xanthélasma, stries palmaires . Diabète, hypothyroïdie | * Très athérogène . Régime hypercalorique |
| IV Hypertriglycémie endogène | - Opalescent - Opalescent | + | + à ++ | VLDL | - ? - Augmentation de synthèse des VLDL - Grosses VLDL | - Fréquence (2 à 3%) - Autosomique dominant | * Xanthélasma . Obésité, diabète, hyperuricémie | * Athérogène . Glucides, alcool |
| V Hypertriglycéridémie mixte (I + IV) | - Lactescent - Gâteau crémeux et sous-nageant opalescent | + | ++ à ++++ | CM et VLDL | - ? - apo E4 - apo C III | - Rare (10 ⁻⁶) - Polygénique | * Xanthomes éruptifs * Douleurs abdominales . Obésité, diabète | * Peu ou pas athérogène, risque de pancréatite . Lipides, glucides, alcool |

CM : chylomicrons

LPL : lipoprotéine lipase

cependant différencier les HLP primitives et secondaires. Cette distinction dépend de la mise en évidence ou non de causes sous-jacentes et des résultats des études familiales. Le tableau III reproduit la classification des hyperlipoprotéinémies primitives et donne les principales caractéristiques de chacune d'entre elles.

Les HLP secondaires sont beaucoup plus fréquentes et importantes à prendre en compte car la maladie causale révélée par l'hyperlipoprotéinémie peut être grave :

- L'HLP peut être une cause de morbidité comme dans le diabète et l'insuffisance rénale au cours desquels l'infarctus du myocarde constitue la principale cause de mortalité.
- La perturbation du métabolisme lipidique peut accélérer l'évolution de la maladie comme cela a été observé dans les atteintes rénales et hépatiques.

Le tableau IV donne des exemples de pathologies, parmi les plus fréquentes associées à la présence d'hyperlipoprotéinémies secondaires. La bonne connaissance de ces situations permettra d'améliorer le diagnostic de ces affections et de prévenir l'essentiel de leurs complications.

Tableau IV: Exemples de pathologies associées à des hyperlipoprotéinémies secondaires

| Pathologie | Type / Fréquence |
|---------------------------------|--|
| Obésité | Type IV rencontré chez 30 à 50 % des individus obèses |
| Diabète | Type IV chez 40 % des diabétiques |
| | Type II b et V plus rares |
| Affections hépatiques | |
| - Hépatite aiguë | Type IV atypique dans 90 % des cas |
| - Hépatite chronique | Type II b atypique chez 50 % des individus |
| - Cirrhose | Hypolipoprotéinémie fréquente |
| - Cholestase | Complexe lipoprotéine X - Type II b atypique |
| Affections rénales | |
| - Insuffisance rénale | Type IV dans 70 % des cas |
| - Transplantation | Type II a et II b rencontrés chez 90 % des individus transplantés |
| - Syndrome néphrotique | Type II a dans les cas légers et type II b dans les cas graves avec augmentation des alphalipoprotéines |
| Affections thyroïdiennes | |
| - Hyperthyroïdie | Hypercholestérolémie - hypertriglycéridémie |
| - Hypothyroïdie | Type II a et II b |
| Alcool | |
| - Consommation modérée | Type IV |
| - Alcoolisme chronique | Type IV et Type V avec pancréatite aiguë fréquemment associée |
| Effets des médicaments | |
| - Contraceptifs oraux | Effet variable selon leur composition |
| - Corticostéroïdes | Type I pouvant être provoqué par un traitement à forte dose et Type IV au cours d'un long terme |
| - Bêtabloquants | Type IV dans quelques cas |

BIBLIOGRAPHIE

- Dyslipoprotéinémie et athérogénèse in « XXXIIe » Dimanches biologiques de Lariboisière, 1992, 176 pages, CNB Editeur (Paris).
- LUC G., LECERF J.M., BARD J.M., MACHULLA E., FRUCHART J.C., DEVULDER B., Cholestérol et athérosclérose, Collection Abrégis, 1991, 246 pages, Masson éd. (Paris).

- SCHLIENGER J.L., SOS Cholestérol : Propos sur le cholestérol à l'usage des médecins et de leurs malades. Collection SOS, 1995, 196 pages, Frison-Roche Éd. (Paris).
- MOLLIN P., BETHEZENE F., Hyperlipoprotéïnémie-Épidémiologie, étiologie, physiopathologie, diagnostic, traitement diététique et médicamenteux. Revue du Praticien, 1995, 234, 1546-1554.

II - MÉTHODES D'EXPLORATION

DES LIPIDES ET RÉSULTATS DES ÉVALUATIONS

EXTERNES DE LA QUALITE

A. LEGRAND, C. COSSON, A. VASSAULT

CAHIER
DE
Formation
version numérique

L'exploration des lipides et lipoprotéines α pour but de mettre en évidence les dyslipoprotéïnémies qui représentent un facteur prédisposant majeur au développement de l'athérosclérose. Leur mise en évidence précoce permet l'instauration de mesures diététiques et (ou) thérapeutiques appropriées en fonction de leur nature.

Les lipoprotéines de basse densité (LDL) et de densité intermédiaire (IDL), ainsi que la lipoprotéine Lp(a) et à un degré moindre les lipoprotéines de très basse densité (VLDL) sont athérogènes, alors que les lipoprotéines de haute densité (HDL) assurent le retour du cholestérol périphérique vers le foie et sont dites anti-athérogènes. Ainsi, une augmentation des concentrations plasmatiques des lipoprotéines légères (LDL, IDL, VLDL) de la Lp(a) et/ou une diminution des lipoprotéines de haute densité (HDL) constituent des « marqueurs » du risque athérogène.

L'exploration des lipides et des lipoprotéines comprend :

- l'étude de l'aspect du sérum ;
- la quantification des constituants lipidiques totaux du sérum : cholestérol total et triglycérides ;
- l'analyse des lipoprotéines ou de leurs constituants : cholestérol-HDL, apolipoprotéines, lipoparticules, lipoprotéinogramme et lipoprotéine Lp(a).

■ I. ÉTUDE DE L'ASPECT DU SÉRUM

C'est un examen très simple, préliminaire à toute autre investigation. Son interprétation, correctement effectuée, permet de typer d'emblée certaines dyslipoprotéïnémies ou d'éviter (confrontée aux autres tests) une erreur d'interprétation. L'aspect du sérum découle directement de l'aspect des lipoprotéines en solution : les HDL et les LDL du fait de leur petite taille sont limpides, les chylomicrons et les VLDL présentent un aspect trouble. Les chylomicrons par leur très faible densité auront en outre la propriété de remonter spontanément à la surface du sérum à + 4 °C (test de crémage). Ainsi, un sérum opalescent ou lactescent correspond à une augmentation des VLDL ou à un défaut d'épuration des chylomicrons (test de crémage positif). Un sérum d'aspect limpide traduit un bilan lipidique normal ou, en cas d'hyperlipoprotéïnémie, une augmentation des LDL ou des HDL.

■ II. DOSAGE DU CHOLESTÉROL ET DES TRIGLYCÉRIDES

Les dosages de ces constituants, compte-tenu de leur présence dans toutes les lipoprotéines, mais en proportions différentes, doivent être associés. C'est en effet la comparaison des résultats obtenus qui permettra d'orienter vers un type ou un autre de dyslipoprotéïnémie. Le dosage des

phospholipides, exceptionnellement prescrit, ne peut apporter des informations que dans certaines pathologies particulières comme par exemple la cholestase hépatique (apparition de LPX).

II.1 - Dosage du cholestérol

Les méthodes enzymatiques sont actuellement employées par la totalité des laboratoires, parmi lesquelles la réaction utilisant une estérase et une oxydase est la plus employée (99,6 % des techniques employées lors du dernier échange inter-laboratoire du Contrôle National de Qualité). Elles utilisent des enzymes assurant l'hydrolyse des esters du cholestérol (cholestérol estérase) puis l'oxydation du cholestérol non estérifié (cholestérol oxydase) pour aboutir à la formation de peroxyde d'hydrogène. La quantification du peroxyde d'hydrogène est le plus souvent effectuée, en présence de peroxydase et d'un chromogène phénolique (méthode sélectionnée par la SFBC). Ces méthodes donnent des résultats très proches de ceux fournis par la méthode de référence SFBC. Dans les conditions d'utilisation actuelle de ces techniques, les réactions enzymatiques mises en œuvre pour l'hydrolyse des stérides et l'oxydation du cholestérol sont spécifiques (les autres stérols pouvant interférer sont présents en trop faible proportion). Cependant les réactions de révélation du peroxyde d'hydrogène et notamment la réaction de TRINDER sont sujettes à plusieurs interférences ou causes d'erreurs (hémolyse, bilirubine, certaines substances réductrices comme l'acide ascorbique par exemple...). Ces interférences affectent tous les dosages dont la

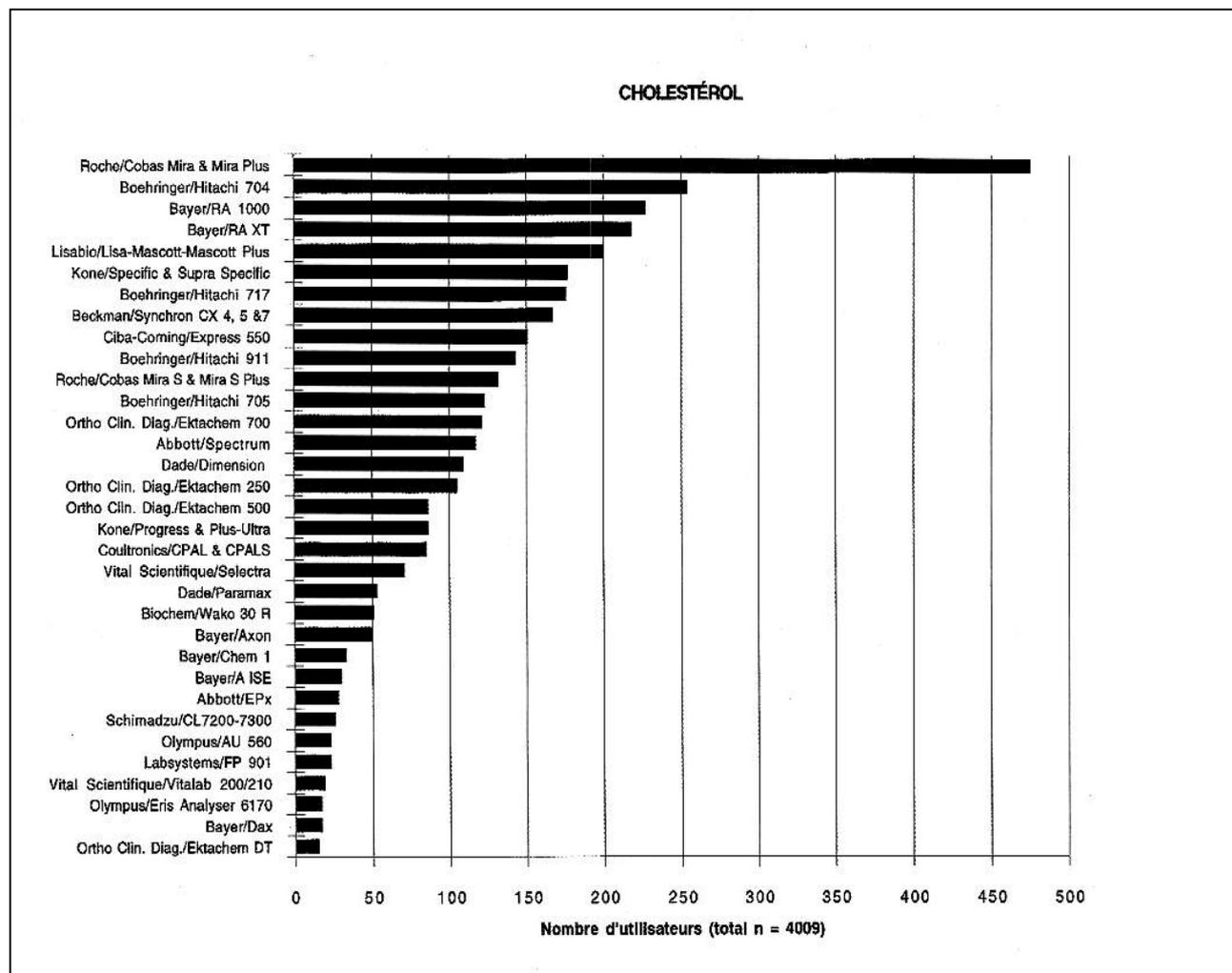


Figure 1 : Dosage du cholestérol (CN 05-95) : répartition des différents systèmes analytiques (n ≥ 15)

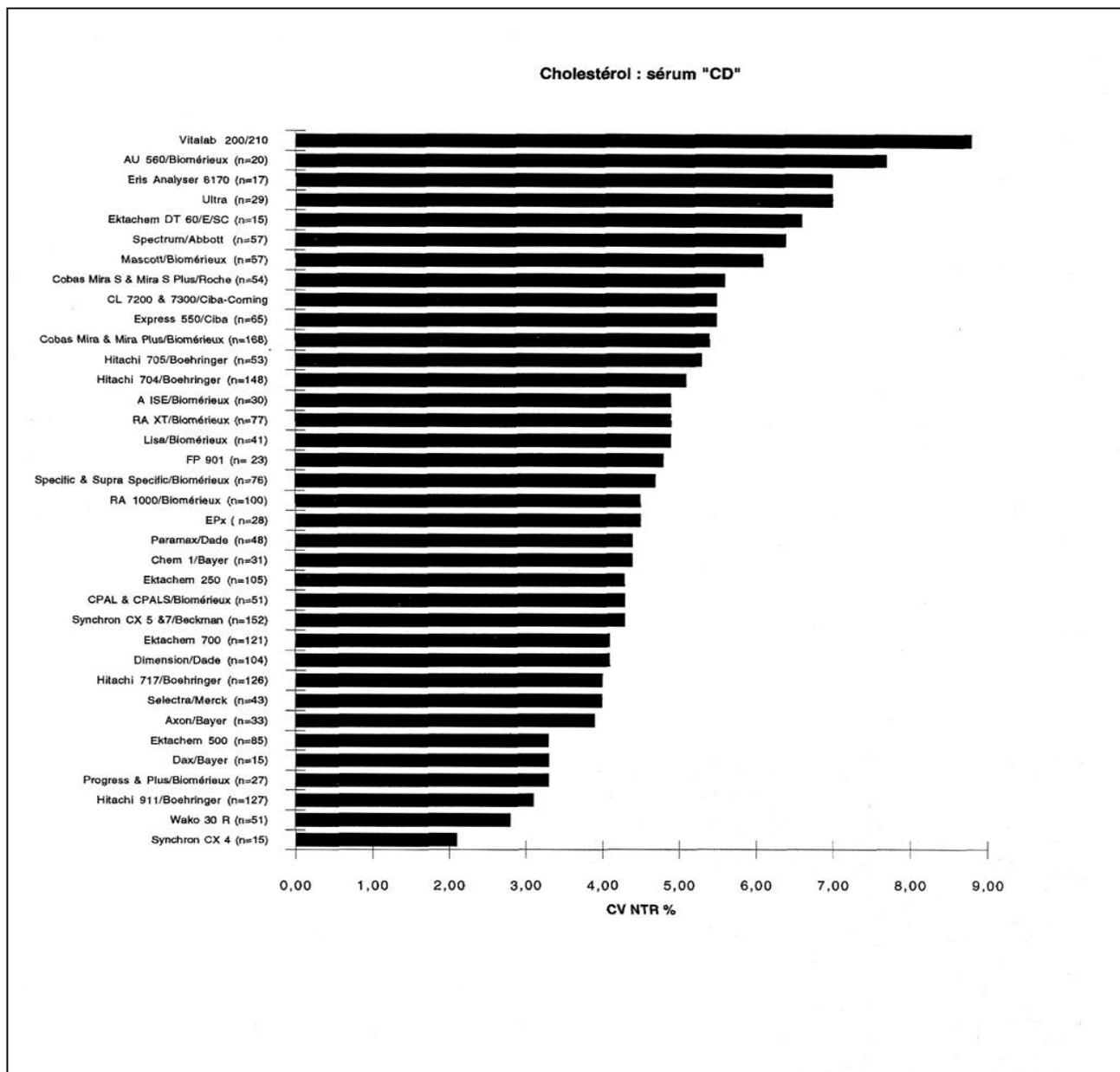


Figure 2 : cholestérol (CN 05-95) : Reproductibilité interlaboratoire des résultats obtenus avec chacun des systèmes (analyseur/réactif) les plus utilisés – sérum CD

réaction de révélation utilise une peroxydase et un chromogène phénolique (cholestérol, triglycérides et phospholipides...).

La méthode de référence pour le dosage du cholestérol repose sur une séparation chromatographique gaz liquide utilisant une colonne capillaire.

Les différents systèmes analytiques utilisés, lors d'un récent échange interlaboratoire effectué sur le plan national, sont présentés dans la figure 1. La plupart des systèmes utilisés présentent une reproductibilité interlaboratoire inférieure à 6 % (figure 2) et une erreur de justesse, calculée

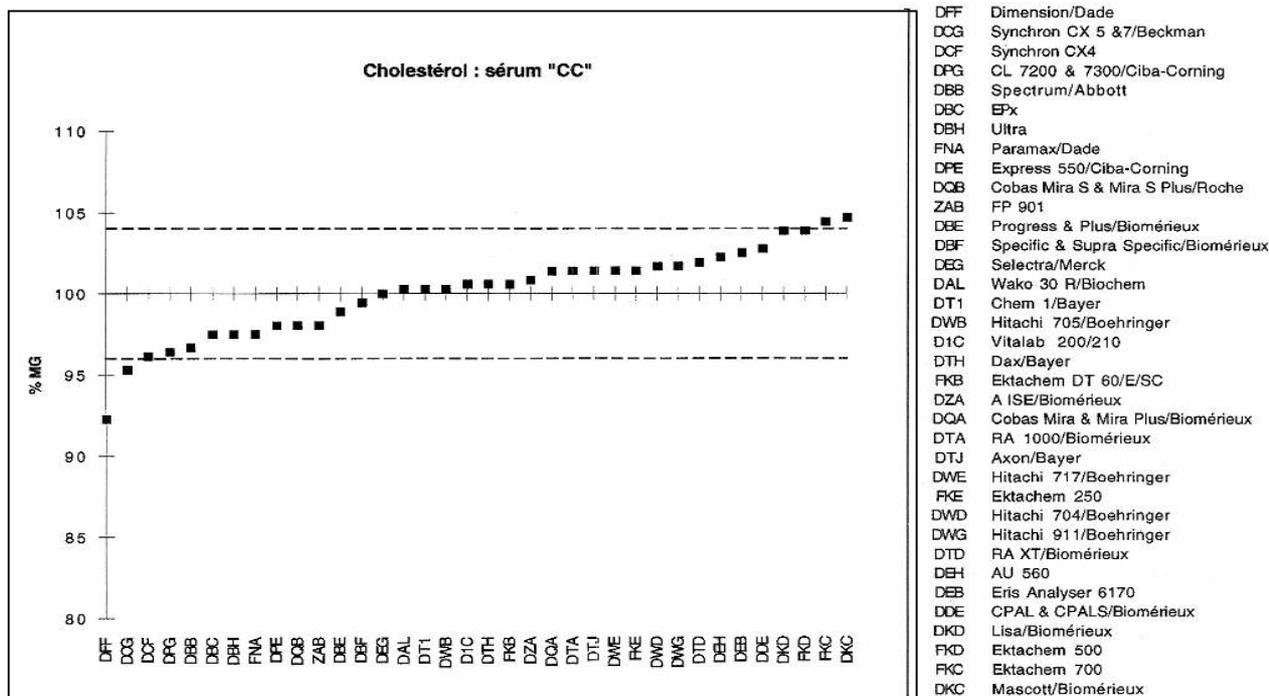


Figure 3 : cholestérol (CN 05-95) : Justesse des différentes techniques ($n > 30$) - sérum CC (expression en % de la valeur de la moyenne générale)

par rapport à la moyenne générale, inférieure à 4 % (figure 3). Les deux sérums de contrôle utilisés (CC et CD) ont donné des résultats similaires.

