

Rôle du laboratoire dans le dépistage , le diagnostic et le suivi du diabète sucré

Michèle Fonfrède (1) et Didier Chevenne (2)

(1) Laboratoire de Biochimie B , hôpital de la Salpêtrière, Paris

(2) Laboratoire de Biochimie Hôpital Saint-Joseph Paris

Le diabète sucré est défini par un désordre métabolique, d'étiologies diverses, caractérisé par la présence d'une hyperglycémie chronique accompagnée d'une perturbation des métabolismes glucidique, lipidique et protéique, résultant d'un défaut de sécrétion d'insuline, de son activité ou des deux associés. Outre les complications aiguës liées à une absence ou une mauvaise adaptation du traitement (comas acido-cétosique, hyperosmolaire, hypoglycémique), l'hyperglycémie chronique s'accompagne de complications apparaissant au long cours et touchant de nombreux organes, particulièrement l'œil, le rein, les systèmes nerveux et cardio-vasculaire. Le diabète est une maladie mondialement répandue et dont la prévalence est importante et en augmentation.

Le laboratoire joue un rôle important dans le dépistage, le diagnostic et le suivi de la maladie, de la simple détermination de la glycémie à la mise en évidence plus complexe de facteurs immunologiques de prédisposition.

La glycémie

Dépistage

La glycémie est classiquement déterminée par une méthode enzymatique utilisant l'hexokinase ou la glucokinase. La glycémie reste le seul examen permettant un dépistage de masse mais en tenant compte de certains facteurs. Une glycémie à jeun supérieure à 1,26g/l (7mmol/l) doit toujours être contrôlée. En effet, compte tenu des variations intra-individuelles pouvant aller jusqu'à 14% et des variations analytiques pouvant être de 4%, le cumul de ces deux « erreurs » a pour conséquence qu'une valeur théorique de 1,26g/l peut être mesurée à 1,03g/l (sujet non diabétique) mais également à 1,49g/l (donc sujet diabétique)(1,2). Pour le dépistage de masse, les valeurs de glycémie obtenues à 120 minutes (Gt120) peuvent être retenues seules ou avec celles de la glycémie à jeun.

Diagnostic

Pour les sujets asymptomatiques, les critères de diagnostic reposent sur une épreuve d'hyperglycémie par voie orale (HGPO) strictement standardisée (75 g de

glucose ou 1,75 g/kg chez l'enfant avec un maximum de 75 g).

Surveillance

La surveillance glycémique des diabétiques est basée sur une autosurveillance facilitée par la mise sur le marché de lecteurs. L'autosurveillance est un point incontournable mais il faut insister sur le contrôle indispensable de ces lecteurs à l'occasion, par exemple, d'une glycémie faite au laboratoire. Pour pouvoir dépister un éventuel problème technique il faudra tenir compte du fait que les valeurs de la glycémie sont variables en fonction du milieu analysé (plasma, sang veineux ou sang capillaire). Pour une méthode à la glucose oxydase par exemple, si la glycémie du plasma veineux est de x g/l, celle du sang veineux est de $x - 0,20$ g/l et celle du sang capillaire est de $x + (0,20 \text{ à } 0,50)$ g/l. La différence est d'autant plus importante que l'on se trouve en période postprandiale.

Cas particulier du diabète gestationnel

Le diabète gestationnel est défini comme la découverte d'un diabète au cours d'une grossesse. Dans l'idéal, le dépistage systématique du diabète gestationnel devrait être effectué lors de toutes les grossesses. Néanmoins, comme l'HGPO est une épreuve lourde difficilement applicable à toutes les femmes, sans parler du coût, les experts recommandent au minimum le dépistage systématique chez toutes les femmes ayant des facteurs de risque : obésité, âge > 25 ans, antécédent familial de diabète de type 2, appartenance à une ethnie ayant une prévalence élevée de diabète gestationnel. Lorsque le risque est modéré, le dépistage devrait être effectué entre la 24-28^{ème} semaine mais s'il apparaît très important, le dépistage devrait être réalisé le plus tôt possible et refait entre la 24-28^{ème} s'il est trouvé négatif.

Aux USA et dans de nombreux autres pays, la méthode la plus employée est le test de O'Sullivan et Mahan qui consiste à mesurer la glycémie une heure après une charge de 50 g de glucose. Si la glycémie est $\geq 1,4$ g/l, le diagnostic est réalisé en effectuant une HGPO sur 3 heures avec 100 g de glucose en prenant les critères de O'Sullivan ou ceux de Carpenter et Coustan (inférieurs de 0,1 g/l sauf à 180 mn où la même valeur est retenue). L'OMS, elle, ne distingue pas ce type de diabète des autres en ce qui concerne le diagnostic et applique donc

les mêmes critères à jeun et à deux heures d'une HGPO de 75 g.

Corps cétoniques

La présence d'une acidocétose et la mise en évidence d'une cétonurie restent un point important pour le diagnostic et la classification des diabètes chez l'enfant et l'adolescent. En effet la recrudescence du diabète de type 2 chez les jeunes obèses ou présentant un surpoids rend nécessaire la détection d'une cétonurie plus caractéristique du diabète de type 1 afin d'adapter une thérapeutique adéquate. Il faut cependant rester prudent sur l'interprétation de la cétonurie chez l'enfant pour éviter une classification trop rapide. En effet la présence de cétonurie a été retrouvée chez les adolescents présentant un diabète de type 2 dans une proportion de 25 à 30% (3).

Marqueurs de la glycation

La glycation protéique : définition, historique

La glycation, réaction initialement décrite par L.C.Maillard en 1912, est une réaction chimique survenant in vitro et in vivo entre la fonction aldéhyde d'un ose et une fonction amine libre et accessible d'une protéine (fig.1). La première étape de la réaction aboutit à la formation d'une base de Schiff instable qui soit se redissocie en amine et en ose, soit subit une translocation de la double liaison (réarrangement d'Amadori) pour aboutir à une cétoamine stable et quasiment irréversible dont la vitesse de formation est 60 fois moins rapide que celle de la première étape. L'intensité de la glycation est fonction de la protéine (concentration et demi-vie), de la nature et de la concentration de l'ose réactionnel et du temps de contact entre l'ose et la protéine. Le glucose, ose peu réactif mais le plus abondant de l'organisme humain réagit sous sa forme non cyclique, mais c'est la

forme cyclique qui est présente dans la cétoamine conférant à la molécule glyquée une fonction cis-diol. Toutes les protéines peuvent être glyquées mais l'exemple le mieux connu est celui de l'hémoglobine.

