

Hémoglobine N Baltimore : quelles conséquences sur le dosage de l'HbA1c ?

Effect of hemoglobin N Baltimore on HbA1c measurement in six methods

Caroline Ratnam¹
Thu Hai Yen Tran Houangkeo²
Stéphane Moutereau³
Julie Plantamura¹
Mathilde Sollier⁴
Cyril Garcia⁴
Hervé Delacour^{1,5}

¹ Hôpital d'instruction des armées
Bégin, Département des laboratoires,
Saint-Mandé, France

² Hôpitaux universitaires Pitié
Salpêtrière – Charles Foix, Biochimie
métabolique, Paris, France

³ Hôpitaux universitaires Henri Mondor,
Département de biochimie-
pharmacologie-biologie
moléculaire-génétique médicale,
Créteil, France

⁴ Hôpital d'instruction des armées
Bégin, Service d'endocrinologie,
Saint-Mandé, France

⁵ Ecole du Val-de-Grâce, Paris, France
<herve.delacour@intradef.gouv.fr>

Résumé. En présence d'un variant de l'hémoglobine, la valeur sémiologique de l'HbA1c peut être altérée par modification de la demi-vie des hématies, altération du processus de glycation de l'hémoglobine ou interférence analytique. Nous avons évalué l'impact d'un variant rare de l'hémoglobine (hémoglobine N Baltimore) sur les performances analytiques de six techniques de dosage de l'HbA1c : deux méthodes immunologiques (Tina-quant[®] HbA1c Gen et DCA Vantage), trois méthodes chromatographiques (G8 HPLC, Variant II Turbo A1c 2.0 et Variant II Dual kit) et une méthode électrophorétique (Capillarys Hb A1c kit). La présence de l'hémoglobine N Baltimore a des conséquences différentes sur le dosage d'HbA1c selon les méthodes mises en œuvre : impossibilité de rendre un résultat (Capillarys Hb A1c kit), sous-estimation de la valeur d'HbA1c (G8 HPLC, Variant II Turbo A1c 2.0 et Variant II Dual kit), impact limité sur la valeur d'HbA1c (Tina-quant[®] HbA1c Gen et DCA Vantage). Dès lors il convient de garder à l'esprit que la présence d'un variant de l'hémoglobine doit être suspectée en cas d'inadéquation entre le résultat du dosage de l'HbA1c et le contexte clinico-biologique. Un dosage d'HbA1c avec une ou plusieurs techniques alternatives ainsi qu'une recherche d'un variant de l'hémoglobine doivent être réalisés pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Mots clés : *hémoglobine glyquée, interférence, hémoglobine N Baltimore*

Abstract. The presence of hemoglobin variants can adversely affect the accuracy of some HbA1c methods depending on the variant. We examine the analytical interference from a rare Hb variant (Hb N Baltimore) with six different HbA1c methods using various method principles: two immunoassays methods (Tina-quant[®] HbA1c Gen et DCA Vantage), three high-performance liquid chromatography methods (G8 HPLC, Variant II Turbo A1c 2.0 et Variant II Dual kit), and one capillary-electrophoresis method (Capillarys Hb A1c kit). Hb N Baltimore can adversely affect determination of HbA1c levels. An underestimation of HbA1c level is observed with the chromatographic methods included in this study and no HbA1c result can be obtained with the capillary-electrophoresis method. Inversely, limited impact is observed with the immunoassays methods. The presence of an hemoglobin variant should be suspected when inconsistencies are observed between a patient's home blood glucose monitoring and laboratory-measured HbA1c. In these situations additional testing should be carried out using a test based on a different analytical method.

Key words: *glycated hemoglobin A, interference, hemoglobin N Baltimore*

Article reçu le 24 mai 2018,
accepté le 12 janvier 2019

Tirés à part : H. Delacour

L'hémoglobine A1c (HbA1c) constitue l'examen de référence pour la surveillance de l'équilibre glycémique des patients diabétiques et l'évaluation du risque de survenue des complications associées à cette maladie [1, 2]. La standardisation des différentes méthodes de dosage de l'HbA1c menée par le *National glycohemoglobin standardization program* (NGSP) et par l'*International federation of clinical chemistry* (IFCC) a permis de minimiser la variabilité analytique de cet examen [3]. En présence d'un variant de l'hémoglobine, la valeur sémiologique de l'HbA1c peut être altérée par modification de la demi-vie des hématies, altération du processus de glycation de l'hémoglobine ou interférence analytique [4]. De nombreux travaux ont évalué l'impact des cinq hémoglobinopathies les plus fréquentes (Hb S, Hb C, Hb E, Hb D et persistance d'Hb F) sur les performances analytiques des différentes techniques de dosage de l'HbA1c. Ces données sont compilées sur le site du NGSP et sont généralement mentionnées dans les notices techniques des coffrets [5]. Toutefois, plus de 900 variants des chaînes de globine sont décrits dans la littérature, chacun pouvant impacter ou non le dosage de l'HbA1c [5-7].