II.2 - Dosage des triglycérides

Les triglycérides sont dosés par des méthodes enzymatiques dans la majorité des laboratoires (les méthodes chimiques sont utilisées par moins de 10 laboratoires d'après les données du dernier échange interlaboratoire du Contrôle National de Qualité).

Toutes les méthodes enzymatiques de dosage des triglycérides reposent sur la mesure du glycérol libéré après action d'une lipase. La réaction de dosage du glycérol consiste :

- soit à mesurer l'absorbance à 340 nm après action d'une glycérol déshydrogénase en présence de NADH (15 % des participants au dernier échange interlaboratoire de contrôle de qualité) ;
- soit à procéder à une mesure colorimétrique après action d'une glycérol kinase et d'une glycérol phosphate oxydase, en présence d'une peroxydase et d'un chromogène phénolique (85 % des laboratoires participants).

Ces techniques mesurent donc le glycérol provenant de l'hydrolyse des triglycérides, mais aussi le glycérol présent sous forme libre dans le plasma. Les valeurs physiologiques dépassent rarement 0,1 mmol/l, mais une élévation de sa concentration peut s'observer dans :

- les déficits congénitaux en glycérokinase (affections très rares et non graves où la glycérolémie peut atteindre des valeurs très élevées : plus de 10 mmol/l) ;
- les troubles du rythme cardiaque et le diabète (on peut observer des glycérolémies allant jusqu'à 2-3 mmol/l)

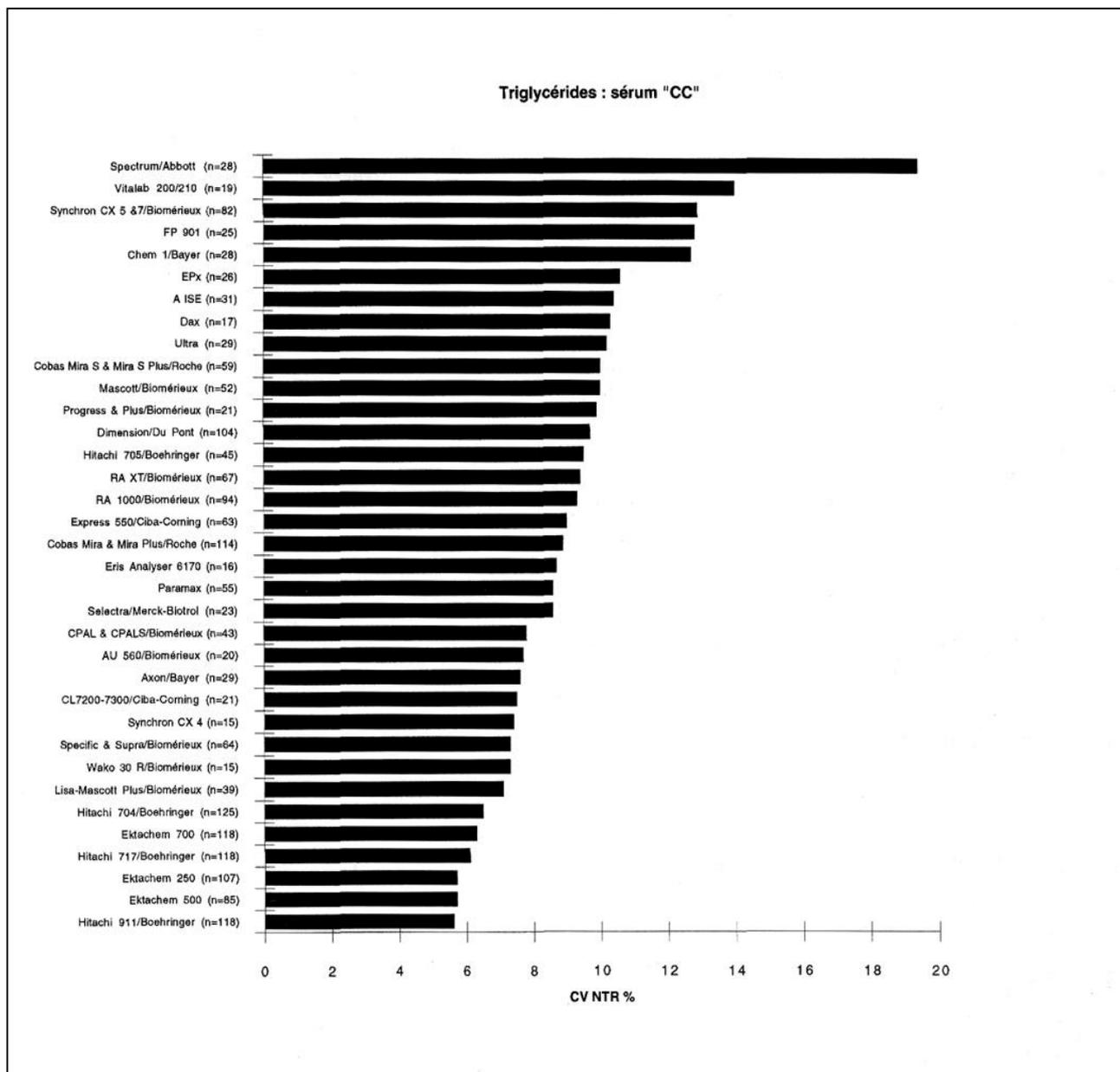


Figure 4 : triglycérides (CN 05-95) : Reproductibilité interlaboratoire des résultats obtenus avec chacun des systèmes (analyseur/réactif) les plus utilisés - sérum CC

- certaines thérapeutiques : héparine (comme activateur de la lipoprotéine lipase assurant l'hydrolyse des triglycérides), glycérol (utilisé en neurologie), les dérivés trinitrés... ;
- certains états physiologiques comme le jeûne.

Dans ces circonstances, avec les techniques dosant le glycérol total, il en résulte de fausses « hypertriglycéridémies » que le biologiste peut détecter par les incohérences existant entre les éléments de l'exploration (« triglycérides » élevés avec aspect du sérum limpide et absence d'augmentation des VLDL ou prébéta lipoprotéine à l'électrophorèse). Dans ces conditions un dosage du glycérol libre devra être pratiqué (par exemple, par une méthode manuelle en supprimant l'hydrolyse par la lipase) afin d'obtenir, par déduction du glycérol total, le taux de triglycérides « vrais ».

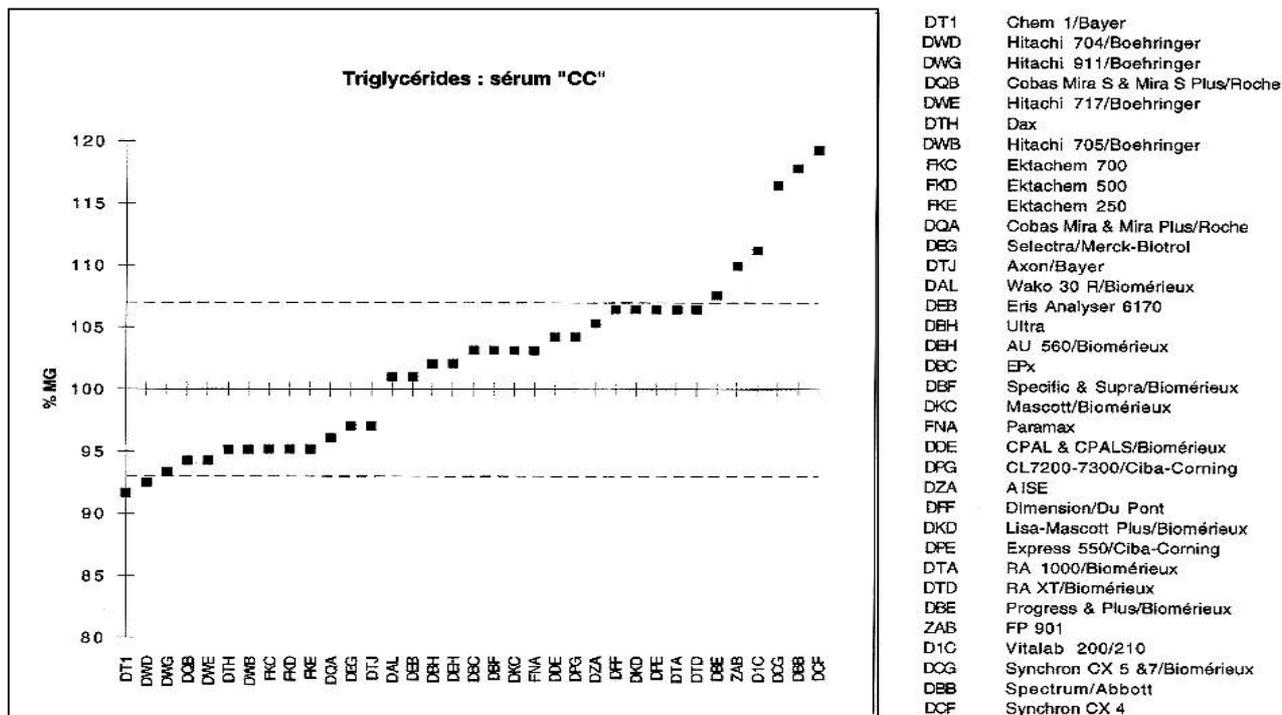


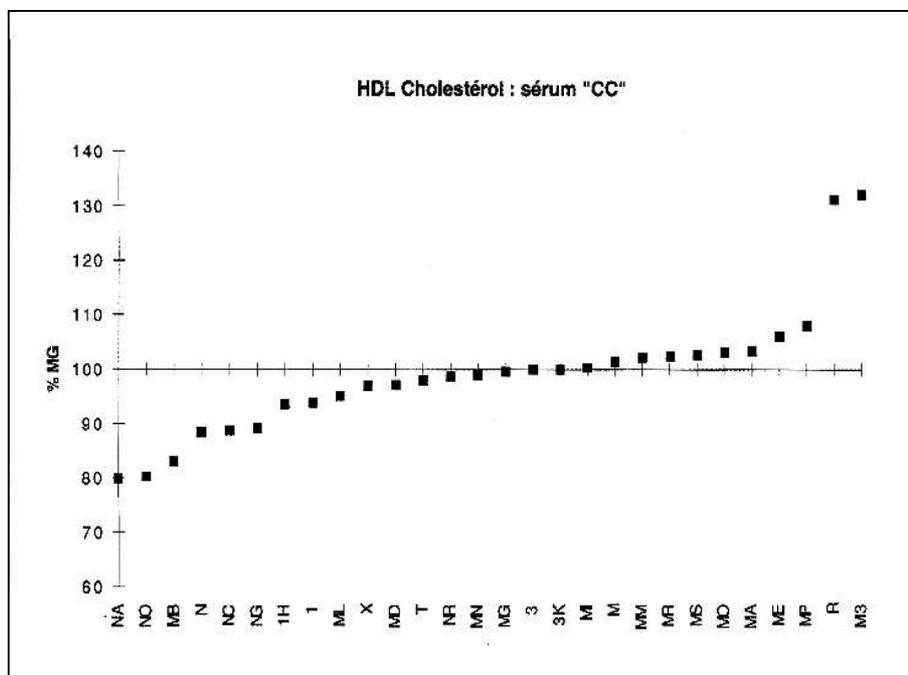
Figure 5 : triglycérides (CN 05-95) : Justesse des différentes techniques ($\eta > 30$) - sérum CC (expression en % de la valeur de la moyenne générale)

Le dosage des triglycérides est toujours couplé avec celui du cholestérol total : la répartition des différents systèmes analytiques lors de la dernière campagne du contrôle national portant sur les constituants lipidiques (CN 05 95) était tout à fait identique à celle observée pour le cholestérol (voir figure 1). La qualité des techniques utilisées (reproductibilité et justesse) est inférieure à celle observée pour le cholestérol avec des différences notables entre les deux échantillons de contrôle CC et CD. Pour le sérum CC la reproductibilité des techniques est inférieure à 10 % (figure 4) et la justesse, évaluée par comparaison à la moyenne générale se situe pour la plupart dans l'intervalle ± 7 % (figure 5). Pour le sérum CD les paramètres de qualité donnent des résultats moins bons pour la reproductibilité (CV interlaboratoires presque toujours compris entre 10 et 20 %) et la justesse (moins de la moitié des techniques se situe dans l'intervalle ± 7 %).

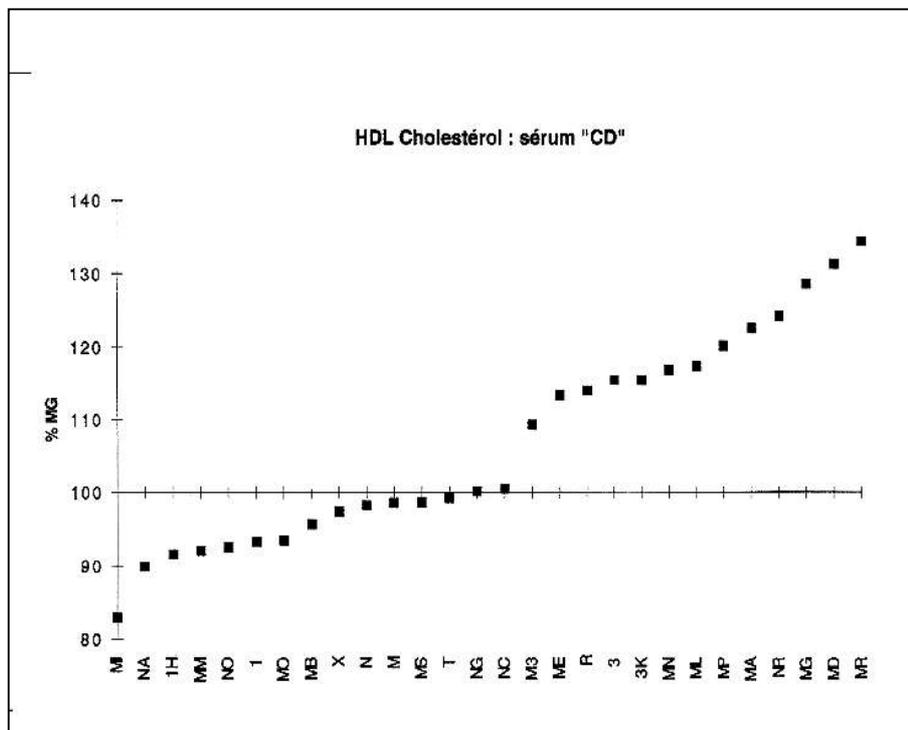
■ III. CHOLESTÉROL DES LIPOPROTÉINES : CHOLESTÉROL HDL ET CHOLESTÉROL LDL

Il s'agit de l'analyse des lipoprotéines par leur contenu en lipides. Du fait de la répartition de tous les constituants lipidiques dans toutes les lipoprotéines, un isolement préalable des lipoprotéines est nécessaire. Le dosage du cholestérol des lipoprotéines séparées par différents procédés en fonction de critères physicochimiques a pris une grande importance depuis que des études épidémiologiques prospectives ont montré notamment, que le risque cardiovasculaire est proportionnel à la concentration des lipoprotéines légères (LDL - VLDL) et inversement proportionnel à la concentration des lipoprotéines HDL.

Les différentes méthodes utilisées pour la séparation des lipoprotéines (ultracentrifugation, électrophorèse, précipitation sélective) ne donnent pas des résultats comparables, ne séparant pas les mêmes types de particules. Si l'ultracentrifugation constitue la méthode de référence elle ne peut pas, par son coût et sa durée de mise en œuvre, être utilisée en routine. L'électrophorèse est à déconseiller, la reproductibilité de cette méthode n'étant pas suffisante. Elle n'est pratiquement plus utilisée actuellement.