On sait depuis les travaux de Rabhar en 1969 et de Trivelli en 1971 que les sujets diabétiques possèdent une fraction d'hémoglobine migrant plus rapidement que l'hémoglobine A à l'électrophorèse (d'où sa première dénomination de fast hemoglobin) et depuis une quinzaine d'années de nombreux travaux ont été réalisés pour déterminer la composition exacte de cette fraction. L'hémoglobine glyquée résulte de la fixation d'oses sur les chaînes de globine. Différents sites peuvent être affectés (Valine N - terminale des chaînes α et β groupement ϵ - aminés des résidus lysine intrachaînes) donnant lieu à la formation de plusieurs formes d'hémoglobine glyquée. (Tableau I). La forme la plus abondante est l'hémoglobine A1c définie par la fixation du glucose sur la valine N-terminale de la chaîne β , mais qui ne représente que 60% de l'ensemble des hémoglobines glyquées. les 40% restant étant répartis entre les formes où le glucose est fixé sur la valine N terminale de la chaîne α et les formes où le glucose est fixé sur les lysines intrachaînes.

Le principe de la glycation est utilisé pour mesurer l'imprégnation glucidique chez les diabétiques à l'aide de marqueurs dont la détermination va refléter les moyennes glycémiques selon un temps plus ou moins long en fonction de la protéine étudiée : de quelques jours pour les lipoprotéines à plusieurs années pour les protéines de structure (4).

Méthodes de dosage

Les méthodes de dosage d'hémoglobine glyquée présentent deux particularités : leurs principes sont basés sur les différentes caractéristiques structurales et donc très variés et les composés dosés ne sont pas tous les mêmes (Tableau II).

HbA	Tétramère $\alpha_2\beta_2$
HbA0	Composant majeur de l'hémoglobine A séparée par échange d'ions ou électrophorèse Comprend l'hémoglobine glyquée sur les sites ne modifiant pas son pHi
HbA1	Hémoglobine(s) rapides en échange d'ions ou électrophorèse Comprend HbA1a1+HbA1a2+HbAb+HbA1c
HbA1c	Fraction cétoamine stable formée par fixation du glucose sur la valine N terminal de la chaîne β de l'HbA
HbpréA1c	Forme labile de l'HbA1c caractérisée par une fonction aldimine (base de Schiff)
Hbglyquée	Hémoglobine formée par fixation du glucose et d'autres oses sur les fonctions amines libres et accessibles des chaînes α et β

Tableau I. Principales fractions de l'hémoglobine et principaux termes utilisés caractérisant l'hémoglobine glyquée.

Méthodes basées sur la modification de charge	Chromatographie d'échange d'ions CLHP (échange d'ions) Electrophorèse	
Basée sur la modification de structure	Par la fonction cis-diol	Chromatographie d'affinité
	Par l'extrémité β glyquée	Immunturbidimétrie Inhibition d'agglutination

Tableau II. Différents principes de dosage de l'hémoglobine glyquée

La présence de glucose fixé sur l'extrémité N terminale de la chaîne β modifie la charge électrique de la molécule permettant une séparation par chromatographie d'échange cationique ou par électrophorèse.

Le glucose (sous sa forme cyclique) fixé sur la protéine (dans sa forme cétoamine) est caractérisé par un groupement cis-diol qui présente une affinité pour le boronate. Ce principe est utilisé pour la séparation de l'hémoglobine glyquée par chromatographie d'affinité.

Le peptide β glyqué N terminale est utilisé comme antigène pour la fabrication d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux qui sont ensuite utilisés dans les méthodes de dosage immunochimiques.

Ces différents principes ne dosent pas le même composé chimique : hémoglobine A1 ou A1c pour le premier, hémoglobine glyquée totale incluant la détermination de tous les sites de glycation de l'hémoglobine pour le deuxième et chaîne β glyquée pour le troisième.

Il est maintenant admis que le terme d'hémoglobine A1c (HbA1c) est le seul à utiliser (5). Même si dans une définition chromatographique telle qu'elle est actuellement, il n'est pas possible d'individualiser une seule structure puisque la glycation peut avoir lieu sur une ou deux extrémités N-terminale des chaînes β et également sur les extrémités N-terminale des chaînes α , il apparaît indiscutable d'utiliser le terme d'HbA1c pour l'expression des résultats quelle que soit la méthode utilisée pour les dosages. En effet c'est un terme connu et accepté par tous (les cliniciens n'apprécient guère la consonance du terme hémoglobine glyquée), il correspond au composant le mieux caractérisé et le plus abondant de l'hémoglobine glyquée.

Standardisation

Depuis 1980 les méthodes de dosage se sont multipliées et à la fin du XX^{ème} siècle on pouvait recenser au moins 20 méthodes commercialisées. Les problèmes d'interprétation rencontrés pendant longtemps par les cliniciens devraient avoir disparu dans les quelques prochaines années grâce à une standardisation et une information des biologistes. La nécessité d'une standardisation s'est fait sentir dès 1986 pour permettre une comparaison intertechnique des résultats et depuis une dizaine d'années on assiste en France à une amélioration de la qualité des résultats. L'agence

française du médicament a organisé des contrôles de qualité nationaux sur l'HbA1c en 1992, 1995 (en association avec la SFBC) et 1999 et 2000. Rétrospectivement on constate que le premier contrôle a eu pour conséquence de montrer la nécessité de faire une information sur les différentes techniques utilisées, puisque le mode d'expression était mal classé en fonction des techniques utilisées (6). Le second a montré une relative diminution des méthodes par électrophorèse et par échange ionique en minicolonne qui ne détermine que la forme HbA1 (7). Pourtant, seulement 75 % des participants ont rendu un résultat compris dans l'intervalle de ± 20 % d'une valeur cible à 5,5 % d'HbA1c, avec des résultats allant de 3,5 à 9,5 % ! De la même façon une grande hétérogénéité des méthodes a été constatée avec des coefficients de variation (CV) tronqués entre 3 et 25 %. Le contrôle de qualité nationale de 1999 montre que sur un ensemble de plus de 2200 résultats les moyennes tronquées allaient de 5,09% à 6,13% pour l'échantillon de valeur normale et de 9,53% à 13,20% pour l'échantillon de valeur élevée. Par contre, les CV non tronqués étaient toujours de 4,02% à 20,59%, les plus grandes variations étant observées pour les méthodes électrophorétiques ou chromatographiques non automatisées.

Lorsque que l'on sait qu'une variation de 1 point d'HbA1c (soit une élévation de 7 à 8% ou inversement une diminution de 7 à 6 %) peut inciter le clinicien à modifier le traitement, on comprend l'importance d'une standardisation et la nécessité d'une grande qualité analytique. Sans vouloir relativiser ces chiffres il faut cependant noter la difficulté de comparer les résultats de contrôles non standardisés. En effet Mosca et coll.(8) ont montré la difficulté d'utiliser une même solution de contrôle (parmi celles actuellement disponibles sur le marché du diagnostic), sur différents automates. Ceci est dû, entre autre, à un effet de matrice, à la composition des contrôles (certains ont une proportion élevée de méthémoglobine) et à la présence de conservateurs jamais bien définis par les fabricants.

