



HAL
open science

Mise en place du dépistage néonatal de la drépanocytose en Nouvelle Aquitaine

Paola Inchauspe

► **To cite this version:**

Paola Inchauspe. Mise en place du dépistage néonatal de la drépanocytose en Nouvelle Aquitaine. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02161477

HAL Id: dumas-02161477

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02161477>

Submitted on 20 Jun 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

U.F.R DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2019

N°42

MEMOIRE DE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE

Tenant lieu de

Thèse pour l'obtention du

DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 29 Mai 2019 à Bordeaux

Par **INCHAUSPE Paola**

Née le 01/02/1994 à Saint-Palais (64)

Titre de la thèse

MISE EN PLACE DU DEPISTAGE NEONATAL DE LA DREPANOCYTOSE

EN NOUVELLE AQUITAINE

Discipline : Biochimie

Directeur de la Thèse

Docteur BERARD Annie

Jury

Mme DUFOURCQ Pascale, PU de Pharmacie, Président

Mme BERARD Annie, MCU-PH de Médecine, Directeur de Thèse

Mme JAMES Chloé, PU-PH de Médecine, Examineur

Mr LACOMBE Didier, PU-PH de Médecine, Examineur

Mr BOUTIN Julian, AHU de Médecine, Examineur

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury d'avoir pris le temps d'évaluer mon travail.

Au Professeur Pascale DUFOURCQ,

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse et d'avoir accepté de juger ce travail. Merci également pour tous les enseignements que vous nous avez prodigués pendant mes années d'études de Pharmacie.

Au Docteur Annie Berard,

Je vous remercie du temps passé à évaluer mon travail et de m'avoir confié la mise en place du dépistage néonatal de la drépanocytose. Je vous remercie également d'avoir généreusement pris le temps de me guider dans la rédaction de cette thèse, malgré toutes vos tâches et responsabilités et je vous remercie également pour les six mois passés dans votre Service de Biochimie où vous nous laissez apprendre notre métier de Biologiste.

Au Docteur Lacombe Didier,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être membre de mon jury et d'organiser le dépistage néonatal au niveau de la nouvelle Région Aquitaine.

Au Docteur Julian Boutin,

Merci à toi Julian de m'avoir guidée dans la réalisation de la vérification de méthodes. Merci d'avoir toujours été là quand j'en avais besoin. Merci pour ta patience et ton soutien.

Au Docteur Sylvie Colomer,

Je vous remercie pour votre gentillesse, votre écoute et votre soutien tout au long des études de Pharmacie. Merci de m'avoir encouragée et de m'avoir donné l'envie de devenir Biologiste.

A mes parents, ma sœur, mon beau-frère, mon petit Théo et à mon frère, merci d'être là tous les jours à mes côtés, de me supporter, m'encourager et de me soutenir à longueur de journées.

A toi Thibaut, tu fais maintenant partie de ma famille.

A tout le reste de la famille, pour les bons moments passés en famille.

A tous mes amis, amis d'enfance, du collège, de la danse, de la natation, à tous les internes que j'ai pu côtoyer et surtout à la bande de Limoges qui m'ont permis de décompresser, de rigoler et de faire la fête.

Je remercie également tous les biologistes, assistants, internes et techniciens avec qui j'ai pu travailler tout au long de mon internat et en particulier toute l'équipe du service de Biochimie, du secteur protéines et pharmacologie qui m'a bien aidée dans mon travail.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	7
LISTE DES FIGURES.....	9
LISTE DES TABLEAUX	10
INTRODUCTION.....	11
I) L'HEMOGLOBINE	13
A. Généralités	13
B. Structure de l'hémoglobine	13
1) La globine.....	13
2) L'hème.....	15
3) La liaison globine-hème	15
C. Rôle de l'hémoglobine.....	18
D. Synthèse de l'hémoglobine	20
E. Les gènes codant les chaînes de globine de l'hémoglobine	23
F. Les variants de l'hémoglobine	25
II) LA DREPANOCYTOSE	26
A. Epidémiologie.....	27
1) Prévalence au niveau mondial	27
1) Mortalité au niveau mondial.....	29
2) Prévalence en France	29
1) Mortalité en France.....	32
B. Transmission	32
C. Physiopathologie de la drépanocytose	33
D. Tableau clinico-biologique	36
E. Complications	37
1) Les crises vaso-occlusives (CVO).....	37
2) Le syndrome thoracique aigu (STA)	37
3) Exacerbation de l'anémie	38
4) Le priapisme	38
5) Le risque infectieux	38
6) Complications neurologiques	39
7) Les complications cardio-vasculaires.....	39
8) Les ulcères	39
9) Les complications ostéo-articulaires	39
10) Les complications rénales.....	40
11) Les complications hépatiques.....	40
12) Les complications ophtalmologiques	40
F. Traitements.....	40
1) Transfusions	40

2) Traitement chélateur	41
3) Hydroxyurée	41
4) Traitements symptomatiques	42
5) Traitement curatif	42
6) Saignées	42
7) Nouvelles thérapeutiques	42
G. Pronostic	43
H. Prévention	43
III) LE DEPISTAGE NEONATAL	44
A. Intérêt et pathologies concernées	44
B. Organisation à la mise en place	45
C. Organisation et missions des CRDN	46
D. Tutelle et financement des CRDN	51
E. Application au dépistage néonatal de la drépanocytose	51
1) Intérêt	51
2) Conditions du dépistage	53
3) Rendu des résultats	53
IV) MISE EN PLACE DU DEPISTAGE NEONATAL DE LA DREPANOCYTOSE EN NOUVELLE AQUITAINE => GESTION DE PORTEE FLEXIBLE	53
A. Bibliographie et état des lieux pour répondre à la demande => énoncer un besoin	54
B. Programmation de la mise en place du matériel analytique	58
C. Portée d'accréditation	58
D. Vérification de méthode HPLC	60
1) Description du processus	62
2) Description de la méthode	63
3) Maîtrise des risques	65
4) Evaluation des performances de la méthode	70
E. Mise en place d'indicateurs de qualité	73
F. Gestion documentaire	74
G. Formation, évaluation et habilitation du personnel médico-technique et médical	74
V) BILAN 1^{ERE} ANNEE	75
CONCLUSION	96
BIBLIOGRAPHIE	98
ANNEXES : FICHES DE TUTORAT, EVALUATION, HABILITATION DU PERSONNEL MEDICO-TECHNIQUE POUR LE VARIANT NBS	107

LISTE DES ABREVIATIONS

2,3 BPG : 2,3 bisphosphoglycérate
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADR : Accord for Dangerous goods by Road
AFDPHE : Association Française pour le Dépistage et la Prévention du Handicap de l'Enfant
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
AP 1 : Protéine Activatrice 1
ARS : Agence Régionale de Santé
AVC : Accidents Vasculaires Cérébraux
BCAM/Lu : Basal Cell Adhesion Molecule/ Lutheran
CAQ : Correspondant Assurance Qualité
CE : Conformité Européenne
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CHRU : Centre Hospitalier Régional Universitaire
CNAMTS : Caisse Nationale de l'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés
CNCDN : Centre National de Coordination du Dépistage Néonatal
CO : monoxyde de carbone
COFRAC : Comité Français d'Accréditation
CO₂ : dioxyde de carbone
CRDN : Centres Régionaux de Dépistage Néonatal
CV : coefficient de Variation
CVO : Crises Vaso-occlusives
DGOS : Direction Général de l'Offre des Soins
DM-DIV : Dispositif Médicaux de Diagnostic In Vitro
DO : Densité Optique
DOM – TOM : Départements d'Outre-Mer et Territoires d'Outre-Mer
EEQ : Evaluation Externe de la Qualité
Fe²⁺ : Fer ferreux
FN : Faux Négatif
FP : Faux Positif
GDM : Genetic Data Management
Glu : Glutamate
GR : Globule Rouge
GTA : Guide Technique d'Accréditation
Hb : Hémoglobine
HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance
HTA : Hypertension Artérielle
HTAP : Hypertension Artérielle Pulmonaire
ICAM : IntraCellular Adhesion Molecule
IEF : isoélectrofocalisation
Ig : Immunoglobuline
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
ISO : International Standard Organisation

LDH : Lactate DésHydrogénase
Leu : Leucine
N : atome d'azote
NBS : NewBorn Screnning
NEQAS : National External Quality Assessment scheme
NFkB : Nuclear Factor kappa B
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PCU : Phénylcétonurie
PDCA : Plan Do Check Act
Phe : Phénylalanine
PO2 : pression partielle en dioxygène
RAQ : Responsable Assurance Qualité
SA : semaines d'aménorrhée
SDM : Syndrome Drépanocytaire Majeur
SH : Standard Harmonisation
SIL : Système Informatique du Laboratoire
SMQ : Système Management de la Qualité
S02 : saturation en dioxygène
STA : Syndrome Thoracique Aigu
TSP : Thrombospondine
VAE : Validation des Acquis de l'Expérience
Val : Valine
VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule
VLA 4 : Very Late Antigen 4
VN : Vrai Négatif
VNAS : Variant Newborn Automatic Sampler
VNCS : Variant Newborn Chromatography Station
VP : Vrai Positif
VPN : Valeur Prédictif Négative
VPP : Valeur Prédictive Positive

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Assemblage des chaînes de globine 2 à 2	13
Figure 2 : Structure des chaînes alpha et bêta de l'hémoglobine humaine chez l'adulte	14
Figure 3 : Structure secondaire d'une molécule de globine	14
Figure 4 : Structure tertiaire d'un monomère de globine	14
Figure 5 : Localisation et structure de l'hème	15
Figure 6 : Liaison de coordination entre l'hème et les histidine F8 et E7	15
Figure 7 : Désoxyhémoglobine	16
Figure 8 : Oxyhémoglobine.....	16
Figure 9 : Effet du 2,3 bisphosphoglycérate (2,3 BPG) dans la modulation de l'affinité de l'Hb pour le dioxygène	17
Figure 10 : Transition allostérique, modèle séquentiel.....	17
Figure 11 : Rôle du 2,3 bisphosphoglycérate (BPG).....	18
Figure 12 : courbe de Barcroft	19
Figure 13 : Courbe de dissociation de l'hémoglobine.....	20
Figure 14 : Synthèse des chaînes de globine in utero et en période post-natale.....	21
Figure 15 : Pourcentage des différents types d'hémoglobine au cours de la vie.....	21
Figure 16 : Taux d'hémoglobine fœtale chez les nouveau-nés nés à terme et chez les prématurés.....	22
Figure 17 : Localisation des clusters alpha et bêta	23
Figure 18 : Emergence d'une famille multigénique	23
Figure 19 : Arbre phylogénétique des globines humaines	24
Figure 20 : Organisation des clusters et expression des chaînes de globine en fonction des stades de développement.....	24
Figure 21 : Globules rouges normaux (photo de gauche), hématies en faucille (photo de droite).....	26
Figure 22 : Comparaison de la distribution géographique de la drépanocytose (A) et du paludisme (B) dans le monde	27
Figure 23 : Distribution des décès liés à la drépanocytose par période et par classe d'âge en France de 1979 à 2010.....	32
Figure 24 : Mode de transmission de l'allèle muté HbS	33
Figure 25 : Physiopathologie de la drépanocytose	35
Figure 27 : Corps de Jolly	36
Figure 26 : hématies falciformes	36
Figure 28 : Mécanisme d'action de l'hydroxyurée.....	42
Figure 29 : Organisation du dépistage néonatal en France.....	45
Figure 30 : Dépliant d'information sur le dépistage néonatal	47
Figure 31 : Prélèvement sanguin sur carton Guthrie par ponction capillaire au talon	49
Figure 32 : Les deux modules composant le Variant NBS (VNCS à gauche, VNAS à droite)	56
Figure 33 : Principe de l'électrophorèse capillaire.....	57
Figure 34 : Pourcentage d'hémoglobines du CIQ utilisé sur le Capillarys 2.....	57
Figure 35 : Sélection des méthodes	59
Figure 36: Exemple d'un résultat montrant les fractions de l'hémoglobine et le % des aires associées.....	61
Figure 37 : Arbre décisionnel de la démarche du dépistage néonatal de la drépanocytose.....	76
Figure 38 : Profil d'un enfant sain sur le Variant NBS	77

Figure 39 : Profil d'un nouveau-né transfusé sur le Variant NBS.....	78
Figure 40 : Profil homozygote FS d'un nouveau-né sur obtenu sur le Variant NBS	80
Figure 41 : Confirmation diagnostic du profil homozygote du nouveau-né obtenu sur le Capillarys 2	81
Figure 42 : Profil hétérozygote FAS d'un nouveau-né obtenu sur le Variant NBS	82
Figure 43 : Confirmation diagnostic du profil hétérozygote du nouveau-né obtenu sur le Capillarys 2.....	83
Figure 44 : Profil hétérozygote FAD d'un nouveau-né obtenu sur le Variant NBS.....	86
Figure 45 : Confirmation diagnostic du profil hétérozygote FAD du nouveau-né obtenu sur le Capillarys 2.87	
Figure 46 :Profil hétérozygote FAC d'un nouveau-né obtenu sur le variant NBS.....	88
Figure 47 : Confirmation diagnostic du profil hétérozygote FAC du nouveau-né obtenu sur le Capillarys 2.89	
Figure 48 : Profil hétérozygote FA « other » d'un nouveau-né obtenu sur le Variant NBS	90
Figure 49 : Confirmation diagnostic du profil hétérozygote FAOArab du nouveau-né obtenu sur le Capillarys 2.....	91
Figure 50 : Profil hétérozygote FAE d'un nouveau-né obtenu sur le variant NBS	92
Figure 51 : Confirmation diagnostic du profil hétérozygote FAE du nouveau-né obtenu sur le Capillarys 2.93	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Pourcentage des différents types d'hémoglobine chez l'adulte.....	22
Tableau 2 : Prévalence à la naissance des SDM et des porteurs hétérozygotes dans le monde	28
Tableau 3 : Fréquence des pathologies dépistées par le programme national du dépistage néonatal en France ...	29
Tableau 4 : Dépistage de la drépanocytose en 2015 en France	30
Tableau 5 : Bilan au 31/12/2015 depuis l'origine du dépistage néonatal de la drépanocytose en France.....	31
Tableau 6 : Les différents profils obtenus chez le nouveau-né en fonction du génotype des parents	33
Tableau 7 : Caractéristiques biologiques des syndromes drépanocytaires chez l'Adulte	37
Tableau 8 : Maitrise des risques	66
Tableau 9 : résultats de l'essai de répétabilité.....	70
Tableau 10 : résultats obtenus lors des essais de fidélité intermédiaire.....	71
Tableau 11 : Résultats du Dépistage néonatal de la drépanocytose obtenus au CHU de Bordeaux en 2018.....	76

INTRODUCTION

La drépanocytose est une maladie génétique autosomique récessive par mutation du gène de la β -globine qui induit la synthèse d'une hémoglobine anormale, l'hémoglobine S (HbS). C'est la première maladie génétique en France et dans le monde.

L'HbS, pouvant se polymériser en situation désoxygénée, est principalement responsable de l'ensemble des manifestations cliniques vaso-occlusives et d'une hémolyse chronique avec anémie de degré variable. A ce titre, la drépanocytose constitue un problème de santé publique mondial.

Parmi les nombreuses complications qui peuvent être fatales, les poussées vaso-occlusives génèrent des lésions ischémiques tissulaires pouvant entraîner des crises algiques paroxysmiques parfois au-delà des possibilités actuelles de contrôle antalgique. De même, le syndrome thoracique aigu, complication majeure de la drépanocytose, comporte un risque vital. Le risque infectieux, notamment à bactéries encapsulées, joue un rôle essentiel dans la morbi-mortalité de cette pathologie principalement chez le nouveau-né.

Cependant, une prise en charge rapide et adaptée dès la naissance, avant même l'apparition de signes cliniques, tend à diminuer ces risques justifiant la mise en place du dépistage néonatal de la drépanocytose.

Actuellement en France, cinq pathologies sont dépistées à la naissance. Quatre d'entre elles le sont systématiquement : il s'agit de la phénylcétonurie, de l'hypothyroïdie congénitale, de l'hyperplasie congénitale des surrénales et de la mucoviscidose. La cinquième, la drépanocytose, est dépistée de façon systématique dans les Départements Outre-Mer et de façon ciblée en métropole où cela concerne les nouveau-nés de parents originaires de régions à risque.

Ce dépistage néonatal est très bien organisé et coordonné au niveau national, ainsi qu'au niveau régional grâce aux Centres Régionaux de Dépistage Néonatal (CRDN). Ces Centres sont en lien avec les différentes instances nationales et régionales telles que la Haute Autorité de Santé, l'Agence Nationale de Sécurité des Médicaments et les Agences Régionales de Santé, ceci permettant une harmonisation de la prise en charge des patients.

En 2017, en France, seuls cinq laboratoires étaient en charge du dépistage néonatal de la drépanocytose : CHRU de Lille, CHU de Marseille, CHU de Robert-Debré à Paris, CHU de Pointe à Pitre. Quant à l'hôpital Delafontaine de Saint-Denis, il a mis en place un dépistage non ciblé compte tenu que 85 % des patients suivis présentent un risque pour la drépanocytose.

Jusqu'alors, le CHU de Bordeaux envoyait ses demandes de dépistage néonatal de la drépanocytose au CHU de Marseille. Suite à la création du CRDN Nouvelle-Aquitaine et en accord avec les CHU de Poitiers et Limoge, le CHU de Bordeaux a mis en place ce dépistage aux côtés de ceux qui existaient déjà (phénylcétonurie, hypothyroïdie congénitale, hyperplasie congénitale des surrénales et de la mucoviscidose).

Pour cela, une vérification de méthodes a été nécessaire et s'inscrit dans le cadre de la démarche qualité mise en place au sein du Laboratoire du CHU de Bordeaux (Pôle de Biologie et Pathologie). En effet, l'ordonnance de 2010 relative à la Biologie Médicale (Ordonnance 2010-49

du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale et Loi n° 2013-442 du 30 mai 2013 portant réforme de la biologie médicale; art. L.6221-1 du Code de la Santé Public) rend désormais obligatoire l'accréditation des examens de tous les Laboratoires par le Comité Français d'Accréditation (COFRAC) avec pour objectif la totalité des examens et des sites accrédités au 01/11/2020.

A la différence d'une certification, l'accréditation est une reconnaissance de la compétence attestée par des pairs, c'est-à-dire par des professionnels du métier, experts de chacun des secteurs techniques de Biologie Médicale (Biochimie, Hématocytologie, Coagulation, Microbiologie, ...). Cette compétence s'exprime aussi bien en termes organisationnels (Système de Management de la Qualité, SMQ), qu'en termes de compétences techniques (métier, activités). Elle atteste de la mise en œuvre d'un SMQ au sein du Laboratoire qui répond aux principes de la Norme NF EN ISO 15189 pour le rendu de résultats d'examens de Biologie Médicale valides et fiables.

Des audits de surveillance réguliers (annuels) réalisés par le COFRAC permettent de garantir le maintien de la compétence du Laboratoire.

Engagé dans une démarche qualité depuis quelques années, le Laboratoire du CHU de Bordeaux dont fait partie le Service de Biochimie qui a mis en place le dépistage néonatal de la drépanocytose, mobilise au quotidien tous ses collaborateurs dans la mise en œuvre d'un SMQ et l'amélioration en continu de son efficacité afin de garantir la satisfaction des besoins implicites et explicites des patients ou de la population générale dans le cadre de missions de prévention, un service adapté aux demandes des prescripteurs pour une prise en charge optimale des patients, et la reconnaissance d'une compétence technique et biologique.

Cela implique un engagement fort dans une démarche de responsabilisation, sensibilisation et formation en continu du personnel du Laboratoire afin de renforcer leurs compétences et qualifications techniques et/ou biologiques dans leurs fonctions, ainsi que la maîtrise des outils qualité mis à leur disposition afin de refuser tout compromis en matière de qualité.

Dans une première partie, je ferai des rappels sur l'hémoglobine et j'aborderai les variants de l'hémoglobine avec un focus sur la drépanocytose.

Dans un second temps, j'exposerai les points essentiels du dépistage néonatal en France en insistant sur celui de la drépanocytose.

Cela m'amènera dans un troisième temps à décrire sa mise en place au CHU de Bordeaux qui s'est accompagné d'une procédure dite de «gestion de la portée flexible» (ou encore «gestion des changements techniques») listant l'ensemble des opérations à réaliser pour maîtriser le processus, lors d'un changement dans un Laboratoire, pour une compétence déterminée. Ainsi je décrirai les résultats de mon implication dans la vérification de méthode, la gestion documentaire et la mise en place des fiches de tutorat, évaluation et habilitation pour le personnel médico-technique.

J'illustrerai enfin l'aboutissement de cette mise en place par un récapitulatif des résultats obtenus au 31 décembre 2018, sept mois après le démarrage du rendu des résultats de dépistage néonatal de la drépanocytose.

I) L'hémoglobine

La drépanocytose étant une anomalie de la structure de l'hémoglobine, il apparaît important d'aborder en premier lieu quelques éléments clés sur l'hémoglobine.

A. Généralités

La molécule d'hémoglobine est la protéine majeure du globule rouge. Essentielle à la vie, elle est retrouvée aussi bien chez les vertébrés que chez de nombreux invertébrés. Elle est issue de la famille multigénique des globines, toutes impliquées dans le transport ou le stockage du dioxygène. Il en existe donc différents types, dont l'expression évolue au cours du développement. De plus, outre son rôle principal de transport du dioxygène dans les tissus, la molécule d'hémoglobine possède d'autres fonctions telles que le transport et l'élimination du CO₂ ou la régulation du pH intra-érythrocytaire.

B. Structure de l'hémoglobine

L'hémoglobine est un pigment protéique de 68 kDa, concentré dans les globules rouges, et responsable de la couleur rouge de ces derniers. Elle est constituée d'une partie protéique : les chaînes de globine unies par des liaisons non covalentes, et une partie non protéique : l'hème. Il existe quatre sous-unités de globine semblables 2 à 2. Chaque paire de chaînes polypeptidiques de globine contient un noyau d'hème fixant le dioxygène. C'est la nature des chaînes qui va caractériser le type d'hémoglobine. Deux chaînes alpha like (α ou ζ) vont s'associer avec deux chaînes non alpha like (ϵ , γ , β , δ) (Figure 1) (1,2). Dans plus de 97% des cas, il s'agit de l'association de deux chaînes alpha et deux chaînes β constituant l'HbA.

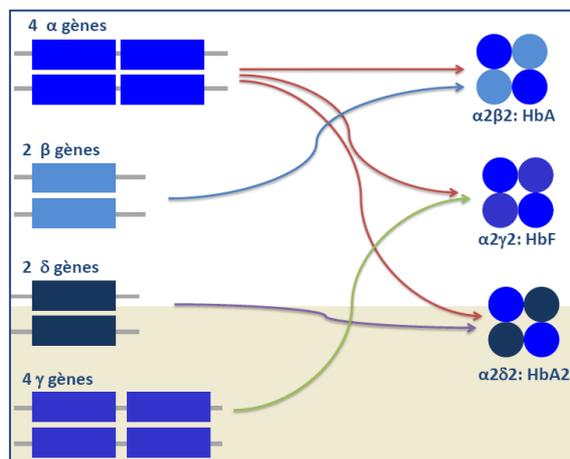


Figure 1 : Assemblage des chaînes de globine 2 à 2

1) La globine

La globine présente une structure secondaire riche en hélices alpha. En effet, sept à huit hélices alpha sont reliées entre elles par des coudes et désignées en nomenclature stéréochimique par une lettre de A à H en partant de l'extrémité N-terminale (Figures 2 et 3).

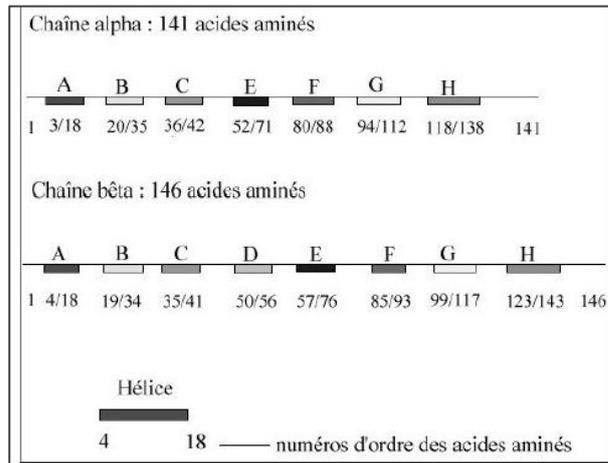


Figure 2 : Structure des chaînes alpha et bêta de l'hémoglobine humaine chez l'adulte

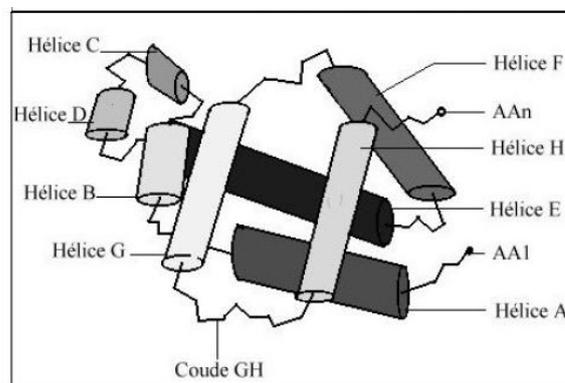


Figure 3 : Structure secondaire d'une molécule de globine

Sa structure tertiaire ou tridimensionnelle est caractéristique et intimement liée à sa fonction. Elle lui permet de présenter un environnement interne hydrophobe réalisant une véritable poche au sein de laquelle se loge une molécule d'hème et son atome de fer ferreux (Fe^{2+}) ; cette poche permet alors de protéger ce dernier de l'oxydation (Figure 4).