- NA Abbott/A-Gent-Spectrum-Vision
- NO Kone/Cholestérol HDL
- MB Beckman/CX 4-5-7
- N PRÉCIP. DEXTRANE/SPECTRO.
- NC Bayer/Axon-Dax-RA-Chem 1
- NG Ciba-Corning/Cholestérol HDL
- 1H Helena/REP Titan
- 1 ELECTROPHORESE
- ML Roche/Cholestérol HDL
- X AUTRES TECHNIQUES
- MD Du Pont/Aca
- T PRÉCIP. : AUTRE
- NR Boehringer/Hitachi
- MN Randox/HDL
- MG Du Pont/Dimension
- 3 PRÉCIP. DEXTRANE/RÉLECTRO.
- 3K Kodak/Ektachem
- M Biolabo/Cholestérol HDL
- M PRÉCIP. PHOSPHOTUNGSTATE
- MM Biomérieux/HDL Chol & P
- MR Boehringer/Cholestérol HDL
- MS Sigma/Cholestérol HDL
- MO Merck-Biotrol/Cholestérol HDL
- MA Bayer/Serapak
- ME Eurodiag/Cholestérol HDL
- MP Dade/Paramax
- R PRÉCIP. : PEG
- M3 Bio Direct/Cholestérol HDL



- M Biolabo/Cholestérol HDL
- NA Abbott/A-Gent-Spectrum-Vision
- 1H Helena/REP Titan
- MM Biomérieux/HDL Chol & P
- NO Kone/Cholestérol HDL
- 1 ELECTROPHORESE
- MO Merck-Biotrol/Cholestérol HDL
- MB Beckman/CX 4-5-7
- X AUTRES TECHNIQUES
- N PRÉCIP. DEXTRANE/SPECTRO.
- M PRÉCIP. PHOSPHOTUNGSTATE
- MS Sigma/Cholestérol HDL
- T PRÉCIP. : AUTRE
- NG Ciba-Corning/Cholestérol HDL
- NC Bayer/Axon-Dax-RA-Chem 1
- M3 Bio Direct/Cholestérol HDL
- ME Eurodiag/Cholestérol HDL
- R PRÉCIP. : PEG
- 3 PRÉCIP. DEXTRANE/RÉLECTRO.
- 3K Kodak/Ektachem
- MN Randox/HDL
- ML Roche/Cholestérol HDL
- MP Dade/Paramax
- MA Bayer/Serapak
- NR Boehringer/Hitachi
- MG Du Pont/Dimension
- MD Du Pont/Aca
- MR Boehringer/Cholestérol HDL

*Dosage du cholestérol HDL (CN 05-95) : Justesse des différentes techniques ($\eta > 15$)
(expression en % de la valeur de la moyenne générale)*

- Dosage du cholestérol HDL : les méthodes de précipitation sélective

Les méthodes utilisant la précipitation sélective des lipoprotéines sont les plus répandues car elles sont simples à mettre en œuvre, peu coûteuses et fiables si elles sont correctement pratiquées. Parmi les différents agents précipitants décrits (héparine / Ca^{2+} ou Mn^{2+} , sulfate de dextrane / Ca^{2+} ou Mg^{2+} , acide phosphotungstique / Mg^{2+} , PEG 6 000), c'est l'acide phosphotungstique en présence d'ions Mg^{2+} qui est la technique la plus répandue (80 ‰ des participants au récent échange interlaboratoire effectué sur le plan national). Les utilisateurs de techniques utilisant le sulfate de dextrane représentent 15 ‰ des participants. Les résultats obtenus peuvent varier en fonction de l'agent de précipitation et de la composition lipidique des sérums. À titre d'exemple, lors d'un récent contrôle national de qualité interlaboratoire, il existait pour l'un des sérums 12 ‰ de différence entre les techniques utilisant le sulfate de dextrane et celles utilisant l'acide phosphotungstique, tandis que pour l'autre sérum, aucune différence n'est observée (figures 6a et 6b).

La reproductibilité interlaboratoire des techniques de précipitation n'est pas satisfaisante : les CV interlaboratoires par technique sont tous (à une exception près) supérieurs à 10 ‰ et pour plusieurs systèmes supérieurs à 20 ‰. Il convient néanmoins de faire les réserves nécessaires sur le matériel de contrôle pour ces échanges interlaboratoires, particulièrement en raison de leur lyophilisation (compte tenu de l'analyse concernée). Il reste cependant que la procédure analytique (avec une partie manuelle) de ce dosage peut en partie expliquer les performances médiocres constatées.

C'est la technique utilisant l'acide phosphotungstique qui est sélectionnée par la SFBC.

Pour une bonne exécution des dosages du cholestérol HDL et pour obtenir une meilleure qualité dans les résultats l'ARCOL et la SFBC ont récemment précisé un certain nombre de précautions à suivre.

Précautions pour une bonne exécution du cholestérol HDL

- la centrifugation des lipoprotéines précipitées doit être effectuée à 5 000 g pendant au moins 10 minutes
- après précipitation des LDL-VLDL et centrifugation, le surnageant contenant les HDL doit être séparé rapidement du précipité ;
- il est nécessaire de s'assurer que le surnageant de précipitation est limpide ;
- la technique de dosage utilisée pour la détermination du cholestérol dans le surnageant doit être adaptée aux concentrations mesurées (entre 0 et 2 mmol/l soit 0 à 0,80 g/l).

Les résultats obtenus ne sont fiables que si la précipitation des lipoprotéines légères est totale. En cas d'hyperVLDLémies ou en présence de chylomicrons la précipitation est incomplète et le surnageant de centrifugation, outre les HDL, peut renfermer des lipoprotéines très légères ce qui conduit à un résultat erroné. Dans ces circonstances le surnageant de précipitation n'est pas limpide mais opalescent ou lactescent (présence de VLDL et/ou de chylomicrons). Ces limites de validité de la technique peuvent être observées pour des triglycéridémies supérieures à 4 mmol/l.

- Calcul du Cholestérol LDL

La détermination du cholestérol-HDL permet l'appréciation de la fraction lipoprotéinique assurant le retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie (lipoprotéines anti athérogènes) et d'évaluer par calcul le cholestérol des LDL directement impliqué dans le risque athérogène.

La formule de FRIEDEWALD permet cette approche

| | | | | | |
|------------|--------------------|---|------------------|---|----------------------|
| Chol LDL = | Chol total dosé | - | Chol HDL dosé | - | Chol VLDL calculé |
|------------|--------------------|---|------------------|---|----------------------|

Le chol-VLDL est estimé à partir des triglycérides plasmatiques totaux :

TG/5 si les résultats sont exprimés en g/l

TG/2,2 si les résultats sont exprimés en mmol/l.

Cette formule n'est valable que si la détermination du chol HDL est correcte, c'est à dire en l'absence de chylomicrons et pour des triglycéridémies inférieures ou égales à 4 mmol/l.

■ IV. LIPOPROTÉINOGRAMME

La séparation électrophorétique des lipoprotéines peut être réalisée /

- en fonction de la charge des lipoprotéines (gel d'agarose ou d'acétate de cellulose) : ce sont les protéines en proportions différentes dans les lipoprotéines qui permettent la séparation ;
- en fonction de la charge et de la taille des lipoprotéines (gel de polyacrylamide en gradient continu ou discontinu) : les plus grosses lipoprotéines (chylomicrons : 100 à 1 000 nm de diamètre, et VLDL : 50 à 100 nm) sont arrêtées en fonction du degré de réticulation du gel tandis que les lipoprotéines de tailles plus petites (LDL : de 20 à 30 nm et HDL : de 10 à 20 nm) se sépareront en fonction de leur seule charge.

Tableau I : Lipoprotéinogramme : avantages et limites respectifs des supports d'électrophorèse

| | Avantages | Inconvénients |
|--|---|--|
| gel d'agarose ou d'acétate de cellulose | bonne séparation des lipoprotéines quelles que soit leur concentration | difficulté dans certains cas de détection de la Lp(a) |
| gel de polyacrylamide | - visualisation de la migration des échantillons précolorés - détection de la Lp(a) | appréciation difficile des lipoprotéines en présence de sérums hypertriglycéridémiques (chylomicrons et VLDL) |

Il s'agit d'une analyse qualitative ou pseudo quantitative des lipoprotéines. Les enregistrements densitométriques ne doivent jamais être exprimés en pourcentage de lipoprotéines : ils représentent la quantité de colorants fixés par les lipides des lipoprotéines (les différents constituants lipidiques ne fixent pas de la même manière les colorants).

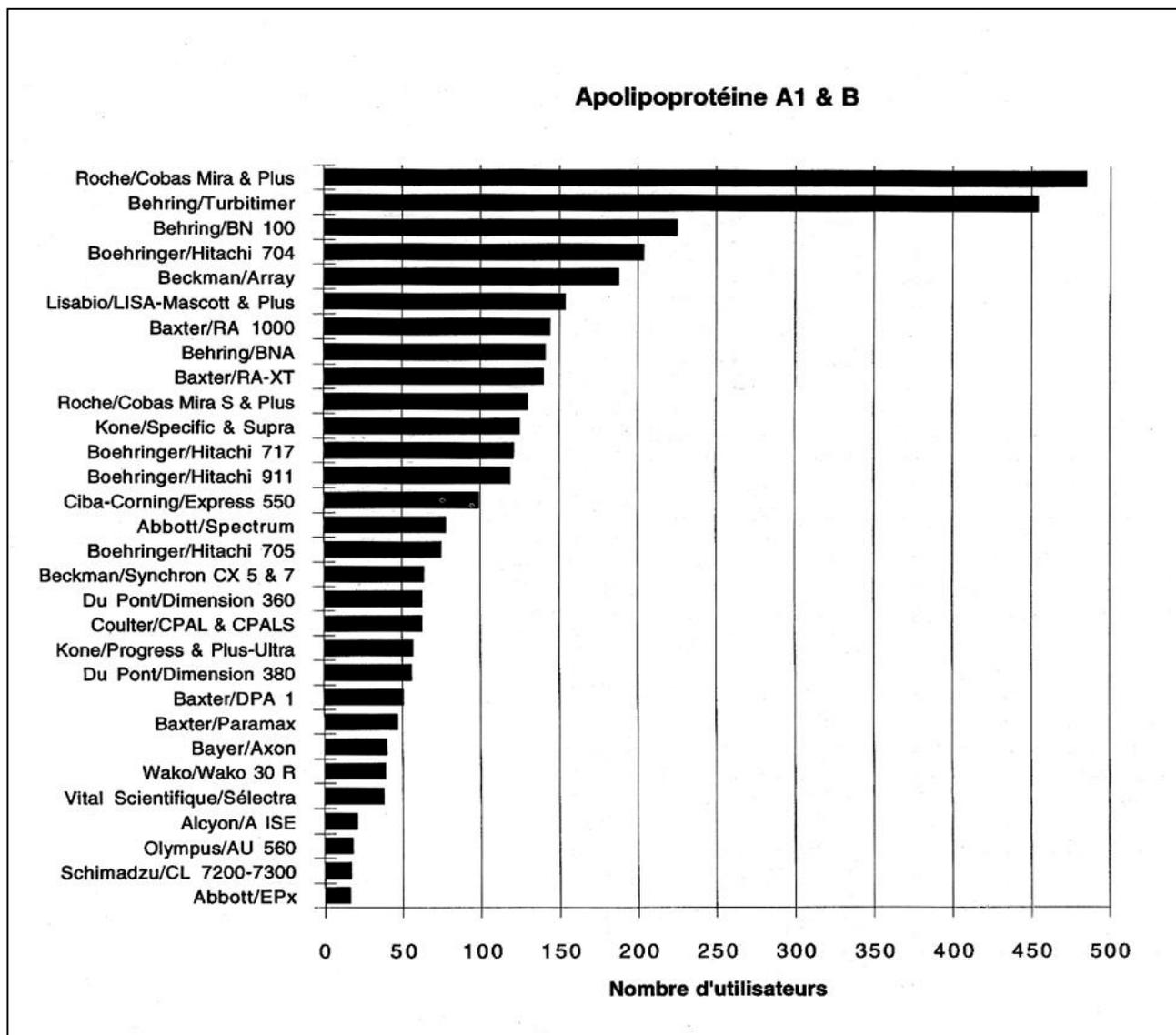


Figure 7 : Dosage des apolipoprotéines A1 & B (CN 05-95) : Répartition des différents systèmes analytiques (n > 15)

L'interprétation du lipidogramme est donnée par rapport à un sérum témoin de sujet normolipémique. Il est indispensable pour le typage des hyperlipoprotéïnémies (Classification Internationale des Hyperlipoprotéïnémies de FREDRICKSON) : le lipoprotéinogramme permet notamment la mise en évidence d'une bande d'IDL (Broad bêta = hyperlipoprotéïnémie de type III). En outre le lipoprotéinogramme est indispensable pour détecter certaines lipoprotéines anormales (LPX, HDL anormales...) ou particulières telles que la lipoprotéine Lp(a).

Remarques

- Pour la mise en évidence de la Lp(a) sur gel d'agarose (migration entre les prébLP et les bLP) il est conseillé de pratiquer l'électrophorèse avec des sérums fraîchement prélevés (12 heures). Un délai supérieur à 48 heures modifie la migration de la Lp(a) qui se confond avec les prébLP.

L'utilisation de supports spécialement mis au point (Hydragel SEBIA, par exemple) permet d'individualiser la Lp(a) entre les prébLP et les aLP : dans ces conditions, la Lp(a) ne subit pas de modification de migration en fonction de la conservation des échantillons.

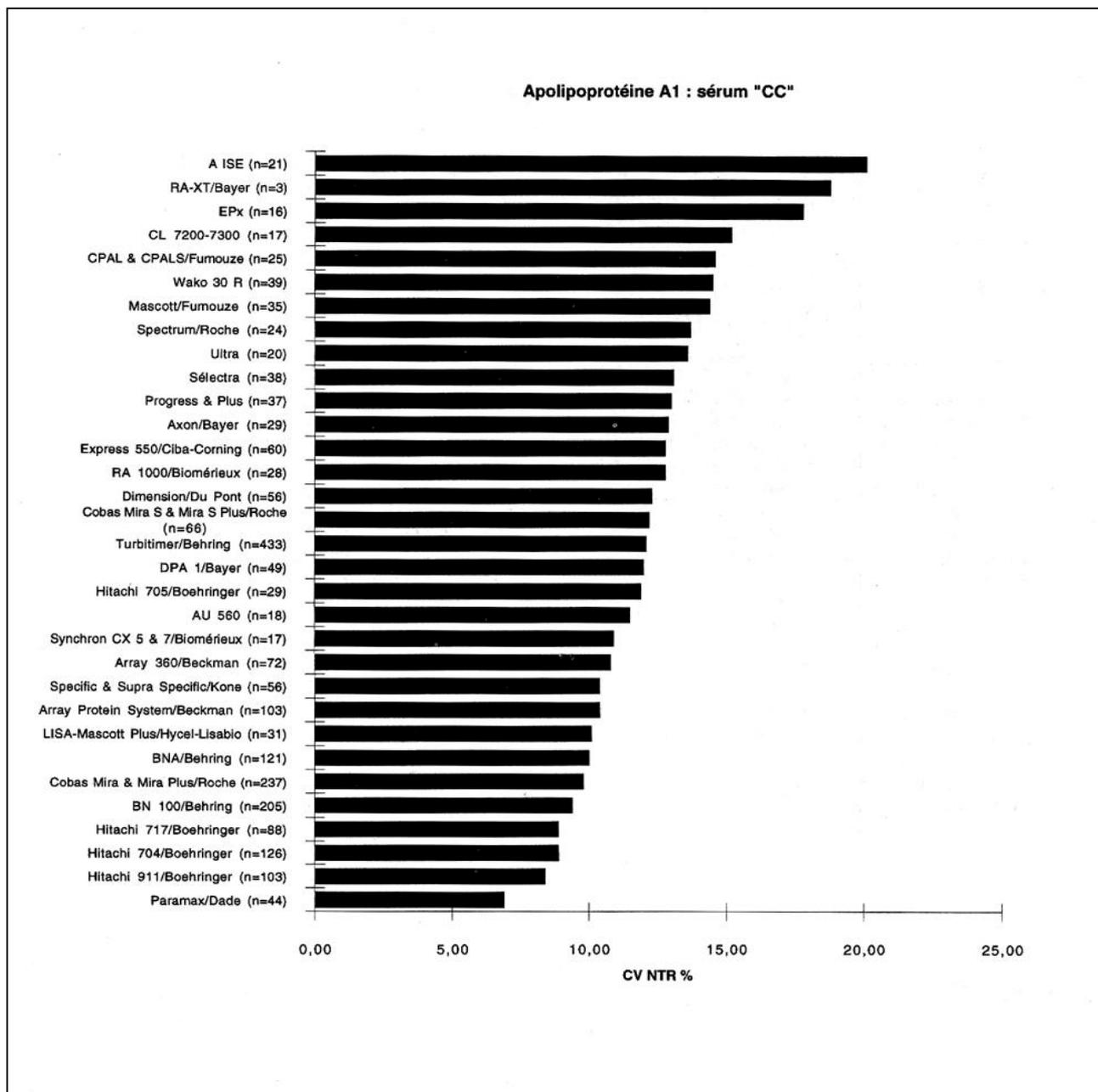


Figure 8 : Dosage de l'apolipoprotéine A1 (CN 05-95) : Reproductibilité interlaboratoire des résultats obtenus pour chacun des systèmes les plus utilisés - sérum CC

- La détection électrophorétique de la Lp(a) est fonction de sa concentration (de l'ordre de 0,20 g/l). Le seuil de détection est variable selon les supports et pour un type de support varie en fonction du lot de fabrication. La détection électrophorétique ne permet pas une évaluation quantitative de sa concentration.

- L'utilisation du gel de polyacrylamide avec précoloration des échantillons peut en cas d'hyperchylomicronémie ou hyper prébLP (ou hyper VLDLémies) entraîner des interprétations erronées : le colorant se fixant préférentiellement sur les triglycérides des lipoprotéines, il en résulte une diminution de coloration des bLP (LDL) et aLP (HDL) sans rapport avec la concentration de ces lipoprotéines.