En ce qui concerne la méthode et les matériaux de référence il existe toujours deux propositions. Le groupe américain initialement mis en place par l'AACC et relayé par le NGSP (National Glycohemoglobin Standardisation Program) et dirigé par David Goldstein de l'Université de Columbia (Missouri) utilise comme

système de référence une CLHP évaluant toutes les formes d'HbA1c. Les calibrants et les contrôles sont des échantillons de sang humain congelé à l'exclusion de tout autre matériel. Un réseau de laboratoires de référence existe et propose un protocole de certification des méthodes. Il s'appuie sur les travaux menés depuis plusieurs années par le DCCT qui ont permis de définir un intervalle de référence de 4 à 6 % ainsi que des seuils décisionnels.

L'IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) a créé en 1993 un groupe de travail de standardisation, dirigé par Kor Miedema de l'hôpital de Zwolle (Pays-Bas) qui a adopté une définition plus restrictive de l'HbA1c en considérant comme structure de référence l'hexapeptide N-terminal glyqué des chaînes β de la globine. La méthode de référence capable d'évaluer cet hexapeptide associe une CLHP en phase inverse et une spectrométrie de masse ou une électrophorèse capillaire après hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine (9,10). Cette mesure de l'HbA1c chimiquement définie est plus satisfaisant sur le plan scientifique mais il n'est pas évident que les résultats obtenus depuis 20 ans par le DCCT seraient transposables aux résultats obtenus par cette nouvelle technique. De plus on ne dispose pas, à l'heure actuelle, d'études prospectives utilisant cette technique et permettant d'établir des valeurs de référence et des seuils de décisions.

Dans cette période transitoire la SFBC a émis des recommandations afin de sensibiliser les biologistes et d'initier le processus de standardisation en France (11). A côté de ces travaux portant sur les méthodes, les calibrants et les valeurs de référence, il ne faut pas négliger le fait que chaque technique doit posséder des qualités analytiques intrinsèque à savoir une précision avec un $CV < 3\%$ (une variation de 6,8% à 7,2% peut être considérée comme significative!), un dépistage de variants d'hémoglobine si possible, une absence d'interférence de la forme labile et de l'hémoglobine carbamylée retrouvée en quantité non négligeable en cas d'urémie chronique supérieure à 15 mmol/l.

Dépistage

Malgré l'amélioration des techniques HbA1c n'est actuellement pas utilisable pour un dépistage systématique.

Diagnostic

L'apparition des nouveaux critères de diagnostic et de classification des diabètes depuis 1997 a eu comme conséquence que de nombreux travaux ont tenté de faire valoir la valeur diagnostique de l'HbA1c. Chez des sujets classés diabétiques d'après les nouveaux critères il a été montré que, au moment du diagnostic, 60 % des sujets ont une HbA1c inférieure à 6%, 35,8% ont une HbA1c comprise entre 6 et 7%, et seulement 3,4% ont une HbA1c supérieure à 7%. Comparativement chez les sujets classés diabétiques selon les critères de l'OMS de 1985, on retrouve la même proportion d'individus ayant une valeur d'HbA1c comprise entre 6 et 7%, alors que

48,9% ont une HbA1c supérieure à 7% (12). Ceci témoigne donc d'une glycation importante seulement lorsque la glycémie à jeun dépasse 1,40g/l et permet à plusieurs auteurs de reposer le problème de la définition du diabète:

Le diagnostic doit-il être basé sur la seule notion d'hyperglycémie ou bien sur la survenue de complications macro ou microvasculaires ? (13-15).

La polémique soulevée par l'utilisation de l'hémoglobine A1c comme facteur plus sensible que la glycémie pour le diagnostic du diabète de type 2 en prenant comme valeur limite 6% et non 6,1%(16) reste, à notre avis, peu adaptée compte tenu des écarts encore observés entre les différentes méthodes de dosage.

En effet même si la standardisation a grandement amélioré les écarts entre les techniques il n'en reste pas moins vrai qu'il existe une grande variabilité d'exactitude entre les différentes méthodes et que si l'utilisation de l'HbA1c devenait un complément important pour le diagnostic de diabète, il faudrait alors tenir compte du fait qu'il existe des variations intra-ethniques, vraisemblablement une valeur de base individuelle (17-19), que des variations saisonnières chez la femme ont été observées (20) et donc adapter les valeurs usuelles en fonction de ces différents paramètres. On trouve cependant quelques exceptions pour lesquelles l'HbA1c est un examen très utile au diagnostic :

Les valeurs d'HbA1c permettent de faire la distinction entre différents types de diabète dans la population asiatique puisque chez des sujets ne possédant pas d'anticorps anti-GAD, une valeur d'HbA1c "normale" témoigne de la présence d'un diabète de type 1 fulminant (21).

La détermination de l'HbA1c associée à une glycémie à jeun peut se révéler intéressante lors d'un accident vasculaire aigu myocardique ou cérébral pour différencier l'hyperglycémie d'un diabète méconnu de l'hyperglycémie de stress provoquée par la contre régulation hormonale.

Suivi

Marqueur rétrospectif et objectif de l'équilibre glycémique à moyen terme l'HbA1c est devenue un paramètre quasiment obligatoire dans le suivi du sujet diabétique quel que soit le type de diabète. Un rapport de la CNAMTS fait ressortir qu'en 1994 seul un diabétique sur trois avait un dosage régulier d'HbA1c et qu'en 1999 il y en avait 41 %. L'objectif pour 2000 étant d'obtenir 61 % de diabétiques de type 2 ayant un contrôle régulier de l'HbA1c

Longtemps sous utilisée par les cliniciens du fait de l'hétérogénéité des formes et des valeurs usuelles, l'HbA1c est devenue un paramètre à prendre en compte dans le suivi du diabétique grâce à deux études prospectives: le Diabetes Control and Clinical Trial Study (DCCT) portant sur les diabétiques de type 1 et l'United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) pourtant sur les diabétiques de type 2 (22,23). Ces deux études ont effet clairement établi une relation entre l'équilibre glycémique objectivé par l'HbA1c et les

complications micro et/ou macro-angiopathiques. L'étude du DCCT a porté sur 1441 sujets suivis pendant une période moyenne de 6,5 ans et classés en deux groupes, comparables sur le plan de leur HbA1c initiale, selon des critères cliniques basés sur la présence ou non de rétinopathies et/ou néphropathie. La moitié des sujets a reçu un traitement conventionnel alors que les autres ont reçu un traitement intensif soit par pompe à insuline soit par un minimum de 3 injections d'insuline par 24 heures. Parallèlement au contrôle de l'évolution de la rétinopathie et de la néphropathie, l'HbA1c a été mesurée 1 fois par mois. Au terme de cette étude il a été observé un ralentissement de l'évolution de la rétinopathie et une diminution de la microalbuminurie chez les sujets recevant un traitement intensif par rapport à ceux recevant un traitement conventionnel. Dans le même temps l'HbA1c a diminué de façon significative de 3 points passant de 11,6 % à 8,3 % dans le groupe diabétique ayant un traitement intensif alors qu'elle est restée à la même valeur dans l'autre groupe.