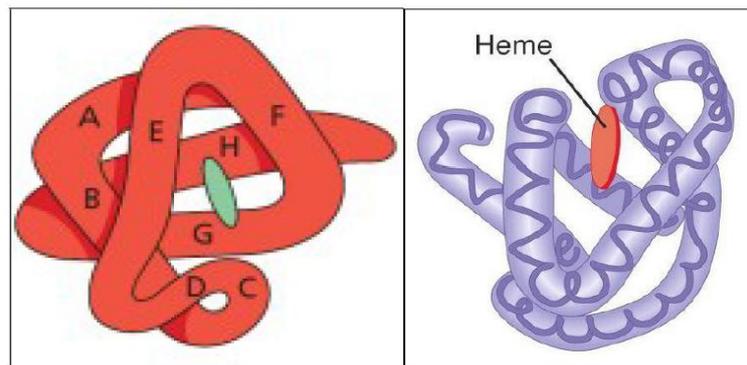


Figure 4 : Structure tertiaire d'un monomère de globine

Les radicaux externes sont, quant à eux, pour la plupart hydrophiles, conférant à la protéine sa solubilité dans le globule rouge. Quelques acides aminés de surface restent en revanche hydrophobes et permettent la formation de liaisons non covalentes entre les monomères de globine.

De plus, les chaînes de globine bêta sont en contact au niveau de la cavité centrale via la molécule de 2,3 bisphosphoglycérate ce qui stabilise la forme désoxygénée (forme T). En présence de dioxygène, la transition de la forme T vers la forme R (relâchée) expulse le 2,3 bisphosphoglycérate favorisant la fixation du dioxygène (3).

2) L'hème

L'hème, logé dans une cavité au niveau de chaque sous-unité de globine, est un groupement prosthétique, c'est-à-dire une molécule non peptidique, nécessaire à la fonction de la protéine. C'est une protoporphyrine constituée de quatre noyaux pyrroles (C_4H_5N), centrés sur un atome de fer à l'état ferreux Fe^{2+} (forme réduite) qui permet de fixer de façon réversible le dioxygène (3,4) (Figure 5).

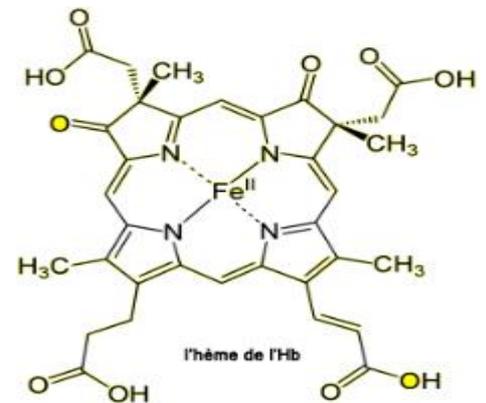
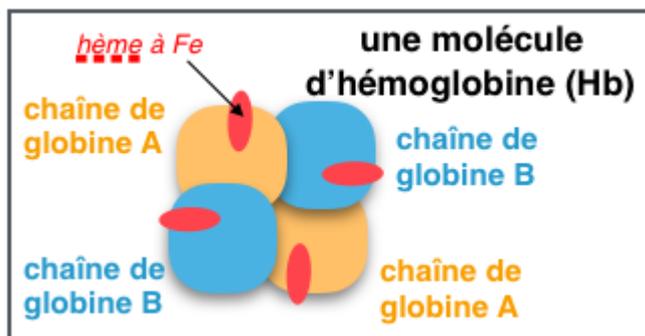


Figure 5 : Localisation et structure de l'hème

3) La liaison globine-hème

La liaison globine/hème est réalisée par deux acides aminés (liaisons de coordination) : l'histidine proximale F8 directement liée à l'atome de fer et l'histidine distale E7 située de l'autre côté du plan et non liée directement à l'hème, présentant la particularité de fixer le dioxygène et de limiter la fixation du monoxyde de carbone (CO) par son encombrement stérique (Figure 6).

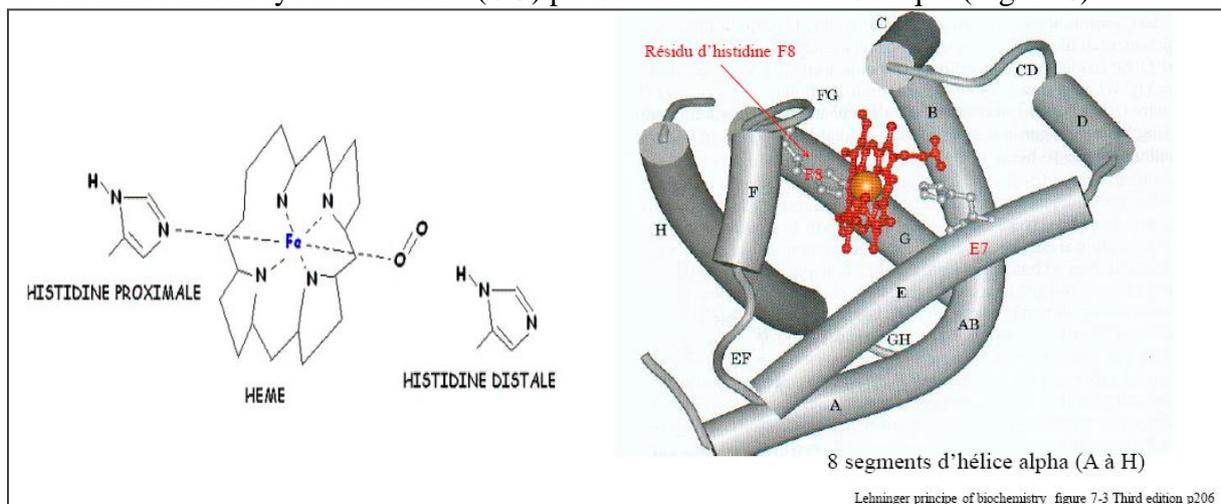


Figure 6 : Liaison de coordination entre l'hème et les histidine F8 et E7

Ces deux liaisons, extrêmement importantes, vont être directement impliquées dans la fixation de la molécule de dioxygène à l'hème, dans la modification de sa conformation spatiale (allostérie) et donc dans la modulation de son pouvoir oxyphorique.

En l'absence de dioxygène (désoxyhémoglobine), l'atome de fer est pentacoordonné c'est-à-dire qu'il existe quatre liaisons de coordination avec les atomes d'azote (N) de chaque noyau pyrrole et une liaison de coordination avec l'histidine proximale F8 de la chaîne de globine. La liaison hème/globine est donc principalement assurée par cette liaison fer ferreux/histidine F8. L'atome de fer ferreux est alors hors du plan du noyau tétrapyrrolique (Figure 7).

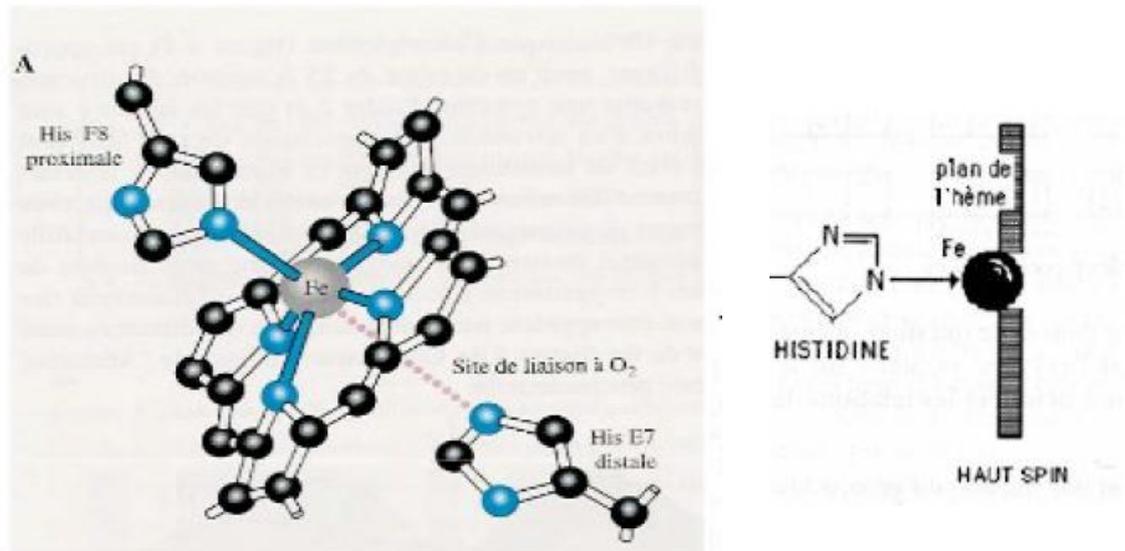


Figure 7 : Désoxyhémoglobine

En présence de dioxygène, celui-ci va se fixer à la fois à l'histidine distale E7 et à l'atome de fer ferreux formant ainsi l'oxyhémoglobine. La liaison fer ferreux/dioxygène constitue la sixième position de coordination : l'atome de fer est alors hexacoordonné. Ceci va entraîner un déplacement de Fe^{2+} dans le plan de l'hème (Figure 8). Ce mouvement est alors transmis à l'histidine proximale F8 puis à l'ensemble de la chaîne de globine.

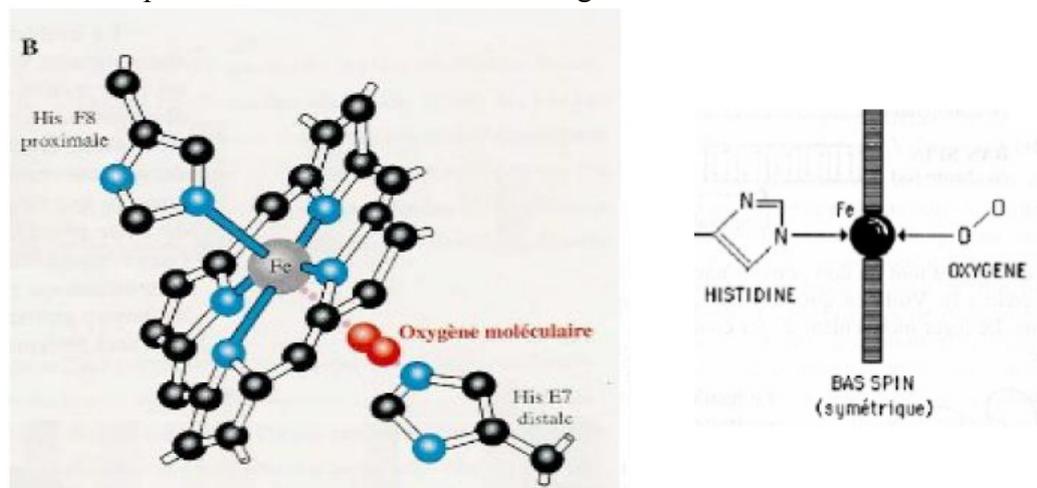


Figure 8 : Oxyhémoglobine

On définit alors deux conformations différentes de l'hémoglobine.

La première, appelée T pour « tendue », est de faible affinité pour le dioxygène et correspond donc à la forme désoxygénée. Cet état est maintenu par le 2,3 bisphosphoglycérate (2,3 BPG) et permet le relargage du dioxygène dans les tissus.

La deuxième, appelée R pour « relâchée », est de forte affinité pour le dioxygène et correspond à la forme oxygénée. Cette forme est issue de la transition allostérique au cours de laquelle le changement conformationnel occasionné par la fixation d'une ou de deux molécules de dioxygène aux sous-unités alpha, engendre une diminution d'affinité de l'hémoglobine pour le 2,3 bisphosphoglycérate, celui-ci étant alors expulsé de la cavité centrale, permettant donc une saturation optimale des sous-unités restantes (5) (Figures 9 et 10).

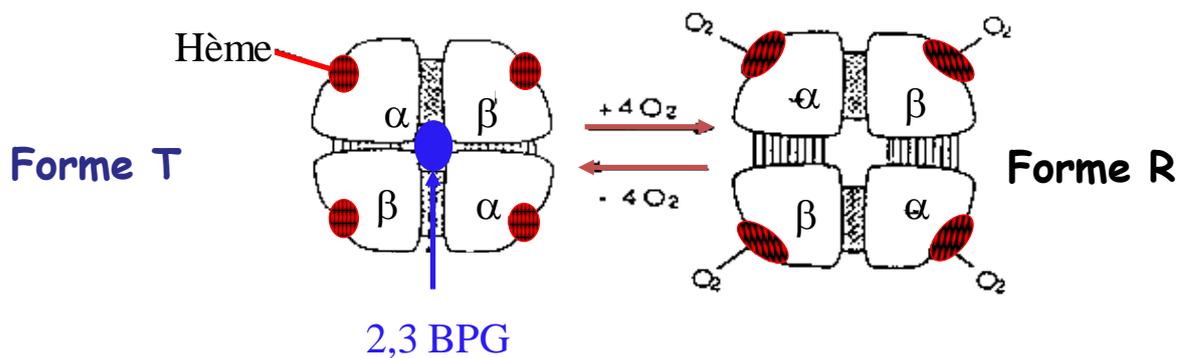


Figure 9 : Effet du 2,3 bisphosphoglycérate (2,3 BPG) dans la modulation de l'affinité de l'Hb pour le dioxygène

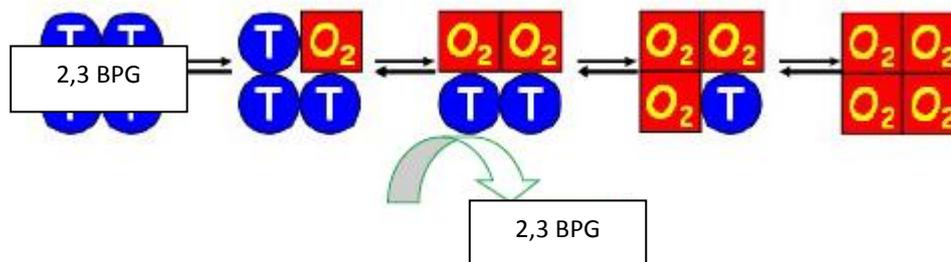


Figure 10 : Transition allostérique, modèle séquentiel

Une absence totale de 2,3 bisphosphoglycérate occasionnerait une perte des propriétés coopératives de l'hémoglobine. L'affinité pour le dioxygène serait alors toujours forte et la molécule saturée rapidement pour de faibles pressions partielles en dioxygène (P_{50} basse) (Figure 11). Ainsi, en l'absence de 2,3 bisphosphoglycérate, la courbe devient hyperbolique, similaire à celle de la myoglobine, l'hémoglobine n'est alors plus apte à transporter et libérer le dioxygène dans les tissus.

Ce schéma peut être retrouvé en pathologie car il existe des mutations de l'hémoglobine entraînant une diminution ou une absence de fixation du 2,3 bisphosphoglycérate dans la molécule, l'hémoglobine est alors dite hyper affine.

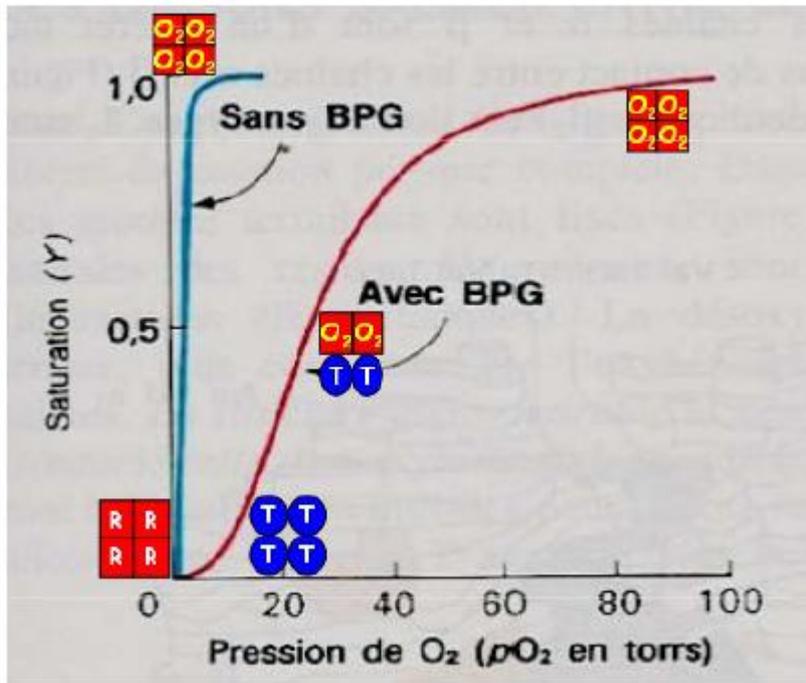


Figure 11 : Rôle du 2,3 bisphosphoglycérate (BPG)

C. Rôle de l'hémoglobine

La principale fonction de l'hémoglobine est d'assurer le transport sanguin du dioxygène des poumons vers les tissus. Ce transport est facilité par le caractère allostérique de l'hémoglobine c'est-à-dire que la fixation d'une molécule de dioxygène favorise la fixation de molécules additionnelles de dioxygène (4).

Son caractère allostérique lui confère en effet des propriétés de coopérativité, donc une affinité pour le dioxygène modulable, permettant la captation du dioxygène dans les poumons et sa libération dans les tissus.

L'effet coopératif découle donc directement du caractère allostérique de l'hémoglobine :

- à l'état désoxygéné, les sites de fixation au dioxygène sur chacune des deux chaînes bêta sont inaccessibles. En revanche, les chaînes alpha présentent un accès étroit au dioxygène.

L'affinité de l'hémoglobine pour le dioxygène est ainsi faible.

- La fixation d'une première molécule de dioxygène sur une chaîne alpha va induire un mouvement, qui va se répercuter de proche en proche jusque sur la deuxième chaîne alpha. Cette chaîne va ainsi voir fortement augmenter son affinité pour le dioxygène.

Lorsque les deux chaînes alpha vont avoir chacune liée une molécule de dioxygène, les modifications conformationnelles transmises à l'ensemble du tétramère vont conférer aux deux chaînes bêta une conformation à très haute affinité pour le dioxygène. L'hémoglobine se sature en dioxygène.

Ainsi, la fixation d'une molécule de dioxygène sur un monomère de globine augmente l'affinité de liaison pour la seconde molécule de dioxygène et ainsi de suite.

Ceci est possible car les monomères de globine sont liés entre eux par des liaisons non covalentes de faible énergie. Ces liaisons confèrent le caractère allostérique et les propriétés de coopérativité de la protéine.

Les zones de contacts entre les deux dimères sont étroites puisqu'elles mettent en jeu seulement 34 acides aminés. On distingue :

- les contacts entre sous-unités non homologues d'un même dimère (alpha1 béta1 ou alpha2 béta2) conférant la stabilité ;
- les contacts entre sous-unités non homologues de deux dimères différents (alpha1 béta2 ou alpha2 béta1) : c'est là que vont s'effectuer les mouvements de glissement et de rotation engendrés par la liaison du dioxygène à l'hème, à l'origine du changement conformationnel de l'hémoglobine lors de l'oxygénation ;
- les contacts entre sous-unités homologues alpha1 alpha2 qui sont très faibles ;
- l'absence de contact direct entre sous-unités homologues béta1 béta2 ménageant une petite cavité avec résidus basiques qui permet d'accueillir une petite molécule de 2,3 bisphosphoglycérate (2,3-BPG). Ce 2,3 BPG va stabiliser la configuration désoxygénée de l'hémoglobine et donc favoriser le relargage du dioxygène dans les tissus, c'est l'état tendu.

La courbe de Barcroft est une conséquence directe de ce phénomène (Figure 12).

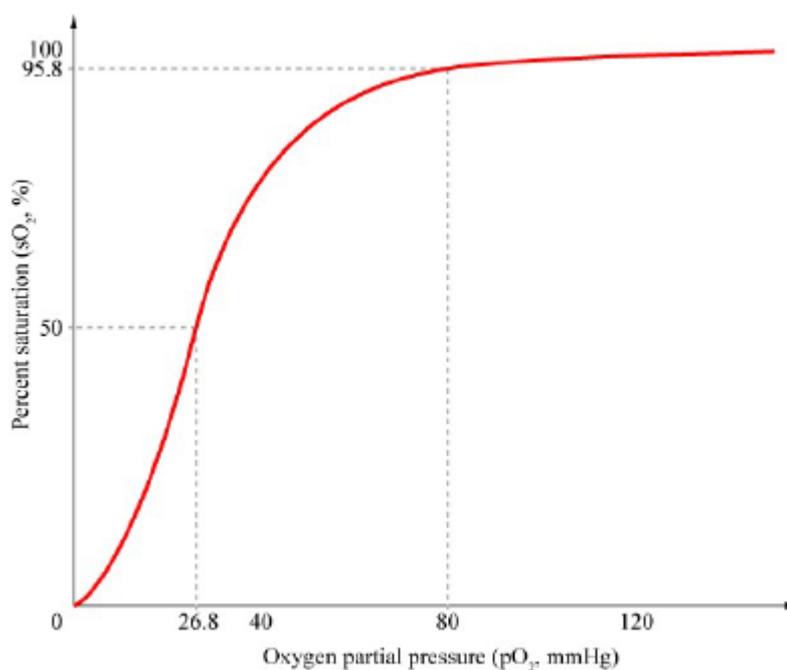


Figure 12 : courbe de Barcroft

Cette courbe de dissociation sigmoïde exprime le pourcentage de saturation en dioxygène (SO_2 en %) de l'hémoglobine en fonction de la pression partielle en dioxygène (pO_2 en mmHg).

On observe que, plus la pression partielle en dioxygène est faible, plus l'affinité de l'hémoglobine pour le dioxygène est faible et donc plus la saturation est basse (c'est ce qu'il se passe dans les tissus périphériques).

A l'inverse, dès lors que la pO_2 est élevée, l'affinité de l'hémoglobine pour le dioxygène augmente et l'hémoglobine se sature en dioxygène (c'est ce qu'il se passe dans les poumons) grâce à l'effet coopératif.

La P50 érythrocytaire correspond à la pression partielle en dioxygène pour 50% de saturation de l'hémoglobine. A l'état physiologique, la P50 est égale à 26,8 mmHg.

L'affinité de l'Hb pour le dioxygène varie également en fonction d'autres paramètres tels que le pH, la température, la teneur en CO₂ et 2,3 bisphosphoglycérate (4). En effet, une augmentation du pH, une diminution de la température, une diminution de la pCO₂ ou encore une diminution de la concentration en 2,3 bisphosphoglycérate augmentent l'affinité de l'hémoglobine pour le dioxygène, lui évitant donc de se décharger au niveau des poumons. Ce phénomène est bien visible au niveau de la courbe de dissociation de l'hémoglobine avec un déplacement de cette courbe vers la gauche (Figure 13).

Au contraire, une diminution de pH ou une augmentation de la pCO₂ entraînent une diminution de l'affinité de l'hémoglobine pour le dioxygène : il s'agit de l'effet Bohr. De même, une augmentation de température ou de la concentration en 2,3 bisphosphoglycérate entraînent une diminution de l'affinité de l'hémoglobine pour le dioxygène (6,7).

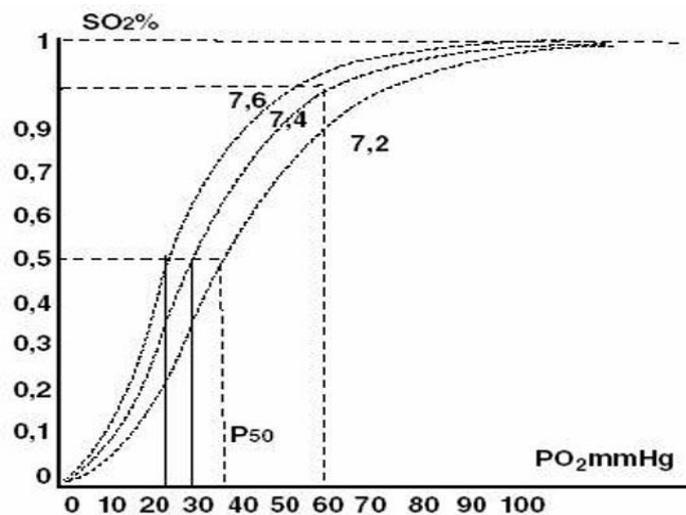


Figure 13 : Courbe de dissociation de l'hémoglobine

L'hémoglobine permet également l'élimination du dioxyde de carbone (CO₂). Ceci s'explique par le fait que le CO₂ n'a pas de transporteur spécifique. La majorité est dissoute sous forme de bicarbonate de sodium dans le plasma et les globules rouges. Lorsque l'hémoglobine est à l'état désoxygénée, elle peut fixer plus de CO₂ que lorsqu'elle est à l'état oxygénée. Ceci permet donc à l'hémoglobine de prendre en charge le CO₂ après avoir déchargé son dioxygène dans les tissus : il s'agit de l'effet Haldane (4,6,7). Ce CO₂ sera libéré plus facilement au niveau des échangeurs respiratoires puisque l'hémoglobine se chargera en dioxygène.