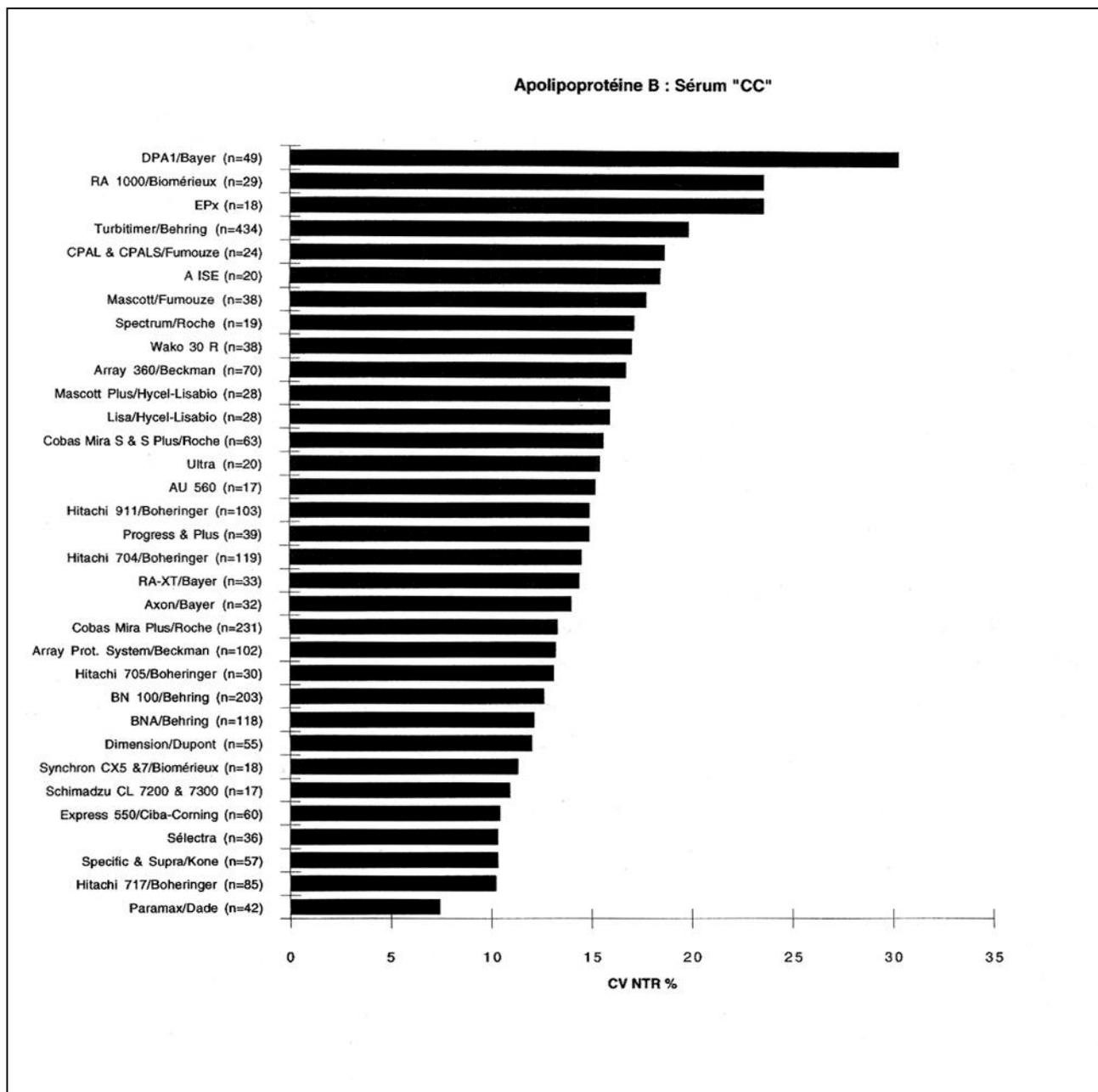
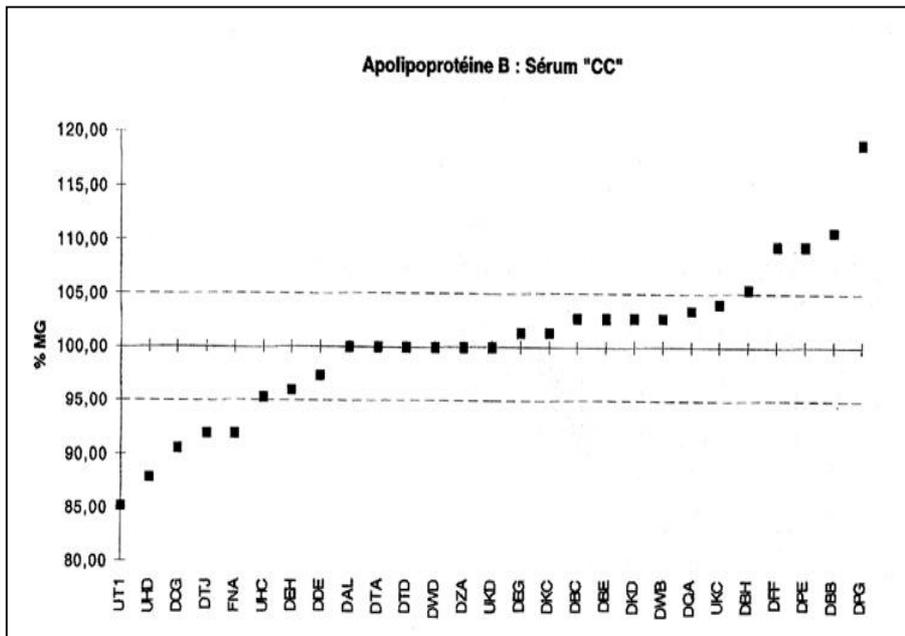


Figure 9 : Dosage de l'apolipoprotéine B (CN 05-95) : Reproductibilité interlaboratoire des résultats obtenus pour chacun des systèmes les plus utilisés - sérum CC

■ V. DOSAGE DES APOLIPOPROTÉINES A1 ET B

L'apolipoprotéine A1 présente dans les HDL, reflète la concentration des lipoprotéines antiathérogènes tandis que l'apolipoprotéine B retrouvée dans les LDL et les VLDL (et les chylomicrons), constitue un marqueur d'athérogénicité.

Les techniques de dosage les plus employées font appel à la réaction antigène-anticorps de précipitation en milieu liquide (immunoturbidimétrie et immunonéphélométrie).

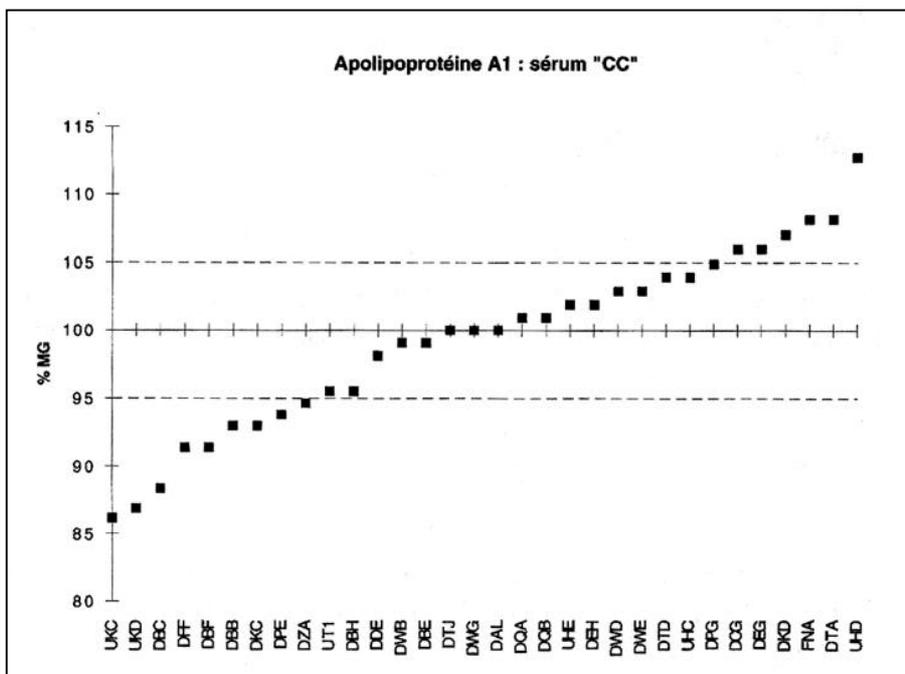


| | |
|---------|---|
| UT1 | DPA1/Bayer |
| UHD | Turbitimer/Behring |
| DOG | Synchron CX5 & 7/Biomérieux |
| DTJ | Axon/Bayer |
| FNA | Paramax/Dade |
| UHC/E | BNA-BN 100/Behring |
| DEH | AU 560 |
| DDE | CPAL & CPALS/Fumouze |
| DAL | Wako 30 R |
| DTA | RA 1000/Biomérieux |
| DTD | RA-XT/Bayer |
| DWD/E/G | Hitachi 704-717-911/Boehringer |
| DZA | AISE |
| UKD | Array 360/Beckman |
| DEG | Sélectra |
| DKC | Mascott/Fumouze |
| DBC | EPx |
| DBE/F | Progress & Plus-Specific & Supra/Kone |
| DKD | Lisa-Mascott Plus/Hycel-Lisabio |
| DWB | Hitachi 705/Boehringer |
| DQA/B | Cobas Mira & Plus-Mira S & S Plus/Roche |
| UKC | Array Prot. System/Beckman |
| DBH | Ultra |
| DFE | Dimension/Dupont |
| DPE | Express 550/Ciba-Corning |
| DBB | Spectrum/Roche |
| DPG | Schmadzu CL 7200 & 7300 |

Figure 10 : Dosage de l'apolipoprotéine B (CN 05-95) : Justesse des différentes techniques (n > 30) - sérum CC (expression en % de la valeur de la moyenne générale)

Les principaux systèmes analytiques utilisés sont présentés dans la figure 7. Les techniques immunoturbidimétriques sont les plus employées (77 % des utilisateurs). La majorité des dosages est effectuée sur des analyseurs automatiques multiparamétriques de Biochimie.

La reproductibilité interlaboratoire meilleure que pour le cholestérol HDL reste cependant assez médiocre. Les résultats obtenus lors d'un récent échange de contrôle de qualité montrent pour la plupart des systèmes des CV interlaboratoires supérieurs à 10 % pour les apolipoprotéines A1 et B (figures 8 et 9). De nombreux efforts de standardisation, conduits sur le plan international



| | |
|-----|----------------------------------|
| UKC | Array Protein System/Beckman |
| UKD | Array 360/Beckman |
| DBC | EPx |
| DFE | Dimension/Du Pont |
| DBF | Specific & Supra Specific/Kone |
| DBB | Spectrum/Roche |
| DKC | Mascott/Fumouze |
| DPE | Express 550/Ciba-Corning |
| DZA | AISE |
| UT1 | DPA 1/Bayer |
| DBH | Ultra |
| DDE | CPAL & CPALS/Fumouze |
| DWB | Hitachi 705/Boehringer |
| DBE | Progress & Plus |
| DTJ | Axon/Bayer |
| DWG | Hitachi 911/Boehringer |
| DAL | Wako 30 R |
| DQA | Cobas Mira & Mira Plus/Roche |
| DQB | Cobas Mira S & Mira S Plus/Roche |
| UHE | BN 100/Behring |
| DEH | AU 560 |
| DWD | Hitachi 704/Boehringer |
| DWE | Hitachi 717/Boehringer |
| DTD | RA-XT/Bayer |
| UHC | BNA/Behring |
| DPG | CL 7200-7300 |
| DOG | Synchron CX 5 & 7/Biomérieux |
| DEG | Sélectra |
| DKD | LISA-Mascott Plus/Hycel-Lisabio |
| FNA | Paramax/Dade |
| DTA | RA 1000/Biomérieux |
| UHD | Turbitimer/Behring |

Figure 11 : Dosage de l'apolipoprotéine A1 (CN 05-95) : Justesse des différentes techniques (n > 30) - sérum CC (expression en % de la valeur de la moyenne générale)

(IFCC) ont abouti à une diminution importante de la dispersion intertechnique des résultats. L'utilisation de valeurs de référence communes reste l'objectif à atteindre.

Sur le plan de la justesse de nombreux systèmes fournissent des résultats dont les moyennes se situent à $\pm 5\%$ de la moyenne générale pour l'apolipoprotéine B (figure 10). Pour l'apolipoprotéine A1, la dispersion est plus importante mais la plupart des systèmes fournissent des résultats compris dans l'intervalle $\pm 10\%$ de la moyenne générale (figure 11). Des améliorations doivent donc encore être apportées. Cependant globalement les résultats obtenus pour les apolipoprotéines sont comparables à ceux déjà observés pour différentes fractions protéiques (CN 03 93). Dans les paramètres lipidiques et apolipoprotéiniques étudiés dans la récente campagne nationale (CN 05 95), ils se situent à un niveau légèrement inférieur à celui des triglycérides mais supérieur à celui du cholestérol HDL.

■ VI. DOSAGE DE LA Lp(a)

La lipoprotéine Lp(a) est une lipoprotéine particulière constituée d'une particule de LDL à laquelle est liée une molécule d'apo (a) qui lui confère des propriétés physico-chimiques et immunologiques originales permettant sa détection par électrophorèse et son dosage immunochimique. Les techniques de dosage faisant appel à la réaction antigène-anticorps sont identiques à celles utilisées pour les apolipoprotéines A1 et B : immunoprécipitation en milieu gélifié (Immunodiffusion radiale et électroimmunodiffusion) et surtout immunoprécipitation en milieu liquide (immunoturbidimétrie et immuno-néphélométrie) sur les mêmes analyseurs que pour les apolipoprotéines. Des difficultés sont actuellement rencontrées dans l'uniformisation des résultats obtenus par les différentes techniques. Ceci est dû au fait que la concentration de cette lipoprotéine « normalement » inférieure à 0,2 - 0,3 g/l (pour plus de 75 % de la population) est faible et contrôlée par un polymorphisme génétique complexe.

Des efforts de standardisation, comme pour les apolipoprotéines, menés sur le plan international et national devraient aboutir à une diminution importante de la dispersion inter techniques des résultats.

Il est important de savoir que le cholestérol LDL calculé en utilisant la formule de FRIEDEWALD correspond en réalité au cholestérol LDL + cholestérol Lp(a). Le cholestérol Lp(a), du fait que cette lipoprotéine constitue un facteur de risque athérogène indépendant des autres facteurs lipoprotéiniques, doit donc être pris en compte pour une évaluation correcte du cholestérol LDL. C'est dans ce sens que DAHLEN a proposé la formule suivante pour la détermination du cholestérol LDL vrai :

- en mmol/l

$$\text{Chol LDL} = \text{Chol total} - \text{Chol HDL} - \frac{\text{TG} - \text{Lp(a) g/l} \times 0,3}{2,2 \quad 0,386}$$

- en g/l

$$\text{Chol LDL} = \text{Chol total} - \text{Chol HDL} - \frac{\text{TG} - \text{Lp(a) g/l} \times 0,3}{5}$$

■ VII. CONCLUSION

L'exploration des lipides lipoprotéines devra comporter au minimum dans son bilan de dépistage la détermination de l'aspect du sérum et les dosages obligatoirement simultanés du cholestérol total et des triglycérides.

En fonction des résultats obtenus et/ou selon le contexte clinique faisant apparaître un ou plusieurs facteurs de risque cardio-vasculaire une exploration complète visant à apprécier les HDL, les LDL et les VLDL devra être mise en œuvre. Cette exploration comportera outre les éléments précédents les dosages du chol HDL et calcul du cholestérol LDL ou les dosages des apolipoprotéines A1 et B avec éventuellement une électrophorèse des lipoprotéines pour confirmation et typage de la dyslipoprotéinémie. Un dosage de la concentration de la lipoprotéine Lp(a) permettra encore d'apprécier le risque directement lié à cette lipoprotéine.

BIBLIOGRAPHIE

- COUDERC R., LEGRAND A., Bilan lipidique en pratique médicale courante. Exemples de bilans lipidiques. *Biologiste et Praticien*, 1996/1, n° 105, 80 pages, P. Fauchier Ed. (Paris).
- LEGRAND A., Les méthodes d'exploration des lipoprotéines et les problèmes rencontrés dans leur utilisation. *Semaine des Hôpitaux-Paris*, 1993, 69, 401-410.
- Commission Lipides-Lipoprotéines de la SFBC
 - Mise au point sur les méthodes de séparation des lipoprotéines et leur intérêt, ISB, 1979, 1, 14-17
 - Méthode définitive pour le dosage du cholestérol total sérique, ISB, 1979, 4, 5-8
 - Méthode de référence pour le dosage du cholestérol total sérique, ISB, 1979, 4, 9-12
 - Méthode sélectionnée pour le dosage du cholestérol total sérique, ISB, 1979, 4, 13-22
 - Méthode sélectionnée pour le dosage enzymatique du cholestérol, ISB, 1979, 4, 23-31
 - Méthode sélectionnée pour le dosage des triglycérides sériques, ISB, 1982, 6, 445-451
 - Méthode de dosage des apolipoprotéines B, ISB, 1984, 4, 227-230
 - Classification et nomenclature des lipoprotéines plasmatiques humaines, ISB, 1987, 1, 32-42
- ARCOL, Consensus français sur le cholestérol, ISB, 1989, 2, 121-124.

III - ANALYSE DES RÉSULTATS : DÉPISTAGE ET PRÉVENTION DES TROUBLES LIPIDIQUES

J.-M. LEMASSON*, J.-F. MEYER**, J. STEINMETZ***

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

I. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

VALEURS DE RÉFÉRENCE - VALEURS OBSERVÉES OU USUELLES

Dans ce paragraphe nous essayerons de montrer de façon très pragmatique tout l'intérêt que l'on peut tirer de la connaissance de valeurs de référence et de valeurs observées pour choisir des valeurs de décision utilisables dans l'élaboration d'une stratégie de santé.

Pour le cholestérol et les triglycérides nous donnerons et comparerons :

- les valeurs de référence contenues dans Références en Biologie Clinique (1) ;
- les valeurs observées (valeurs usuelles) dans la population ayant consulté de façon spontanée en 1995 dans les Centres d'Examens de Santé (C.E.S.) des Caisses Primaires d'Assurance Maladie de Saint-Brieuc en Côtes-d'Armor et de Poitiers dans la Vienne et dans le Centre de Médecine Préventive de Vandœuvre-Lès-Nancy en Lorraine (C.M.P.).

II. QUELQUES DÉFINITIONS ET CONCEPTS

G. SIEST et ses collaborateurs ont développé très largement le concept de valeurs de références et ses relations avec les sources de variation des examens de laboratoire (2) en apportant un certain nombre de définitions qu'il est important de rappeler.

Les valeurs de référence

Elles correspondent aux valeurs obtenues pour un échantillon de référence constitué d'un certain nombre d'individus de référence sélectionnés « à l'aide de critères bien définis, c'est à dire se trouvant dans un état de santé décrit avec clarté et précision ». Cette sélection introduit obligatoirement la notion de critères d'exclusion et d'inclusion qui permettront de recruter les individus de référence. Ces critères aboutiront en pratique à définir une population de référence idéale « chez laquelle on mesurera des valeurs de référence idéales » dépendantes pour l'essentiel de l'hérédité et des habitudes de vie communes à un groupe culturel ou géographique. Par analogie à la biologie on pourrait dire que ce sont des « valeurs étalons ».