Les résultats de l'UKPDS, qui a porté sur des diabétiques de type 2 suivis pendant 15 ans et traités par antidiabétiques oraux associés ou non à l'insuline, ont montré que un bénéfice clinique caractérisé par une diminution du nombre d'infarctus du myocarde corrélé à une diminution de l'HbA1c.

Au terme de ces 2 études des valeurs décisionnelles et des valeurs cibles de traitement optimum ont été proposées. Le but est d'obtenir des chiffres d'HbA1c aussi proches que possibles des chiffres normaux en évitant les hypoglycémies. Les objectifs thérapeutiques varient suivant le type de diabète. Dans le diabète de type 1, l'objectif thérapeutique optimal est représenté par des HbA1c comprises entre 7 et 7,5 %. Dans le diabète de type 2, les données de l'UKPDS permettent de fixer la valeur optimale d'HbA1c au seuil de 6,5 %.

Ces valeurs bien établies ne sont valables que pour des techniques dont les valeurs usuelles sont de 4 à 6 % (définies lors de l'étude du DCCT) et dont les critères analytiques sont tels qu'une variation de 0,2 % soit significative.

Fructosamines

Dans les circonstances physiopathologiques mettant en défaut l'interprétation de l'HbA1c, l'équilibre glycémique peut également être contrôlé par le dosage des fructosamines ou protéines glyquées plasmatiques. On entend par dosage de fructosamines la détermination des protéines glyquées sériques, mesurées par une méthode colorimétrique non spécifique. Le manque d'intérêt clinique pour ce marqueur tient d'une part à sa demi-vie courte - les fructosamines reflètent les moyennes glycémiques des 2 à 3 semaines précédant le dosage - et d'autre part à l'absence d'études épidémiologiques comparables à celles du DCCT et de l'UKPDS permettant de fixer un "seuil". Son intérêt reste néanmoins important dans au moins 2 situations :

- chez les femmes diabétiques au cours de la grossesse pour lesquelles le clinicien a besoin d'un marqueur à cinétique rapide.

- chez les sujets présentant un variant d'hémoglobine et pour qui il est d'une part difficile d'interpréter l'HbA1c en fonction de la méthode utilisée pour le dosage, d'autre part quasiment impossible de fixer un seuil équivalent à celui de 7 % ou 6,5 % résultant des études DCCT et UKPDS (24).

Il a été possible d'établir une relation générale entre glycémie, HbA1c et fructosamines. Une variation de 1 point d'HbA1c correspond à une variation des moyennes glycémiques de 0,3 g/l (1,6mmol/l) et à 37 µmol/l de fructosamines. Cette relation utile doit être interpréter avec prudence puisque chacun des 2 paramètres reflète un état cumulatif différent et qu'une dissociation peut être observée comme par exemple une fructosamine plus élevée que ne le laisserait supposer la valeur d'HbA1c témoignant d'un déséquilibre récent.

Marqueurs de l'atteinte pancréatique

Insuline

Produite par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, l'insuline est synthétisée sous forme d'un précurseur, la préproinsuline (11 5000 Da) qui est très rapidement convertie en proinsuline (86 acides aminés, 9600 Da) puis transportée dans l'appareil de Golgi. Constituée d'une seule chaîne divisée en trois régions appelées A, B, C et comprenant trois ponts di-sulfures, la proinsuline est clivée par deux endopeptidases aux jonctions AC et BC ; une carboxypeptidase élimine ensuite les deux paires d'acides aminés situés aux deux points de clivage générant enfin le C-peptide et l'insuline. Ce processus complexe engendre donc des composés intermédiaires (split-proinsulines) qui, avec la proinsuline intacte, subsistent en faible proportion (2-6%) dans les granules de sécrétion au côté de l'insuline et du peptide-C. La sécrétion d'insuline dans le compartiment vasculaire, qui s'effectue par exocytose, s'accompagne donc de la libération de faibles quantités de proinsulines et d'une quantité équimolaire de C-peptide. Le foie capte environ 50% de l'insuline plasmatique à chaque passage tandis que le C-peptide et les proinsulines sont principalement éliminés par le rein. La demi-vie de l'insuline est d'environ 4 mn, celle du C-peptide 20 à 30 mn. L'insuline est constituée de 51 acides aminés, 5808 Da, composée d'une chaîne A (21 acides aminés) et d'une chaîne B (30 acides aminés) reliées par deux ponts disulfures, tandis que le C-peptide correspond aux 31 acides aminés (3020 Da) reliant les régions A et B de la proinsuline en position 33-63.

En absence d'insuffisance hépatique ou rénale, d'injection d'insuline ou encore de présence d'anticorps anti-insuline, le C-peptide et l'insuline donnent des informations équivalentes. La détermination de l'insuline est souvent préférée car elle moins coûteuse, souvent plus précise et qu'il existe très peu de valeurs de référence pour le C-peptide. Cependant, l'hémolyse, en libérant une enzyme dégradant l'insuline, rend impossible son dosage alors que le C-peptide n'est pas affecté par ce phénomène (25).

Dépistage

Le dosage de l'insuline est utilisé pour le dépistage des sujets prédisposés à développer le diabète de type 1 dans les familles à risque. Pour cela, l'insuline est mesurée au cours d'une épreuve d'hyperglycémie provoquée par voie intraveineuse (HGPIV). L'HGPIV est une épreuve désormais standardisée qui consiste à injecter, après un jeûne de 10 à 16 heures, 0,5 g de glucose (maximum 35 g) par kg de poids avec une solution glucosée à 25% pendant 3 minutes (± 15 s). Des prélèvements de sang sont réalisés avant toute injection afin de mesurer la glycémie et l'insuline de base puis à +1, +3, +5, +10 mn, le temps 0 correspondant à la fin de l'injection du glucose. Le pic précoce insulinaire (PPI) est mesuré en additionnant l'insulinémie à t+1 mn et t+3 mn. Une diminution du PPI est associée à un risque augmenté de développer un diabète de type 1 (26,27).