D. Synthèse de l'hémoglobine

Il existe physiologiquement six types de chaînes de globine, exprimés aux différents stades de la vie dans le globule rouge (Figure 14) (5) et leur combinaison entre elles amène à la production de six types d'hémoglobine (Figure 15).

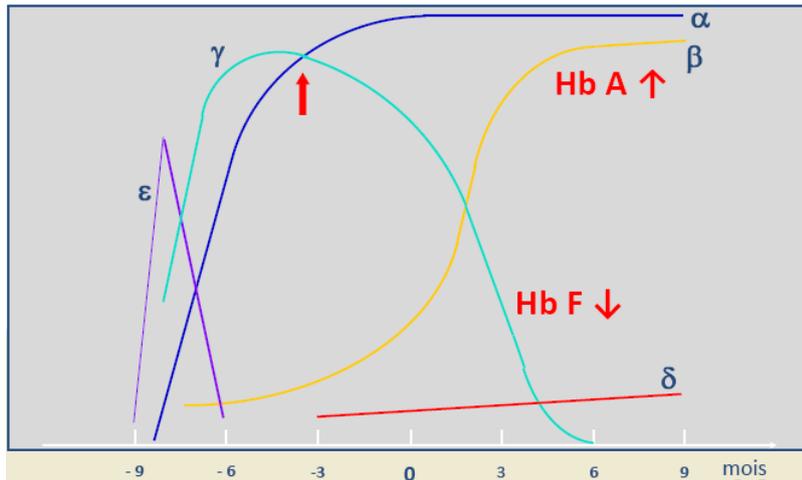


Figure 14 : Synthèse des chaînes de globine in utero et en période post-natale (chaîne zeta non représentée)

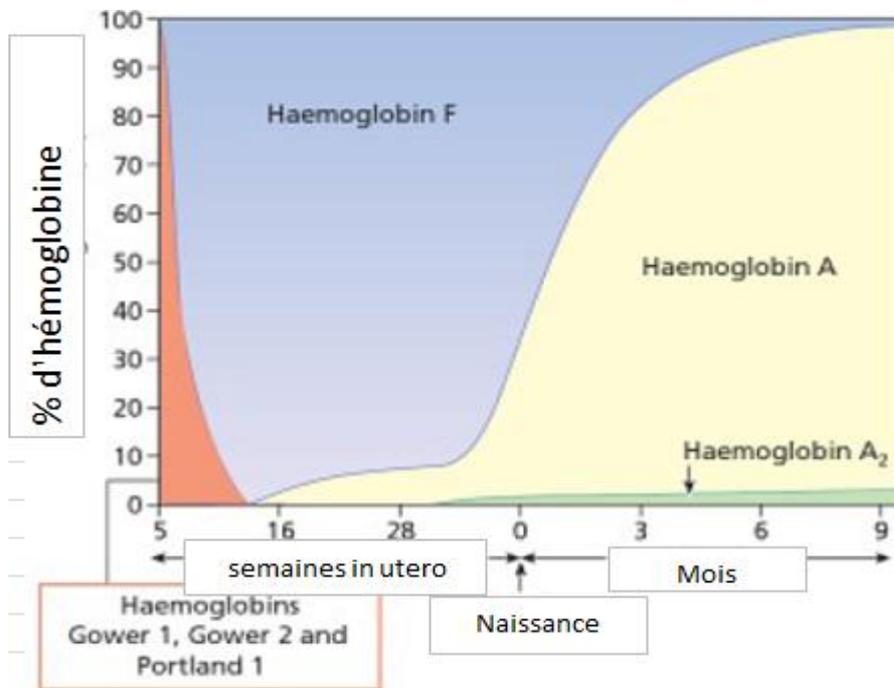


Figure 15 : Pourcentage des différents types d'hémoglobine au cours de la vie

La synthèse des chaînes peptidiques varie avec l'âge.

Elle débute durant la vie embryonnaire, au niveau du sac vitellin.

A partir de cinq semaines de gestation, les cellules primitives érythroblastiques vont synthétiser les chaînes zeta (chromosome 16) et epsilon (chromosome 11). Vers six semaines, les chaînes alpha (chromosome 16), gamma (chromosome 11) puis bêta (chromosome 11) commencent à être exprimées. Ces chaînes, à l'exception de la chaîne bêta, vont être majoritairement exprimées en début de vie embryonnaire. Des hémoglobines spécifiques de cette période sont donc produites au niveau du foie et de la rate : l'hémoglobine Gower 1 composée de deux chaînes zéta et de deux chaînes epsilon ($\zeta_2\epsilon_2$), l'hémoglobine Gower 2 composée de deux chaînes alpha et de deux chaînes epsilon ($\alpha_2\epsilon_2$) et l'hémoglobine Portland composée de deux chaînes zéta et de deux

chaînes gamma ($\zeta\gamma_2$) (8). Ces hémoglobines ont une affinité pour le dioxygène supérieure à celle de l'HbA et ont, en outre, la capacité de continuer à lier fortement le dioxygène malgré l'acidose (pas de sensibilité à l'effet Bohr).

Vers dix-douze semaines de gestation, la synthèse des chaînes zéta et epsilon va diminuer tandis que celle des chaînes alpha et gamma va augmenter. Les hémoglobines Gower 1, Gower 2 et Portland vont progressivement disparaître et l'hémoglobine fœtale composée de deux chaînes alpha et de deux chaînes gamma ($\alpha_2\gamma_2$) va devenir majoritaire.

Vers la 32^{ème} semaine *in utero*, dans la moelle osseuse, la synthèse des chaînes gamma est toujours importante tandis que celle de la chaîne bêta augmente progressivement. Débute également la synthèse de la chaîne delta (chromosome 11). Ainsi, on retrouve à cette période environ 90 % d'HbF, 8 % d'HbA et 0,2-0,3 % d'HbA2 (Figure 15).

A la naissance, la synthèse de la chaîne gamma est stoppée et celle de la chaîne bêta va devenir majoritaire, c'est la commutation gamma / bêta. L'HbA composée de deux chaînes alpha et de deux chaînes bêta ($\alpha_2\beta_2$) va donc remplacer progressivement l'HbF. Les taux normaux d'HbF chez le nouveau-né né à terme sont plus faibles que ceux retrouvés chez les prématurés (Figure 16). A six mois post-natal, un nouveau-né né à terme a un taux d'HbF qui représente moins de 10% de l'hémoglobine totale, alors que l'hémoglobine A atteint environ 90% puis atteint 95% à un an de vie (Figure 16) (9,10). Après l'âge de 2 ans, la concentration d'HbF est inférieure à 1% de l'hémoglobine totale.

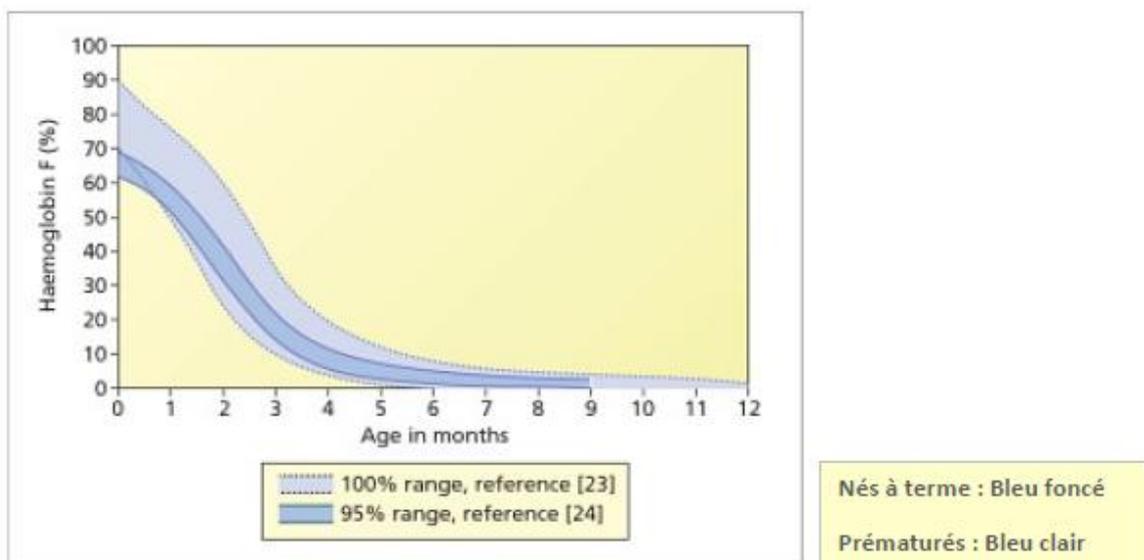


Figure 16 : Taux d'hémoglobine fœtale chez les nouveau-nés nés à terme et chez les prématurés

Chez l'adulte sain, 96 à 98 % de l'hémoglobine est constituée d'HbA ($\alpha_2\beta_2$). Il existe également une hémoglobine mineure, l'HbA2, exprimée entre 2,0 et 3,5 %, composée de deux chaînes alpha et de deux chaînes gamma ($\alpha_2\delta_2$), et l'HbF ($\alpha_2\gamma_2$) à moins de 1% (Tableau 1).

Tableau 1 : Pourcentage des différents types d'hémoglobine chez l'adulte et leur représentativité à la naissance

		ADULTE	NOUVEAU-NE
Hb A	$\alpha_2\beta_2$	97%	15-30 %
Hb A2	$\alpha_2\delta_2$	2-3,5 %	Traces
Hb F	$\alpha_2\gamma_2$	< 1 %	65-80 %

A noter l'importance de la chaîne alpha, dont l'absence rend impossible la synthèse des hémoglobines fœtale et adultes, ce qui explique la gravité clinique d'une absence totale de cette chaîne.

E. Les gènes codant les chaînes de globine de l'hémoglobine

Les différentes chaînes de globine sont codées par des gènes localisés sur deux clusters (= ensemble de gènes) : alpha et β , présents respectivement sur les chromosomes 16 (16p13.3, à proximité du télomère du bras court du chromosome 16) et 11 (11p15.5, bras court du chromosome 11) (Figure 17). Chaque molécule d'hémoglobine associe deux chaînes identiques codées par des gènes du cluster alpha et deux chaînes identiques issues du cluster bêta.

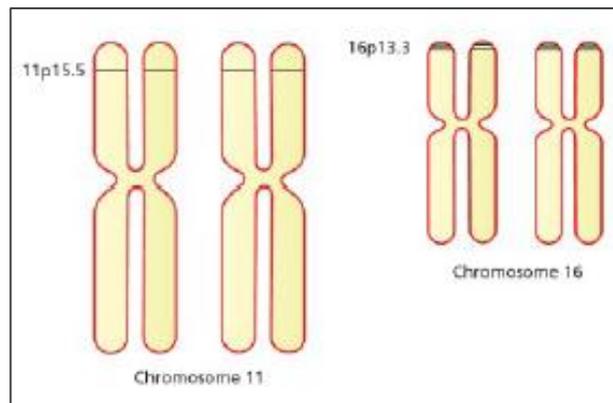


Figure 17 : Localisation des clusters alpha et bêta

Les molécules de globine présentent de nombreuses ressemblances structurales et fonctionnelles. La comparaison des séquences nucléotidiques des gènes de globine montre qu'il existe un haut degré de similitude entre elles, témoignant d'une origine génétique commune vraisemblable. Ces différents gènes descendent en fait d'un gène ancestral commun qui codait une protéine de transport du dioxygène. Une série de duplications/transpositions de ce gène s'est produite il y a environ 800 millions d'années, associée à la survenue de mutations ponctuelles (Figure 18).

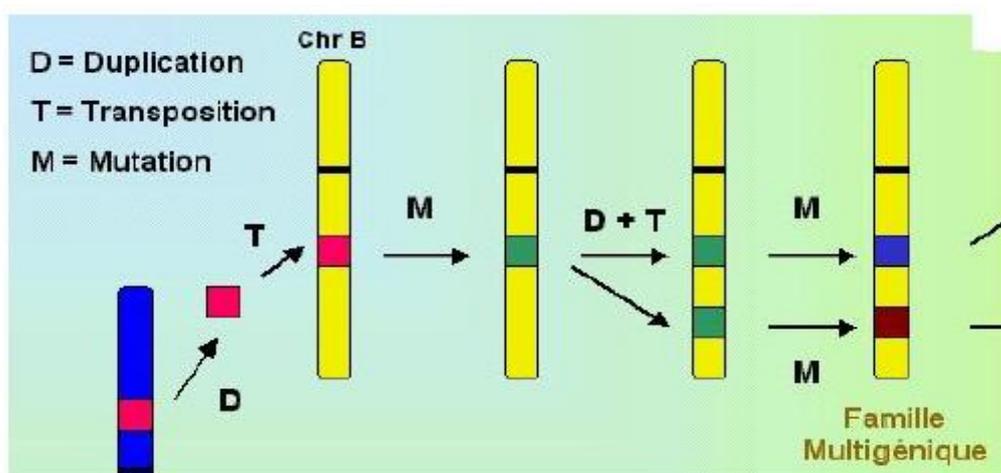


Figure 18 : Emergence d'une famille multigénique

Cela a abouti à la production de gènes différents codant pour des protéines homologues (gènes apparentés). L'émergence de cette famille multigénique des gènes de globine est véritablement un modèle évolutif d'innovation génétique.

La duplication à l'origine de la différenciation de ces deux clusters serait survenue vers 500 millions d'années. La myoglobine diffère des sous-unités alpha et bêta plus que celles-ci ne diffèrent l'une de l'autre, ce qui indique que la myoglobine a divergé avant l'apparition des clusters α et β avec une duplication il y a 800 millions d'années (Figure 19).

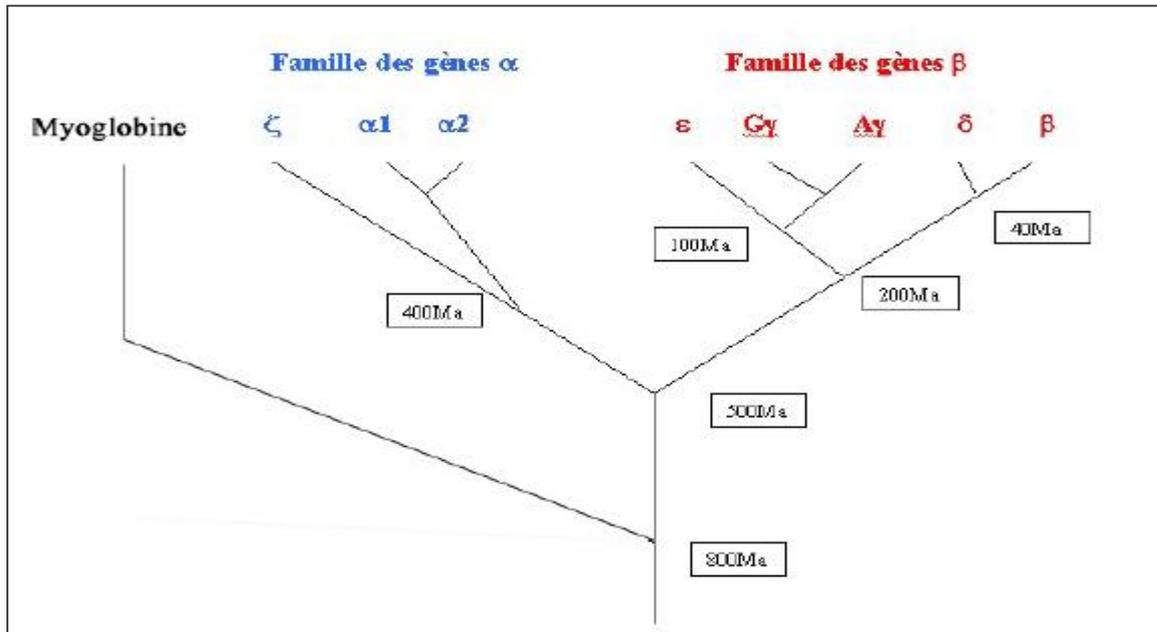


Figure 19 : Arbre phylogénétique des globines humaines

Ainsi, le cluster alpha contient dans le sens 5'-3' : un gène ζ , un pseudogène ζ : $\psi\zeta$, deux pseudogènes α : $\psi\alpha2$ et $\psi\alpha1$, deux gènes α dupliqués : $\alpha2$ et $\alpha1$, et un pseudogène θ (Figure 20). Les deux gènes α diffèrent dans leur structure par l'intron 2 et leur région 3'UTR mais codent, *in fine*, des séquences identiques.

Le cluster β contient dans le sens 5'-3' : Un gène ϵ , deux gènes γ : $G\gamma$ puis $A\gamma$, un pseudogène $\psi\beta$, un gène δ et un gène β (Figure 20). Les deux gènes γ , $G\gamma$ et $A\gamma$, codent des protéines proches, différant principalement par un acide aminé en position 136, respectivement la Glycine et l'Alanine. Il existe donc deux types d'hémoglobine fœtale.

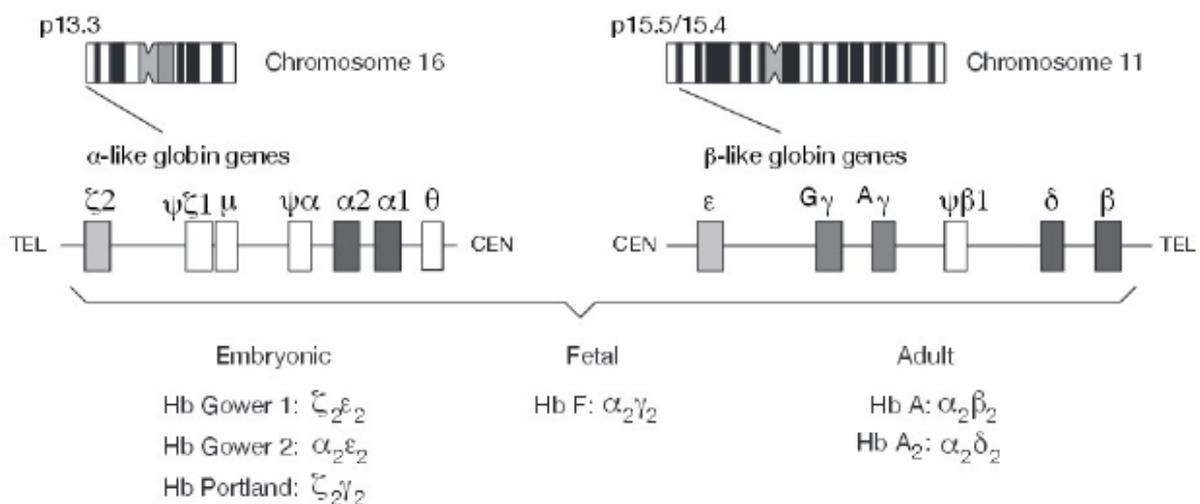


Figure 20 : Organisation des clusters et expression des chaînes de globine en fonction des stades de développement

Les gènes de ces loci sont toujours exprimés de manière coordonnée, occasionnant une production équilibrée d' α -globines like et de β -globines like, balance nécessaire pour une synthèse appropriée des différentes hémoglobines.

L'hémoglobine est un constituant du globule rouge essentiel à la vie notamment par sa fonction de transport du dioxygène. Il paraît donc évident qu'une atteinte de l'hémoglobine puisse engendrer des conséquences néfastes voire mortelles pour l'individu. On distingue deux types d'anomalies de l'hémoglobine : d'une part, les anomalies quantitatives correspondant à un défaut de synthèse, partiel ou total d'une chaîne de globine structurellement normale, il s'agit du groupe des thalassémies, et, d'autre part, les anomalies qualitatives correspondant à la présence d'une hémoglobine de structure anormale (appelée aussi variant), entraînant ou non des signes fonctionnels dont fait partie la drépanocytose (11,12).

F. Les variants de l'hémoglobine

Les anomalies des chaînes peptidiques de l'hémoglobine sont regroupées sous le terme d'hémoglobinopathies (13). Deux types sont généralement décrits :

- le premier correspond à la présence d'une hémoglobine de structure anormale, entraînant ou non des signes fonctionnels ;

- le second correspond à un défaut de synthèse, partiel ou total, des chaînes alpha et/ou bêta, qui constitue le groupe très hétérogène des thalassémies.

Les pathologies sont différentes dans leur expression clinique et leur physiopathologie. Néanmoins, il existe un certain chevauchement entre ces deux groupes puisque certaines hémoglobines de structure anormale se comportent comme des variants thalassémiques. D'autre part, les deux types d'anomalies peuvent être présents chez un même individu.

Plus de mille mutations des gènes codant les chaînes de l'hémoglobine ont été décrites. La plupart d'entre elles n'ont pas d'implications cliniques. Trois hémoglobines anormales occupent une place prépondérante de par leur fréquence et leur caractère pathogène : HbS, HbE et HbC. Les Hb anormales peuvent être classées en quatre groupes :

- 1- les variants à l'origine de problèmes de santé publique majeurs. Il s'agit surtout des HbS dans la population majoritairement africaine et des HbE dans les populations du Sud-Est asiatique ;

- 2- les variants plus rares mais présents dans les populations où l'HbS a une forte prévalence : HbC, OArab et DPunjab, qui, par elles-mêmes, n'ont pas d'effet pathogène majeur, mais qui, associées à l'HbS, conduisent à des syndromes drépanocytaires majeurs (SDM). La substitution du 6^{ème} acide aminé sur la chaîne bêta, l'acide glutamique par une valine, caractérise la variante HbS, alors qu'une substitution du même acide aminé par une lysine caractérise la variante HbC ;

- 3- les polymorphismes, habituellement silencieux sur le plan clinique (leur caractérisation et leur suivi dans des bases de données contribuent à éviter les confusions avec les variants aux conséquences cliniques sévères) ;

- 4- les variants exceptionnels à l'origine de désordres hématologiques variés (ex. Hb instables, cause d'anémies hémolytiques chroniques).

Dans les hémoglobinopathies majeures, l'hémoglobine A de l'adulte, qui comporte normalement deux chaînes d'alpha-globine et deux chaînes de bêta-globine, est modifiée par des polymorphismes génétiques qui codent la substitution d'un acide aminé au niveau des chaînes de β -globine (comme pour l'HbS, l'HbC, l'HbE) ou réduisent la production d'alpha-globine (alpha-thalassémies) ou de la β -globine (β -thalassémies). Ces dernières sont liées aux anomalies quantitatives de la production des chaînes alpha ou β et sont surtout caractérisées par une anémie

chronique, dont l'importance varie en fonction des altérations génétiques en cause et donc du type précis d'alpha-thalassémie ou de β -thalassémie.

II) La drépanocytose

La découverte de l'HbS en 1949 par Linus Pauling a été la première démonstration que la production d'une protéine anormale pouvait être la cause d'une maladie génétique (14). Ainsi naissait la notion de maladie moléculaire et la drépanocytose en était le premier exemple. En 1956, Vernon Ingram identifie l'anomalie dans la séquence en acides aminés de la chaîne β -globine (β 6Glu \rightarrow Val) (15). Un premier schéma physiopathologique centré autour de la polymérisation de l'HbS émerge dès les années 60-70. Il explique la mécanistique des événements de vaso-occlusion caractéristiques de la maladie, au premier rang desquels, la classique crise douloureuse vaso-occlusive (CVO). Il rend compte aussi de la fragilisation des globules rouges et donc de l'anémie hémolytique.

En effet, dans cette hémoglobinopathie, appelée aussi anémie falciforme, la mutation ponctuelle du 6^{ème} codon du gène de la β -globine (GAG \rightarrow GTG) se traduit par le remplacement du glutamate par la valine en position 6 de la chaîne polypeptidique. Or, le glutamate est un acide aminé hydrophile alors que la valine est un acide aminé hydrophobe. Ceci va altérer considérablement les structures secondaire, tertiaire et quaternaire du tétramère d'hémoglobine synthétisé. Cette mutation entraîne une déformation des globules rouges en faucille (Figure 21) à l'origine d'hémolyse et de l'obstruction des vaisseaux.