Les valeurs usuelles ou observées

Ce sont les valeurs d'une population d'individus à priori non sélectionnés, population la plus proche possible de la population générale. Elles représenteraient les valeurs de l'état de santé

* Centre d'Examens de Santé de Poitiers, 21, rue Saint-Louis, 86000 Poitiers

** Centre d'Examens de Santé de Saint-Brieuc, 2, rue Notre-Dame, 22000 Saint-Brieuc

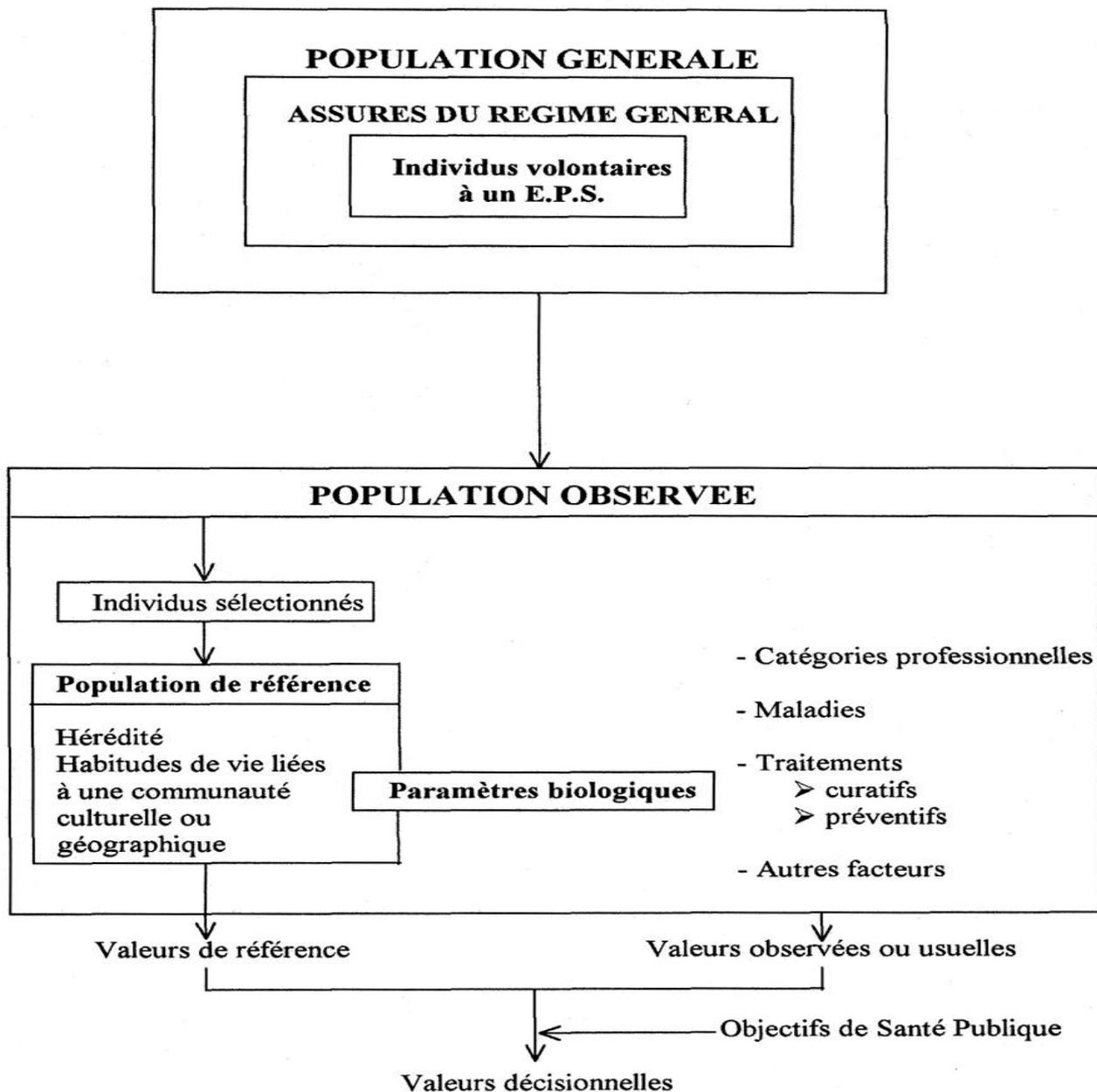
*** Centre de Médecine Préventive, 2, avenue du Doyen-J.-Parisot, 54501 Vandœuvre-lès-Nancy

d'une population soumise à la fois l'influence des facteurs décrits précédemment et de tous les autres facteurs comportementaux et socio-économiques.

Les valeurs décisionnelles

Ce sont des valeurs d'utilité stratégique. Elles varient en fonction du but à atteindre : décision thérapeutique, définition de populations à risque, objectifs de prévention primaire, secondaire...

Le tableau suivant résume ces notions.



■ III. ÉTABLISSEMENT DES VALEURS DE RÉFÉRENCE ET DES VALEURS OBSERVÉES

Les valeurs que nous présentons ici ont été établies à partir d'un même type de population « tout venant », volontaire à un Examen Périodique de Santé (E.P.S.), non hospitalisée, qui est elle-même un sous-ensemble de la population du régime général de la Sécurité Sociale.

Sont donc exclues de ce groupe, les populations relevant de régimes particuliers (agriculteurs, artisans, commerçants...).

La méthodologie de recueil de l'information, les critères de description de la population reçue (3) sont communs aux trois centres. Les critères d'exclusion obtenus par l'exploration préclinique et l'examen clinique utilisés pour sélectionner les individus de référence sont propres au C.M.P. (3).

Les dosages ont été pratiqués dans les laboratoires des centres qui participent au programme de contrôle de qualité interlaboratoire, les prélèvements étant toujours effectués dans les mêmes conditions. La dispersion des résultats obtenus lors de ces échanges interlaboratoires par les différents laboratoires des C.E.S. estimée par le C.V. interlaboratoire moyen (calculé sur une année) est respectivement de 9 % pour les apolipoprotéines A1 et 5 % pour les apolipoprotéines B. La moyenne des coefficients de variation inter laboratoires des C.E.S. sur l'année 1995 est de 3 % pour le cholestérol et 7,1 % pour les triglycérides.

Les valeurs de référence rapportées sont celles publiées en 1990 (4, 5).

Les valeurs observées ou usuelles sont celles recueillies durant toute l'année 1995 contenues dans les rapports d'activité des C.E.S. et du C.M.P.

Elles sont présentées sous forme de percentiles (méthode statistique non paramétrique qui permet de s'affranchir des lois de probabilité des variables considérées) en fonction du sexe et de tranches d'âge qui correspondent pour les valeurs observées aux tranches d'âge définies dans les recommandations pour les Examens Périodiques de Santé (1993) (6).

L'équivalent de l'intervalle de confiance correspond aux percentiles (quantiles) extrêmes 2,5 % et 97,5 %.

- le tableau I décrit la manière dont sont présentées les valeurs
- le tableau II rapporte les valeurs de référence (4, 5). Elles sont présentées sous la forme décrite dans le tableau 1
- les tableaux III, IV, V rassemblent les valeurs observées respectivement dans les 3 centres

Tableau I : Variation de la médiane et de la dispersion du cholestérol et des triglycérides en fonction de l'âge et du sexe

PRÉSENTATION GÉNÉRALE

Centiles :

Les valeurs sont classées par ordre croissant puis distribuées en 100 parties égales de la population étudiée (centiles).
 La valeur d'un centile 2,5 - 50 - 97,5 correspond à la valeur en dessous de laquelle se trouve 2,5 - 50 - 97,5% de la population étudiée.

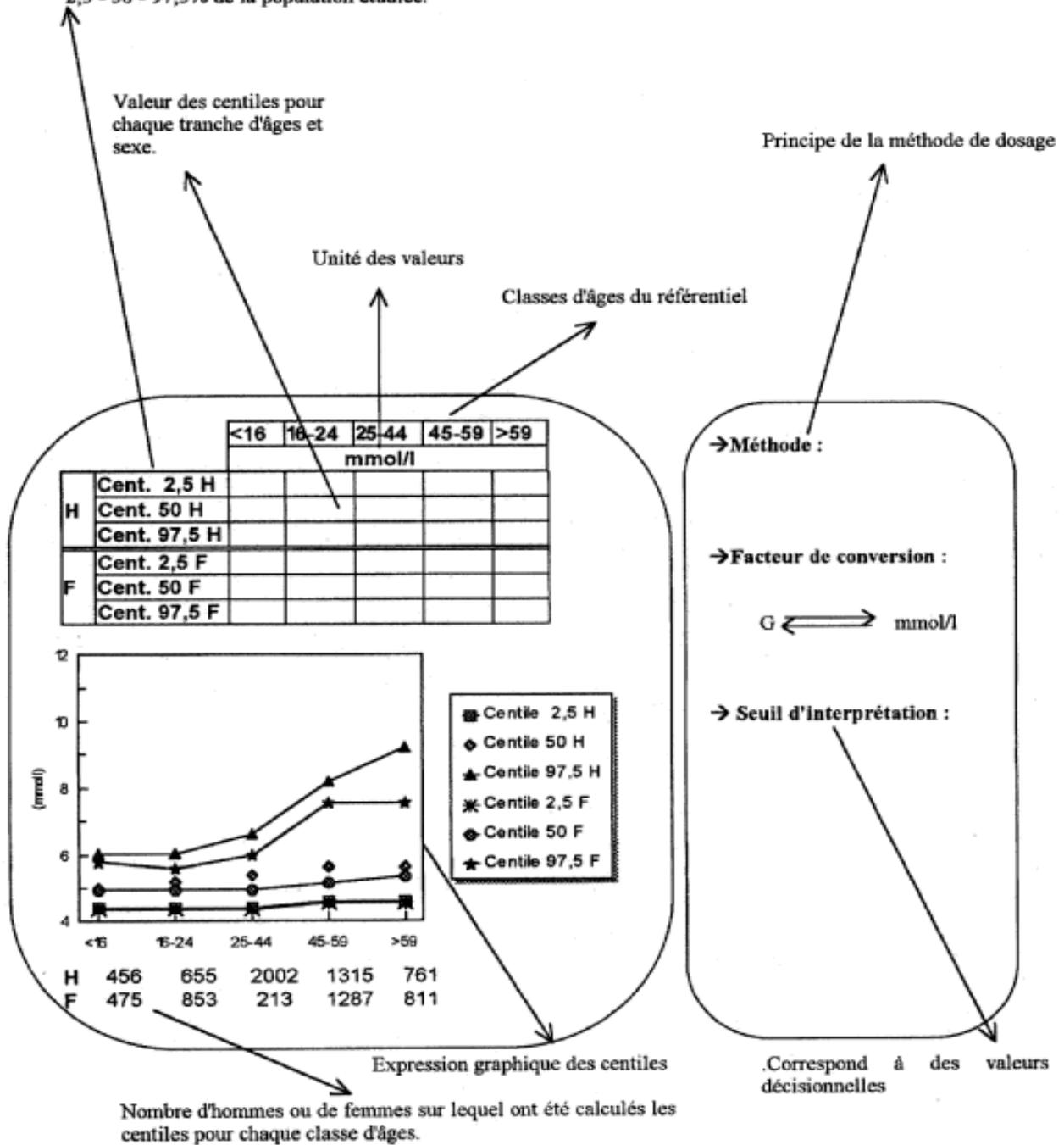
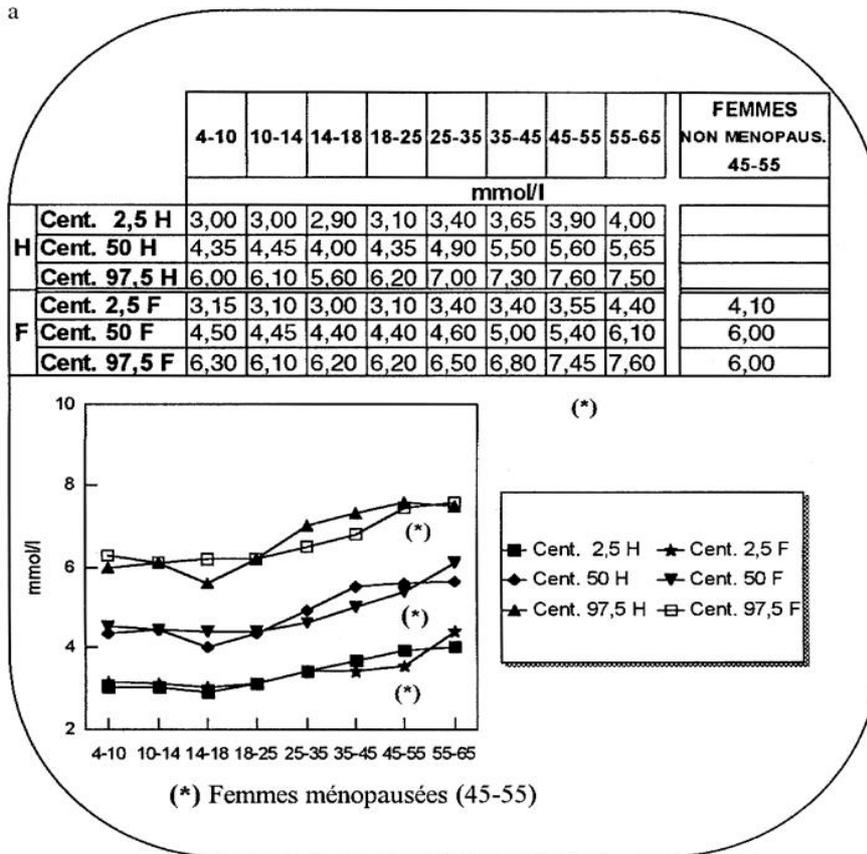


Tableau II : Limites de référence du cholestérol (a) et des tryglycérides (b) (C.M.P. 1990)

a



Limites de référence du cholestérol total :

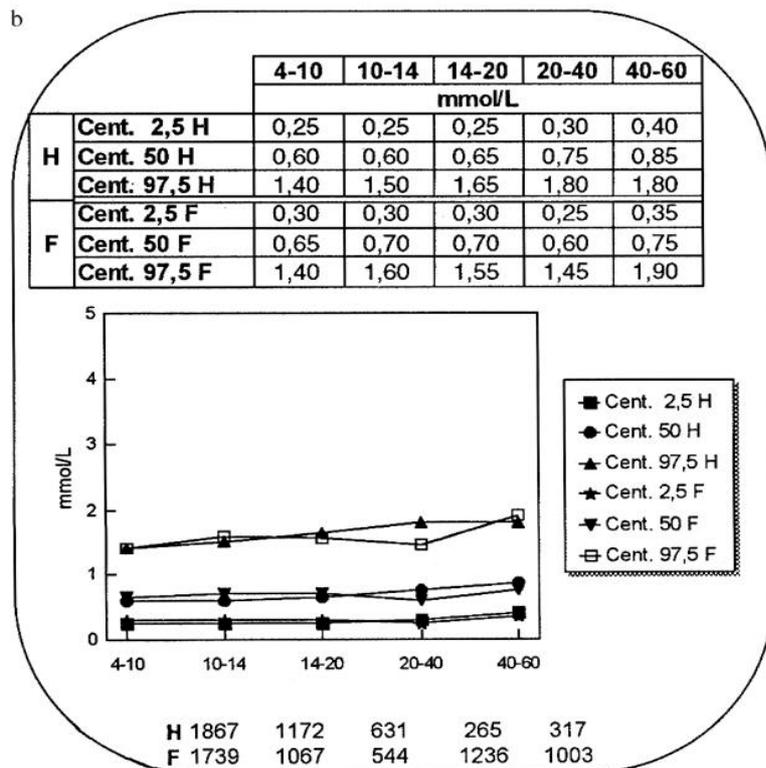
Les principaux critères de partition dans le cas du cholestérol sont l'âge, le sexe. Nous proposons des classes d'âge de 4 ans jusqu'à 18 ans et de 10 ans chez les adultes. Il serait intéressant chez les enfants de 10 à 16 ans de tenir compte de la maturation sexuelle.

Chez les femmes au-delà de 45 ans, la ménopause sera un facteur de partition supplémentaire.

Les critères d'exclusion sont :

- la surcharge pondérale importante,
- la grossesse,
- l'imprégnation éthylique,
- l'absence d'activité physique,
- la prise de médicaments.

b



Limites de référence des triglycérides

En plus des critères de partition que sont l'âge et le sexe, il est nécessaire d'exclure les sujets obèses.

La consommation importante de tabac et d'alcool sera un critère d'exclusion pour les hommes en particulier après 40 ans.

La limite que nous avons fixée est de 11 cigarettes par jour et de ½ litre de vin (soit 44 g d'alcool) par jour.

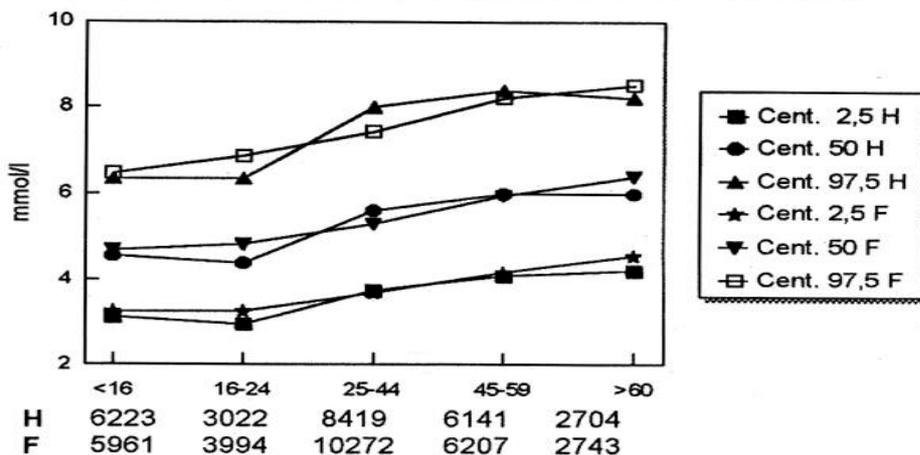
Les sujets prenant des médicaments, les femmes prenant des contraceptifs oraux ou pendant la grossesse sont également exclus.

De plus, les sujets seront obligatoirement à jeun.