L'observation

Dans ce contexte, nous avons évalué l'impact d'un de ces variants de la chaîne β , l'hémoglobine N Baltimore (NM_000518.4 :c.286A>G, NP_000509.1 :p.Lys96Glu, rs33914359) sur six techniques de dosage de l'HbA1c : deux méthodes immunologiques (Tina-quant® HbA1c Gen. 3 sur système Cobas® 6000 Roche Diagnostics et DCA Vantage Siemens), trois méthodes chromatographiques (G8 HPLC Tosoh Biosciences, Variant II Turbo A1c 2.0 Biorad et Variant II Dual kit Biorad) et une méthode électrophorétique (Capillarys Hb A1c kit Sebia). Ces six techniques sont mises en œuvre par plus de 60 % des participants du programme d'évaluation externe de la qualité Probioqual [8].

Les prélèvements veineux recueillis sur tubes EDTA ont été effectués chez un patient diabétique connu pour présenter une hémoglobine N Baltimore à l'état hétérozygote. Après recueil du consentement éclairé du patient, l'identification

formelle de ce variant d'hémoglobine a été effectuée par un séquençage Sanger du gène codant pour les chaînes de globine bêta. Des fractions aliquotes de sang total ont été envoyées à différents laboratoires pour dosage de l'HbA1c avec les différentes méthodes mises en œuvre dans ce travail. Parallèlement, un dosage des fructosamines (coffret FRA sur Cobas® 6000, Roche Diagnostics) a été réalisé sur le même prélèvement. Par ailleurs, des fractions aliquotes de trois autres prélèvements provenant de patients ne présentant pas d'hémoglobinopathie ont été envoyées à chaque laboratoire et ont permis de vérifier l'adéquation interlaboratoire des résultats d'HbA1c en l'absence de variant d'hémoglobine. Les dosages ont été réalisés selon les recommandations des différents fournisseurs. Les résultats obtenus pour l'échantillon avec l'hémoglobine N Baltimore sont résumés dans le *tableau 1*.

Discussion

La présence à l'état hétérozygote de l'hémoglobine N Baltimore rend impossible le dosage de l'HbA1c avec la méthode d'électrophorèse capillaire. Ce variant co-élué avec la fraction HbA1c. Le profil observé est identifié comme anormal par le logiciel embarqué de l'analyseur et aucun résultat n'est disponible (*figure 1*).

Deux méthodes chromatographiques (G8 HPLC et Variant II Turbo A1c 2.0) donnent des résultats similaires (4,8 % et 4,7 % d'HbA1c respectivement). Aucun message d'alarme n'est notifié par les logiciels embarqués des analyseurs, les profils chromatographiques étant proches de ceux observés chez des patients ne présentant pas de variant d'hémoglobine (*figure 1*). Les valeurs d'HbA1c obtenues sont incohérentes avec la valeur des fructosamines mesurée (284 $\mu\text{mol/L}$ soit 3,93 $\mu\text{mol/g}$ de protéines). Au regard de notre expérience, une valeur d'HbA1c inférieure à 5 % est associée à une valeur de fructosamines inférieure à 210 $\mu\text{mol/L}$ (soit une valeur inférieure à 2,91 $\mu\text{mol/g}$ de protéines dans le cas de ce patient). L'utilisation de ces deux techniques peut donc conduire à une sous-estimation de la valeur de l'HbA1c en présence de ce variant d'hémoglobine. La valeur d'HbA1c estimée à l'aide de la technique Variant II Dual kit est sensiblement supérieure

Tableau 1. Résumé des résultats du dosage d'HbA1c obtenus avec les différentes méthodes évaluées et du dosage des fructosamines.