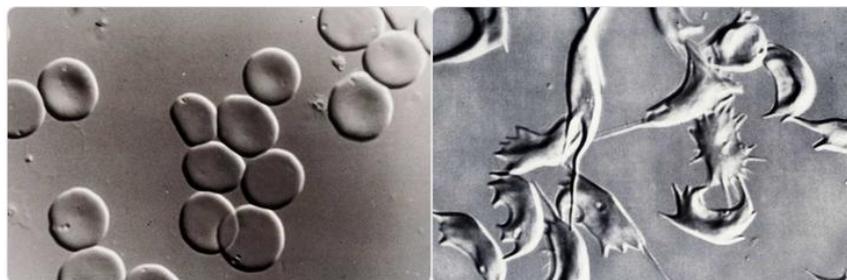


Figure 21 : Globules rouges normaux (photo de gauche), hématies en faucille (photo de droite)

Une personne atteinte de drépanocytose (symptomatique) est décrite comme homozygote S/S : les deux allèles sont porteurs de la mutation (allèle du père, allèle de la mère) ; il n'y aura donc plus d'HbA. Les sujets hétérozygotes ont un allèle muté et un allèle normal, ils ont de l'HbA et de l'HbS : ces sujets sont porteurs sains, on parle de trait drépanocytaire (16).

On appelle syndromes dépanocytaires majeurs (SDM) : les homozygotes SS et les hétérozygotes composites S ou E β thalassémiques, SC, SE, SD Punjab, SO'Arab, S-Lepore et la présence de ASAntilles (forme dominante), ASOman

A. Epidémiologie

1) Prévalence au niveau mondial

La drépanocytose est l'hémoglobinopathie la plus importante et est classée au 4^{ème} rang dans la liste des priorités de santé publique mondiales derrière le cancer, VIH et le paludisme.

120 millions de personnes sont porteuses d'un trait S soit 2,3% de la population mondiale, et sont réparties entre essentiellement les pays d'Afrique Noire (jusqu'à 25%), les Antilles, le continent Américain, le pourtour méditerranéen (Maghreb, Italie, Grèce, Egypte, Malte, ...), le Moyen-Orient et l'Asie du Sud-Est (Inde, Indonésie, ...) (4,11,17-20) (Figure 22).

Fait remarquable est la superposition de la distribution mondiale de la drépanocytose et du paludisme (Figure 22). En effet, à l'état hétérozygote, la drépanocytose offre une protection partielle vis-à-vis du paludisme. Les globules rouges A/S infestés prennent plus facilement la forme de faucille, ce qui facilite leur élimination de la circulation. De plus, la croissance du parasite est entravée en cas d'hypoxie (21).

Parmi les populations des régions où le paludisme est (était) endémique, 3 à 40% des individus seraient porteurs de variants significatifs, la prévalence des atteintes de l'hémoglobine allant de 0,3 à 25 pour 1 000 naissances vivantes (22).

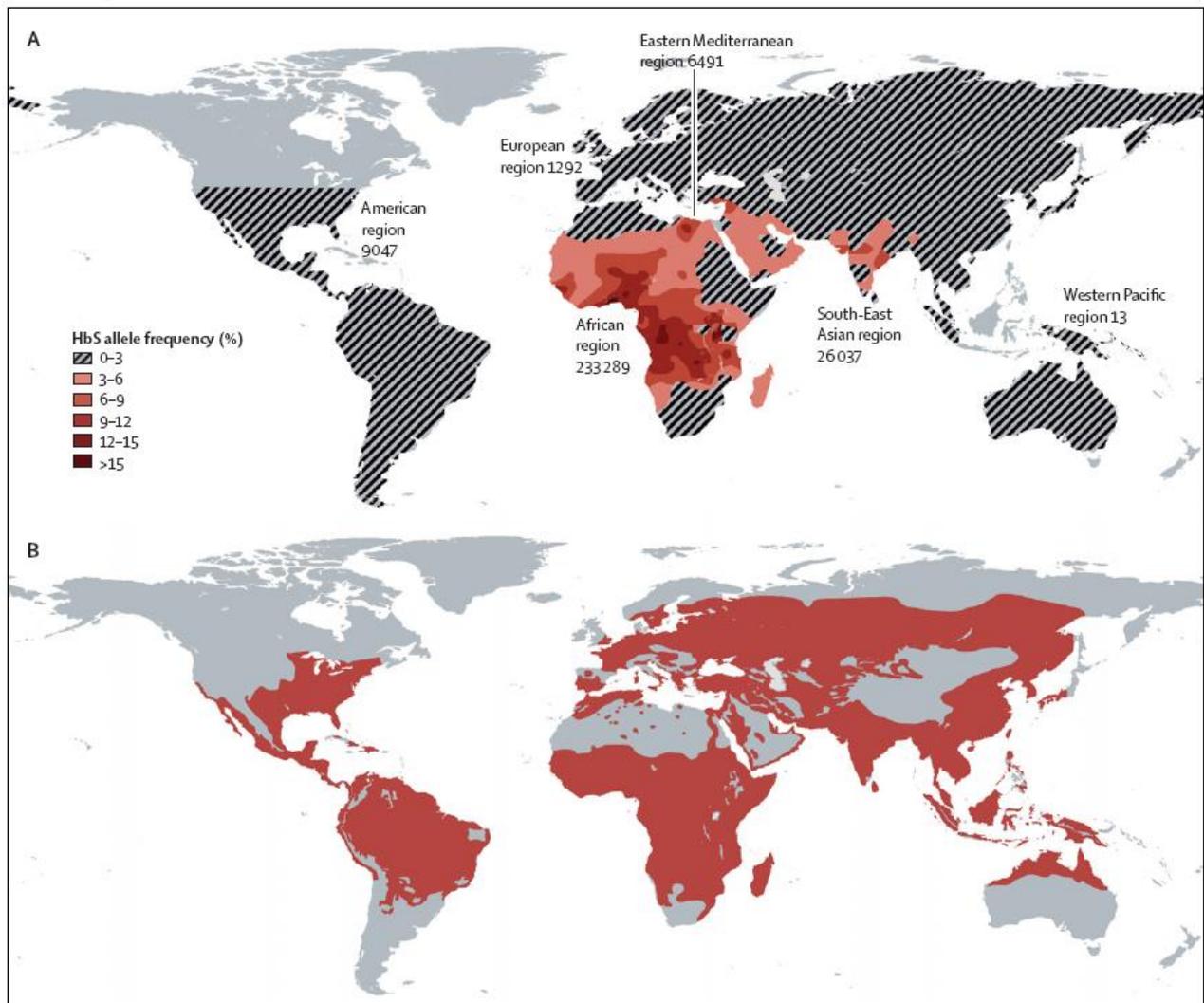


Figure 22 : Comparaison de la distribution géographique de la drépanocytose (A) et du paludisme (B) dans le monde

Suite aux migrations, la fréquence des hémoglobinopathies augmente en Europe du Nord-Ouest et en Amérique du Nord.

Cependant, l'absence de données fiables dans la plupart des pays rend difficile l'estimation du nombre de personnes réellement touchées. Il n'existe pas de registres nationaux sur la maladie dans tous les pays (20). Diverses estimations ont été publiées (20,22,23) : l'Organisation Mondiale de la Santé rapporte des fréquences de distribution de l'allèle S très variables selon les régions : Afrique subsaharienne (une vingtaine de pays 2% à 38 %), Inde (6 régions 17 % à 30 %), Méditerranée orientale (Arabie saoudite [1 % à 29%] et Irak [0 % à 22%] (23). À partir de ces estimations, la prévalence de la pathologie est la plus élevée en Afrique sub-saharienne : 230 000 nouveau-nés par an. En comparaison, 2600 nouveau-nés par an seraient concernés en Amérique du Nord, et 1300 en Europe.

50 % du nombre total de nourrissons AS ou SS seraient nés dans des régions spécifiques de trois pays, Nigeria, Inde et Congo. Les fréquences les plus élevées d'HbS sont presque exclusivement retrouvées en Afrique subsaharienne.

Plusieurs études ont estimé la prévalence à la naissance des SDM et des porteurs hétérozygotes pour un certain nombre de pays (Tableau 2).

Tableau 2 : Prévalence à la naissance des SDM et des porteurs hétérozygotes dans le monde

	SDM/100 000 naissances	Hb AS (%)	Hb AC (%)
Italie	10	0,2	0
Portugal	32	0,8	0
Liban	23	1,0	—
Égypte	3	0,2	—
Turquie	17	0,4	0
Nigeria	2 182	24,4	4,5
Somalie	0	0,1	0
Jamaïque	578	11	4
Mexique	5	0,3	0,1
Chili	0	0	0
Inde	98	1,9	0
Pakistan	7	0,2	0
Chine	0	0	0
Vietnam	0	0	0
États-Unis	62	0,9	0,7
Grande-Bretagne	63	0,5	0,1
Canada	28	0,48	0,1

Source : Modell's Haemoglobinopathologist's Almanac. Epidemiological estimates for Haemoglobin disorders compiled by B. Modell & M. Darlison. UCL (University College of London) Centre for Health Informatics and Multiprofessional Education (CHIME) and WHO Collaborating Centre for the Community Control of Hereditary Disorders. www.chime.ucl.ac.uk/work-areas/cab/hb/quickref.xls, consulté le 5 novembre 2009.

Plusieurs limites sont attachées à ces estimations, liées à la rareté et à l'accessibilité de l'information sur la fréquence de l'allèle HbS. Les estimations n'incluent pas obligatoirement les HbSC ou les HbS β -thalassémiques.

1) Mortalité au niveau mondial

À l'échelle mondiale, les hémoglobinopathies seraient responsables de 3,4 % des décès des enfants de moins de 5 ans. En Afrique de l'Ouest, ce taux atteindrait 40% des enfants de couples à risque de SDM (22).

2) Prévalence en France

La drépanocytose est la plus fréquente des maladies repérées dans le cadre du dépistage néonatal, devant l'hypothyroïdie congénitale, la mucoviscidose, la phénylcétonurie (classique ou atypique), l'hyperplasie congénitale des surrénales (formes classiques) (Tableau 3) (24).

Tableau 3 : Fréquence des pathologies dépistées par le programme national du dépistage néonatal en France

	PCU	HC	HCS*	SDM	CF
Nombre nouveau-nés testés	809 078	809 078	809 078	335 360	792 187
% suspects	0.04	0.13	0.24	0.14	0.50
Nombre de malades	37 (+ 41 HMP)	270	47	466	160
Nombre de convoqués	127	437	382	466	465
Fréquence globale [IC95%]	1 / 21 867 [1/32 262-1/16 538] Avec HMP : 1 / 10 373 [1/13 331-1/8 489]	1 / 2 997 [1/3 402 - 1/2 671]	1 / 17 214 [1/24 326-1/13 388]	1 / 1 736 [1/1 910 - 1/1 592]	1 / 4 951 [1/5 859 - 1/4 288]

Chaque année, l'Association Française pour le Dépistage et la Prévention du Handicap de l'Enfant (AFDPHE) publiait (jusqu'en 2018) le bilan d'activité du dépistage néonatal.

En 2015, 335 360 nouveau-nés ont été testés pour le dépistage ciblé de la drépanocytose (39409 en DOM-TOM et 295951 nouveau-nés en France métropolitaine). Sur l'ensemble des nouveau-nés testés, 466 cas de SDM dont 336 homozygotes S/S (drépanocytose) ont été recensés, soit une prévalence 1,4/1000 de SDM (1/1000 pour la drépanocytose) répartis en 1,3/1000 en France métropolitaine et 2/1000 dans les DOM-TOM (Tableau 4) :

- 387 SDM en Métropole (281 SS ou non différenciés « SS ou Sβ°thal », 14 Sβ+ ou Sβ°thal et 92 SC). L'incidence moyenne des SDM en métropole est de 1/765 [IC95 % : 1/849;1/695] nouveau-nés testés pour drépanocytose de façon ciblée et de 1/1969 [IC95 % : 1/2186;1/1790] sur l'ensemble des nouveau-nés. En métropole, 38,85 % des nouveau-nés sont ciblés, ce pourcentage varie de 8,13% en Bretagne à 73,40 % en Ile de France, en fonction des différentes origines géographiques représentées dans la population.

- 79 SDM outre-mer (55 SS ou non différenciés « SS ou Sβ°thal », 2 Sβ+ ou Sβ°thal et 22 SC) soit une incidence de 1/499 [IC95% : 1/640;1/409]. En 2015, l'incidence la plus forte est constatée en Guyane avec 4,1/1000 soit 1/244 naissances et la plus faible à la Réunion avec 4,3/10 000 soit 1/2326.

Les enfants atteints d'un SDM se trouvent essentiellement en Ile de France qui représente 61,5% (238/387) des malades de Métropole et 51,1 % (238/466) des malades de toute la France avec une incidence régionale de 1/765 [IC95% : 1/876;1/678] en population générale (Tableau 4).

Tableau 4 : Dépistage de la drépanocytose en 2015 en France

	Nombre de NN testés Drépanocytose	Malades Syndrome Drépanocytaire					β ⁰ Thalassémie majeure	Hétérozygotes HbS			
		SDM	SS	SC)	Sβthal	Autres SDM		AS	Fréquence AS sur les NN ciblés	AC	Autre anomalie
Alsace	8 939	7	6	0	1	0	0	163	1/55	44	29
dont Est Mosellan-Lorraine	1 273	0	0	0	0	0	0	10	1/127	5	0
Aquitaine	6 090	10	6	2	2	0	0	185	1/33	49	56
Auvergne	2 373	1	1	0	0	0	1	44	1/54	9	0
Bourgogne	3 265	7	7	0	0	0	0	93	1/35	24	1
Bretagne	2 769	3	2	1	0	0	0	140	1/20	26	0
Centre	6 469	17	13	2	2	0	0	284	1/23	59	1
Champagne-Ardenne	2 886	7	6	1	0	0	0	95	1/30	17	5
Franche-Comté	3 040	1	1	0	0	0	0	43	1/71	18	11
Ile de France	133 549	238	168	62	8	0	4	4 443	1/30	1 155	34
Languedoc-Roussillon	12 379	2	2	0	0	0	0	133	1/93	63	52
Limousin	1 881	1	0	1	0	0	0	66	1/29	13	6
Lorraine (sauf Est Mosellan)	5 090	5	2	2	1	0	0	101	1/50	31	16
Midi-Pyrénées	10 448	11	10	1	0	0	0	198	1/53	51	80
Nord-Pas de Calais	10 986	3	2	1	0	0	0	210	1/52	79	23
Normandie	6 306	12	8	4	0	0	0	266	1/24	48	15
PACA + Corse	33 410	7	2	5	0	0	3	370	1/90	111	117
dont Corse	1 016	0	0	0	0	0	0	10	1/102	1	1
Pays de Loire											
Angers	4 253	6	4	2	0	0	0	201	1/21	36	16
Nantes	4 483	7	4	3	0	0	0	169	1/27	40	9
dont Poitou Charentes	2 381	7	5	2	0	0	0	89	1/27	19	6
Picardie	5 627	9	6	3	0	0	0	222	1/25	54	1
Rhône-Alpes	31708	33	31	2	0	0	2	646	1/49	152	115
Sous Total	295 951	387	281	92	14	0	10	8 072	1/37	2 079	587
Guadeloupe ⁽⁴⁾	5 805	22	13	8	1	0	0	430	1/14	132	14
Guyane	6 795	28	16	12	0	0	0	561	1/12	173	15
Martinique ⁽⁴⁾	3 969	15	13	2	0	0	0	266	1/15	112	16
Mayotte	8 734	7	6	0	1	0	1	384	1/23	0	1
Réunion	14 073	6	6	0	0	0	0	323	1/44	6	20
St Pierre et Miquelon	10	0	0	0	0	0	0	0	1/-	0	0
Polynésie, Nouvelle Calédonie, Wallis et Futuna	23	1	1	0	0	0	0	2	1/12	1	0
Sous Total	39 409	79	55	22	2	0	1	1 966	1/20	424	66
TOTAL	335 360	466	336	114	16	0	11	10 038	1/33	2 503	653

Le dépistage repère également des anomalies génétiques de l'hémoglobine autre que les SDM (Tableau 4) :

- La 2^{ème} anomalie la plus fréquente est l'hémoglobine C (HbC) présente chez 2 503 nouveau-nés ; d'autres anomalies sont retrouvées chez 653 nouveau-nés (HbE, HbD ...). Ces enfants ne sont pas malades, ils sont porteurs d'une anomalie à l'état hétérozygote qu'ils sont susceptibles de transmettre à leur descendance.

- Enfin, il peut s'agir d'une absence d'hémoglobine normale (HbA), ou une hémoglobine A basse, et nécessitant une prise en charge. Il s'agit de la β⁰thalassémie majeure et de certaines

C β thalassémies. La β thalassémie majeure est une hémoglobinopathie grave non SDM, 11 cas ont été déclarés en 2015. N'étant pas définis comme SDM, les cas de β thalassémies majeures ne sont ni systématiquement déclarés ni documentés à l'AFDPHE mais au Centre de référence des Thalassémies.

En conclusion, ce dépistage en 2015 a engendré 466 consultations de prise en charge d'un SDM et 11 dans le cadre de β thalassémies majeure et, pour environ 12 500 nouveau-nés porteurs hétérozygotes, une consultation d'information aux familles.

Le Tableau 5 récapitule le nombre de nouveau-nés dépistés et la répartition des anomalies de l'hémoglobine par région, bilan au 31/12/2015 depuis l'origine du dépistage en France.

Tableau 5 : Bilan au 31/12/2015 depuis l'origine du dépistage néonatal de la drépanocytose en France

	Nombre de NN testés	SS	SC	S β thal	Autre	Total ^(a)	Fréquence
Alsace	118 925	73	14	12	1	100	1/1 189
Aquitaine	68 125	53	18	5	0	76	1/896
Auvergne	36 288	12	3	0	0	15	1/2 419
Bourgogne	45 779	43	5	0	0	48	1/954
Bretagne	28 690	35	5	14	0	54	1/531
Centre	71 042	105	23	8	0	136	1/522
Champagne-Ardenne	53 164	41	9	6	0	56	1/949
Franche-Comté	39 342	7	0	2	1	10	1/3 934
Ile de France	1 947 883	2 552	793	268	14	3 627	1/537
Languedoc-Roussillon	159 714	29	2	1	0	32	1/4 991
Limousin	22 311	15	3	2	0	20	1/1 116
Lorraine	74 896	39	9	6	0	54	1/1 387
Midi-Pyrénées	126 898	66	17	2	0	85	1/1 493
Nord-Pas de Calais	217 752	86	19	9	0	114	1/1 910
Normandie	100 744	117	29	6	0	152	1/663
PACA + Corse	464 762	59	23	41	0	123	1/3 779
Pays de Loire + Poitou							
Angers	61 091	61	17	4	0	82	1/745
Nantes	71 587	44	14	7	0	65	1/1 101
Picardie	68 361	69	22	6	0	97	1/705
Rhône-Alpes	383 927	254	44	26	2	326	1/1 178
Sous Total	4 161 281	3 760	1 069	425	18	5 272	1/789
Guadeloupe	199 363	542	124	24	1	691	1/289
Guyane	128 649	340	209	13	0	562	1/229
Martinique	143 111	296	96	22	6	420	1/341
Mayotte	126 748	187	0	5	0	192	1/660
Réunion	302 883	66	2	6	1	75	1/4 038
St Pierre et Miquelon	2	0	0	0	0	0	1/-
Polynésie, Nouvelle Calédonie, Wallis et Futuna							
400	1	0	0	0	0	1	1/-
Sous Total	901 156	1 432	431	70	8	1 941	1/464
TOTAL	5 062 437	5 192	1 500	495	26	7 213	1/702

1) Mortalité en France

Sur la période 1979-2010, 953 décès liés à la drépanocytose ont été enregistrés en France (Figure 23). On observe un recul de l'âge médian des décès aussi bien en France métropolitaine (de 21,5 à 35,1 ans entre 1979-1994 et 1995-2010) que dans les départements d'outre-mer (DOM) (de 27,0 à 38,7 ans entre 1979-1994 et 1995-2010).

Les taux ont diminué nettement chez les enfants de moins de cinq ans entre 1987 et 2010. Les décès concernent surtout des personnes résidant dans les DOM et en Ile-de-France (25).

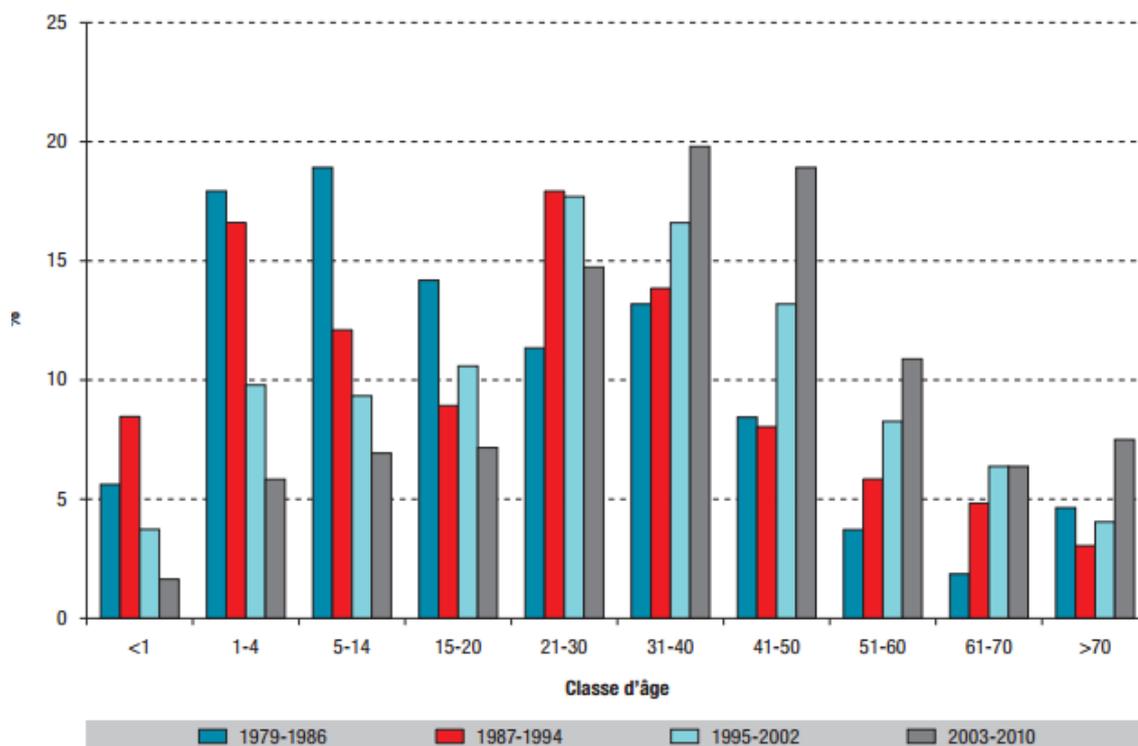


Figure 23 : Distribution des décès liés à la drépanocytose par période et par classe d'âge en France de 1979 à 2010

B. Transmission

La drépanocytose est une maladie à transmission autosomique récessive. Le terme «autosomique» signifie que les deux gènes en cause dans la maladie sont situés sur l'une des 22 autres paires de chromosomes que les chromosomes sexuels (X et Y). La maladie peut donc apparaître aussi bien chez une fille que chez un garçon. Chaque individu porte deux copies de chaque gène : une copie héritée de la mère et une copie héritée du père. Le terme « récessif » signifie que les deux copies du gène doivent être porteurs d'une mutation pour que la maladie apparaisse. Ainsi, les parents d'un enfant atteint de la maladie ne sont peut-être pas malades eux-mêmes, mais ils sont tous les deux «porteurs» d'au moins un exemplaire du gène défectueux (ils sont hétérozygotes AS, cf. ci-dessous). Dans ce cas, le risque d'avoir un enfant atteint de la drépanocytose pour un couple où les deux parents sont «porteurs» est de un sur quatre à chaque grossesse (Figure 24, Tableau 6). Les modes de transmission de la drépanocytose et les risques pour un couple d'avoir un enfant atteint peuvent être précisés lors d'une consultation de conseil génétique.