Tableau III : Valeurs observées du cholestérol (a) et des tryglycrides (b) dans la population du C.M.P. de Vandoeuvre-Lès-Nancy en 1995

a

| | | <16 | 16-24 | 25-44 | 45-59 | >60 |
|---|--------------|--------|-------|-------|-------|------|
| | | mmol/L | | | | |
| H | Cent. 2,5 H | 3,14 | 2,97 | 3,75 | 4,09 | 4,20 |
| | Cent. 50 H | 4,57 | 4,39 | 5,63 | 6,00 | 6,00 |
| | Cent. 97,5 H | 6,33 | 6,37 | 8,01 | 8,39 | 8,21 |
| F | Cent. 2,5 F | 3,27 | 3,24 | 3,69 | 4,19 | 4,56 |
| | Cent. 50 F | 4,71 | 4,81 | 5,29 | 5,94 | 6,38 |
| | Cent. 97,5 F | 6,46 | 6,88 | 7,45 | 8,21 | 8,52 |



b

| | | <16 | 16-24 | 25-44 | 45-59 | >60 |
|---|--------------|--------|-------|-------|-------|------|
| | | mmol/L | | | | |
| H | Cent. 2,5 H | 0,19 | 0,36 | 0,39 | 0,43 | 0,46 |
| | Cent. 50 H | 0,60 | 0,79 | 1,06 | 1,23 | 1,20 |
| | Cent. 97,5 H | 1,64 | 2,30 | 3,89 | 3,90 | 3,36 |
| F | Cent. 2,5 F | 0,28 | 0,36 | 0,36 | 0,38 | 0,42 |
| | Cent. 50 F | 0,68 | 0,80 | 0,80 | 0,94 | 1,08 |
| | Cent. 97,5 F | 1,69 | 2,06 | 2,34 | 2,78 | 2,91 |

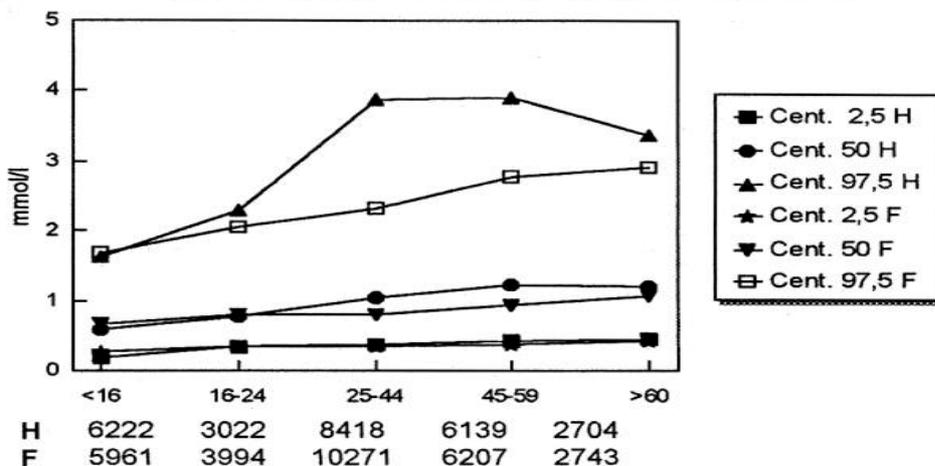
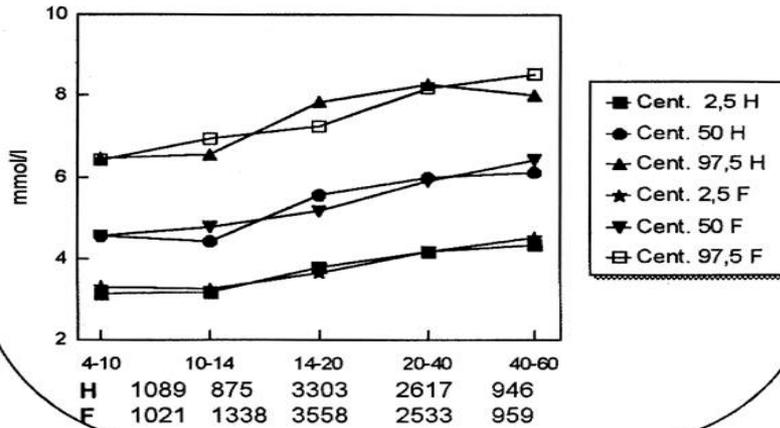


Tableau IV : Valeurs observées du cholestérol (a) et des triglycérides (b) dans la population du C.E.S. de Saint- Brieux en 1995

a

| | | <16 | 16-24 | 25-44 | 45-59 | >59 |
|---|--------------|--------|-------|-------|-------|------|
| | | mmol/L | | | | |
| H | Cent. 2,5 H | 3,14 | 3,16 | 3,79 | 4,17 | 4,33 |
| | Cent. 50 H | 4,54 | 4,44 | 5,57 | 5,99 | 6,10 |
| | Cent. 97,5 H | 6,44 | 6,56 | 7,86 | 8,27 | 8,04 |
| F | Cent. 2,5 F | 3,29 | 3,24 | 3,64 | 4,18 | 4,51 |
| | Cent. 50 F | 4,57 | 4,78 | 5,18 | 5,88 | 6,40 |
| | Cent. 97,5 F | 6,42 | 6,92 | 7,25 | 8,21 | 8,52 |



Méthode :

Enzymatique colorimétrique (cholestérol estérase + oxydase)

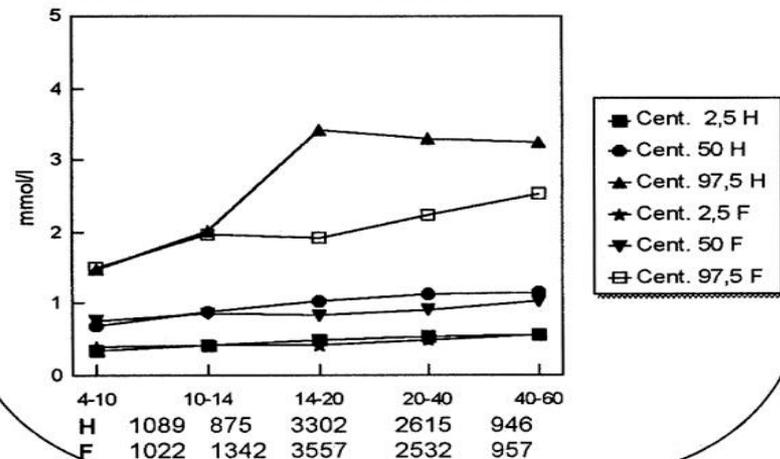
Facteurs de conversion :

Mmol → g/l. 0,39

Seuil d'interprétation :

b

| | | <16 | 16-24 | 25-44 | 45-59 | >59 |
|---|--------------|--------|-------|-------|-------|------|
| | | mmol/L | | | | |
| H | Cent. 2,5 H | 0,35 | 0,41 | 0,48 | 0,53 | 0,57 |
| | Cent. 50 H | 0,69 | 0,88 | 1,03 | 1,13 | 1,15 |
| | Cent. 97,5 H | 1,48 | 2,02 | 3,44 | 3,31 | 3,26 |
| F | Cent. 2,5 F | 0,38 | 0,42 | 0,42 | 0,48 | 0,56 |
| | Cent. 50 F | 0,75 | 0,86 | 0,84 | 0,90 | 1,03 |
| | Cent. 97,5 F | 1,51 | 1,98 | 1,92 | 2,25 | 2,53 |



Méthode :

Enzymatique GPO PAP (LPL + GPO + Peroxydase)

Facteur de conversion :

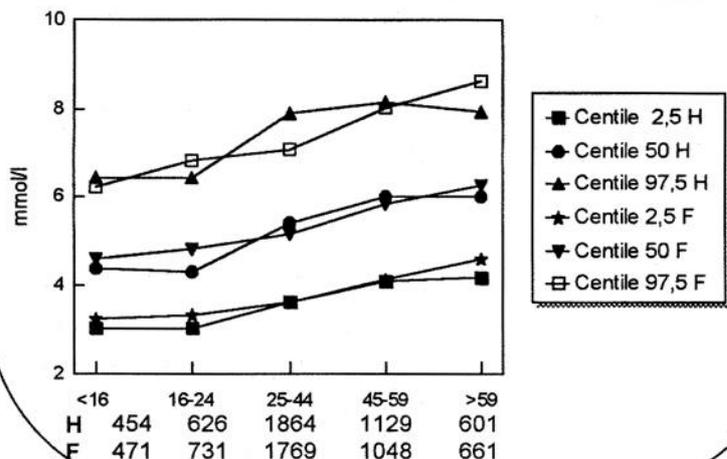
mmol → g/l. 0,87

Seuil d'interprétation :

Tableau V : Valeurs observées du cholestérol (a) et des triglycérides (b) dans la population du C.E.S. de Poitiers en 1995

a

| | | <16 | 16-24 | 25-44 | 45-59 | >59 |
|---|----------------|--------|-------|-------|-------|------|
| | | mmol/l | | | | |
| H | Centile 2,5 H | 3,01 | 3,01 | 3,62 | 4,08 | 4,17 |
| | Centile 50 H | 4,39 | 4,32 | 5,44 | 6,00 | 6,03 |
| | Centile 97,5 H | 6,45 | 6,45 | 7,89 | 8,14 | 7,94 |
| F | Centile 2,5 F | 3,22 | 3,32 | 3,62 | 4,13 | 4,60 |
| | Centile 50 F | 4,59 | 4,81 | 5,15 | 5,86 | 6,28 |
| | Centile 97,5 F | 6,24 | 6,84 | 7,08 | 8,03 | 8,61 |



→ Méthode :

Enzymatique PAP
(cholestérol estérase + oxydase)

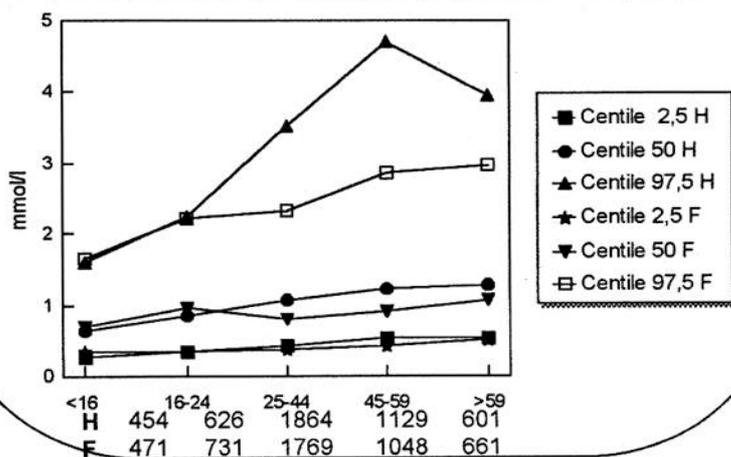
→ Facteur de conversion :

$$G \begin{matrix} \xrightarrow{x 2,58} \\ \xleftarrow{x 0,387} \end{matrix} \text{mmol/l}$$

→ Seuil d'interprétation :

b

| | | <16 | 16-24 | 25-44 | 45-59 | >59 |
|---|----------------|--------|-------|-------|-------|------|
| | | mmol/l | | | | |
| H | Centile 2,5 H | 0,28 | 0,35 | 0,43 | 0,54 | 0,54 |
| | Centile 50 H | 0,63 | 0,85 | 1,07 | 1,24 | 1,28 |
| | Centile 97,5 H | 1,61 | 2,25 | 3,54 | 4,70 | 3,96 |
| F | Centile 2,5 F | 0,35 | 0,35 | 0,37 | 0,42 | 0,50 |
| | Centile 50 F | 0,70 | 0,96 | 0,81 | 0,92 | 1,08 |
| | Centile 97,5 F | 1,66 | 2,22 | 2,33 | 2,85 | 2,96 |



→ Méthode :

enzymatique GPO PAP
(LPL + GPO + Péroxydase)

→ Facteur de conversion :

$$G \begin{matrix} \xrightarrow{x 1,14} \\ \xleftarrow{x 0,875} \end{matrix} \text{mmol/l}$$

→ Seuil d'interprétation :

■ IV. COMPARAISON ENTRE LES VALEURS DE RÉFÉRENCE ET LES VALEURS OBSERVÉES (USUELLES)

Les valeurs de référence

Le cholestérol

La cholestérolémie augmente progressivement avec l'âge à partir de 18-25 ans. Celle des hommes est toujours plus élevée que celle des femmes jusque dans la tranche d'âge 45-55 ans. Au-delà de 55 ans, c'est l'inverse : les femmes ont un cholestérol plus élevé que celui des hommes.

Pour les hommes : les valeurs extrêmes de la médiane (centile 50 %) sont de 4 mmol/l (1,54 g/l) et 5,65 mmol/l (2,18 g/l). Celles du centile 97,5 %, 5,60 mmol/l (2,16 g/l) et 7,50 mmol/l (2,90 g/l).

Pour les femmes: les valeurs sont de 4,40 mmol/l (1,70 g/l) et 6,10 mmol/l (2,36 g/l) pour la médiane et 6,10 mmol/l (2,36 g/l) et 7,60 mmol/l (2,94 g/l) pour le centile 97,5 %.

Les triglycérides

Ils augmentent peu avec l'âge, les valeurs sont voisines entre hommes et femmes.

Pour les hommes: les valeurs extrêmes de la médiane sont de 0,60 mmol/l (0,50 g/l) et de 0,85 mmol/l (0,71 g/l) et celles du centile 97,5 %, de 1,40 mmol/l (1,17 g/l) et 1,80 mmol/l (1,50 g/l).

Pour les femmes: les valeurs sont de 0,65 mmol/l (0,54 g/l) et 0,75 mmol/l (0,62 g/l) pour la médiane et de 1,40 mmol/l (1,17 g/l) et de 1,90 mmol/l (1,59 g/l) pour le centile 97,5 %.

Les valeurs observées



Le cholestérol

La comparaison entre les 3 centres montre une similitude totale de l'allure des courbes en fonction du sexe et de l'âge avec des valeurs très proches quelles que soient les tranches d'âge considérées.

La comparaison des valeurs du cholestérol de la population du C.E.S. de Saint-Brieuc avec les valeurs de référence pour les mêmes tranches d'âge (tableau VI) montre que

Chez les hommes : l'écart est toujours inférieur à 10 % quelles que soient les tranches d'âge.

Chez les femmes : l'écart des valeurs du centile 97,5 % est d'au moins 10 % dans les tranches d'âge 18-34 ans et 55-65 ans. De plus, dans la même tranche d'âge 18-34 ans, cet écart au centile 50 % est encore relativement élevé.

Tableau VI : Comparaison des valeurs du cholestérol du C.E.S. de Saint-Brieuc aux valeurs de référence pour les mêmes tranches d'âge (écart exprimé en pourcentage de la valeur de référence) dans les percentiles 50 % et 97,5 %

| | Tranches d'ages | 4-9 | 10-14 | 15-17 | 18-24 | 25-34 | 35-44 | 45-54 | 55-65 |
|---------------|-----------------------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Centiles | | | | | | | | |
| HOMMES | Centile 50% | 6,6 | 1,1 | 4,5 | 4,6 | 6,3 | 5,4 | 5,9 | 7,9 |
| | Centile 97.5% | 8,5 | 5,2 | 2,7 | 6,9 | 8,85 | 9,3 | 9,2 | 7,2 |
| FEMMES | Centile 50% | 4,6 | 1,35 | 3,2 | 9,5 | 9,3 | 5,6 | 6,3 | 3,1 |
| | Centile 97,5 % | 4,4 | 4,4 | 1,3 | 11,6 | 10 | 8 | 7,4 | 11,7 |

Tableau VII : Comparaison des écarts des valeurs observées et de référence des triglycérides dans la population des 2 C.E.S. de Saint-Brieuc et de Poitiers dans la tranche d'âge de 20-60 ans (écart exprimé en pourcentage de la valeur de référence)

| | Centiles | SAINT-BRIEUC | POITIERS |
|---------------|-----------------------|--------------|----------|
| HOMMES | Centile 50 % | 34 | 40 |
| | Centile 97,5 % | 67 | 99 |
| FEMMES | Centile 50 % | 26 | 26 |
| | Centile 97,5 % | 25 | 51 |

Les Triglycérides

L'allure des courbes de populations dans les 2 C.E.S. et le C.M.P. est similaire avec la présence d'un pic dans la classe d'âge 45-59 ans pour la population de Poitiers.

Les courbes des valeurs de référence et des valeurs observées des centiles 2,5 et 50 % sont identiques. Par contre, les courbes de centiles 97,5 % sont très différentes. L'écart entre les hommes et les femmes est beaucoup plus grand dans la population observée que dans la population de référence.

La comparaison des valeurs des triglycérides des populations des C.E.S. de Saint-Brieuc et de Poitiers avec les valeurs de référence pour la tranche d'âge 20-60 ans (tableau VII) montre

Chez les hommes : un écart compris entre 34 et 40 % pour respectivement la population du C.E.S. de Saint-Brieuc et de Poitiers dans le centile 50 % et de 67 % et 99 % dans le centile 97,5%.

Chez les femmes : un écart de 26 % dans le centile 50 % pour la population des 2 C.E.S. et de 25 % à 51 % dans le centile 97,5 % pour les populations des C.E.S. de Saint-Brieuc et de Poitiers.

■ V. UTILISATION EN PRÉVENTION DES VALEURS DE RÉFÉRENCE ET DES VALEURS OBSERVÉES

Dans le cadre d'actions de prévention primaire du risque cardio-vasculaire dont il faut se rappeler que cholestérol total et triglycérides ne sont que deux facteurs parmi tant d'autres, valeurs de référence et valeurs observées peuvent être très utiles pour agir, tant du point de vue collectif qu'individuel.

Du point de vue collectif

Comparer les valeurs observées aux valeurs de référence permet de mesurer à l'échelon d'une population l'importance du problème à résoudre, d'identifier des particularités régionales, d'isoler les tranches d'âge les plus exposées au risque, d'aider à la définition d'une stratégie de prévention et d'en évaluer son impact dans le temps.

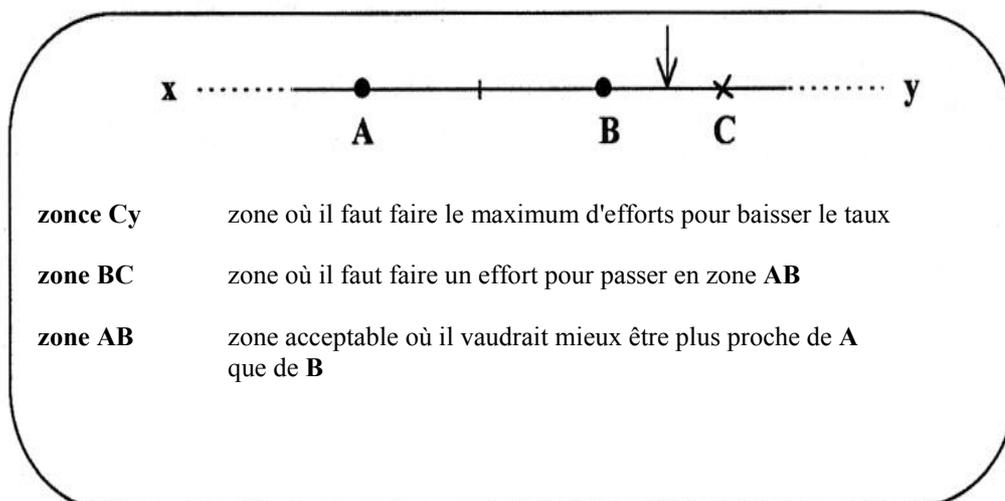
Par exemple, il apparaît que l'écart à la référence le plus important pour le cholestérol se situe chez les femmes jeunes âgées de 18 à 34 ans. Quelle est la cause de cet écart ? La contraception orale en est-elle responsable ? Quels conseils donner ? Mais que penser également de ce même écart pour les femmes de 55 à 65 ans ? La prévention doit-elle être accentuée pour elles ?

De même à l'évidence, l'écart à la référence important au centile 97,5 % pour les triglycérides chez les hommes âgés de 25 à 59 ans appelle une action particulière.

Du point de vue individuel

Il serait souhaitable de situer le résultat d'un individu par rapport aux valeurs de référence et observées de sa tranche d'âge. Ceci permettrait de « doser les conseils » en fonction de son positionnement. Cette manière de présenter les choses permettrait de sortir de l'ornière trop normative du chiffre stratégique trop rigoureux, tel que : pas de cholestérol au-dessus de 2 g/l (5,16 mmol/l).