Hb A1c (%)					Fructosamines ($\mu\text{mol/L}$)	
Méthodes immunologiques		Méthodes chromatographiques			Méthode électrophorétique	
Tina-quant® HbA1c Gen. 3 (Cobas® 6000)	DCA Vantage	G8 HPLC	Variant II Turbo A1c 2.0	Variant II Dual kit	Capillarys Hb A1c kit	FRA (Cobas® 6000)
7,2	7,2	4,8	4,7	6,3	Non dosable	284

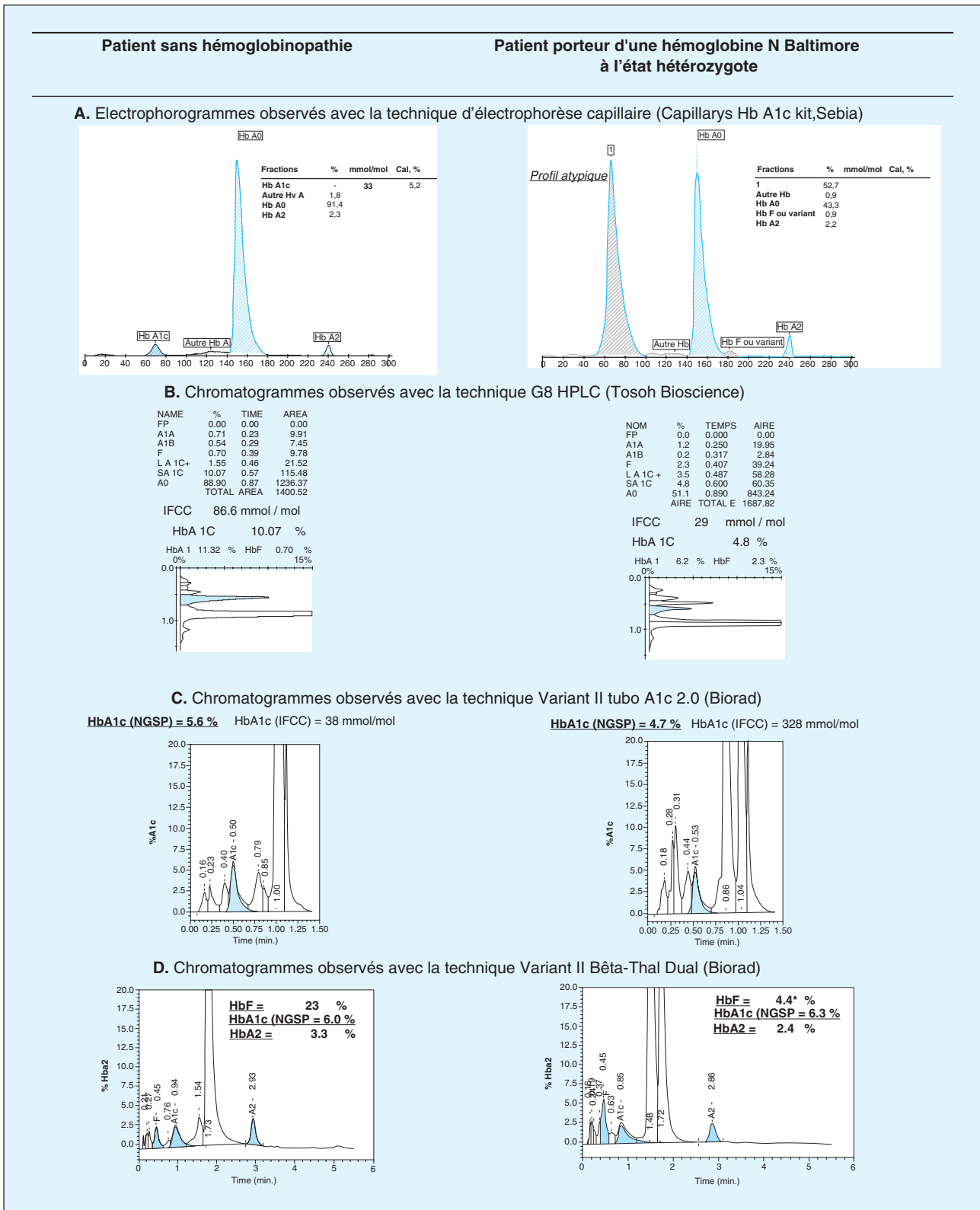


Figure 1. Comparaison des profils électrophorétiques ou chromatographiques observés chez un sujet sans hémoglobinopathie et chez le sujet présentant une hémoglobine N Baltimore à l'état hétérozygote avec les techniques (A) Capillarys Hb A1c kit (Sebia) (B), G8 HPLC (Tosoh Biosciences), (C) Variant II Turbo A1c 2.0 (Biorad) et (D) Variant II Dual kit (Biorad).