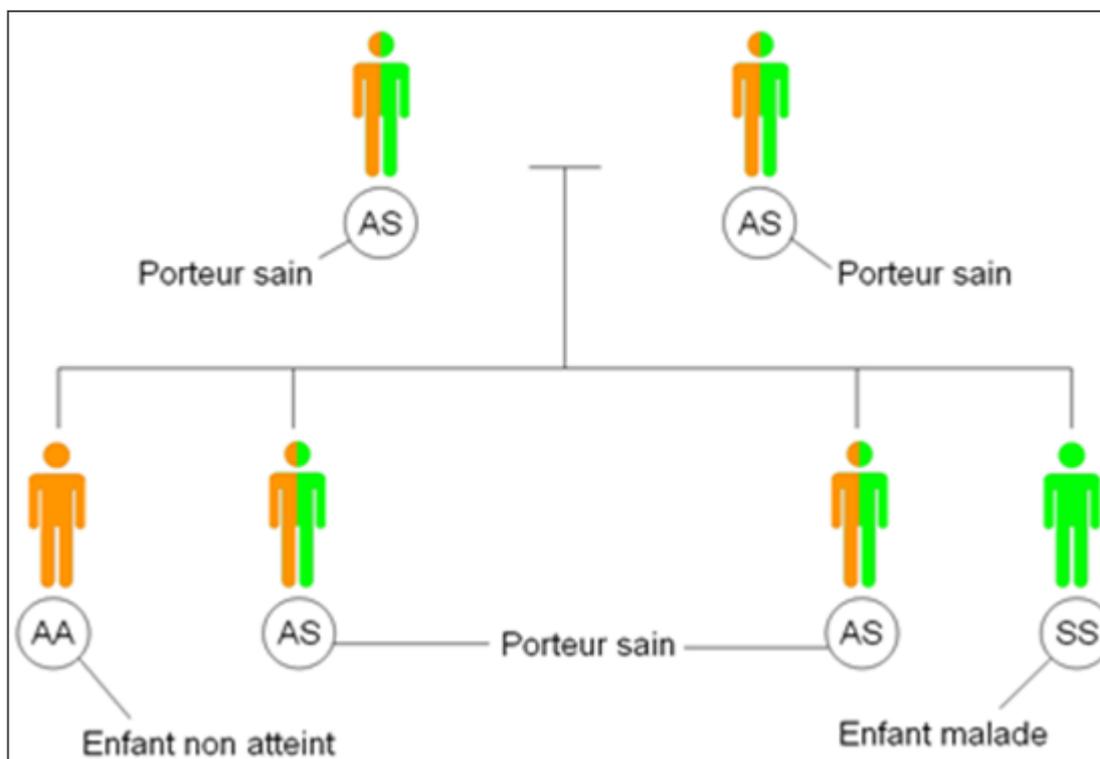


Figure 24 : Mode de transmission de l'allèle muté HbS

Tableau 6 : Les différents profils obtenus chez le nouveau-né en fonction du génotype des parents

Mère ↓	Père →	AA	AS	SS
AA		AA = 100%	AA = 50% AS = 50%	AS = 100%
AS		AA = 50% AS = 50%	AA = 25% SS = 25% AS = 50%	AS = 50% SS = 50%
SS		AS = 100%	AS = 50% SS = 50%	SS = 100%

C. Physiopathologie de la drépanocytose

La drépanocytose est caractérisée par une mutation du 6^{ème} acide aminé de la chaîne β de la globine, responsable de la formation d'HbS qui est moins affine au dioxygène.

A l'état désoxygéné, les monomères β S vont présenter leur valine en surface, valine qui va interagir avec deux acides aminés hydrophobes d'un autre monomère β (85 β Phe et 88 β Leu)

formant une poche hydrophobe. Ceci va aboutir à la polymérisation des tétramères d'HbS. Les polymères vont ensuite s'associer en un réseau fibreux rigide non soluble déformant l'hématie en faucille : c'est la falciformation. Le cycle de falciformation/défalciformation est réversible pendant quelques cycles puis devient irréversible, et le globule rouge devient définitivement un drépanocyte. Les globules rouges ayant subi plusieurs cycles de désoxygénation sont fragilisés et il s'ensuit une hémolyse chronique. Les globules rouges drépanocytaires ont une déformabilité diminuée et leur agglutination constitue le facteur principal des accidents vaso-occlusifs qui se produisent de façon privilégiée dans la microcirculation capillaire. Ces CVO sont dues à des microthrombi au niveau des capillaires profonds à l'origine d'infarctus tissulaires (Figure 25). Ils concernent surtout l'extrémité des membres chez l'enfant, puis peuvent toucher les os et les viscères profonds.

La formation de ces grandes fibres de polymères citées ci-dessus entraîne également une cascade d'autres anomalies cellulaires qui participent au mécanisme physiopathologique. Une dérégulation de l'homéostasie des cations avec, notamment, la perte de potassium et une déshydratation cellulaire augmente la concentration intracellulaire en Hb ce qui favorise la polymérisation de la désoxy-HbS. L'Hb se dénature et des hémichromes s'agglomèrent à la face interne de la membrane avec les protéines du cytosquelette, en particulier la protéine bande 3. Ce processus s'accompagne de la perte d'hème et de la libération de Fe^{3+} qui favorise l'existence d'un microenvironnement oxydant. L'asymétrie normale des phospholipides membranaires est perturbée avec exposition à la surface cellulaire de phosphatidylsérines anioniques. Des immunoglobulines IgG anti-protéine bande 3 s'accumulent en surface au niveau des agglomérats de protéine bande 3, exacerbant l'érythrophagocytose par les macrophages. Enfin, toutes ces altérations membranaires s'accompagnent de la libération de microparticules. Rigidification et fragilisation des globules rouges sont à la base de la vaso-occlusion d'une part et de l'anémie hémolytique d'autre part. De façon inattendue, plutôt que les globules rouges altérés décrits plus haut, les acteurs principaux sont une population de globules rouges jeunes, dit «réticulocytes de stress» qui, prématurément sortis de la moëlle osseuse, expriment à leur surface des protéines d'adhérence dont le rôle normal est précisément de les maintenir dans la moëlle. La vaso-occlusion semble donc se faire en deux étapes :

- la première ferait intervenir l'adhérence de ces globules rouges jeunes à l'endothélium des veinules postcapillaires, ralentissant le flux circulatoire, initiant et propageant la falciformation des globules matures
- et conduisant dans une deuxième étape à «l'entrappement» des drépanocytes irréversibles et à l'occlusion complète des micro-vaisseaux.

Les premiers partenaires moléculaires identifiés comme acteurs de ces interactions anormales sur les globules rouges ont été l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) qui se lie directement à la protéine VCAM-1 de l'endothélium, et CD36 qui interagit avec une autre molécule CD36 exprimée sur l'endothélium par l'intermédiaire d'une molécule de thrombospondine (TSP). Il y a d'autres partenaires identifiés érythroïdes d'un côté, endothéliaux de l'autre, l'implication d'autres protéines plasmatiques et la description d'un réseau intriqué d'interactions probablement coopératives. La situation varie selon les territoires vasculaires, par exemple VCAM-1 est spécifique de l'endothélium de la microcirculation, le facteur de von Willebrand interviendrait au niveau des gros vaisseaux. Les structures sous-endothéliales, exposées par des lésions de l'endothélium dont témoignent la mise en évidence de cellules endothéliales circulantes, sont également impliquées : l'antigène BCAM/Lu érythrocytaire, par exemple, interagit avec la laminine du sous-endothélium. Ainsi plusieurs acteurs cellulaires interviennent dans le déclenchement de la vaso-occlusion : globules rouges drépanocytaires, cellules endothéliales, plaquettes activées (sécrétant la TSP) mais aussi les polynucléaires. En effet, l'hyperleucocytose est presque toujours constante chez le drépanocyttaire. La présence de leucocytes adhérents dans

les veinules post-capillaires suggère fortement, du fait de leur volume, leur participation majeure au ralentissement circulatoire initiateur de la vaso-occlusion. Il a été aussi montré que les globules rouges drépanocytaires sont capables d'interagir avec les leucocytes et tout particulièrement les polynucléaires neutrophiles. L'ensemble de ces interactions se déroule dans un contexte inflammatoire subintraité entretenu par un ensemble de mécanismes surajoutés. Les phosphatidylsérines anormalement exposées à la surface des globules rouges et les cellules endothéliales circulantes exprimant du facteur tissulaire participent à une activation à bas bruit du système de la coagulation. La production *a minima* de thrombine qui en résulte, surajoutée à des lésions d'ischémie-reperfusion sont probablement à la base de ces phénomènes inflammatoires. Il en résulte une production de cytokines proinflammatoires qui entretiennent un état d'activation cellulaire généralisé. De plus, la libération par hémolyse de fer hémérique libre est à l'origine d'un stress oxydatif qui participe via l'activation de facteurs de transcription tels que NF- κ B et AP-1 à l'expression endothéliale de VCAM-1, d'ICAM-1 et de E-sélectine, protéines impliquées dans l'adhérence des réticulocytes de stress et le recrutement des leucocytes. Il faut noter enfin, que ces phénomènes d'activation cellulaire s'accompagnent de la libération de microparticules. A côté donc des microparticules d'origine érythrocytaire mentionnées plus haut, on observe aussi des microparticules circulantes d'origine endothéliale, plaquettaire et leucocytaire, avec une production exacerbée au moment des CVO. De façon significative, ces microparticules ne sont pas que le reflet passif de l'activation cellulaire, elles en sont aussi probablement des acteurs importants par les propriétés activatrices que leur confèrent leur membrane remaniée. Cytokines et hypoxie modulent des voies de signalisation impliquées dans la régulation des transports ioniques et l'hydratation du globule rouge dont on voit l'influence sur la polymérisation de l'HbS. Ainsi, l'équilibre précaire dans lequel se trouve le patient drépanocytaire à l'état basal et comment celui-ci peut basculer vers le déclenchement d'une CVO lors d'une infection par exemple qui majore l'inflammation, ou lors d'un stress qui active des protéines d'adhérence sur le globule rouge. La compréhension physiopathologique de la maladie est essentielle au développement de nouvelles hypothèses thérapeutiques à tester.

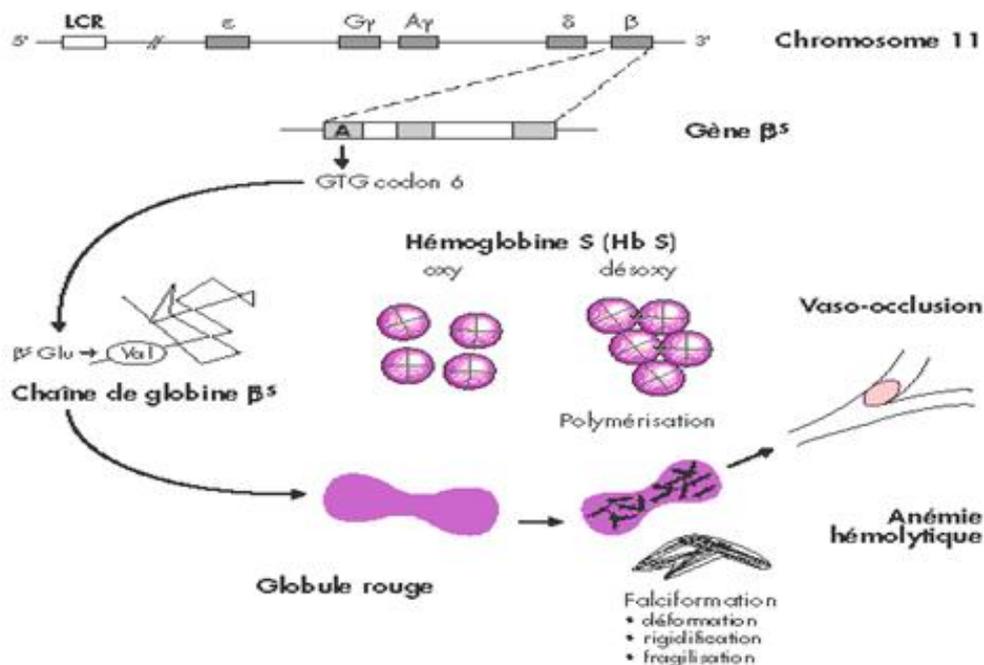


Figure 25 : Physiopathologie de la drépanocytose

D. Tableau clinico-biologique

La plupart des nouveau-nés atteints de drépanocytose (S/S) sont asymptomatiques à la naissance et deviennent symptomatiques durant la première année de vie lorsque le taux d'HbF diminue et que celui d'HbS augmente (26).

Le diagnostic d'anémie drépanocytaire est suspecté chez les jeunes enfants en cas de gonflements douloureux des mains et des pieds, de pâleur, d'ictère, de méningite ou septicémie à pneumocoques, d'anémie hémolytique chronique sévère avec hypertrophie de la rate (splénomégalie due à la séquestration splénique des globules rouges falciformes).

Les signes cliniques retrouvés chez les patients drépanocytaires sont une susceptibilité aux infections bactériennes, une anémie hémolytique chronique avec épisode d'aggravation aiguë et des phénomènes vaso-occlusifs.

Sur le plan biologique, pour les homozygotes, on retrouve une anémie normocytaire normochrome régénérative ainsi qu'une hyperleucocytose.

L'hémolyse entraîne une augmentation de bilirubine libre et de LDH.

Au frottis sanguin, on peut voir les drépanocytes, une anisopoïkylocytose ainsi que des corps de Jolly (dû à l'asplénisme) (Figures 26, 27).

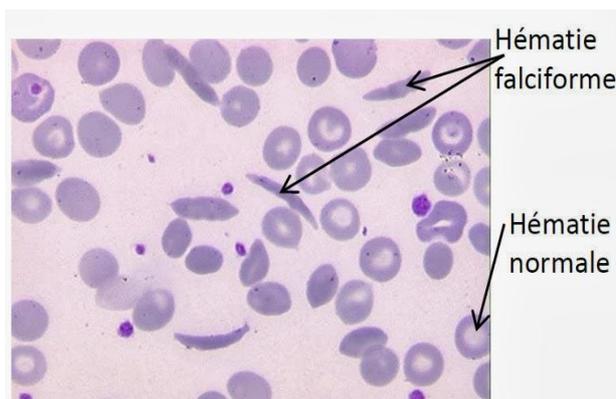


Figure 27 : hématies falciformes

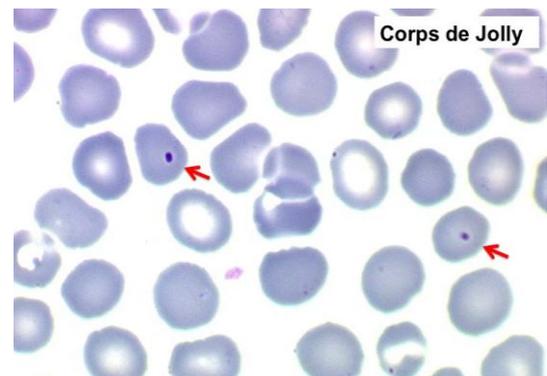


Figure 26 : Corps de Jolly

Les hétérozygotes sont généralement asymptomatiques, en l'absence de mutations associées. L'hémogramme est alors normal et le taux d'HbS se situe à terme à l'âge adulte entre 35 et 40%.

Il peut arriver que l'hétérozygote soit symptomatique. C'est le cas du variant est l'HbS Antilles qui possède une mutation supplémentaire au niveau de la chaîne β . Cette mutation supplémentaire favorise la polymérisation du variant et équivaut à un SDM de génotype S/C (4).

Parfois une α -thalassémie est associée à l'HbS, ce qui entraîne une microcytose et diminue le taux d'HbS, mais ne crée pas de SDM. Si un allèle alpha est muté, on a 30 à 35% d'HbS. Si deux allèles alpha sont mutés, ce taux est de 25 à 30%. Il existe plusieurs mutations qui, associées à un HbS hétérozygote, entraînent systématiquement un SDM (hétérozygotes composites). C'est le cas de l'hémoglobine C, ainsi que des β -thalassémies. La présence d'HbC favorise la déshydratation des globules rouges alors que la β -thalassémie augmente le taux d'HbS (Tableau 7). Deux autres variant plus rares, l'HbD Punjab et l'HbO Arab, engendrent également la survenue d'un SDM chez l'hétérozygote HbS. En effet, ces deux variants stabilisent les polymères d'HbS (4).

Tableau 7 : Caractéristiques biologiques des syndromes drépanocytaires chez l'Adulte

	Hb (g/dl)	VGM (fl)	réticulocytes	Morphologie érythrocytaire	Étude de l'Hb			
					HbA (%)	HbS (%)	HbF (%)	HbA ₂ (%)
AS	N	N*	N	N	60-65	35-40*	< 1	v
SS	6-10	N*	↑	Drépanocytes (+ à +++) Cellules cibles (+) Corps de Jolly (±)	0	80-95	5-20	v
SC	10-12	↓ (70-90)	↑	Drépanocytes (rares) Cellules cibles (50 %) Poïkilocytose	0	50 (HbC = 45)	1-7	v
S/β ⁰ -thalassémie	9-12	↓ (65-95)	↑	Drépanocytes (rares) Cellules cibles (+ à ++) Microcytes (+ à ++) Poïkilocytose	1-25	55-90	5-15	v
S/β ⁺ -thalassémie	7-11	↓ (60-80)	↑	Drépanocytes (+) Cellules cibles (+ à ++) Microcytes (+ à ++) Poïkilocytose	0	80-90	5-15	v
S/PHHF	N	N*	N	Cellules cibles (±) Microcytes (±)	0	≥ 70	15-35	v

VGM : volume globulaire moyen ; N : normal.

* : valeur abaissée en cas d'α-thalassémie associée.

v : variable car le dosage de l'HbA₂ est ininterprétable en raison d'une contamination par de l'HbS.

D'après : Girot R. – La drépanocytose. – Montrouge : John Libbey Eurotext, 2003 ; p. 16.

E. Complications

Parmi les complications aiguës, on retrouve les infections (pneumopathies, méningites, ostéomyélites et cholécystites), les CVO, les séquestrations spléniques, le syndrome thoracique aigu (STA), les accidents vasculaires cérébraux (AVC) et les exacerbations aiguës de l'anémie.

1) Les crises vaso-occlusives (CVO)

Les CVO sont les complications les plus fréquentes (27) ainsi que celles qui suscitent le plus d'hospitalisations (28). Les accidents ischémiques vaso-occlusifs hyperalgiques entraînent une ischémie des tissus conduisant à des douleurs aiguës et chroniques ainsi qu'à une perte de fonctionnalité de tissus ou d'organes à l'origine des complications, osseuses et ostéoarticulaires, d'ulcères cutanés, de priapisme, de complication hépatobiliaires, ophtalmologiques et rénales. La prise en charge de ces crises nécessite un traitement antalgique efficace en essayant d'éviter les dérivés morphiniques (risque de dépendance).

De plus, les CVO au niveau des extrémités (dactylites) sont une des manifestations les plus fréquentes au cours des premières années, les crises douloureuses au niveau des os longs et des vertèbres ont tendance à survenir plus tardivement. Une étude a montré que l'apparition d'une dactylite, une anémie inférieure à 7g/dL ainsi qu'une hyperleucocytose, au cours des deux premières années de la vie de l'enfant, sont prédictifs d'une drépanocytose avec symptomatologie sévère au cours de la vie de l'individu (29).

La surveillance de ces crises est essentielle et doit être rigoureuse. En effet, sans traitement adapté, la CVO peut évoluer vers un syndrome thoracique aigu (STA) (30).

2) Le syndrome thoracique aigu (STA)

Le STA est un infiltrat pulmonaire : tout symptôme respiratoire doit faire penser à un STA. Il peut apparaître un ou deux jours après une dyspnée, une toux, une expectoration, des douleurs thoraciques ou de la fièvre. Différents mécanismes en sont la cause, comme la vaso-occlusion,

l'hypoventilation, la thrombose et l'infection. Plusieurs facteurs favorisent l'apparition de ce syndrome tel que l'hypertension artérielle pulmonaire, le surdosage morphinique, l'hypoventilation alvéolaire (par douleur thoracique) et les corticoïdes. La mise en place d'un traitement antalgique efficace, de la kinésithérapie respiratoire associée à une oxygénothérapie ainsi qu'une hydratation abondante afin de maintenir la volémie est essentielle à la résolution du STA. Cependant, ce STA suscite chez de nombreux patients de l'anxiété nécessitant l'administration d'hydroxyzine (anti-histaminique sédatif). Un soutien psychologique peut s'avérer bénéfique pour certains d'entre eux (30).

3) Exacerbation de l'anémie

En ce qui concerne l'anémie, elle est généralement correctement tolérée au repos. Mais, lorsque le taux d'hémoglobine atteint une valeur inférieure à la valeur de base du patient moins 2g/dL, l'exacerbation aiguë de l'anémie nécessite une hospitalisation. Différentes étiologies peuvent expliquer cette exacerbation. C'est le cas notamment de l'insuffisance rénale, de l'inflammation, d'une carence ou d'une infection virale notamment à parvovirus B19 avec un tableau clinique de crise aplasique. L'interprétation fait appel aux données cliniques (séjour en zone impaludée, fièvre, splénomégalie, observance) et biologiques (baisse de l'hémoglobine, réticulocytes, LDH, fractions de l'Hb) (30). Les séquestrations spléniques, se traduisent par une augmentation du volume de la rate et une exacerbation brutale de l'anémie entraînant un choc hypovolémique.

4) Le priapisme

Le priapisme est une autre complication grave. Il peut entraîner une nécrose des corps caverneux, et donc une impuissance définitive, avec un risque psychologique important. Il concerne 42% des adultes drépanocytaires. Il est donc essentiel d'informer précocement les hommes afin de repérer et traiter au plus vite le priapisme. Lorsque celui-ci se résout en moins d'une heure, il est dit intermittent. Dans ce cas, il peut être pris en charge au domicile. L'objectif est d'éviter le passage au priapisme aigu (plus d'une heure) ou à la récurrence. Pour ce faire, le patient doit pratiquer des exercices musculaires des membres inférieurs (montée et descente d'escaliers par exemple) susceptibles de résoudre le priapisme par vol vasculaire. Le traitement médicamenteux initial est l'étiléfrine par voie orale (20 à 50 mg/j). En fonction de la compliance du patient, une auto-injection d'étiléfrine est possible en cas de persistance (formation nécessaire). Ce principe actif est contre indiqué en cas de glaucome à angle fermé, de rétention urinaire, d'insuffisance coronarienne, de troubles du rythme ou d'hypertension artérielle.

Si le priapisme est aigu, la prise en charge est hospitalière. Dans ce cas, on injecte en intra caverneux 10mg d'étiléfrine, puis à nouveau 10mg vingt minutes plus tard en l'absence de résultat. En cas d'échec ou de priapisme de plus de trois heures, l'injection est précédée par un drainage par pression manuelle douce. Les injections peuvent être répétées si la réponse est temporaire.

La prise en charge est aussi psychologique.

Enfin, on recommande au patient d'éviter les facteurs favorisants (déshydratation, désaturation nocturne, tabac) (31).

5) Le risque infectieux

En ce qui concerne les complications aiguës précoces, les drépanocytaires ont une susceptibilité accrue aux infections (en particulier à celles dues aux bactéries encapsulées). Ainsi, les septicémies à *Streptococcus pneumoniae*, avec ou sans méningite, sont parmi les complications et les causes de décès les plus fréquentes chez les enfants de moins de 3 ans atteints de drépanocytose. Des infections à *Hemophilus influenzae* ou à *Neisseria meningitidis* ont aussi été identifiées lors d'infections invasives chez les enfants drépanocytaires.

Des programmes de vaccination ainsi que l'administration de pénicilline en prophylaxie dès le plus jeune âge ont montré une nette diminution de l'incidence de ces infections (29,32,33). Ceci montre tout l'intérêt de la mise en place du dépistage néonatal afin d'éviter ces complications chez les enfants.

6) Complications neurologiques

L'atteinte des gros vaisseaux cérébraux est la complication neurologique la plus fréquente. Elle est dépistée chez l'enfant (par doppler transcranien). Les patients présentant une vasculopathie bénéficieront alors d'un programme d'échange transfusionnel ayant pour objectif de diminuer la quantité d'HbS, ce qui a pour effet de prévenir la récurrence. Chez l'adulte, ce sont les ruptures d'anévrisme et les AVC distaux qui prédominent.

Lorsque l'on suspecte un AVC, l'examen de référence est l'imagerie par résonance magnétique (IRM) cérébral. Des mesures complémentaires telles que la rééducation, la kinésithérapie, l'adaptation professionnelle et la psychothérapie peuvent être proposées.

En dehors des complications aiguës, les patients peuvent être victimes de complications chroniques comme par exemple des vasculopathies cérébrales, des atteintes cardiaques et pulmonaires, des ulcères au niveau des jambes, une rétinopathie, une insuffisance rénale ou respiratoire chronique, des lithiases biliaires, une ostéonécrose ainsi qu'une surcharge en fer secondaire au traitement.

7) Les complications cardio-vasculaires

Parmi les complications cardiovasculaires, on retrouve les troubles de la microcirculation, l'hypertension artérielle (HTA) ou l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). Les troubles de la microcirculation engendrent des symptômes qui ressemblent à ceux de l'angor, bien que les gros vaisseaux coronariens ne soient pas atteints.

L'HTAP chronique peut être causée par l'hyper débit cardiaque qui sera confirmée par un cathétérisme droit. Une HTAP transitoire est possible, par exemple lors d'un STA.

L'HTA est plus fréquente chez les patients S/C. Elle doit être prise en charge par des antihypertenseurs car elle peut aboutir à une cardiomyopathie hypertrophique.

8) Les ulcères

Les ulcères cutanés concernent souvent les membres inférieurs, et plus précisément la malléole. Comme les ulcères existants dans la population générale, ils sont invalidants et récidivent régulièrement. Certains sont de petite taille et cicatrisent rapidement, alors que d'autres sont étendus et persistants. La prise en charge est identique à celle des ulcères des patients non drépanocytaires. On peut citer le port de chaussures adaptées, la surélévation des jambes et la mise à jour du vaccin contre le tétanos. En cas d'anémie importante et de mauvaise cicatrisation, une transfusion est possible.