Ainsi le résultat serait situé par rapport à 3 zones délimitées par les valeurs de référence des centiles 50 % et 97,5 % - **A** et **B** - et la valeur observée du centile 97,5 % - **C** - pour la tranche d'âge et le sexe considérés



■ VI. CONCLUSION

Les moyens logistiques disponibles dans les Centres d'Examens de Santé et les Centres de Médecine Préventive répartis sur l'ensemble du territoire métropolitain permettent une connaissance très approfondie d'indicateurs de santé d'une population proche de la population générale. On a vu l'intérêt que la biologie pouvait tirer de ces données à propos du cholestérol et des triglycérides. Cette manière d'aborder valeurs de références et valeurs observées est applicable à bien d'autres paramètres. Un effort national pourrait être entrepris afin d'améliorer la standardisation de la présentation pour mettre à la disposition de tous un recueil de données facilement utilisable qui serait régulièrement remis à jour et concernerait les paramètres présentant un intérêt en dépistage et en prévention.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- SIEST G., HENNY J., SCHIELE F., références en biologie clinique Paris, ELSEVIER 679, 1990
- 2- SIEST G., HENNY J., SCHIELE F., GUEGEN R., Le concept des valeurs de référence, ses relations avec les sources de variations des examens de laboratoire in références en biologie clinique, 1990, 23-42
- 3- HENNY J., HOUOT O., STEINMETZ J., SCHIELE F. et coll., Recueil de l'information, contrôle de la qualité, description de la population étudiée in références en biologie clinique, 1990,43-56
- 4- STEINMETZ J., Cholestérol total in références en biologie clinique, 1990, 193-209
- 5- VISVIKIS S., Triglycérides in références en biologie clinique, 1990, 609-624
- 6- GANCES, Recommandations pour les examens périodiques de santé. Caisse Nationale de l'Assurance Maladie des travailleurs salariés (CNAMTS), 1993, non publié.

IV - STANDARDISATION DU DOSAGE DES APOLIPOPROTÉINES A1 ET B

J. STEINMETZ

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

I. INTRODUCTION

Les études cliniques et épidémiologiques incluant la détermination des apolipoprotéines A1 et B parallèlement aux autres indicateurs de risque cardio-vasculaire se sont multipliées ces quinze dernières années. Récemment, le dosage de l'apo B a été proposé en remplacement de celui du cholestérol (1).

Même si les conclusions de certaines des études publiées font apparaître des discordances en fonction des populations retenues, l'intérêt du dosage des apolipoprotéines en tant que marqueur de risque cardio-vasculaire a été largement démontré. La diversité des méthodes de dosages a mis en évidence un défaut de standardisation et des difficultés pour comparer les résultats provenant de différents laboratoires.

II. NÉCESSITÉ DE LA STANDARDISATION

Plusieurs enquêtes de contrôle de qualité effectuées sur le plan national et international (2, 3) ont montré dans les années 80 que la dispersion interlaboratoire était importante et liée aux conditions analytiques employées (coefficients de variation (CV) inter-laboratoires de 20 à 25 % pour les apo A1 et de 15 à 30 % pour les apo B) (tableau 1).

Tableau 1 : Contrôle de qualité des Apo A1 et B organisé par le CRECQ 1988

| | | Immunodiffusion radiale | Immunonéphélométrie | Immunoturbidimétrie |
|--------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Codes techniques | | EA, EB, ... | GA, GK, GX, ... | HA, HD, HK, HX, ... |
| | Moyenne générale tronquée | (n = 66) | ; 1,18 ± 0,31 | ; CV = 26,4 % |
| Apo A1 (en g/l) | Moyenne par groupe de techniques | 1,37 ± 0,25 (n = 8) ; CV = 18,1 % | 1,39 ± 0,45 (n = 26) ; CV = 32 % | 1,10 ± 0,33 (n = 30) ; CV = 29,6 % |
| | Moyenne générale tronquée | (n = 70) | ; 0,88 ± 0,14 | ; CV 16,0 % |
| Apo B (en g/l) | Moyenne par groupe de techniques | 1,02 ± 0,11 (n = 6) ; CV = 10,8 % | 0,88 ± 0,15 (n = 25) ; CV = 17,2 % | 0,87 ± 0,13 (n = 35) ; CV = 14,8 % |

Les travaux de la commission de standardisation de l'ARCOL en collaboration avec l'industrie du bioréactif ont mis également en évidence une dispersion importante des résultats des apolipoprotéines quelle que soit la nature du trouble lipidique (sérums clairs ou sérums troubles), malgré l'utilisation d'un calibrant international de consensus (4). L'étalonnage en 6 points par utilisation de 6 échantillons sériques de concentrations croissantes permet de réduire la variabilité observée mais se révèle encore inadapté dans le cas de certains sérums normo ou hypertriglycéridémiques (4).

La standardisation des apolipoprotéines apparaît donc comme difficile en raison de la structure complexe de ces protéines d'une part, de l'absence de méthodes de référence ou de méthodes définitives d'autre part, pour attribuer une valeur à des préparations purifiées d'apolipoprotéines.

■ III. LA STANDARDISATION INTERNATIONALE

En 1989 sous l'égide de l'IFCC et en collaboration avec les industriels fabriquant du matériel ou des réactifs de dosage des apolipoprotéines, un programme de standardisation collaboratif a été initié (5). L'antisérum n'étant pas le principal responsable des disparités observées, si sa spécificité et son affinité sont suffisantes (6), le projet a porté essentiellement sur l'étalonnage.

En effet, l'absence de matériel de référence titré utilisable pour atteindre l'exactitude et la comparabilité des résultats obtenus par diverses méthodes est l'obstacle majeur à la standardisation. Les principales sources de variations sont liées à l'utilisation de matériels de calibrage différents : l'absence de linéarité, de parallélisme, un rapport de concentrations entre apolipoprotéines et anticorps dans le mélange réactionnel mal adapté, un effet de matrice, des dilutions inadéquates ont été ainsi mis en évidence (7).

L'étude a été réalisée en trois phases qui se sont succédées pendant plusieurs années.

Les objectifs de la première phase étaient :

- d'évaluer la part de variabilité induite par les différentes méthodes de calibrage selon les systèmes,
- de déterminer si l'utilisation de pools de sérums congelés utilisés comme matériel de référence intermédiaire permettait une harmonisation des résultats,
- d'évaluer et de sélectionner des préparations candidates au rôle de matériaux de référence internationaux.

Les objectifs de la seconde phase étaient d'évaluer la stabilité, la linéarité et le parallélisme des matériaux de référence candidats sélectionnés.

Enfin, les objectifs de la troisième phase étaient la certification des matériaux de référence sélectionnés, le transfert d'exactitude des valeurs cibles aux calibrants commercialisés pour aboutir à une amélioration de la comparabilité des données obtenues sur différents systèmes testés.

La première phase à laquelle ont participé 25 industriels et 3 laboratoires de recherche (ce qui représente 26 systèmes pour l'apo A1 et 28 pour l'apo B), a abouti aux résultats suivants (7). Une diminution relativement modeste des coefficients de variation inter-systèmes calculés sur 10 échantillons de sérums congelés a été observée. Pour l'apo A1, les valeurs des CV de 7 % avant calibrage uniforme diminuaient (5 %). Dans le cas de l'apo B, les CV inter-systèmes diminuaient de 19 % à 6 % (tableau II).

Tableau II : Évolution de la précision interlaboratoire des Apo A1 et B Moyennes et coefficients de variation avant et après calibrage uniforme (7)

| Échantillon | Apo A1 | | | Apo B | | |
|-------------|------------------------|---------------------|---------------------|------------------------|---------------------|---------------------|
| | Moyenne ^(a) | CV ^(b) % | CV ^(c) % | Moyenne ^(a) | CV ^(b) % | CV ^(c) % |
| 1 | 1.471 | 6.1 | 4.0 | 0.894 | 18.6 | 4.8 |
| 2 | 1.494 | 7.3 | 6.2 | 1.560 | 18.2 | 5.4 |
| 3 | 1.118 | 6.2 | 4.7 | 1.381 | 19.4 | 4.9 |
| 4 | 1.392 | 6.8 | 4.6 | 0.496 | 19.7 | 7.9 |
| 5 | 1.335 | 6.6 | 4.1 | 0.734 | 18.8 | 3.7 |
| 6 | 1.362 | 7.7 | 6.0 | 1.383 | 18.0 | 8.7 |
| 7 | 1.170 | 6.4 | 5.1 | 1.370 | 18.5 | 5.8 |
| 8 | 1.494 | 7.0 | 4.3 | 0.775 | 19.1 | 5.2 |
| 9 | 1.637 | 8.3 | 6.7 | 1.546 | 18.9 | 8.7 |
| 10 | 1.241 | 6.5 | 4.5 | 0.796 | 19.5 | 7.8 |

a) moyenne après calibrage uniforme

b) avant calibrage uniforme

c) après calibrage uniforme

La preuve était apportée que l'utilisation de matériaux de référence (MR) adaptés permet d'améliorer la comparabilité des données même pour un paramètre comme l'apo B.

De plus, parmi 15 préparations proposées, trois préparations lyophilisées pour l'apo A1 et 3 préparations de sérum liquide stabilisé pour l'apo B ont été sélectionnées pour une évaluation ultérieure en tant que MR internationaux grâce à leurs propriétés physico-chimiques : homogènes, optiquement clairs, présentant un blanc faible en néphélométrie même après plusieurs jours de conservation à 4°C, utilisables sur tous les systèmes testés, de composition et de mobilité électrophorétique proche de celle du sérum humain normal en gel d'agarose.

La seconde phase de cette étude internationale a abouti, par sélections successives à retenir parmi les MR candidats une préparation lyophilisée pour l'apo A1 : le SPI-01 préparé par Berhingwerke AG et une préparation liquide pour l'apo B le SP3-07 (Berhingwerke AG) en raison de leurs performances : linéarité comparable à celle de pools de sérum congelés ou frais et CV inter-systèmes de l'ordre de 6 % pour apo A1 et de 7 % pour apo B grâce à leur utilisation comme calibrants (8).

Enfin en 1993 et 1994, au cours de **la troisième phase** de transférabilité, la fiabilité du standard unique a été vérifiée dans des laboratoires de biologie clinique simultanément en Europe, en collaboration avec la SFBC et PARCOL, aux USA et au Japon (9, 10). L'objectif était d'obtenir dans des conditions de routine des résultats les plus proches possibles de la valeur conventionnelle vraie (11).

Dans ce contexte, le transfert d'exactitude vise à obtenir avec un système analytique utilisé en routine des résultats les plus proches possibles de ceux obtenus avec le système de référence.

Dans le cas des apolipoprotéines comme dans celui des protéines (12), l'approche a été de calibrer les MR par une méthode de référence avec un étalon primaire selon le schéma présenté dans la figure 1.

Une valeur cible de 1,50 g/l d'apo A1 dans le MR candidat SPI-01 a été déterminée par méthode radioimmunologique calibrée avec une préparation d'apo A1 purifiée, de masse déterminée par analyse des acides aminés (9). Puis, selon un protocole très précis, les firmes industrielles ont étalonné les calibrants, utilisés en routine, sur la valeur cible du MR SP1 et ont confirmé l'efficacité de ce transfert en dosant 50 sérums frais ou congelés de concentrations physiologiques et pathologiques. La valeur moyenne obtenue par chaque système est parfaitement en accord avec

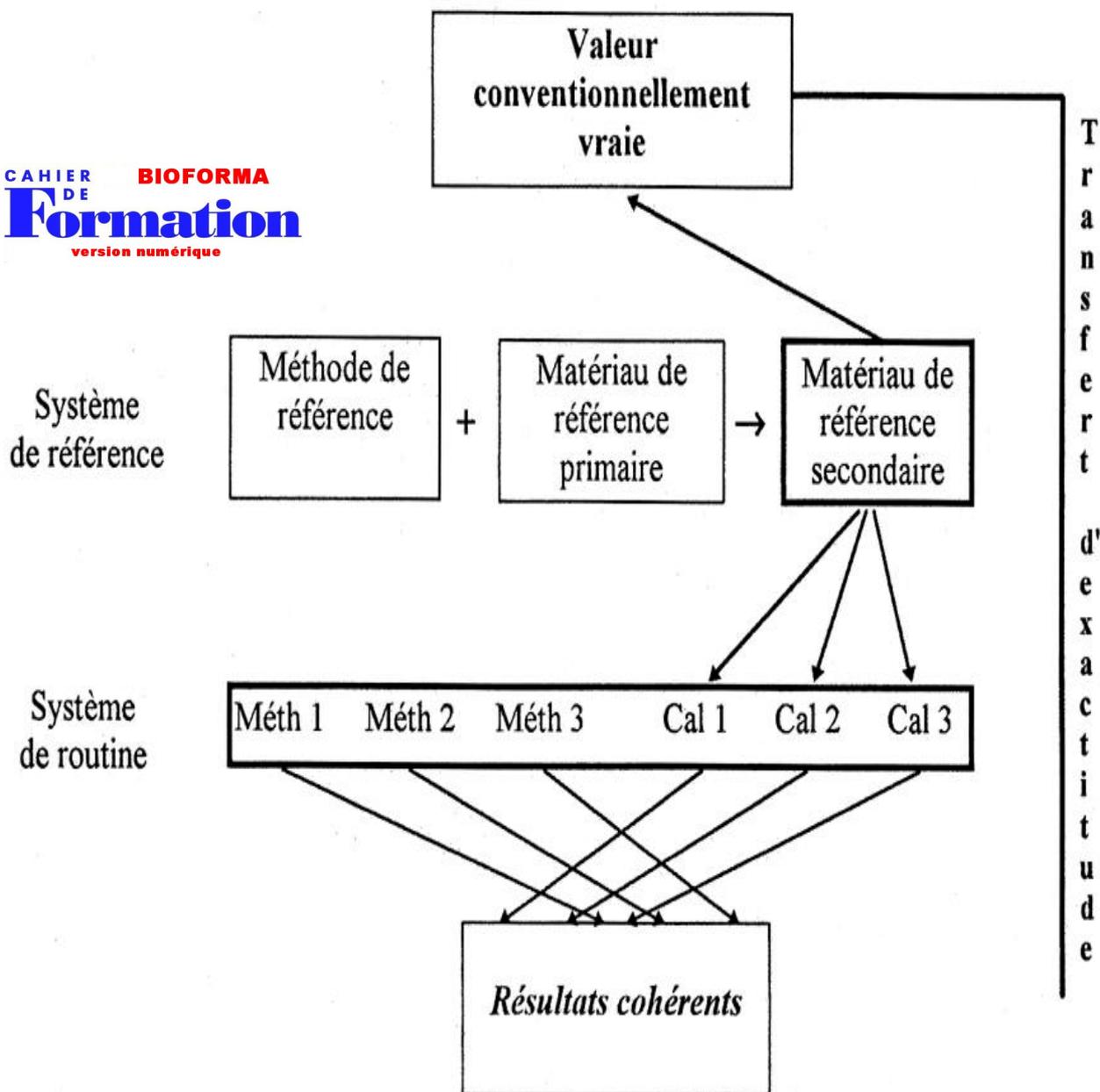


Figure 1 : Transfert d'exactitude : exemples de protéines (11)

la valeur assignée par le laboratoire de référence : sur 29 systèmes testés, le biais moyen varie de - 3,4 % à + 3,7 %. Vingt-cinq systèmes ont un biais absolu inférieur à 4 %, 3 ont un biais inférieur 5 % et une seule méthode a un biais supérieur, égal à 5,1 % (tableau III) (9).

Tableau III : Résultats de la standardisation internationale des Apo A1 et B (9,10)

| Compagnie | Système | Méthode | Apo A1 | | | Apo B | | |
|----------------------------------|----------------------|----------------|----------------|--------------------------------|-------|----------------|--------------------------------|-------|
| | | | C.V. moyen (%) | Biais moyen % (biais absolu %) | | C.V. moyen (%) | Biais moyen % (biais absolu %) | |
| Bacton Assay Systems | 550 Express | ITA fixed time | 1.6 | -0.1 | (1.1) | 1.4 | 1.3 | (3.9) |
| Bacton Assay Systems | CADRA 1 | ITA fixed time | 1.8 | 2.4 | (3.3) | - | - | - |
| Baxter Healthcare Corp. | Paramax | ITA fixed time | 2.6 | -0.2 | (2.8) | 2.3 | -1.7 | (4.2) |
| Bayer Diagnostici S.p.A. | Optimate | ITA endpoint | 1.8 | 0.3 | (2.4) | - | - | - |
| Bayer Manufacturing S.A. | RA-XT | ITA endpoint | 3.9 | 0.7 | (2.6) | 2.4 | -0.9 | (3.5) |
| Beckman Instruments | Array | INA rate | 2.0 | 1.0 | (1.9) | 1.5 | 3.6 | (4.0) |
| Behringwerke AG | BNA | INA fixed time | 3.0 | 1.6 | (2.0) | 3.3 | 0.4 | (1.7) |
| Behringwerke AG | Cobas Bio | ITA fixed time | 2.0 | 0.7 | (1.7) | - | - | - |
| Behringwerke AG | Lipo-Partigen | RID endpoint | 3.0 | -1.0 | (2.1) | - | - | - |
| BioMérieux | Technicon RA 1000 | ITA endpoint | 2.4 | -0.6 | (2.5) | 3.2 | 3.1 | (3.5) |
| Boehringer Mannheim GmbH | Hitachi 704 | ITA fixed time | 1.3 | -1.2 | (2.4) | 1.5 | -5.3 | (5.3) |
| Ciba-Corning Diagnostics Corp. | 550 Express | ITA fixed time | 1.6 | 3.7 | (4.6) | 1.5 | -1.2 | (4.1) |
| Daïchi Pure Chemicals Co., Ltd. | Hitachi 7050 | ITA endpoint | 2.1 | 0.1 | (3.0) | 0.9 | 3.6 | (6.0) |
| Daïchi Pure Chemicals Co., Ltd. | Daïchi RID | RID | 2.7 | -2.1 | (5.0) | 0.4 | -0.5 | (3.8) |
| Du Pont de Nemours B.V. | Dimension | ITA endpoint | 1.2 | -2.6 | (2.9) | 1.1 | -0.9 | (2.9) |
| Eiken Chemical Co., Ltd. | Hitachi 705 | ITA endpoint | 1.1 | 3.4 | (5.0) | 1.6 | -0.7 | (2.7) |
| Eldan Technologies Co., Ltd. | Greiner Delta 250 | ITA endpoint | 1.5 | -2.7 | (3.9) | 2.0 | -1.7 | (6.3) |
| Flemming GmbH | Cobas Mira | ITA endpoint | 2.0 | 0.7 | (2.1) | 1.6 | 0.4 | (1.5) |
| Immuno AG | Immuno RID | RID endpoint | 1.5 | 2.4 | (3.8) | 4.5 | 4.7 | (6.0) |
| Incstar Corp. | Cobas Bio | ITA fixed time | 1.7 | 1.0 | (1.8) | 2.2 | -0.7 | (2.1) |
| Miles-Technicon Corp. | DPA-1 | INA | 2.2 | -0.4 | (1.8) | - | - | - |
| Orion Diagnostica | Koné Progress | ITA fixed time | 1.3 | 0.4 | (2.4) | 2.3 | -0.7 | (4.5) |
| Reagents Applications, Inc. | Cobas Bio | ITA fixed time | 3.3 | -3.4 | (3.9) | 1.7 | -1.6 | (3.0) |
| Roche Diagnostic Systems, Inc. | Cobas Bio | ITA endpoint | 3.9 | -0.3 | (2.5) | 1.6 | -2.3 | (2.7) |
| Roche Diagnostic Systems, Inc. | Cobas Mira S | ITA endpoint | 1.7 | 0.7 | (1.4) | 2.7 | 2.3 | (3.1) |
| Rogosin Institute | Cobas Fara II | ITA endpoint | 3.4 | 1.1 | (2.6) | 1.7 | -1.0 | (2.3) |
| Rogosin Institute | Cobas Mira | ITA endpoint | 1.7 | 1.5 | (1.9) | 2.1 | 1.3 | (2.7) |
| Sanofi Diagnostics Pasteur, Inc. | OM 300 | INA rate | 2.5 | 0.7 | (3.0) | 1.9 | 0.5 | (4.6) |
| Sanofi Diagnostic Pasteur N600 | Nephelometer S8 | ITA endpoint | 3.2 | 3.2 | (5.1) | 1.9 | -4.5 | (4.5) |
| Sébia | Hydragel apo A1 et B | EIA | - | - | - | 5.0 | 3.8 | (6.3) |

ITA : immuno turbidimétrie EIA : électro immuno diffusion
 INA : immuno néphélométrie RID : radial immuno diffusion

De plus, les CV inter-systèmes calculés sur chacun des 50 échantillons sont inférieurs à 5,6 % (9) (tableau IV).