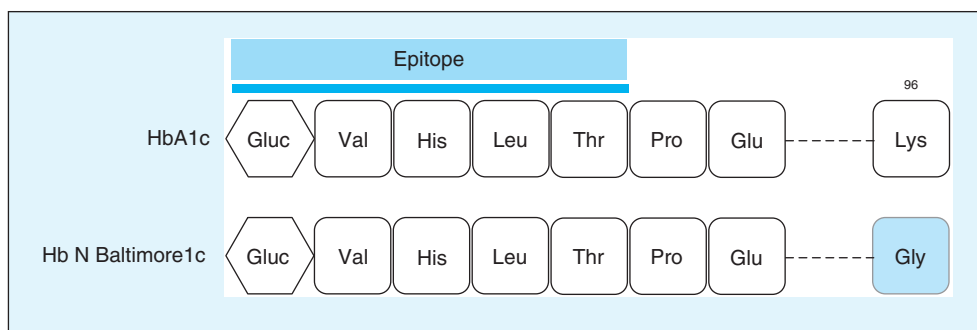


Figure 2. Epitope d'identification de la glycation de la chaîne de β-globine par l'anticorps Tina-quant® HbA1c (Roche Diagnostics). La variation protéique associée à l'hémoglobine N Baltimore (p.Lys96Gly) n'a pas d'impact sur la réaction antigénique support du dosage.

(HbA1c : 6,3 %). Toutefois, les mêmes limites peuvent être émises : absence de notification d'un profil anormal, sous-estimation probable de l'HbA1c. Il est également à noter sur les différents chromatogrammes la présence d'un pic, compris entre 2,3 et 4,4 %, identifié comme de l'HbF. Il s'agit probablement du pic correspondant à l'Hb N Baltimore glyquée.

Les deux techniques immunologiques donnent des résultats identiques avec une valeur d'HbA1c (HbA1c : 7,2 %) en adéquation avec la concentration en fructosamines observée. Ces techniques ne semblent donc pas impactées par la présence de l'hémoglobine N Baltimore à l'état hétérozygote. Ces deux techniques reposent sur l'utilisation d'un anticorps reconnaissant le résidu N-terminal glyqué de quelques acides aminés de la chaîne β de globine. Dans le cas de l'hémoglobine N Baltimore, la variation protéique observée (p.Lys96Glu) est située à distance de cet épitope et n'impacte donc pas la liaison épitope – paratope (figure 2). Toutefois, le calcul de l'HbA1c par le logiciel embarqué des analyseurs ne peut tenir compte de la présence du variant et du pourcentage d'HbA inférieur à la normale. Le résultat d'HbA1c est donc impacté et potentiellement faux, malgré l'absence de message d'alarme induit par la présence du variant d'hémoglobine. Toutefois, la bonne adéquation entre les dosages d'HbA1c et des fructosamines semble indiquer que l'impact de l'Hb N Baltimore à l'état hétérozygote sur ces deux techniques est limité [7].

Nos résultats ne sont pas en accord avec ceux rapportés par Little *et al.* [9]. Selon ces auteurs, si la présence de l'hémoglobine N Baltimore impactait la technique G8 HPLC, elle était sans conséquence sur les techniques Tina-quant® HbA1c et Variant II Turbo A1c 2.0. Les autres techniques évaluées dans le cadre de notre travail n'avaient pas été étudiées dans cette publication. Selon Lorenzo-Medina *et al.*, la présence de l'hémoglobine N Baltimore induit également une sous-estimation de l'HbA1c avec les techniques Adams® HA-8160 et HA-8180 (ELITech Group), deux techniques chromatographiques peu utilisées par les participants au programme Probioqual [8, 10]. À

l'inverse, une surestimation de l'HbA1c en présence de cette hémoglobinopathie ne doit pas être exclue comme l'illustre le cas rapporté par Nyenwe [11].