9) Les complications ostéo-articulaires

Les complications ostéo-articulaires concernent le plus souvent les vertèbres, les côtes, le sternum et les os longs. La douleur est inflammatoire et évolue par paroxysmes. L'infection ostéo-articulaire nécessite souvent une hospitalisation. Ainsi, les germes les plus fréquemment en cause sont *Staphylococcus aureus* et les salmonelles.

De plus, les ostéonécroses aseptiques épiphysaires, touchent surtout le fémur et l'humérus. Leurs incidences augmentent avec l'âge. En cas de douleurs persistantes, l'IRM permet un diagnostic précoce d'ostéonécrose aseptique.

10) Les complications rénales

Les complications rénales sont également répandues. La fréquence de la néphropathie augmente avec l'âge. Elle peut évoluer vers une insuffisance rénale terminale, ce qui explique qu'elle soit recherchée annuellement à l'aide d'une bandelette urinaire et d'une protéinurie. L'hyposthénurie concerne tous les patients et va favoriser la déshydratation qui peut se compliquer d'une CVO.

11) Les complications hépatiques

L'atteinte hépatique la plus fréquente est due à l'hémochromatose post-transfusionnelle, mais une CVO est aussi possible. La prévention de l'hémochromatose passe par l'échange manuel (saignées/transfusions) ou par l'échange transfusionnel qui est préférable sur le long terme.

Le bilan hépatique des patients drépanocytaires est particulier. La bilirubine libre est augmentée du fait de l'hémolyse. Les phosphatases alcalines sont souvent augmentées lors de l'atteinte osseuse (CVO), alors que le temps de prothrombine (TP) est régulièrement diminué lors des CVO. Enfin, lorsque les hépatocytes sont atteints, l'ALAT augmente.

12) Les complications ophtalmologiques

Les complications ophtalmologiques sont également fréquentes, en particulier chez les patients S/C (35 à 40 % de ces patients adultes). Elles sont dues à une occlusion vasculaire en périphérie. Dans la mesure où une cécité est possible, la prévention est importante. Ainsi l'examen rétinien est annuel, et peut s'accompagner d'une angiographie. Le cas échéant, le laser permet une photo-coagulation des zones ischémiques avec néo-vascularisation.

En cas de diminution soudaine de l'acuité visuelle, les causes les plus fréquentes sont l'occlusion de l'artère centrale de la rétine, l'AVC postérieur, l'hémorragie intravitréenne et la rétinopathie maculaire. En fonction de la cause, un échange transfusionnel peut être bénéfique. Par la suite, un traitement de fond par échanges transfusionnels ou hydroxyurée est possible.

Afin de limiter la survenue de ces différentes complications, différents traitements sont disponibles.

F. Traitements

Lors de crise drépanocytaire vaso-occlusive, une hospitalisation du patient doit être envisagée en fonction de la gravité. Les patients étant souvent déshydratés, une hydratation efficace par voie veineuse est nécessaire jusqu'à la fin de la crise. Un traitement symptomatique de la douleur doit être mis en place.

De plus, l'imagerie peut contribuer à une prise en charge rapide des complications potentiellement mortelles comme les AVC et le STA.

1) Transfusions

Les transfusions et les échanges transfusionnels sont indiqués en fonction du taux d'hémoglobine et de la clinique. Ils sont essentiels en cas de vasculopathie cérébrale, l'objectif étant de corriger l'anémie, tout en éliminant les globules rouges falciformes. En effet, une transfusion ramène en principe le taux d'HbS à 60 % (chez l'homozygote), et un échange transfusionnel aboutit à un taux d'HbS de 20 à 30%. Il peut parfois être utile de pratiquer auparavant une saignée, en fonction du taux d'Hb et de l'indication (17).

Cependant, les transfusions comprennent des risques à titre d'allo-immunisation ou encore de surcharge en fer en cas de transfusions répétées (34).

En ce qui concerne l'allo-immunisation, il est essentiel de rechercher la présence d'agglutinines irrégulières (qui doit être négative), ainsi que de vérifier l'historique transfusionnel des patients.

En effet, des cas d'hémolyses retardées ont été décrits 5 à 15 jours après la transfusion, sous forme de douleurs, associées à une coloration foncée des urines. Dans ce contexte-ci, seuls les cas d'urgence vitale nécessitent une transfusion.

2) Traitement chélateur

Lors d'une surcharge en fer, avec une ferritinémie dépassant 1000 µg/L, ou lorsque l'imagerie par résonance magnétique (IRM) révèle plus de 150 mg de fer par g de foie, il est utile d'associer un traitement chélateur : la déféroxamine (défériprone ou déférasirox en 2^{ème} intention). Ces taux sont généralement atteints lors de transfusions de plus de vingt culots globulaires. La déféroxamine présentant de nombreux effets indésirables. Il paraît donc nécessaire de réaliser, avant la mise sous traitement, un bilan ophtalmologique, un audiogramme ainsi qu'un bilan cardiaque. Un contrôle de la ferritinémie tous les trois mois, et une IRM hépatique tous les ans sont ensuite nécessaires. Un taux de ferritinémie inférieure à 500 µg/L permet l'arrêt du traitement chélateur.

3) Hydroxyurée

Certaines molécules utilisées en chimiothérapie anticancéreuse pour traiter notamment certaines leucémies et tumeurs solides ont obtenu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour la drépanocytose. C'est le cas notamment de l'hydroxyurée. Cette molécule est utilisée dans la prévention des CVO douloureuses récurrentes ainsi que des STA des patients de plus de deux ans. Ainsi, l'hydroxyurée entraîne une resynthèse d'HbF chez certains patients (35). Cependant, ce mécanisme d'action reste partiellement élucidé.

L'augmentation du taux d'HbF entraîne une inhibition de la polymérisation de l'HbS (36). Ceci a donc pour conséquence l'inhibition de la falciformation du globule rouge. Ceci est dû au fait que l'HbF ne peut pas s'intégrer au polymère de désoxyHbS, ce qui interrompt son élongation. De plus, il existe une compétition entre la synthèse d'HbF et celle d'HbS, ce qui implique que la synthèse d'HbF se fait aux dépens de celle d'HbS. En conséquence, l'hydroxyurée permet de diminuer la fréquence de survenue des CVO et des STA.

Plusieurs études ont montré que l'hydroxyurée inhibe de façon réversible la ribonucléotide réductase, enzyme qui convertit les ribonucléosides en désoxyribonucléosides, qui sont indispensables pour la synthèse et la réparation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) (37). Ceci a pour conséquence une diminution des désoxyribonucléotides triphosphates intracellulaire et bloque le passage en phase S de la division cellulaire (38,39). Il y a un arrêt temporaire de l'hématopoïèse causé par l'hydroxyurée ainsi qu'un recrutement des progéniteurs érythroïdes qui maintiennent leur capacité de production d'HbF (40,41). Les globules rouges contenant plus d'HbF ont une déformabilité améliorée.

De plus, l'hydroxyurée entraîne une diminution d'expression des molécules qui adhèrent à l'endothélium (42), une diminution de l'inflammation chronique ainsi qu'une synthèse accrue de monoxyde d'azote entraînant une vasodilatation et une induction d'HbF (43) (Figure 28).

Cependant, l'hydroxyurée présente quelques effets indésirables tels que la stérilité ou encore une neutropénie. Enfin, il existe une perte secondaire d'efficacité pour la moitié des patients, dont les causes sont inconnues (45).

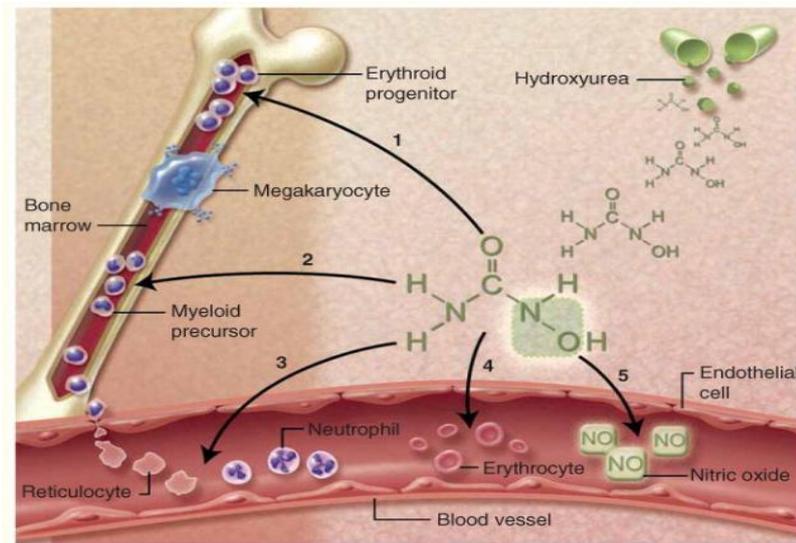


Figure 28 : Mécanisme d'action de l'hydroxyurée

4) Traitements symptomatiques

En ce qui concerne les traitements symptomatiques, l'érythropoïétine est indiquée en cas d'insuffisance rénale ou d'anémie aigüe sans possibilité de transfusion (hémolyse post transfusionnelle). De plus, elle est parfois associée hors AMM à l'hydroxyurée lorsque l'aggravation de l'anémie revient régulièrement.

5) Traitement curatif

Actuellement, l'allogreffe de moëlle osseuse constitue le seul traitement curatif de la drépanocytose. Elle est réservée aux formes graves (rétinopathies cérébrale, CVO et STA récidivants sous hydroxyurée) et est le plus souvent effectuée à partir d'un donneur HLA compatible issu de la fratrie.

6) Saignées

Les saignées peuvent être utiles lorsque le taux d'hémoglobine est élevé (utilisation d'hydroxyurée ou d'érythropoïétine, patients S/C). Par ailleurs, on les utilise quelquefois lorsqu'une surcharge en fer est associée à un taux correct d'hémoglobine.

7) Nouvelles thérapeutiques

La thérapie génique a été entreprise avec succès sur des modèles animaux mais doit encore faire l'objet d'essais cliniques chez l'homme (34). Cela consiste à « greffer » un gène sain de la β globine dans les cellules souches hématopoïétiques des drépanocytaires.

De nombreuses études travaillent sur l'émergence de nouvelles thérapeutiques dans le traitement de la drépanocytose telles que le ciblage de la voie de l'inflammation, des inhibiteurs de sélectine ou autres molécules d'adhésion ainsi que l'utilisation de cellules souches pluripotentes induites (45,46). A partir de fibroblastes humains, on peut « différencier » la cellule et obtenir des cellules souches pluripotentes induites. Celles-ci vont ensuite se différencier en cellules souches hématopoïétiques et ainsi reconstruire un système hématopoïétique en donnant naissance à des globules rouges sains.

Une étude récente a montré que l'activation du gène qui code la chaîne γ de la globine aurait des effets bénéfiques sur les pathologies telles que la β -thalassémie ou encore la drépanocytose. Ainsi, il a été montré que Mi2 β (composant du complexe NuRD) exerce un contrôle positif sur les gènes *KLF1* et *BCL11A*. Ces deux gènes codent pour des facteurs de transcription impliqués dans l'arrêt de la production d'HbF peu après la naissance. De ce fait, l'inhibition de Mi2 β pourrait permettre de rétablir la production de l'HbF au dépend de l'hémoglobine S, sans perturber la différenciation

des progéniteurs érythroïdes. Ces résultats montrent que le Mi2β est une cible potentielle qui favorise la synthèse d'HbF, permettant ainsi l'amélioration des signes cliniques de la drépanocytose (47).

G. Pronostic

Les complications de la drépanocytose peuvent survenir dès l'âge de trois mois (l'enfant étant protégé avant cet âge par la présence de l'HbF) et menacer la vie de l'enfant.

La fréquence et la gravité des manifestations cliniques sont très variables au cours de la vie du même patient et entre différents patients présentant un même génotype.

H. Prévention

Le diagnostic prénatal est possible à partir de la 10^{ème} semaine de grossesse par analyse moléculaire sur biopsie des villosités choriales (11-14 semaines d'aménorrhée (SA)) ou amniocentèse (16-18 SA), ou par étude phénotypique de l'hémoglobine sur sang de cordocentèse (18 SA). Il a été instauré dans certains pays, tels que l'Angleterre où il a été estimé que, sans programme de dépistage anténatal, il naîtrait par an, environ 400 enfants drépanocytaires homozygotes, 66 enfants atteints de β-thalassémie majeure et 10 *hydrops foetalis* (48). Cependant, il peut soulever des questions d'ordre éthique.

Ces programmes de dépistage ont pour but de prévenir les cas les plus lourds : l'*hydrops foetalis* et la naissance d'enfants lourdement atteints par un SDM ou une β-thalassémie majeure dans les populations à risque (8).

Dans le cas d'*hydrops foetalis*, il y a délétion des quatre allèles du gène de l'α-globine (--/--). Si une délétion homozygote des 2 allèles du gène ζ survient en plus, alors la vie embryonnaire est impossible ce qui se traduit par des fausses couches spontanées précoces. En revanche, en l'absence de délétion ζ, l'embryon survit grâce à ses hémoglobines Gower 1 (ζ2ε2) et Portland (ζ2γ2). L'excès de chaînes γ forme un tétramère γ4 ou hémoglobine Bart's qui a une affinité très augmentée pour le dioxygène et une faible coopérativité. Il en résulte une hypoxie tissulaire par défaut de relargage du dioxygène aux tissus. La synthèse des Hb Gower 1 et Portland est insuffisante pour compenser l'absence d'HbF (et d'HbA). Une anémie fœtale sévère va donc s'installer avec hématopoïèse extra médullaire (hépatosplénomégalie), insuffisance cardiaque et anasarque fœto-placentaire. La mort survient *in utero* au 3^{ème} trimestre ou en période néonatale précoce. Pour prévenir cette situation, l'identification des parents porteurs hétérozygotes α° (--/αα) ou porteurs d'une hémoglobinose H (--/-α) est nécessaire. S'il s'avère que chacun des parents est porteur d'un chromosome avec une délétion α° alors le risque d'hydrops est de 25% : le fœtus doit être dépisté.

L'échographie joue également un rôle important avec évaluation de la taille du placenta, du rapport cardiothoracique, recherche d'hépatosplénomégalie et d'anasarque, évaluation de la vitesse systolique maximale dans l'artère cérébrale moyenne (corrélation à la sévérité de l'anémie fœtale).

Le dépistage néonatal, quant à lui, permet de prévenir les complications liées à la pathologie.

III) Le dépistage néonatal

A. Intérêt et pathologies concernées

Certaines pathologies sont indétectables cliniquement à la naissance mais peuvent cependant avoir des conséquences graves chez les enfants atteints s'ils ne sont pas traités très rapidement d'où l'importance de la mise en place d'un dépistage néonatal permettant une prise en charge précoce et adaptée. Ainsi, historiquement, le d Wilson et Jungner (49):

- La pathologie doit être un problème de santé publique avec une fréquence minimale de l'ordre de 1/15 000.
- La pathologie doit être connue et repérable avant l'apparition de lésions irréversibles et sensible à un traitement efficace. De plus, son diagnostic doit pouvoir être fait avec certitude grâce à des examens complémentaires faciles à réaliser chez le nouveau-né.
- Le marqueur doit être fiable, facile à doser avec une technique robuste et peu coûteuse. Le test réalisé ne doit être à l'origine que d'un minimum d'erreurs de classement des enfants bénéficiant du test.
- Les intérêts, coût-bénéfice et coût-efficacité doivent être démontrés, non pas seulement en terme financier mais aussi sur le plan d'une utilité personnelle pour le malade.
- Le financement du programme doit être acquis sur un long terme.
- L'organisation doit être définie avec un accès identique au test et une efficacité comparable pour toute la population.
- Les parents doivent avoir une information précise sur le programme mis en place. Cette information leur permet de comprendre et d'accepter l'acte qui leur est proposé : dépister pour prendre en charge efficacement.

A l'heure actuelle, ces critères sont réunis pour les cinq pathologies du programme de dépistage néonatal. La liste, en application de l'article R. 1131-21 du code de la santé publique, est fixée comme suit pour l'ensemble des nouveau-nés :

- ▶ la Phénylcétonurie ;
- ▶ l'Hyperplasie congénitale des surrénales ;
- ▶ l'Hypothyroïdie congénitale ;
- ▶ la Mucoviscidose ;

Et pour les nouveau-nés présentant un risque particulier de développer la maladie :

- ▶ la Drépanocytose.

Ainsi, avant l'apparition de signes cliniques irréversibles, les nouveau-nés bénéficieront d'un diagnostic précoce ce qui permettra une mise en place rapide d'un traitement efficace pouvant modifier le cours de l'évolution de leur maladie et améliorer leur qualité de vie. Le dépistage néonatal a donc pour but final d'apporter à l'enfant un bénéfice direct individuel.

Cependant, le test de dépistage ne donne pas un diagnostic de certitude, mais représente un test de repérage. Il permet simplement de classer les nouveau-nés en « enfants probablement non atteints » ou « enfants possiblement malades ». Un résultat suspect doit donc toujours être confirmé ou infirmé par des examens complémentaires spécifiques à la maladie.

B. Organisation à la mise en place

Depuis 1972, une triple mission a été confiée à l'Association Française pour le Dépistage et la Prévention des Handicaps de l'Enfant (AFDPHE) par le Ministère de la Santé et la Caisse Nationale de l'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés (CNAMTS). Cette association avait donc en charge d'organiser et de coordonner le dépistage néonatal en France, de suivre la réalisation des prélèvements chez tous les nouveau-nés et de s'assurer de la prise en charge des enfants chez lesquels une des maladies dépistées est suspectée et de la mise en route du traitement chez ceux reconnus atteints (50).

Cependant, le Ministère de la Santé a engagé une restructuration de l'organisation du programme national de dépistage, en passant d'une gestion associative à une gestion hospitalière sous l'égide des Agences Régionales de Santé (ARS). Ainsi, l'Arrêté du 22 février 2018 relatif à l'organisation du programme national de dépistage néonatal recourant à des examens de biologie médicale, met fin à cette AFDPHE (depuis le 01/03/2018) et confie l'organisation du dépistage néonatal aux Centres Régionaux de Dépistage Néonatal (CRDN) (51).

Au niveau national, l'AFDPHE laisse place à un Centre National de Coordination du Dépistage Néonatal (CNCNDN), en lien avec deux commissions (épidémiologie et biologie). L'ensemble du programme est suivi par un Comité National de Pilotage sous l'égide du Ministère (52) (Figure 29).

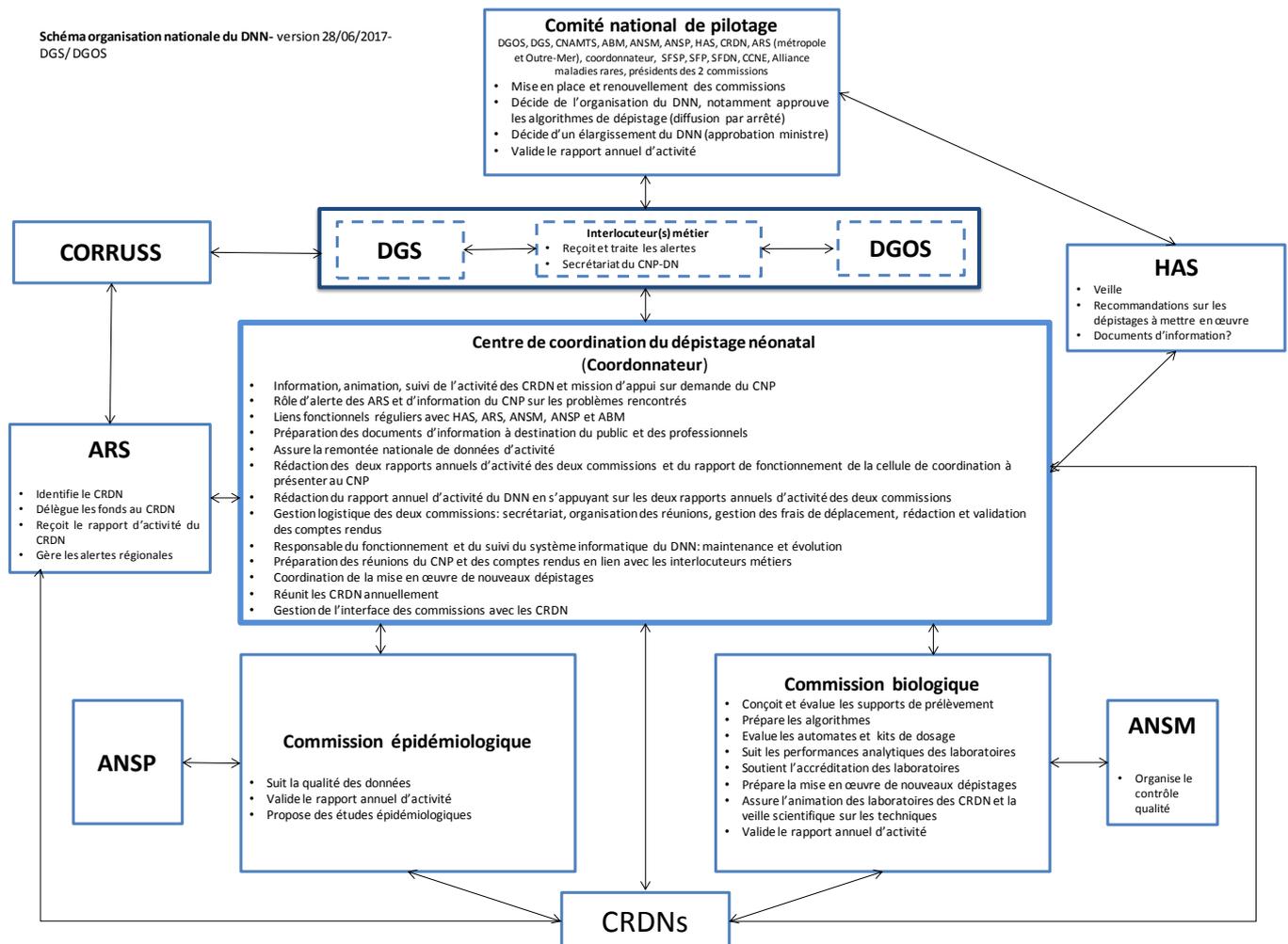


Figure 29 : Organisation du dépistage néonatal en France

C. Organisation et missions des CRDN

Selon l'Arrêté du 22 février 2018 (51), chaque CRDN fait partie intégrante d'un établissement de santé qui doit comporter un centre de référence maladies rares labellisé pour au moins une des maladies dépistées ou un centre de compétences maladies rares rattaché à un tel centre de référence.

Chaque CRDN est composé d'une équipe comportant :

- un coordonnateur identifié au sein du CRDN par le Directeur de l'établissement de santé qui l'abrite ; il est l'interlocuteur de la Direction de l'établissement, de l'ARS et des instances nationales du dépistage néonatal ; il s'occupe de rédiger le rapport annuel d'activité du CRDN ;
- au moins un biologiste médical faisant partie du Laboratoire de Biologie Médicale de l'établissement (Pôle de Biologie) en charge de la réalisation des examens de biologie médicale nécessaire au dépistage néonatal ;
- au moins un pédiatre de l'établissement qui se doit d'assurer notamment les liens avec les professionnels de santé responsables des prélèvements et ceux en charge de la confirmation diagnostique ; lors de dépistage positif, le CRDN a la responsabilité de prévenir les professionnels de santé concernés, en particulier les pédiatres référents des structures de soins identifiés par le CRDN pour la confirmation diagnostique à organiser dans les plus brefs délais sans perte de chance pour le nouveau-né ;
- des pédiatres référents, pour chacune des maladies dépistées, en charge de la confirmation diagnostique et du suivi des nouveau-nés confirmés malades ; ils sont identifiés par le CRDN au sein de la région ;
- un secrétariat dédié et unique inclus dans cette équipe, gérant les fichiers des prélèvements reçus, des résultats ainsi que celui du suivi des résultats suspects (51).

Le CRDN s'appuie également sur les réseaux de santé en périnatalité dans le cadre des missions qui leur sont confiées et financées par les ARS, pour :

- l'identification des besoins et la mise en œuvre des actions d'amélioration du dispositif régional et de formation du personnel responsable du prélèvement ;
- l'information des professionnels, du grand public ou toute autre mission identifiée par l'ARS en relation avec le dépistage néonatal dans leur région.

Ainsi, chaque CRDN est responsable de son propre réseau de professionnels de santé :

- Les services de maternité qui informent les parents et qui font les prélèvements
- Le secrétariat médical
- Les laboratoires qui réalisent quotidiennement les tests de dépistage
- Les médecins spécialistes, la pédiatrie, la protection maternelle et infantile hospitaliers et privés, qui assurent la prise en charge et le suivi des enfants atteints.