La proinsuline est généralement augmentée dans le diabète de type 2. Son augmentation précède l'apparition du diabète et est donc considérée comme un marqueur de risque de développer un diabète de type 2. En pratique, son dosage est réalisé uniquement dans des laboratoires très spécialisés dans la réserve plus à la recherche, ou au diagnostic des insulinomes et des hyperproinsulinémies familiales (25).

Diagnostic

En diagnostic, la seule indication du dosage de l'insuline est la recherche d'hyperinsulinisme ou d'insulinome à l'origine d'hypoglycémies. Le diagnostic est réalisé soit au cours d'un malaise spontané soit le plus souvent au cours d'une épreuve de jeûne. Le C-peptide peut être dosé en parallèle pour éliminer une hyperinsulinémie due à une injection, volontaire ou non. Le contraste entre une concentration élevée d'insuline et effondrée en C-peptide associée à une hypoglycémie indique une administration d'insuline voire une interférence analytique (présence d'anticorps anti-insuline).

Certaines formes de diabète s'accompagnent d'une insulino-résistance majeure que le dosage de l'insulinémie, réalisée à jeun ou sous charge en glucose permet de bien caractériser. Ces diabètes sont liés à des anomalies du récepteur dont l'activité est diminuée (insulino-résistance de type A) allant jusqu'à une absence complète de récepteur (léprechaunisme), ou d'origine inconnue mais probablement post-récepteur (diabète lipodystrophique). Les concentrations circulantes d'insuline sont multipliées par plus de 3, avec des valeurs à jeun variant de 30 à 300 mUI/l et atteignant 900 mUI/l sous charge en glucose et même au-delà en cas de léprechaunisme.

Les marqueurs de l'autoimmunité

Anticorps anti -Îlots de Langerhans (ICA : Islet Cell Antibody)

Jusqu'en 1990, la prédiction du diabète de type 1 était restreinte à la mise en évidence des ICA chez les

apparentés à risque accru. C'est le principal marqueur utilisé dans les enquêtes familiales. La ou les molécule(s) responsable(s) de l'auto-immunité anti-ICA n'ont pas été identifiées précisément, plusieurs antigènes sont sans doute impliqués

Les ICA sont détectés sur coupes congelées de pancréas humain de groupe sanguin O par immunofluorescence indirecte. On met en évidence des ICA aspécifiques (fluorescence sur l'ensemble de l'îlot) et des ICA spécifiques (fluorescence au niveau des cellules β). Cette technique est développée uniquement dans des laboratoires de référence. La standardisation est difficile, chaque pancréas est calibré avec un sérum standard international permettant l'expression des résultats en unité JDF (unité internationale établie par la Juvenil Diabetes Foundation).

Les ICA sont retrouvés chez 60 à 90 % des diabètes de type 1 au moment du diagnostic, ils disparaissent 18 mois à 2 ans après le début du diabète de type 1. Les ICA peuvent être détectés chez les apparentés de premier degré jusqu'à 5 ans avant l'apparition clinique du diabète de type 1.

Leur prévalence est de 2 à 10 % chez les apparentés de premier degré.

Plus le titre des ICA est élevé à la première détection plus le risque de développer un diabète de type 1 est grand. Un risque accru de développer le diabète est associé à la détection d'ICA à un titre élevé (> 20 U JDF) et tous les sujets porteurs d'ICA à un titre supérieur à 80 unités JDF sont devenus diabétiques après 7 ans de recul. Les ICA aspécifiques sont plus fortement associés au risque de diabète de type 1 que les ICA spécifiques. En France, dans la population générale, la prévalence des ICA se situe entre 1 et 2%. La valeur prédictive des ICA dans la population générale est très faible (entre 3 et 6 %). Ce n'est donc pas un marqueur de risque suffisant. L'association de 2 marqueurs (immunologiques et génétique) pourrait améliorer la prédiction dans cette population (28).

Anticorps anti -insuline (IAA : Insulin Auto-Antibodies)

Les IAA sont présents dans le sérum de certains diabètes de type 1 lors du diagnostic, avant toute insulinothérapie. Ils sont mesurés par technique radioimmunologique qui détecte les autoanticorps de haute affinité. Elle repose sur le dosage en phase liquide de la liaison de l'insuline humaine radiomarquée par le sérum après extraction de l'insuline endogène présente. La liaison non spécifique est déterminée après addition d'un excès d'insuline humaine non marquée.

La prévalence des IAA est comprise entre 30 et 50% chez les diabètes de type 1 au moment du diagnostic. Cette fréquence est significativement augmentée chez les jeunes enfants (0 à 4 ans).

La valeur prédictive des IAA est faible, leur détermination n'a intérêt qu'en conjonction avec la détermination des ICA; chez les sujets porteurs d'ICA et

d'IAA le risque augmente significativement. Dans la population générale, les IAA sont retrouvés chez 3 % des enfants et 1% des adultes (29).

Anticorps anti-GAD (décarboxylase de l'acide glutamique)

La GAD est l'enzyme de décarboxylation de l'acide glutamique en GABA (acide gamma aminobutyrique) présent à concentration élevée dans le cerveau et le pancréas. La GAD est synthétisée sous 2 formes, 65 et 67 Kda. Dans le pancréas, l'isoforme 65 Kda prédomine. Les anticorps anti-- GAD ont une prévalence comprise entre 70 et 80% chez les diabétiques de type 1 au moment du diagnostic. Ils peuvent être présents jusqu'à 8 ans avant l'apparition du diabète. Ces anticorps sont plus fréquents après l'âge de 20 ans et sont retrouvés plus fréquemment chez les femmes. Ils pourraient donc jouer un rôle intéressant dans le diagnostic des adultes développant un diabète de type 1. Ces anticorps persistent après le diagnostic.

Les anti-GAD sont présents chez 66 à 89 % des apparentés de premier degré ICA positifs. La valeur prédictive des anticorps anti-GAD est du même ordre que celle des ICA (30).

Anticorps anti -IA2

Ce sont des anticorps circulants dirigés contre des fragments polypeptidiques de 37/40 Kda obtenus après trypsination d'homogénat d'îlot. IA-2 est une glycoprotéine appartenant à la famille des tyrosines phosphatases. Les anti-IA-2 sont présents chez 78 % des diabétiques de type 1 au moment du diagnostic, sans variation de la fréquence en fonction de l'âge et chez 72 % des apparentés de premier degré ICA positifs moins de 2% dans la population générale (31). Leur détection conjointe aux ICA ou aux anti-GAD confère une valeur prédictive positive de 75 à 100 % sur les 5 ans à venir dans les populations à risque.

Marqueurs des complications

Microalbuminurie

Le coût des complications liées au diabète qu'il soit de type 1 ou de type 2 représente 93% du coût total de la maladie. Il est donc important de prévoir la survenue des complications pour retarder leur apparition. Le marqueur de complications le plus utilisé quel que soit le type de diabète est la détermination de la microalbuminurie.