Tableau IV : Variabilité des résultats obtenus sur les systèmes standardisés IFCC en fonction des sérums (9, 10)

| | | |
|---------------|---|---|
| Apo A1 | = | 29 systèmes standardisés |
| | | C.V. inter-système = 2,1 à 5 % pour 46 sérums |
| | | C.V. inter-système = entre 5 et 5,6 % pour 4 sérums |
| Apo B | = | 25 systèmes standardisés |
| | | C.V. inter-système = 3,1 à 5 % pour 16 sérums |
| | | C.V. inter-système = 5 à 5,5 % pour 3 sérums |
| | | C.V. inter-système = 6,7 % pour 1 sérum |

Dans le cas de l'apo B, un protocole voisin a été mis en place (10). La valeur cible du MR candidat SP3 égale à 1,22 g/l a été attribuée par une méthode néphélométrique calibrée avec des LDL fraîchement isolées et dans lesquelles la concentration en apo B avait été déterminée dans

plusieurs laboratoires par la méthode de Lowry. Les CV interlaboratoires calculés sur 20 échantillons varient de 3,1 à 6,7 % (tableau IV) et les biais moyens par rapport à la valeur assignée varient de - 5,3 % à + 4,7 %, le biais absolu étant inférieur à 5 % pour 20 systèmes sur 25 (tableau III).

Ces MR, certifiés par l'OMS et disponibles en quantité limitée ne sont pas destinés à être utilisés quotidiennement dans les laboratoires mais doivent servir à étalonner systématiquement les calibrants produit par les industriels et employés sur les systèmes standardisés.

■ IV. CONSÉQUENCES DE LA STANDARDISATION DES APOLIPOPROTÉINES

La standardisation a entraîné une nette amélioration de la justesse des méthodes avec des conséquences sur l'efficacité diagnostique des résultats transmis (11). Le transfert de l'exactitude d'une méthode de référence vers des techniques de routine permet d'établir non seulement de nouvelles valeurs de référence en fonction de l'âge et du sexe, mais aussi des valeurs seuil de décision entre différents groupes de patients définis du point de vue de leur état pathologique. Plus généralement, l'utilisation de données établies par des équipes de recherche devient directement possible par suite de la transférabilité des données. La réalisation de ces progrès est liée à une collaboration entre biologistes, industriels du bioréactif et sociétés savantes.

La standardisation des apolipoprotéines semble à cet égard exemplaire puisqu'un groupe de travail SFBC-ARCOL-SFRL a été créé en 1994 sur l'initiative des industriels afin d'établir les valeurs de références des apo A1 et B sur les systèmes analytiques ayant suivi toutes les étapes de la standardisation de l'IFCC.

Maîtrise de la variabilité analytique

Avec le développement des calibrateurs validés, les différences liées à la technique ou à l'emploi d'un calibrateur non validé ont été grandement corrigées. Les résultats obtenus lors d'un récent échange interlaboratoire effectué sur le plan national (chapitre II - pp. 49-63) ont mis en évidence une amélioration de la précision interlaboratoire des résultats puisque le CV calculé sur 37 systèmes différents est inférieur à 11 % pour l'apo A1 et à 11,5 % pour l'apo B.

Dans le cadre de l'étude SFBC-ARCOL-SFRL (13), les fabricants se sont engagés à utiliser des techniques préalablement validées selon les critères IFCC (tableau V) et les standards préalablement calibrés par rapport aux matériaux de référence IFCC-OMS, SP1 pour l'apo A1 et SP3 et pour l'apo B. Des mêmes lots de réactifs et de standard ont été utilisés pour toute l'étude par chaque participant.

Tableau V : Liste des industriels ayant participé à l'étude Systèmes et méthodes utilisés (13)

| Compagnies | Systèmes analytiques | Méthodes |
|--------------------------|----------------------|----------------|
| Bayer Diagnostics | RA-XT | IT point final |
| Beckman Instruments | Arrav | IN cinétique |
| Biomedical Diagnostics | Cobas Bio | IT point final |
| Biomérieux | Technicon RA 1000 | IT point final |
| Ciba Corning Diagnostics | 550 Express | IT temps fixe |
| Dade SA Baxter | Paramax RX | IT temps fixe |
| Du Pont De Nemours | Dimension | IT point final |
| Kone Instruments | Kone Specific | IT temps fixe |
| Roche Diagnostic | Cobas | IT point final |

IT : Immuno turbidimétrie IN: Immuno néphélogométrie

Outre le contrôle de qualité pratiqué selon la procédure propre à chaque laboratoire participant et laissé à l'initiative de chacun, un contrôle de qualité spécifique a été mis en place. Des aliquotes d'un pool de sérum, congelées à - 20 °C, ont été distribuées et dosées en même temps que les sérums des patients pendant une période de 3 mois. Les résultats obtenus ont permis d'évaluer la précision intra et interlaboratoire.

Les coefficients de variation intralaboratoires sont inférieurs à 5 % pour l'apo A1 (tableau VI). En ce qui concerne l'apo B, seul un système analytique présente un coefficient de variation légèrement supérieur à 5 % (CV = 6,10 %).

La variation analytique interlaboratoire a été estimée par comparaison de la valeur moyenne du pool de sérum congelé obtenue sur chaque système à la valeur moyenne de l'ensemble des systèmes. Les résultats obtenus s'écartent de moins de 3,2 % de la moyenne générale pour l'apo B et de moins de 4 % pour l'apo A1. Un seul système fournit des résultats supérieurs à la limite fixée à + 5 % par rapport à la moyenne générale (moyenne = 1,85 g/l, + 10 %).

Tableau VI : Précision intralaboratoire du dosage des Apo A1 et B évaluée sur un pool de sérum congelé dosé sur les systèmes standardisés (13)

| Système | Apo A1 (g/l) | | | Apo B (g/l) | | |
|---------|--------------|------|--------|-------------|------|--------|
| | Nombre | m | C.V. % | Nombre | m | C.V. % |
| 1 | 195 | 1,67 | 3,50 | 195 | 1,06 | 4,99 |
| 2 | 110 | 1,72 | 4,67 | 109 | 1,04 | 3,68 |
| 3 | 77 | 1,64 | 3,75 | 77 | 1,00 | 4,29 |
| 4 | 81 | 1,70 | 2,17 | 81 | 1,05 | 1,58 |
| 5 | 75 | 1,65 | 3,80 | 75 | 1,00 | 4,34 |
| 6 | 101 | 1,61 | 3,60 | 107 | 1,02 | 3,80 |
| 7 | 77 | 1,85 | 4,59 | 81 | 1,10 | 3,97 |
| 8 | 20 | 1,70 | 3,22 | 20 | 1,09 | 6,10 |
| 9 | 50 | 1,72 | 2,20 | 50 | 1,03 | 3,23 |

NB : Les systèmes ne sont pas classés par ordre alphabétique.

Apo A1 : Moyenne générale = 1,68 g/l, limites $\pm 5\%$ = 1,59 - 1,77 g/l

Apo B : Moyenne générale = 1,05 g/l, limites $\pm 5\%$ = 1,00 g/l- 1,10 g/l

■ V. VALEURS DE RÉFÉRENCE DES APOLIPOPROTÉINES

La population nécessaire à l'établissement des valeurs de référence a été recrutée dans la population supposée saine, subissant à jeun un examen de santé dans les deux Centres d'Examen de Santé de Vandoeuvre-Lès-Nancy et Tours.

Les sujets âgés de 4 à 60 ans (522 hommes et 505 femmes) ont été sélectionnés a posteriori selon des critères biologiques, morphologiques et cliniques très stricts, sans antécédents familiaux de maladie cardio-vasculaire et sans traitement. Les sérums ont été séparés en plusieurs aliquotes, congelées le jour du prélèvement, conservées à - 20 °C et envoyées régulièrement à chaque participant.

Si on analyse les résultats des apo A1, pour les centiles 50 et 97,5 de la population de référence non stratifiée selon l'âge et le sexe, des discordances apparaissent pour 2 systèmes (tableau VII). Ces systèmes fournissent des résultats différents tant pour la valeur médiane (1,38 et 1,66 g/l) que pour les valeurs supérieures (1,87 et 2,24 g/l). Les 7 autres systèmes ne s'éloignent pas de $\pm 0,10$ g/l les uns des autres, même dans les valeurs élevées.

Les valeurs pour le centile 2,5 %, qui est finalement la limite clinique intéressante pour l'apo A1, sont quant à elles beaucoup moins dispersées : elles varient de 1,04 à 1,16 g/l seulement. Les résultats du système 7 qui donnait un résultat par excès pour le pool de sérum, sont en accord avec l'ensemble des autres systèmes, ce qui signifierait que les résultats observés sur un mélange de sérum ne sont pas toujours transposables à des échantillons individuels.

Quand à l'apo B, les résultats pour le centile 50 varient de 0,83 à 0,89 g/l avec une valeur à 0,78 g/l (système 9). La limite à 97,5 %, elle, est de 1,30 à 1,39 g/l, ce qui nous paraît représenter une variation tout à fait acceptable. Un seul système pose encore un problème de linéarité puisqu'il sous-estime les valeurs élevées.

La plupart des systèmes donnent donc des résultats, pour la limite supérieure de la distribution qui s'écartent peu de la limite de décision à 1,30 g/l généralement acceptée, ceci compte-tenu de la variation analytique évaluée à 5 %. L'analyse de variance montre cependant que les résultats obtenus par les différentes techniques restent statistiquement différents.

Tableau VII : Valeurs de référence des Apo A1 et B
Dosages réalisés sur les systèmes standardisés utilisés en France (13, 14)

| Systèmes | Nombre | Apo A1 | | | Apo B | | |
|-----------|--------|--------|------|-------|-------|------|-------|
| | | 2,5% | 50% | 97,5% | 2,5% | 50% | 97,5% |
| 1 | 1 027 | 1,13 | 1,55 | 2,09 | 0,50 | 0,87 | 1,39 |
| 2 | 1 027 | 1,07 | 1,43 | 1,96 | 0,51 | 0,84 | 1,30 |
| 3 | 994 | 1,15 | 1,50 | 2,07 | 0,57 | 0,89 | 1,33 |
| 4 | 1 017 | 1,04 | 1,45 | 2,13 | 0,51 | 0,86 | 1,36 |
| 5 | 1 022 | 1,12 | 1,48 | 1,98 | 0,55 | 0,84 | 1,20 |
| 6 | 1 020 | 1,04 | 1,38 | 1,87 | 0,51 | 0,83 | 1,33 |
| 7 | 1018 | 1,12 | 1,59 | 2,14 | 0,43 | 0,83 | 1,30 |
| 8 | 965 | 1,16 | 1,66 | 2,24 | 0,53 | 0,87 | 1,30 |
| 9 | 985 | 1,11 | 1,55 | 2,13 | 0,45 | 0,78 | 1,31 |
| (réf. 13) | 1303 | 1,12 | 1,52 | 2,04 | 0,49 | 0,85 | 1,32 |

■ VI. CONCLUSION

Grâce à un effort concerté, la standardisation des apolipoprotéines A1 et B a abouti à une homogénéisation des résultats. D'autres paramètres biologiques sont en cours de standardisation, la Lp(a) dans l'immédiat et l'apo E dans un deuxième temps. Cependant, il n'est pas recommandé d'utiliser des limites de référence communes à tous les systèmes : elles doivent rester spécifiques du couple appareil-réactif.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- SNIDERMAN A.D., CIANFLONE K., Measurement of apoproteins: time to improve the diagnosis and treatment of the atherogenic dyslipoproteinemias, *Clin. Chem.* 42, 1996, 489-491
- 2- STEINBERG K.K., COOPER G.R., GRAISER S.R., ROSSENEU M., Some considerations of methodology and standardization of apolipoprotein A1 immuno assays, *Clin. Chem.* 29, 1983, 415-426
- 3- ROSSENEU M., VERCAEMST R., STEINBERG K.K., COOPER G.R., Some consideration of methodology and standardization of apolipoprotein B immuno assays, *Clin. Chem.* 29, 1983, 427-432
- 4- BEUGLER I., CAGES E., CAMARET R., DACHET C. et al., Utilisation de 6 calibrants sériques pour standardiser les dosages des apolipoprotéines A1 et B dans le sérum humain, *Ann. Biol. Clin.* 48, 1990, 443-447
- 5- MARCOVINA S.M., ALBERS J.J., DATI F., LEDUE T., RICHTIE R.F., International Federation of Clinical Chemistry standardization project for measurements of apolipoproteins A1 and B, *Clin. Chem.* 37, 1991, 1676-1682
- 6- HENDERSON L.O., HANNON W.H., SMITH S.J., COOPER G.R., An international collaborative study on A1 and B. Part II: Evaluation of contribution of antisera to standardisation of apolipoproteins among-laboratory variance components, *Clin. Chem.* 33, 1987, 2250-2256
- 7- SMITH S.J., COOPER G.R., HENDERSON L.O. et al., An international collaborative study on standardization of apolipoproteins A1 and B. Part I. Evaluation of a lyophilized candidate reference and calibration material, *Clin. Chem.* 33, 1987, 2240-2249
- 8- ALBERS J.J., MARCOVINA S.M., KENNEDY H., International Federation of Clinical Chemistry standardization project for measurements of apolipoproteins A1 and B. II: Evaluation and selection of candidate reference materials, *Clin. Chem.* 38, 1992, 658-662
- 9- MARCOVINA S.M., ALBERS J.J., HENDERSON L.O., HANNON W.H., International Federation of Clinical Chemistry standardization project for measurements of apolipoproteins A1 and B. III: Comparability of Apolipoprotein A1 Values by Use of International Reference Material, *Clin. Chem.* 39, 1993, 773-781
- 10- MARCOVINA S.M., ALBERS J.J., HENDERSON L.O., HANNON W.H., International Federation of Clinical Chemistry standardization project for measurements of apolipoproteins A1 and B. IV: Comparability of Apolipoprotein B Values by use of International Reference Material, *Clin. Chem.* 40, 1994, 586-592
- 11- FÉRARD G., BIENVENU J., LESSINGER J.R., LATER R., 1995: un progrès décisif dans la transférabilité interlaboratoire des résultats grâce aux matériaux de référence d'enzyme et de protéines, *Ann. Biol. Clin.* 53, 1995, 469-471

- 12- BIENVENU J., LATER R., PONTET F., Le matériau de référence (CRM 470) pour les protéines sériques : préparation, caractéristiques et conditions d'utilisation, *Ann. Biol. Clin.* 53, 1995, 499-505
- 13- STEINMETZ J., HENNY J., Établissement des valeurs de référence des apolipoprotéines A1 et B. Résultats de l'étude multicentrique coordonnée par le groupe SFBC-ARCOL-SFRL, Corata Lille, 12 octobre 1995.
- 14- STEINMETZ J., TARALLO P., FOURNIER B., SIEST G., Reference limits of apolipoprotein A1 and apolipoprotein B using IFCC standardized immunonephelometric method, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 33, 1995, 337-342

CAHIER DE
Formation
Biologie médicale

Cahiers de formation déjà parus

- | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| N° 1 : HÉMATOLOGIE | N° 15 : DÉPISTAGE |
| N° 2 : IMMUNOANALYSE | DE LA TRISOMIE 21 |
| N° 3 : PARASITOLOGIE | N° 16 : IMMUNO-ALLERGIE (2) |
| N° 4 : BACTÉRIOLOGIE | N° 17 : VIRUS DES HÉPATITES |
| N° 5 : HORMONOLOGIE | A (VHA) et E (VHE) |
| GAZOMÉTRIE | N° 18 : DOSAGE DES MÉDICAMENTS |
| N° 6 : G.B.E.A. | TOME II |
| N° 7 : IMMUNO-ALLERGIE (1) | N° 19 : VAGINITES ET VAGINOSES |
| N° 8 : HÉMOGLOBINES GLYQUÉES | N° 20 : HÉMOSTASE ET THROMBOSE |
| LIPIDES | N° 21 : VIRUS DES HÉPATITES |
| N° 9 : DOSAGE DES MÉDICAMENTS | B (VHB), DELTA (VDH), |
| TOME I | C (VHC), AUTRES |
| N° 10 : HÉMATOLOGIE | N° 22 : SYNDROME |
| CAS ILLUSTRÉS | DES ANTI-PHOSPHOLIPIDES |
| N° 11 : AMIBES ET FLAGELLÉS | N° 23 : PARASITES SANGUINS |
| INTESTINAUX | N° 24 : BIOCHIMIE PEDIATRIQUE |
| N° 12 : LES MALADIES A PRIONS | N° 25 : LES MOISSISSURES |
| N° 13 : AUTOIMMUNITÉ | D'INTÉRÊT MÉDICAL |
| ET AUTOANTICORPS | |
| N° 14 : L'EXPLORATION | |
| DE LA THYROÏDE | |

BIOFORMA est la structure nationale qui gère et organise la formation continue conventionnelle des directeurs et directeurs adjoints de L.a.b.m. privés.

Cette formation continue est financée par les trois Caisses Nationales de l'Assurance Maladie (C.N.A.M.T.S., C.C.M.S.A., et C.A.N.A.M.) dans le cadre de la convention passée entre elles et les trois syndicats de biologistes. (S.d.B., S.N.M.B., et S.L.B.C.).

A ce titre, BIOFORMA édite des cahiers de formation comme celui-ci.

Ces ouvrages sont distribués à chaque laboratoire d'analyse de biologie médicale, privés et hospitaliers, aux inspecteurs des DRASS, aux pharmaciens et médecins conseils des CRAM, aux responsables de la DGS et du Ministère de la Santé. Les précédents numéros, ou épuisés en version papier, seront disponibles à la consultation sur le site Internet www.bioforma.net à partir de 2002.

Ces livres ne sont pas en vente dans le commerce et le tirage est de 6 500 exemplaires.