1) Le personnel réalisant les prélèvements

Le CRDN se doit d'informer et de former le personnel assurant le prélèvement sur le dépistage néonatal sur :

- son organisation et son délai de réalisation
- son organisation régionale
- son caractère impératif de l'information des titulaires de l'autorité parentale préalablement à la réalisation du prélèvement (si possible avant l'accouchement et obligatoirement avant le

prélèvement) comprenant la remise des documents écrits d'information sur le dépistage et les maladies dépistées (Figure 30). Le prélèvement n'est pas obligatoire : un formulaire de refus de réalisation doit alors être signé par le ou les parent(s). Ainsi, les parents doivent donner leur consentement oral à la réalisation des tests de dépistage. Ce consentement doit être écrit pour le dépistage de la mucoviscidose afin de réaliser des tests génétiques.

INFORMER LES PARENTS



Vous allez pratiquer le test de dépistage néonatal systématique chez un nouveau-né. Ses parents doivent absolument bénéficier d'une information sur l'objectif et la nature des actes que vous réalisez.

Mais les parents sont souvent différents ; ils n'ont pas tous les mêmes attentes en matière d'information. Certains souhaiteront préserver leur quiétude et se contenteront d'une information minimale. D'autres seront plus curieux et voudront en savoir davantage sur les maladies dépistées. D'autres auront des difficultés à comprendre les informations données. Il est essentiel d'ouvrir le dialogue avec les parents en tenant compte de toutes ces particularités. Ce dialogue doit avoir lieu avant de pratiquer le prélèvement.

QUELLES INFORMATIONS DONNER ?

Des INFORMATIONS de BASE

Délivrer aux parents une information claire, précise, synthétique, et surtout compréhensible.

Ne pas les affoler inutilement (les maladies recherchées sont rares).

Leur présenter les bénéfices que leur enfant pourra tirer d'un dépistage précoce si, par hasard, il était atteint d'une des maladies recherchées.

→ Remettre aux parents le dépliant "3 jours, l'âge du dépistage".

Celui-ci leur permettra d'en savoir plus sur le programme national de dépistage et les maladies dépistées.

Dans l'idéal, il serait souhaitable de délivrer cette information en fin de grossesse.

QU'EST-IL IMPORTANT D'EXPLIQUER ?

Les MALADIES DÉPISTÉES

Le programme actuel dépiste cinq maladies : la phénylcétonurie, l'hypothyroïdie, l'hyperplasie des surrénales, la mucoviscidose et, chez certains enfants à risque, la drépanocytose.

Leur fréquence est faible dans la population. Mais ces maladies sont très graves si elles ne sont pas traitées dès la naissance.

La RAISON des TESTS de DÉPISTAGE

L'objectif est de repérer très tôt les nouveau-nés atteints d'une des cinq maladies recherchées, avant qu'ils ne l'expriment. Un traitement précoce leur permettra de se développer normalement ; ils échapperont ainsi aux conséquences de la maladie.

Le programme de dépistage systématique concerne tous les nouveau-nés.

La PRATIQUE du PRÉLÈVEMENT

Le prélèvement consiste en une piqûre au talon avec dépôt des gouttes de sang sur la fiche nominative spécifique.

Par l'intermédiaire de l'Association Régionale qui gère le programme, ce prélèvement est transmis aux laboratoires régionaux qui participent au programme.

La COMMUNICATION des RÉSULTATS aux PARENTS

☉ Un résultat négatif des tests (99% des nouveau-nés), signifie que l'enfant n'est vraisemblablement pas atteint d'une des maladies recherchées. Les parents ne sont pas prévenus individuellement du résultat des tests mais ces résultats sont disponibles au secrétariat de l'Association Régionale.

☉ Si le résultat est anormal, les parents sont convoqués par le médecin spécialiste, le plus souvent dans les deux semaines qui suivent le prélèvement. Pour la mucoviscidose, le résultat est plus tardif et peut nécessiter un second prélèvement effectué de nouveau à la maternité.

POUR RÉPONDRE AUX QUESTIONS POSÉES

Vous disposez de ce guide pratique et du dépliant "3 jours, l'âge du dépistage" qui doit être remis aux parents. Si vous ne trouvez pas les réponses recherchées, vous pouvez vous adresser directement à l'Association Régionale de Dépistage dont l'adresse figure au dos du dépliant ou consulter le site internet de l'Association nationale : www.afdphe.asso.fr.

Pour les questions plus générales sur d'autres maladies génétiques, vous disposez de deux structures nationales d'information ouvertes aux professionnels de santé et au grand public :



Figure 30 : Dépliant d'information sur le dépistage néonatal

Le personnel en charge du prélèvement doit être formé aux conditions optimales de prélèvement et de transmission des buvards (enveloppe T, envoi postal) ainsi qu'au remplissage du carnet de santé précisant la date du prélèvement.

Le buvard de recueil des gouttes est considéré comme la feuille de prescription. Il comporte une partie cartonnée recto-verso avec des informations démographiques et des éléments cliniques utiles au dépistage et une partie buvard sécable recevant le prélèvement sanguin (6 ronds).

L'identification du buvard respecte les mentions prévues à l'article D-6211-2 du Code de la Santé Publique.

Les items démographiques figurant sur le carton sont les suivants :

● ENFANT

- code maternité
- n° de naissance annuel
- case « à risque de drépanocytose » (oui -non)
- Nom (patronyme déclaré à l'état civil)
- Prénom
- sexe
- nom de la mère
- date et heure de naissance
- poids, terme
- lieu de naissance
- si grossesse multiple, rang de naissance

● PRELEVEMENT

- initial ou contrôle
- date et heure de prélèvement
- nom du préleveur
- lieu de prélèvement
- date transfusion sanguine

● VERIFICATION DE L'AUDITION

- nouveau-né à risque
- date, lieu, méthode et résultat 1^{er} test
- date, lieu, méthode et résultat 2^{ème} test
- date RDV, lieu, nom du médecin ORL, tél.
- cause non réalisation

● PARENTS

- adresse
- téléphone
- email
- nom et ville médecin déclaré CPAM
- consentement parental mucoviscidose

● INFORMATIONS MEDICALES

- facteurs de risques
- alimentation parentérale
- si drépanocytose connue, type Hb

Ce prélèvement est réalisé au troisième jour de vie (ou 72h), avant la sortie de maternité après accord des parents. Dans le cas de sortie prématuré, le prélèvement peut être réalisé en ville.

Il est réalisé par ponction capillaire à la face latéropostérieure du talon du nouveau-né (Figure 31). Un prélèvement veineux n'est pas recommandé mais son utilisation peut s'avérer possible selon le contexte clinique (53)..



Figure 31 : Prélèvement sanguin sur carton Guthrie par ponction capillaire au talon

Les gouttes de sang sont directement déposées sur le papier buvard (carton Guthrie) après y avoir noté les données nominatives de l'enfant. Les tâches de sang doivent avoir le même aspect sur les deux faces. Une fois le sang séché, le prélèvement est envoyé par courrier postal à l'aide d'une lettre T au secrétariat du CRDN après avoir vérifié la conformité de l'échantillon (vérifier que le sang traverse le papier buvard, et fasse un cercle homogène et sec).

Dans le cas de refus de prélèvement par l'un des titulaires de l'autorité parentale, le formulaire de refus de réalisation signé doit être archivé au niveau du service préleveur dans le dossier de la mère, d'une part, et au niveau du CRDN, d'autre part. Ce refus sera également mentionné dans le carnet de santé du nouveau-né. De plus, un buvard blanc c'est-à-dire sans prélèvement sanguin identifié au nom du nouveau-né doit être transmis au CRDN.

Le transport des buvards est exempt par la réglementation ADR, accord européen relatif au transport international des marchandises dangereuses par la route (54).

2) *Le secrétariat médical*

Le secrétariat du CRDN qui réceptionne les enveloppes T doit :

- Vérifier l'exhaustivité : nombre d'enfants testés/nombre de naissances vivantes, nombre de refus parentaux, nombre de sorties précoces avant 48h, nombre de nouveau-nés transférés en services de néonatalogie
- Vérifier la conformité du prélèvement
- Garantir la traçabilité par l'enregistrement de tous les tests et transmission des prélèvements au laboratoire qui effectue ensuite les analyses
- Récolter l'ensemble des résultats à transmettre aux parents, aux médecins

Par ailleurs, le secrétariat a pour missions :

- informer les professionnels de santé, les centres médicaux sociaux, les parents, le grand public avec mise à disposition de documents d'information sur le dépistage néonatal (dépliants nationaux : « J3, l'âge du dépistage » et « votre bébé va bénéficier du dépistage de la drépanocytose » destinés aux parents).

- former à l'utilisation du matériel et à la bonne réalisation du prélèvement, pour cela il met à disposition de tous les professionnels concernés des documents d'information tels que l'affiche avec le descriptif du buvard, le « guide pratique pour les professionnels de santé » tenant compte des recommandations nationales pour l'information et la réalisation du prélèvement

- identifier les besoins avec l'envoi du matériel nécessaire avec action de formation à son utilisation

- apporter toute amélioration nécessaire à la bonne réalisation du dépistage (envoi de tour de séchage, de lancettes adaptées au prélèvement aux médecins libéraux)

- coordonner au niveau de la région Nouvelle-Aquitaine l'ensemble des acteurs qui concourent au dépistage, à savoir tous les services de maternité, de pédiatrie néonatale, de cardiologie pédiatrique, les réseaux de santé périnataux, les sages-femmes libérales et les professionnels de santé libéraux impliqués (pédiatres, généralistes)

3) Les laboratoires réalisant les tests de dépistage et de confirmation diagnostique

L'organisation régionale mise en place doit assurer, autant que possible, la réalisation à l'échelon régional de l'ensemble des techniques de biologie médicale nécessaires au dépistage de l'ensemble des maladies prévues par le programme national. Cependant, pour des raisons techniques, la réalisation de tout ou une partie des examens de biologie médicale du dépistage peut être déléguée à un laboratoire de biologie médicale d'un autre établissement de santé que celui qui abrite le secrétariat du CRDN, au sein de la même région, ou éventuellement au laboratoire de biologie médicale de l'établissement de santé au sein duquel est établi le CRDN d'une autre région. Cette organisation doit permettre de respecter le délai de prise en charge optimale des nouveau-nés pour les maladies dépistées, sans retard préjudiciable. Elle doit faire l'objet d'une convention entre les établissements de santé concernés au sein de la région et d'un accord de l'ARS, ou d'une convention entre les établissements concernés et d'un accord des ARS concernées si l'organisation est interrégionale.

Lorsqu'il existe un doute, des examens complémentaires doivent être réalisés. Dans ce cas-là, les parents sont contactés en général dans les deux semaines qui suivent le prélèvement sauf pour la mucoviscidose où le résultat peut être plus tardif en raison du test génétique qui doit être réalisé. Il faudra bien expliquer aux parents qu'il s'agit d'une suspicion et non de diagnostic de certitude. Pour cela, un nouveau prélèvement sera réalisé et envoyé ou une consultation avec un spécialiste sera préconisée. Ce ne sont que les examens complémentaires qui pourront confirmer la suspicion initiale ou la rejeter.

4) Les médecins assurant la prise en charge et le suivi des enfants atteints

En cas de résultat anormal la communication des résultats à la famille s'appuie autant que possible sur le médecin ou pédiatre traitant ou pédiatre référent du service préleveur.

Dans le cadre d'un dépistage « suspect, à convoquer » le médecin du CRDN contacte par téléphone et courriel dans les plus brefs délais le pédiatre référent de la maladie concernée dans la

zone d'habitation du nouveau-né afin de lui transmettre toutes les informations nécessaires à sa prise en charge (coordonnées de la famille, du médecin, de la maternité transmises par le secrétariat du CRDN).

Le pédiatre référent impliqué a la responsabilité de l'organisation de l'étape de confirmation diagnostique dans un délai optimal. Il avertit les parents directement ou par l'intermédiaire de leur médecin traitant ou du pédiatre de la maternité. Il programme alors le rendez-vous de consultation diagnostique dans la structure référente la plus proche du domicile des parents.

La sage-femme coordinatrice ou le médecin du CRDN s'assure que l'enfant a bien été pris en charge et récupère auprès du pédiatre référent de la structure les résultats du contrôle ainsi que le diagnostic posé (par l'envoi systématique d'une « fiche de recensement diagnostique »).

Par une telle organisation, chaque CRDN a pour mission d'assurer la qualité du programme de dépistage :

- l'exhaustivité du dépistage chez tous les nouveau-nés
- la validation de méthode de chaque dosage
- la vérification de la qualité de la prise en charge et du suivi des enfants dépistés
- l'organisation de l'information aux familles et aux professionnels de santé
- la réflexion éthique et veille scientifique sur toutes les questions relatives au dépistage néonatal
- l'animation du réseau de professionnels en charge du dépistage
- le suivi au niveau régional de l'élaboration de statistiques
- les relations avec les pouvoirs publics.

D. Tutelle et financement des CRDN

La tutelle est représentée par le Ministère de la Santé, qui pourra décider d'inclure au programme du dépistage néonatal de nouvelles maladies sur avis des différentes commissions s'intéressant aux critères de sélection.

Les missions, objectifs, moyens et financement de chaque CRDN font l'objet d'une convention entre l'établissement de santé qui l'abrite et le Directeur Général de l'ARS.

Chaque région perçoit une dotation construite à partir du nombre de naissances et tenant compte des missions du CRDN. Les montants régionaux sont arrêtés au terme de la sélection des CRDN dans chaque région. Les ARS conventionnent avec les établissements abritant le CRDN pour définir les modalités d'attribution de la dotation.

E. Application au dépistage néonatal de la drépanocytose

1) Intérêt

L'objectif du test de dépistage néonatal de la drépanocytose est de repérer les SDM afin d'instaurer une prise en charge rapide et adéquate, et de mettre en place des actions préventives contre les complications.

La plupart des nouveau-nés atteints de drépanocytose sont en bonne santé à la naissance et deviennent symptomatiques plus tardivement dans l'enfance, lorsque le taux d'HbF diminue et celui de l'HbS augmente. Le diagnostic d'anémie drépanocytaire est suspecté chez les jeunes enfants en cas de gonflements douloureux des mains et des pieds, de pâleur, d'ictère, de méningite ou de septicémie à pneumocoque, d'anémie sévère avec hypertrophie de la rate. Les multiples

complications peuvent se manifester dès trois mois de vie, sont parfois inaugurales et sont à l'origine d'une morbi-mortalité précoce non négligeable.

Parmi les complications aiguës, on retrouve essentiellement les infections, les CVO douloureuses, les séquestrations spléniques, le STA et les AVC, ainsi que les exacerbations aiguës de l'anémie. Des difficultés d'apprentissage sont fréquemment décelées au cours de l'enfance. En plus de l'anémie hémolytique chronique, la progression de la maladie se caractérise par une atteinte multisystémique progressive pouvant se solder par une défaillance d'un ou de plusieurs organes vitaux et qui explique la diversité des complications pouvant se manifester dès l'adolescence ou à l'âge adulte. Les accidents ischémiques vaso-occlusifs hyperalgiques entraînent une ischémie des tissus conduisant à des douleurs aiguës et chroniques ainsi qu'à une perte de fonctionnalité de tissus ou d'organes à l'origine de complications, osseuses et ostéo-articulaires, d'ulcères cutanés, de priapisme, de complications hépatobiliaires, ophtalmologiques et rénales notamment.

En ce qui concerne les complications aiguës précoces, les enfants avec anémie falciforme ont une susceptibilité accrue aux infections qui se traduit par une incidence et une sévérité accrues. Les infections peuvent être par ailleurs un facteur déclenchant pour d'autres complications, comme le STA. Les CVO au niveau des extrémités sont une des manifestations les plus fréquentes au cours des premières années, les crises douloureuses au niveau des os longs et des vertèbres ayant tendance à survenir plus tardivement. Les séquestrations spléniques se traduisent par une augmentation rapide du volume de la rate et une exacerbation brutale de l'anémie, entraînant un choc hypovolémique. Une exacerbation aiguë de l'anémie peut aussi survenir lors d'infections virales, principalement à parvovirus B19, avec un tableau clinique de crise aplasique. Le SDM est la première cause d'AVC chez l'enfant. En cas de survie, la récupération sur le plan physique est généralement assez bonne, mais peut laisser des séquelles sur le plan du développement cognitif.

L'évolution clinique des formes S/ β^0 thalassémiques est similaire à celle des formes HbSS. L'Hb SC ne polymérise pas comme l'HbSS, mais induit également une déshydratation des globules rouges et une falciformation. Les enfants avec des formes HbSC peuvent présenter le même type de complications que ceux avec une forme HbSS mais avec une fréquence moindre. L'histoire naturelle des autres SDM est variable et difficile à prévoir par manque d'évaluation systématique.

L'objectif du dépistage néonatal de la drépanocytose est donc de mettre en place dès la naissance une prise en charge spécialisée et des mesures préventives des complications infectieuses pour l'enfant atteint de drépanocytose (55) (antibioprophylaxie quotidienne et attention particulière portée aux vaccinations) ainsi que des mesures d'accompagnement auprès des parents (information sur les manifestations cliniques précoces, sur le mode de transmission de la maladie, sur la conduite à tenir en cas de fièvre ou de crises douloureuses, sur les mesures à prendre en cas d'urgence, ou encore une sensibilisation sur l'importance d'un suivi rapproché), avant que les premiers symptômes n'apparaissent.

Selon une évaluation rétrospective réalisée dans les hôpitaux de la région Nord-Francilienne (56), l'efficacité du dépistage pour initier un traitement est notable puisque 98,7% des malades commencent un suivi à un âge moyen de 2 mois. Les résultats de 1 033 patients avec 6776 années-patient de suivi, dont 742 sont SS/S β^0 thal, ont été analysés. La moyenne d'âge de la cohorte est de $7,1 \pm 3,9$ ans. Dix-sept patients sont décédés à un âge moyen de 14,9 mois (rang 0,23-89 mois) avec 13 décès en rapport avec la drépanocytose observés uniquement chez des patients SS. Au total la survie des patients SS/S β^0 thal est de 97,1% à 15,8 ans (intervalle de confiance à 95% de 95,2 à 98,3%). Dans la cohorte, la stratégie préventive est appliquée selon les recommandations. Tous les patients bénéficient de l'antibioprophylaxie avec respect du schéma vaccinal strict pour 81% des patients. Le risque cumulatif d'AVC est de 0,25 (0,11-0,39) pour 100 années-patient. La

grande majorité des patients (97,3%) avec une échographie transcrânienne a une intensification thérapeutique adaptée. Cette analyse rétrospective montre l'efficacité de la prise en charge d'un nouveau patient drépanocytaire dépisté. C'est une étape préalable nécessaire à la mise en place de mesures correctives.

2) Conditions du dépistage

Compte tenu de la prévalence de la drépanocytose ainsi que des flux migratoires en France métropolitaine, le dépistage néonatal de la drépanocytose ne s'effectue pas systématiquement pour tous les nouveau-nés : il s'agit d'un dépistage uniquement ciblé. Selon la HAS, en 2013, les régions à risque de développer une drépanocytose sont : les départements français d'Outre-Mer (Antilles, Guyane, la Réunion, Mayotte), tous les pays d'Afrique subsaharienne et le Cap-Vert, l'Amérique du Sud (Brésil), Noirs d'Amérique du Nord, l'Inde, l'Océan Indien, Madagascar, l'Ile Maurice, Comores, l'Afrique du Nord (Algérie, Tunisie, Maroc) et le Moyen-Orient (Liban, Syrie, Arabie Saoudite, Yémen, Oman).

En revanche, le dépistage est effectué chez tous les nouveau-nés dans les départements d'Outre-Mer.

Actuellement, pour que le nouveau-né soit dépisté, il faut :

- Que les deux parents soient originaires d'une région à risque
- Ou qu'un seul des deux parents si le deuxième n'est pas connu
- S'il existe des antécédents de SDM dans la famille
- S'il existe un doute pour les trois critères cités ci-dessus.

3) Rendu des résultats

Le secrétariat du CRDN a pour mission de transmettre les résultats du dépistage néonatal. La suspicion de SDM donne lieu à l'envoi d'un courriel au médecin du centre de référence de la drépanocytose correspondant, précisant toutes les informations nécessaires à la prise en charge du nouveau-né et au contact des parents.

En cas de résultats ininterprétables ou lorsque le nouveau-né est hétérozygote, une lettre d'information est envoyée au médecin traitant, à défaut aux parents.

La consultation entre les parents du nouveau-né potentiellement atteint et le médecin spécialisé dans la prise en charge de la drépanocytose a pour but d'expliquer aux parents que leur enfant a été dépisté comme porteur d'une hémoglobinopathie mais que cela demande à être confirmé, d'expliquer la physiopathologie de la maladie, de réaliser chez l'enfant une étude de l'Hb pour confirmer le diagnostic et la proposer aux deux parents. Une enquête familiale est recommandée si besoin ainsi qu'un dépistage de la fratrie.

IV) Mise en place du dépistage néonatal de la drépanocytose en Nouvelle Aquitaine => gestion de portée flexible

Le CRDN de la Nouvelle-Aquitaine (agrément au 1^{er} mars 2018) est adossé au centre de compétence Maladies Héritaires du Métabolisme (Dr Delphine Lamireau, Dr Sandrine Roche) de la filière G2M (Groupement des Maladies Héritaires du Métabolisme), au centre de compétence des maladies endocriniennes rares (Pr Pascal Barat) et au centre de référence maladies

rare « Anomalies du développement et syndromes malformatifs », coordonné par le Pr Didier Lacombe.

Ainsi, le Laboratoire du CHU de Bordeaux est en charge du dépistage néonatal dont celui de la drépanocytose (Service de Biochimie, secteur Protéines). Cela a nécessité l'établissement de ce qu'il doit être fait pour la mise en place de cette nouvelle activité : une « check-list » (document qualité du Pôle, EN-QUA-403) nécessaire à la bonne conduite du projet :

- Bibliographie et état des lieux pour répondre à la demande => énoncer un besoin
- Programmation de la mise en place du matériel analytique => qui ? quand ? comment ?
- Portée d'accréditation
- Vérification / validation de méthode dont maîtrise des risques
- Gestion documentaire
- Formation, évaluation et habilitation du personnel
- Indicateurs de qualité (Contrôles internes de qualité (CIQ), Evaluation Externe de la Qualité (EEQ), maîtrise des phases pré- et post-analytiques)

A. Bibliographie et état des lieux pour répondre à la demande => énoncer un besoin

L'évaluation du besoin a été réalisée au moment de la réponse à l'appel d'offre « CRDN » en 2017.

Le dépistage néonatal existant pour les autres maladies à détecter, le poinçonnage (« punchage ») des papiers buvards est possible par les puncheurs à ce jour en place : le nombre de demandes de test de dépistage néonatal de la drépanocytose a été jugé compatible avec la charge de travail actuelle sur les deux punchers mis à disposition et avec les ressources humaines médico-techniques.

Quant à la réalisation de l'analyse, différentes techniques sont utilisées pour analyser l'échantillon sanguin recueilli sur papier buvard afin de mettre en évidence un variant de l'Hb. L'étude de l'Hb va détecter les différentes formes de l'Hb, normales ou anormales. Si une anomalie est détectée, une seconde technique de confirmation est nécessaire. Au niveau international, deux techniques sont actuellement préconisées pour un diagnostic rapide d'hémoglobinopathie : l'isoélectrofocalisation (IEF) et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Quelle que soit la technique utilisée en première ligne, il est donc recommandé d'utiliser la méthode alternative en seconde ligne. Le choix entre l'IEF et l'HPLC comme technique de première intention repose sur les ressources du laboratoire ou le degré d'automatisation. Plusieurs études ont montré que ces deux techniques approchaient une sensibilité et spécificité voisines de 99%.

Une technique de quantification de l'HbS par système MALDI-TOF (spectromètre de masse en tandem largement utilisé par les laboratoires pour l'identification des souches bactériennes) est en cours de validation pour le dépistage de la drépanocytose (57).. La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse permettant de détecter et de quantifier de très nombreux métabolites biologiques ou molécules chimiques au sein de mélanges complexes. L'identification de ces métabolites repose sur la mesure de la masse des molécules et de leurs fragments ionisés qui sont séparés et quantifiés sur la base de leur ratio masse moléculaire/charge (m/z).

En France, l'AFDPHE a opté pour plusieurs combinaisons de techniques en fonction de l'équipement des différents laboratoires : soit l'IEF / HPLC, soit HPLC / électrophorèse capillaire.