Le terme de microalbuminurie a été utilisé la première fois par Viberti en 1982 lors d'une étude sur la valeur pronostic d'une élévation modérée de l'excrétion urinaire d'albumine. La microalbuminurie (ou plus précisément la paucialbuminurie) est définie comme une excrétion urinaire d'albumine (EUA) comprise entre 20 et 200 µg/mn (30 à 300 mg/24h). Chez le diabétique de

type 1 elle révèle une néphropathie débutante alors que chez le diabétique de type 2 elle est le marqueur d'une mortalité cardio-vasculaire.

Sur le plan méthodologique la détermination de l'albumine urinaire ne pose aucune difficulté à condition d'utiliser une technique dont la sensibilité est de l'ordre du mg/l. Toutes les techniques (immunonéphélométrie, turbidimétrie ou radio-immunologie) sont comparables. Les résultats sont exprimés dans la mesure du possible en débit (µg/mn ou mg/24h), le rapport albumine (mg/l) sur créatinine (mmol/l) étant utilisable pour un dépistage (32,33). Lorsque le résultat du rapport albumine/créatinine est inférieur à 1, il n'y a pas de microalbuminurie, lorsqu'il est supérieur à 3 il existe une microalbuminurie, lorsqu'il est compris entre 1 et 3 un recueil sur un temps précis est nécessaire pour calculer le débit d'excrétion de l'albumine et confirmer la présence ou non d'une microalbuminurie. Dans le diabète de type 1 la glomérulopathie diabétique peut être dépistée par l'urée sanguine peu sensible et peu spécifique, par la créatinine sanguine peu sensible mais très spécifique, par la clairance de la créatinine sensible, spécifique mais ennuyeuse à faire pour le patient, ou par d'autres tests difficilement utilisables en pratique courante.

L'augmentation de l'excrétion d'albumine peut être expliquée par 2 théories : soit une augmentation de la perméabilité de la membrane basale glomérulaire dont la taille et/ou la charge des pores est altérée, soit par une hypertension intraglomérulaire elle-même sous la dépendance de plusieurs facteurs dont le système rénine-angiotensine et kallikréine-kinines (34).

Le traitement de la néphropathie débutante du diabète de type 1 fait appel, en plus du contrôle glycémique, aux antihypertenseurs dont les inhibiteurs de l'enzyme de conversion même en l'absence d'hypertension. l'effet bénéfique d'un équilibre glycémique à long terme a été décrit dans le protocole EDIC (Epidemiology of Diabetes Intervention and Complications) qui a fait suite à l'étude du DCCT et dans lequel la microalbuminurie a été mesurée au terme de 3 et 4 ans. Les résultats montrent que l'effet bénéfique sur la néphropathie obtenu dans le cas du traitement intensif reste constant malgré une augmentation de l'hyperglycémie (35).

Dans le diabète de type 2 une microalbuminurie prédit une mortalité prématurée liée à l'athérome : accident vasculaire cérébral, infarctus du myocarde, insuffisance cardiaque. Les diabétiques de type 2 présentent souvent une hyperlipémie et une association entre anomalies des lipides et microalbuminurie est fréquemment retrouvée. Les interventions diététiques et les traitements antihypertenseurs réalisés chez le diabétique de type 2 s'accompagnent d'une baisse de la microalbuminurie.

Les recommandations de l'ADA en 1989 étaient que chez les diabétiques de type 2 une détermination de la microalbuminurie doit être faite tous les ans à partir du moment où le diabète est diagnostiqué et que chez les diabétiques de type 1 cette détermination doit être faite tous les ans après 5 ans d'évolution du diabète. Les récentes recommandations de l'ANAES en ce qui

concerne le diabète de type 2 sont également une détermination de la microalbuminurie une fois par an (36).

Produits de fin de glycation (AGE's)

Il reste beaucoup à apprendre sur la glycation des protéines aussi bien sur le plan physiopathologique que celui des conséquences cliniques. Une des principales questions est de savoir s'il pourrait y avoir une glycation des protéines tissulaires avant même que l'on constate une augmentation de l'HbA1c, rendant alors nécessaire une investigation plus poussée des produits de glycation afin de connaître l'effet réellement délétère de l'hyperglycémie chronique (35).

La cascade d'événements de la glycation des protéines commence par l'interaction entre l'aldéhyde d'un glucose et le groupement NH₂, notamment la partie amino-terminale et les radicaux NH₂ libres de la chaîne peptidique de diverses macromolécules. Elle conduit à la formation de dérivés d'addition glyqués au terme d'une suite de réactions non enzymatiques caractéristiques. Dans un premier temps, il se forme une base de Schiff. Si elle n'est pas dissociée dans les quelques dizaines de minutes qui suivent sa formation, elle subit un réarrangement dit d'Amadori qui stabilise la condensation du résidu osidique sur la chaîne protéique. Si la protéine modifiée a une demi-vie inférieure à six ou huit semaines, ces produits d'addition ou adduits d'Amadori sont dégradés et disparaissent de l'organisme. En revanche, si leur demi-vie est supérieure à huit ou dix semaines, l'adduit d'Amadori subit de nouvelles modifications irréversibles en formant par condensation entre plusieurs produits d'Amadori des d'hétérocycles azotés de couleur brune et fluorescents, les produits de Maillard, ou Advanced Glycation End products (AGE's) des anglo-saxons, que d'aucuns traduisent littéralement par "produit de glycation avancée". Le sucre impliqué dans la formation d'un produit d'Amadori est le glucose, mais il peut aussi s'agir du galactose, du fructose, du mannose, du ribose ou même du déhydroascorbate. Des sucres phosphorylés comme les trioses-P ou des hexoses-P peuvent être impliqués(37).

Leur caractérisation des produits de Maillard fait l'objet de recherche depuis une dizaine d'années. Le FFI ([2-furoyl-4 (5)-(2-furanyl)-1H-imidazole]) premier AGE décrit était en fait un artefact de préparation par glycation in vitro. Actuellement, l'AGE le mieux connu est la pentosidine. Si sa formation in vitro est sans équivoque et bien documentée, le principe de sa formation in vivo est plus délicat car sa structure fait intervenir un pentose et non un hexose comme le laisserait supposer la première étape de la réaction. Citons également l'alkyl-formyl-3,4-digluco-syl-pyrrole (AFGP), la pyrrolidine, le carboxy-méthyl-lysine (CML), le carboxy-éthyl-lysine (CEL), 4 méthyl-imidazolium, le 5-méthyl-imidazole-4-one.