Il apparaît que la présence de l'hémoglobine N Baltimore a des conséquences différentes sur le dosage d'HbA1c selon les méthodes mises en œuvre : impossibilité de rendre un résultat, sous-estimation ou surestimation de la valeur d'HbA1c, impact limité sur la valeur d'HbA1c. Il n'est pas impossible que ces conséquences soient variables selon les patients, comme en témoignent les différences observées entre ce travail et celui de Little *et al.* Il convient de souligner que ces auteurs ne signalaient une interférence de l'hémoglobine N Baltimore sur la technique G8 HPLC que chez deux des trois patients inclus dans leur étude.

Conclusion

La présence d'un variant de l'hémoglobine doit être suspectée en cas d'inadéquation entre le résultat du dosage de l'HbA1c et le contexte clinico-biologique (auto-surveillance glycémique du patient, dosage des fructosamines, franche variation du dosage d'HbA1c suite à un changement de technique...). Dans ces circonstances, un dosage d'HbA1c avec une ou plusieurs techniques alternatives ainsi qu'une recherche d'un variant de l'hémoglobine doivent être réalisés pour confirmer ou infirmer cette hypothèse en sous-traitant si nécessaire ces examens à des laboratoires disposant des différentes techniques. Si la présence d'un variant de l'hémoglobine est confirmée, cette information devra obligatoirement être communiquée au clinicien en lui précisant de ne pas utiliser les valeurs seuils DCCT pour interpréter le résultat [12]. Par ailleurs, le suivi de l'HbA1c doit être effectué avec la même méthode, de préférence au sein du même laboratoire pour limiter les variations artéfactuelles, le patient devenant alors son propre référentiel [4]. Dans le cas d'une interférence sur le résultat de l'HbA1c, le dosage des fructosamines reste la seule et unique alternative pour le suivi de ces patients.

Rappelons que si le NGSP préconise la mise en œuvre de techniques séparatives pour le dosage d'HbA1c, il indique qu'en cas d'utilisation de techniques immunologiques la recherche d'un variant de l'hémoglobine doit être effectuée lors du premier dosage d'HbA1c. L'application de cette recommandation peut se révéler difficile. Dans notre pratique quotidienne, nous avons décidé d'effectuer cette recherche en cas de doute sur le résultat d'HbA1c.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Diabetes Control and Complications Trial Research Group, Nathan DM, Genuth S, Lachin J, Cleary P, Crofford O, Davis M, *et al.* The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993 ; 329 : 977-86.
2. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998 ; 352 : 837-53.
3. Hanas R, John G ; International HbA(1c) Consensus Committee. 2010 consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A1c measurement. *Clin Chem* 2010 ; 56 : 1362-4.
4. Gillery P, Hue G, Bordas-Fonfrède M, Chapelle JP, Drouin P, Lévy-Marchal C, *et al.* Dosage de l'hémoglobine A1c et hémoglobino-pathies : problèmes posés et conduite à tenir. *Ann Biol Clin* 2000 ; 58 : 425-9.
5. <http://www.ngsp.org/interf.asp>, consulté le 31 octobre 2017.
6. Patrinos GP, Giardine B, Riemer C, Miller W, Chui DH, Anagnou NP, *et al.* Improvements in the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies. *Nucleic Acids Res* 2004 ; 32 : D537-41.
7. <http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html>, consulté le 31 octobre 2017.
8. Pro. Bio.Qual. Rapport du programme d'évaluation externe de la qualité Hémoglobine glyquée 17BH04 et 17BH05. Pro.Bio.Qual., 2017, 13 pages.
9. Little RR, La'ulu SL, Hanson SE, Rohlfing CL, Schmidt RL. Effects of 49 different rare Hb variants on HbA1c measurement in eight methods. *J Diabetes Sci Technol* 2015 ; 9 : 849-56.
10. Lorenzo-Medina M, Nogueira-Salgueiro P, Martin-Aguila A, Ruiz-Garcia L. Interference of hemoglobin N-Baltimore on measurement of HbA1c using the HA-8160 and HA-8180 HPLC methods. *J Diabetes Sci Technol* 2015 ; 9 : 714-5.
11. Nyenwe EA, Fisher JN. A mistaken diagnosis of type 2 diabetes due to hemoglobin N-Baltimore. *Am J Med Sci* 2008 ; 336 : 524-6.
12. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). Update. DCCT Research Group. *Diabetes Care* 1990 ; 13 : 427-33.