Certains de ces hétérocycles azotés néoformés sont fixés à un seul site de la protéine. C'est le cas de la carboxy-

méthyl-lysine, de la pyrrolidine et de la méthyl-imidazolone. D'autres le sont par deux sites, créant ainsi une réticulation intra- ou inter-moléculaire. Par leur maillage ils contribuent à former un réseau de protéines modifiées tant dans leur structure que dans leurs fonctions. La pentosidine et le 4-méthyl-imidazole appartiennent à ces molécules de pontage. Tous sont décrits comme des dérivés d'addition ou "adduits".

Ces adduits se forment avec des protéines des tissus, de la matrice extra-cellulaire ou de la circulation sanguine et en modifient leurs propriétés métaboliques. Il y a notamment perte de leur plasticité, altération de sites catalytiques d'enzymes ou même dénaturation des épitopes d'antigènes. De plus ces protéines modifiées deviennent résistantes aux enzymes protéolytiques. Les dérivés de glycation intensifient la formation de radicaux libres en amplifiant la décharge oxydante physiologique provoquant de nombreux effets délétères : peroxydation des acides gras, des acides nucléiques....

La glycation des protéines à demi-vie longue a des conséquences plus néfastes que celle des protéines à demi-vie courte puisque les produits formés ont le temps de se remanier pour aboutir aux AGE's. Toutes les protéines tissulaires sont glyquées. Nous prendrons pour exemple des conséquences de la glycation, les effets sur le cristallin et sur le collagène.

- Le cristallin a la particularité de ne présenter aucun renouvellement métabolique et donc de cumuler les éventuels produits de transformation post traductionnels formés. Les agrégats observés sont probablement liés aux AGE's, ces derniers existant en plus grande quantité chez les sujets diabétiques que dans une population témoin. Le fructose joue probablement un rôle important dans la formation des AGE's du cristallin. En effet, la présence de fructose 3-P, agent très glycant, a été retrouvé au niveau du liquide du cristallin chez le rat.

- Les collagènes sont des protéines tissulaires desquelles a été isolée et identifiée la pentosidine. Leur glycation a pour conséquence de modifier leurs propriétés comme leur épaissement, de diminuer leur solubilité et d'augmenter leur résistance à la dégradation enzymatique. Le collagène de type IV présent au niveau de la membrane basale glomérulaire est impliqué dans la néphropathie diabétique. Les collagènes fibrillaires de type I, III et V notamment, présents au niveau de la peau et de la paroi des vaisseaux, sont eux aussi impliqués dans les complications du diabète. La particularité des produits de glycation est la formation de liaisons croisées qui diminuent la flexibilité et qui constituent des "pièges" pour les protéines circulantes. La présence de ces liaisons croisées au niveau artériel piège les apolipoprotéines circulantes au niveau des membranes, et les exposent alors à des concentrations de glucose pendant un temps plus long que lorsqu'elles ne sont pas fixées, favorisant une glycation in situ responsable en partie de risques cardio-vasculaires.

Toutes les autres protéines tissulaires peuvent être glyquées, comme par exemple l'ostéocalcine dont la glycation favorise le développement de l'ostéoporose, ou

la myéline dont la glycation est un facteur important dans le développement de la neuropathie périphérique du diabétique.

Un lien étroit a été établi entre la formation des produits de Maillard dans la matrice extracellulaire et le développement des complications chroniques du diabète sucré (38). Ces produits s'accumulent chez le sujet diabétique dans différents tissus, notamment l'aorte et la matrice du glomérule rénal. Une corrélation positive est établie entre leur concentration et la survenue de micro et macroangiopathies. Ces altérations du tissu vasculaire apparaissent déterminantes dans la physiopathologie de la néphropathie et/ou de la rétinopathie, de la neuropathie et de l'athérosclérose du diabétique.

Longtemps caractérisées par leur fluorescence, ces produits ont été peu explorés du fait de la difficulté de leur dosage. La mise en évidence et le dosage de la N^ε-carboxyméthyllysine nécessite l'usage de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Le dosage de la pentosidine est plus accessible - bien que très délicat - par CLHP. Son application clinique en routine est encore loin d'être réalisée compte tenu de la difficulté du dosage et de la nécessité de travailler sur des échantillons tissulaires.

Des tests ELISA ont été développés vis-à-vis de protéines AGE mais là encore leur utilisation reste très limitée et dépendante de la spécificité des anticorps.

Certains auteurs préconisent l'étude de ces adduits sur une biopsie de peau. Ce tissu présente l'avantage d'étudier le marqueur au niveau d'un site de morbidité, encore que la représentativité du collagène de la matrice extra-cellulaire de l'espace macro- et micro-vasculaire par celui de la peau ne soit pas démontrée. L'inconvénient est de plus de nécessiter une biopsie, acte réservé moins pratique que le prélèvement sanguin ou urinaire. Cette approche a été faite sur certains sujets ayant participé à l'étude du DCCT afin de connaître les effets du traitement - intensif vs conventionnel - sur la glycation du collagène de peau(38). Les produits de glycation (furosine, fluorescence, CML, pentosidine) et les propriétés physiques du collagène (solubilité en milieu acide) ont été mesurés. Les résultats montrent que la furosine se révèle être le paramètre le plus intéressant car le mieux corrélé aux complications du diabète.

Le milieu le plus aisément accessible est le sang et/ou le plasma sanguin. Il reflète le taux des produits de Maillard déjà catabolisés par le système macrophagique et en cours d'élimination par les reins, plus ceux formés avec les protéines de l'espace intra-vasculaire. De plus, dans ce milieu un produit de Maillard comme la pentosidine existe soit liée aux protéines, soit à l'état de peptides solubles. Pour l'étude de la pentosidine totale, une hydrolyse chimique ou enzymatique préalable de l'hétérocycle peptidique est indispensable.

Références

1. Widjaja A, Morris RJ, Levy JC, Frayn KN, Manley SE, Turner RC. Within-and between-subject variation in commonly measured anthropometric and biochemical variables. *Clin.Chem.* 1999 ; 45 : 561-566
2. Howanitz PJ, Cembrowski GS, Steindel SJ, Long TA. Physician goals and laboratory test turnaround times. A college of american pathologists Q-probesstudy of 2763 clinicians and 722 institutions. *Arch.Pathol.Lab.Med* 1993 ;117 : 22-28
3. American Diabetes Association. Type 2 diabetes in children and adolescents. *Pediatrics* 2000, 105, 671 - 680.
4. Brownlee M., Vassara H., Cerami A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann. Int. Med.* 1984, 101, 627-37
5. Gillery P, Bordas-Fonfrède M, Chapelle J.P, Hue G, Perier. Hémoglobine glyquée : le temps de la standardisation est venu. *Ann. Biol. Clin.* 1998, 56, 249-51
6. Gillery P, Labbé D, Dumont G, Vassault A. Glycohemoglobin assays evaluated in a large-scale quality control survey. *Clin. Chem.* 1995, 41, 1644-8
7. Gillery P, Dumont G, Vassault A. Evaluation of glycohemoglobin assays in France by national quality control survey. *Diabetes Care* 1998, 21, 265-70
8. Mosca A, Paleari R, Made A, Ferrero C, Locatelli M, Ceriotti F. Commutability of control materials in glycohemoglobin determinations. *Clin Chem* 1998 ;44 :632-638
9. Kobold U, Jeppson JO, Döpffer T, Finke A, Hoelzel W, Miedema K. Candidate reference methods for hemoglobin A1c based on peptide mapping. *Clin.Chem.* 1997 ;43 :1944-1951
10. Finke A, Kobold U, Hoelzel W, Weykamp C, Miedema K, Jeppson JO. Preparation of a candidate primary reference material for the international standardization of HbA1c determination. *Clin.Chem. Lab.Med* 1998 ; 36 : 299-308
11. Gillery P, Bordas-Fonfrède M, Chapelle JP, DrouinP, Hue G, Levy-Marchal C, Perier C, Selam JL, Slama G, Thivolet C, Vialettes B. HbA1c : Concertation clinico-biologique pour la standardisation des méthodes de dosage. *Diabetes and Metalolism* 1999, 25, 283-287.
12. M.B. Davidson, D.L. Schriger, A.C. Peters, B. Lorber. Relationship between fasting plasma glucose and glycosylated hemoglobin. *JAMA* 1999, 281, 1203 - 1210.
13. A. Saunders. Glycosylated hemoglobin as a diagnostic test for type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2000, 283, 605 - 607.
14. Vimicor F. Glycosylated hemoglobin as a diagnostic test for type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2000, 283, 605 - 607.

15. Davidson MB, Schriger DL, Peters AL, Lorber B. Glycosylated hemoglobin as a diagnostic test for type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2000, 283, 605 - 607.
16. Papoz L., Favier F., Clabe A., Sanchez A., Le Moullec N. Ghb(HbA1c) is more sensitive than fasting blood glucose as a screening test for diabetes. *Diabetes care* 2000,23, 8
17. Hasseini SS, Bibler I, Charles MA. The narrow therapeutic windows of glycated hemoglobin and assay variability. *Metabolism* 1999, 48, 1498 - 1502.
18. Daniel M, O'Dea K, Rowley KG, Mc Dermott R, Kelly S. Glycated hemoglobin as an indicator of social environmental stress among indigenous versus westernized populations. *Prev. Med.* 1999, 29, 405 - 413.
19. Boeing H, Weisgerber UM, Jeckel A, Rose HJ, Kroke A. Association between glycated hemoglobin and diet and other lifestyle factor in a nondiabetic population : cross- sectional evaluation of data from the Potsdam cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000, 71, 1115-1122.
20. Garde AH, Hansen AM, Skovgaard LT, Chritensen JM. Seasonal and biological variation of blood concentrations of total cholesterol, dehydroepiandrosterone sulfate, hemoglobin A1c, IgA, prolactin and free testosterone in healthy women. *Clin.Chem.* 2000, 551-559
21. Imagawa A., Hanafusa T., JMiyagawa J., Matsuzawa Y.. A novel subtype of type 1 diabetes mellitus caracteriezd by a rapid onset and an absence of diabetes - related antidobies. *N. Engl. J. Med.* 2000, 342, 301 – 307.
22. 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. Eng. J. Med* 1993 ; 329 : 977-86
23. 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.
24. Gillery P, Hue G, Bordas-Fonfrère M, Chapelle JP, Drouin P, Levy-Marchal C, Perier C, Selam JL, Slama G, Thivolet C, Vialettes B. Dosage de l'hémoglobine A1c et hémoglobinopathies : problèmes posés et conduite à tenir. *Ann. Biol. Clin.* 2000 ; 58 : 425-430.
25. Chevenne D, Trivin F, Porquet D. Insulin assays and reference values. *Diabetes & Metabolism* 1999 ; 25 : 459-76.
26. Bingley PJ for the ICARUS Group. Interactions of age, islet cell antibodies, insulin autoantibodies, and first-phase insulin response in predicting risk of progression to IDDM in ICA+ relatives. *Diabetes*, 1996 ; 45 : 1720-28.
27. Deschamps I, Hors J, Robert J-J. Rôle des facteurs génétiques et immunologiques dans l'étiologie du diabète insulino-dépendant. *Scheiz Med Wschr* 1990 ; 120 : 46-53.
28. Christie MR, Roll U, Payton MA, Hatfield EC, Ziegler AG. Validity of screening for individuals at risk for type I diabetes by combined analysis of antibodies to recombinant proteins. *Diabetes Care* 1997 ; 20 : 965-70.
29. Ziegler A-G, Hummel M, Schenker M, Bonifacio E. Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes. *Diabetes* 1999; 48 : 460-8.
30. Bonifacio E, Christie MR. Islet cell antigens in the prediction and prevention of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Med* 1997, 29 : 405-12
31. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase HP, Eisenbarth GS. Predicting type 1 diabetes in first degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA5212bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 1996 ; 45 : 926-33.
32. Thiebault A, Pennaforte S, Bordas-Fonfrère M, Grimaldi A, Galli A. Dépistage de la néphropathie diabétique incipiens. Mode de recueil des urines et d'expression des résultats pour le dosage de la microalbuminurie. *Presse Médicale* 1987 ; 16 : 681-682
33. Hutchison AS, O'Reilly DS, MacCuish AC. Albumin excretion rate, albumin concentration, albumin/creatinine ratio compared for screening diabetics for slight albuminuria. *Clin.Chem* 1988 ; 34 : 2019- 21
34. Bouhanick B, Berrut G, Fressinaud P, Marre M. La microalbuminurie : un marqueur de néphropathie débutante dans le diabète de type 1. *Option bio* 1998 ; 218 :22-24
35. The Diabetes control and complications trial/Epidemiology of diabetes and complications research group. *N Engl J Med.* 2000 ;342 : 381-9
36. Recommandations de l'ANAES. Suivi du patient diabétique de type 2 à l'exclusion du suivi des complications. *Diabetes and Metabolism* 1999 ; 25 : 9 - 50.
37. Vassara H, Bucala R. Advanced glycation and diabetes complications : an update. In : The diabete annual/9, Mashall S.M, Home P.D, Aizza R.A. (Eds) *Elsevier Sciences B.V* 1995, 227-44
38. Monnier V, Bautista O, Kenny D, Sell DR, Fogarty J, Dahms W, Cleary PA, Lachin J, Genuth S. and the DCCT Skin Collagen Ancillary Study group. Skin collagen glycation, glycoxidation, and crosslinking are lower in subjects with long - term intensive versus conventional therapy of type 1 Diabetes. *Diabetes* 1999, 48, 870 - 80.