Le Service de Biochimie utilise déjà l'HPLC échangeuse de cations (Variant II Dual, BioRad) et l'électrophorèse capillaire (Capillarys 2, SEBIA) pour réaliser la détection des variants de l'hémoglobine. Le Service est inscrit à un programme d'évaluation externe de la qualité (EEQ) depuis 2012. Du personnel médico-technique est dédié à la réalisation et à la vérification technique de ces examens et du personnel biologique dédié pour la validation de méthode (et suivi), pour l'habilitation et la formation continue du personnel, pour la validation biologique (fiches d'habilitation, matrice de compétences). Ainsi, compte tenu de l'existant en automates et en tenant compte d'une organisation du travail la plus optimale possible, il s'est avéré qu'un nouvel automate d'HPLC (Variant NBS, BioRad) devait être acquis pour répondre à l'ensemble des demandes. Le Capillarys 2, automate sollicité pour les électrophorèses des protéines sériques (moyenne de 110 / jour) et des hémoglobines hors dépistage, est alors en capacité de prendre en charge la confirmation des nouveau-nés « positifs » ou « douteux » sur le programme « néonate » de son logiciel. Ainsi, pour des raisons techniques et organisationnelles, le Service de Biochimie a choisi l'HPLC en 1^{ère} intention, et l'électrophorèse capillaire comme 2nde technique. Pour se faire, une évaluation du temps de travail effectif a amené à énoncer un besoin en personnel médico-technique supplémentaire.

Principe de l'HPLC (Variant NBS, BioRad)

La chromatographie permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification.

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile (éluant ou liquide qui entraîne les solutés à travers la colonne) poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.

La phase stationnaire est un support plus ou moins poreux recouvert d'un gel (liquide greffé) qui a les propriétés désirées pour retenir les molécules de solutés c'est-à-dire qu'il s'agit d'une résine positive si c'est une HPLC par échange d'anions et négative si c'est une HPLC échange de cations (9,58,59). Dans le cadre du dépistage néonatal, on utilise une HPLC échange de cations, la résine étant négative, elle va donc permettre de fixer les molécules positives. Quant aux molécules neutres ou négatives, elles seront éluées directement. Une fois que les molécules à étudier sont fixées, on va les éluer. Pour cela, on utilise une solution tampon contenant des cations. Ce tampon va alors déplacer les cations accrochés sur la résine. En augmentant progressivement la concentration en cations, on décroche les molécules en fonction de leurs forces d'interaction électrostatique, ce qui permet de les différencier. Les molécules fixées à la résine peuvent également être éluées en augmentant le pH. En effet, une augmentation de pH ionise les acides et désionise les bases, ce qui diminue la charge des molécules. Donc, lorsque le pH atteint le pHi d'une molécule, celle-ci devient neutre et elle est donc éluee. Ici aussi, un gradient de pH permet d'éluer tour à tour les molécules à étudier (59).

Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents composés sont caractérisés par un pic élué selon un temps de rétention donné. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

Le Variant NBS, système de dépistage chez le nouveau-né, appartient à une nouvelle génération d'appareils ; il est doté de fonctionnalités supplémentaires d'automatisation des opérations et de gestion des données. Le Variant NBS fournit une méthode intégrée de préparation des

échantillons, ainsi que de séparation et de détermination des taux relatifs d'hémoglobines spécifiques dans des éluats obtenus à partir des tâches de sang sur papier buvard.

Le Variant NBS est un analyseur d'hémoglobines de haute capacité entièrement automatisé. Il est composé de 2 modules : le Newborn Chromatography Station (VNCS) et le Newborn Automatic Sampler (VNAS). En outre, un poste de travail informatisé permet de piloter le Variant NBS à l'aide du logiciel Genetic Data Management (GDM, gestion des données médicales) (60) (Figure 32).



Figure 32 : Les deux modules composant le Variant NBS (VNCS à gauche, VNAS à droite)

Une fois que l'on reçoit les papiers buvards du CRDN, les punchers permettront automatiquement de poinçonner ces papiers buvards (un poinçon par patient) en disque de 3,2 mm, automatiquement déposés dans une plaque 96 puits. 250 μ L d'eau distillée sont ajoutés à chaque puits afin d'éluer l'échantillon. Après 10 minutes d'attente et 5 minutes d'agitation, la plaque peut être lancée au niveau du Variant NBS sans oublier d'encadrer la série par des contrôles internes de qualité (CIQ) appelés aussi marqueurs de temps de rétention (FAES, FACD) permettant de définir les fenêtres de temps de rétention lors de chaque série pour les Hb FASDCE.

Le Variant NBS fait appel aux principes de l'HPLC pour permettre la séparation et le dosage des hémoglobines F, A, S, D, C et E dans des éluats de sang néonataux recueillis sur papier buvard.

Deux pompes à double piston situées dans le VNCS envoient la solution tampon dans la cartouche analytique et dans le détecteur. Les échantillons sont prélevés sur les éluats dans les puits d'une microplaque, puis introduits dans le circuit d'écoulement analytique par injection automatique. Entre les injections d'échantillons, l'aiguille de prélèvement est rincée avec une solution de lavage pour éviter la contamination d'un échantillon à l'autre.

L'échantillon est transporté par le tampon au travers de la cartouche analytique, où il est séparé en ses constituants individuels. Une fois séparés, les constituants de l'échantillon traversent le détecteur à double longueur d'onde, où leur absorbance est mesurée à 415 nm. La deuxième longueur d'onde à 690 nm permet de réduire le bruit de fond. Les valeurs de l'absorbance sont transmises du détecteur à l'ordinateur et affichées par le GDM sous forme de chromatogramme en temps réel (graphique du nombre de volts en fonction du temps) (60). Le logiciel GDM assigne des phénotypes et signale les échantillons anormaux (Hb FA, AFS, FAS, FS...).

L'analyse de chaque échantillon s'effectue en trois minutes. Il est possible d'analyser jusqu'à 864 échantillons par série (60).

Technique de l'électrophorèse capillaire

Le Capillarys 2 (SEBIA) est un système qui comprend une série de 8 capillaires en parallèle permettant 8 analyses simultanées. Cela permet la séparation en milieu basique (pH 9,4) des hémoglobines normales du sang humain de nouveau-né (Hb F et A) ainsi que la détection des Hb anormales (S, C, E, D et Bart) par électrophorèse capillaire (61).

Il s'agit d'une méthode de séparation électrocinétique effectuée dans un tube de diamètre interne inférieur à 100 µm rempli d'un tampon composé d'électrolytes. Placées dans un champ électrique, les Hb se déplacent en fonction de leur charge, de la taille de la molécule, de la force ionique, du pH du tampon et de la nature du support (21,62,63). L'injection dans les capillaires de l'échantillon dilué dans la solution hémolysante est effectuée à l'anode par aspiration. La séparation est ensuite réalisée en appliquant une différence de potentiel de 700 volts aux bornes de chaque capillaire.

La détection directe des Hb est effectuée à 415 nm côté cathode. Les capillaires sont lavés avant chaque analyse par une solution de lavage puis par le tampon d'analyse (Figure 35).

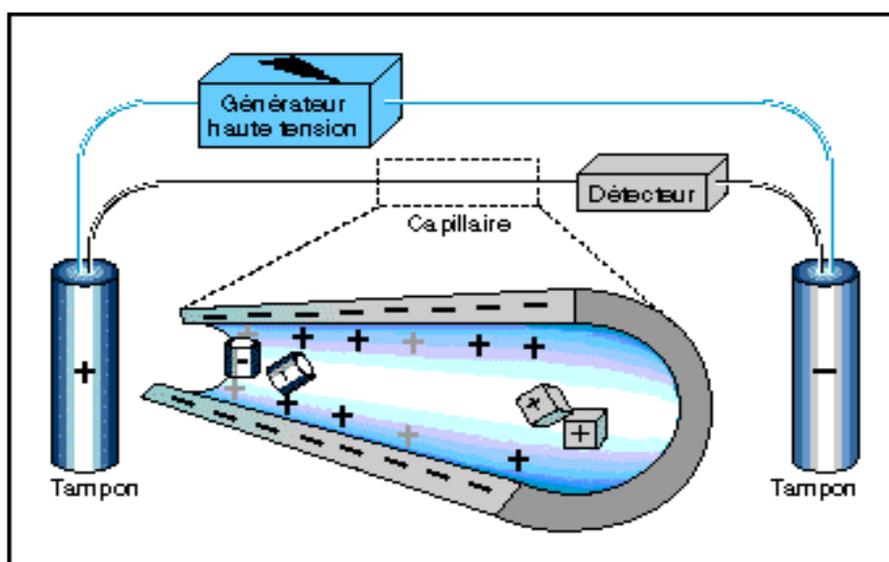


Figure 33 : Principe de l'électrophorèse capillaire

Dès lors qu'une anomalie est détectée sur le Variant NBS ou un doute sur un résultat, la 2^{ème} technique doit être utilisée. On poinçonne les papiers buvards grâce à un puncher manuel (diamètre = 3,8 mm), chaque poinçon étant déposé manuellement dans un puits de barrettes codes-barrées contenant de l'eau distillée. Cette étape est suivie d'une incubation pendant 2 à 72h en chambre humide à 2-8°C.

L'analyse est réalisée directement sur le Capillarys 2 après ajout de la solution hémolysante par l'automate et après avoir passé les CIQ :

- contrôle AF qui est un contrôle de migration analysé avant toute analyse d'échantillons dont les taux d'HbA/F/A2 sont :

CAPILLARYS NEONAT Hb* (CAPILLARYS 2 & CAPILLARYS 2 NEONAT FAST instruments)	
HbA	23.7 % ± 5.5
HbF	51.3 % ± 5.5
HbA2	0.4 % ± 0.3

Figure 34 : Pourcentage d'hémoglobines du CIQ utilisé sur le Capillarys 2

Les analyses du contrôle AF sur les capillaires permettent de définir la position de l'HbF sur chaque capillaire pour le centrage des profils des patients suivants c'est-à-dire une normalisation.

- contrôle AFSC qui est utilisé comme contrôle de qualité additionnel, présente l'intérêt d'avoir de l'HbS.

Les fractions d'Hb obtenues sont affichées sur des zones d'identification (N1 à N13).

Avec le tampon utilisé à pH basique, l'ordre de migration des principales Hb normales et anormales, de la cathode vers l'anode est : C, A2/O-Arab, F-Ouled, E, S, D, G-Philadelphie, Korle-Bu, F, F dégradée, A, A dégradée et Bart. Des variants issus de la mutation de la chaîne gamma sont susceptibles d'apparaître dans certaines zones du profil.

B. Programmation de la mise en place du matériel analytique

Elle a été réalisée dès fin 2017 avec réunions avec le Département des Ressources Matérielles pour l'achat du Variant NBS et des réactifs (gérés ensuite par la cellule des stocks), l'Ingénierie pour les travaux et les prises électriques, le Département du Système Informatique pour les connexions informatiques, la société Epiconcept pour la mise en place du logiciel de gestion des résultats Voozано, le fournisseur (BioRad) pour l'installation de l'automate et sa qualification, le biomédical pour l'enregistrement de l'automate (codification CHU), la cadre de santé pour la programmation de la formation initiale du personnel par le fournisseur.

C. Portée d'accréditation

D'après le NF EN ISO 15189 § 5.3.1.2 pour que le Laboratoire puisse être accrédité :

« Le laboratoire doit vérifier, lors de l'installation et avant utilisation, que le matériel est capable d'atteindre les performances nécessaires et qu'il est conforme aux exigences relatives aux examens concernés. Cette exigence s'applique au matériel utilisé dans le laboratoire, au matériel prêté ou au matériel utilisé dans des locaux associés ou mobiles par des tiers autorisés par le laboratoire. »

« Le matériel doit être utilisé à tout moment par du personnel formé et autorisé. Des instructions sur l'utilisation, la sécurité et la maintenance du matériel (y compris tous les manuels et toutes les instructions d'utilisation fournis par le fabricant) doivent être disponibles. »

D'après le SH-GTA 04 (66), SH-INF50, (64) :

L'accréditation se définit comme une attestation délivrée par une tierce partie, ayant rapport à un organisme d'évaluation de la conformité (COFRAC), constituant une reconnaissance formelle de la compétence de ce dernier à réaliser des activités spécifiques d'évaluation de la conformité.

La portée d'accréditation est l'énoncé formel et précis des activités pour lesquelles le Laboratoire est accrédité (ou demande l'accréditation). La portée d'accréditation est composée de lignes de portée d'accréditation, regroupées au sein de sous-famille(s) rattachée(s) selon la thématique de la section Santé Humaine.

Selon le SH-REF-08, compte-tenu de la possibilité offerte aux laboratoires de biologie médicale de disposer de sites ne réalisant que la phase préanalytique et la phase post-analytique de l'examen de biologie médicale, il est nécessaire d'identifier cette compétence, notamment de prélèvement, dans la portée d'accréditation du laboratoire.

Il est entendu que l'évaluation portera sur la maîtrise de ces phases pré- et post-analytiques pour l'ensemble de l'activité d'examen de biologie médicale du laboratoire. Cette portée d'accréditation est par nature flexible, *i.e.* le laboratoire est autorisé à adopter, adapter, voire développer les méthodes de prélèvement.

Les demandes d'accréditation des laboratoires sont classées en deux catégories (A ou B) selon que le laboratoire a la possibilité de mettre en œuvre sous accréditation, sans évaluation spécifique et préalable, des méthodes qu'il a adoptées (A) ou adoptées/adaptées/développées (B).

Le COFRAC considère que les méthodes reconnues sont a priori validées dans leur domaine d'application. Dans le cadre de la norme ISO 15189, le Laboratoire a, pour ces méthodes, à confirmer et vérifier que ces méthodes sont bien utilisées dans leur domaine d'application, qu'elles correspondent bien aux besoins de ses clients (patients/prescripteurs, ...) et qu'elles sont maîtrisées par le laboratoire (« vérification de méthodes »). Le Laboratoire doit caractériser la méthode et la valider dès lors qu'il ne se trouve pas dans le cas d'une méthode reconnue employée dans son domaine d'application. Les laboratoires peuvent s'appuyer sur le document SH GTA 04 pour avoir des précisions sur les éléments attendus pour une « vérification » et une « validation ».

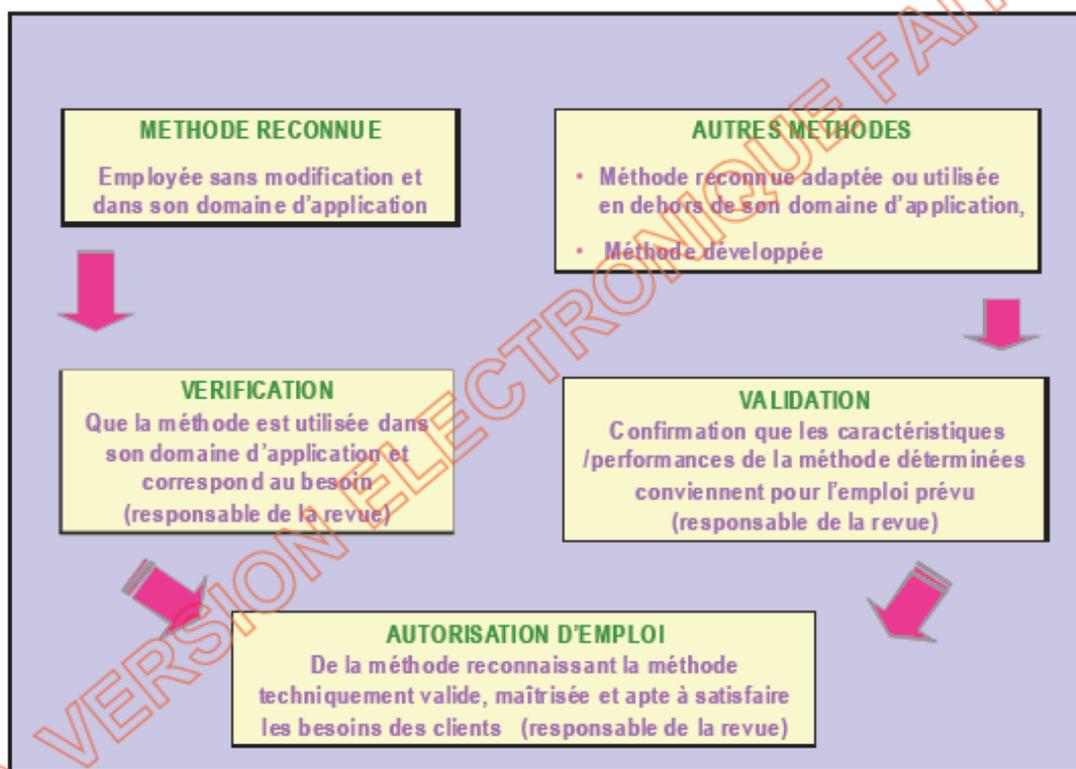


Figure 35 : Sélection des méthodes

Enfin, les examens de biologie médicale peuvent être constitués d'une seule méthode/étape/processus (appelée « processus simple») ou de l'enchaînement de plusieurs méthodes/étapes/sous-processus, faisant appel à des méthodes quantitatives et/ou qualitatives (appelé « processus complexe »).

Concernant le dépistage néonatal de la drépanocytose par HPLC échangeuse de cations et par électrophorèse capillaire, la portée d'accréditation se situe dans :

Domaine : Biologie Médicale

Sous-domaine : BIOCHIMIE

Sous-famille : BIOCHBM (Biochimie – Biologie Moléculaire)

Code BB2 (HPLC), BB4 (électrophorèse capillaire)

De type A : méthodes reconnues nécessitant une vérification et non pas une validation de méthode

Processus analytique : simple (le processus analytique étant défini comme étant l'ensemble de méthodes permettant l'obtention de résultats d'examens aboutissant au diagnostic biologique)

Seule la vérification de méthode HPLC sera exposée dans la suite de la Thèse.

D. Vérification de méthode HPLC

Bien que les résultats rendus par HPLC (éventuellement confirmés par électrophorèse capillaire) soit qualitatifs (présence d'Hb F+A, F+A+S, F+S, F+A+E,), il a été nécessaire d'opter pour une vérification de méthode basé non seulement sur le type d'Hb mais aussi sur les % d'aire comprise sous chaque Hb testée. En effet, la quantification des différents variants de l'hémoglobine est indicative notamment lorsque les nouveau-nés sont transfusés, l'interprétation des résultats se fait selon le pourcentage d'HbA retrouvé (si transfusion, le pourcentage d'HbA sera plus élevé que la normale). Ainsi, cette vérification de méthode s'apparente à une vérification quantitative (Figure 36).

Sample ID:	1418027858	Analysis Performed:	07/08/2018 14:32:09
Run Date:	07/08/2018	Injection Number:	2705
Run Number:	1	Report Generated:	07/08/2018 14:35:13
Tray Type:	1ere Plaque	Operator ID:	egm
Tray Position:	1		
Well#:	G6		

Peak	Peak Name	Retention Time (min)	Height	Area	Area%
1	FAST	0.113	39224	92656	4.7
2	Unknown	0.207	7349	23035	1.2
3	F1	0.269	148399	522586	26.4
4	F	0.468	305622	917360	46.4
5	OTHER(1)	0.687	6157	17436	0.9
6	A	0.802	83786	241832	12.2
7	S	1.185	38866	161179	8.2

Pattern: FAS
 Total Area: 1976083

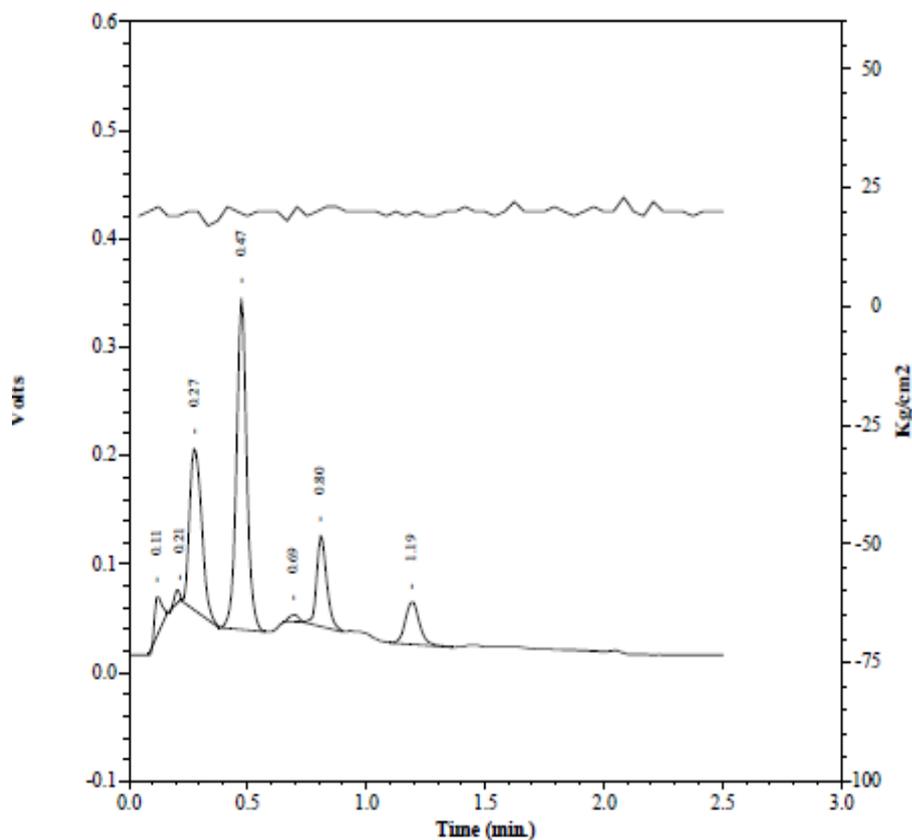


Figure 36: Exemple d'un résultat montrant les fractions de l'hémoglobine et le % des aires associées

Pour respecter les exigences du § 5.5.1 de la norme NF EN ISO 15189 et § 5.4.1 de la norme NF EN ISO/CEI 17025, le Laboratoire doit rédiger une procédure générale de vérification précisant sa démarche (SH-FORM 43, version en cours) et doit conserver les données expérimentales établies sur site.

Cette procédure aborde les points suivants (65) :

- Description du processus avec les modalités de vérification/validation
- Description de la méthode
- Evaluation de la maîtrise des risques
- Evaluation des performances de la méthode

1) Description du processus

Les éléments concernant le Variant NBS :

DESCRIPTION DU PROCESSUS		
<p>Sous-processus 1 : Analyse réalisée à partir de sang total sur carton guthrie</p>	<p>Éléments à vérifier (argumentation)</p>	<p>Modalités de vérification/validation¹ :</p> <ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> 1. Répétabilité <input checked="" type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire <input checked="" type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs <input type="checkbox"/> 4. Justesse <input checked="" type="checkbox"/> 5. Exactitude <input checked="" type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique <input type="checkbox"/> 7. Incertitudes <input type="checkbox"/> 8. Etendue de mesure <input checked="" type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes <input type="checkbox"/> 10. Interférences <input checked="" type="checkbox"/> 11. Contamination <input type="checkbox"/> 12. Robustesse et fiabilité des réactifs <input type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence <input type="checkbox"/> 14. Autre paramètre spécifique :
<p>Sous-processus 2 :</p> <p>...</p>		

L'ensemble des éléments sont décrits ci-dessous.

2) Description de la méthode

Selon le SH-FORM 43, les différents points sont à renseigner :

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte / Mesurande :	Cf. §G.2.2. du SH GTA 04
Principe de la Méthode :	Cette information est retrouvée sous le terme de « principe général des techniques » dans le SH INF 50 (colonne « principe de la méthode »)
Type d'échantillon primaire :	Préciser la matrice : urine, sang total, sérum, plasma, ADN, tissu congelé/fixé ...
Type de récipient, additifs :	Préciser le type de contenant : tube/additif/présence ou non d'un séparateur, flacon/milieux de transport, écouvillon...
Prétraitement de l'échantillon :	Modalités de prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, acidification, alcalinisation, extraction ...)
Unités :	Mode d'expression du résultat (unités, ratio, ...)
Critères d'interprétation¹ :	Intervalles de référence : origine et définition par critères démographiques ; valeurs seuils, ...
Marquage CE (Oui/Non) :	Marquage CE (Oui/Non)
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	Consulter le site de l'ANSM
Equipement (instrument, analyseur, etc.) :	marque, modèle, référence
Référence du réactif :	référence fournisseur, version notice
Matériau d'étalonnage (références) :	Raccordement métrologique
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Type d'étalonnage (linéaire, non linéaire), préciser le nombre de niveaux et les valeurs des niveaux

Appliqué au dépistage néonatal de la drépanocytose par le Variant NBS :

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte / Mesurande :	Hémoglobines (A, F, S, C, E, D et Barts) du sang total des nouveaux nés
Principe de la Méthode :	Chromatographie liquide haute performance (CLHP) automatisée avec détection par spectrophotométrie : Séparation chromatographique phase liquide des hémoglobines sur cartouche échangeuse de cations
Type d'échantillon primaire :	Sang total prélevé au talon du nouveau-né
Type de récipient, additifs :	Papier buvard (carton Guthrie)
Prétraitement de l'échantillon :	Poinçonnage des cartons Guthrie en disque de 3.2mm, dépôt des disques dans des plaques 96 puits, élution dans 250µL d'eau distillée et agitation à 500tr/min pendant 5 minutes
Unités :	Aucune
Critères d'interprétation :	Présence ou absence de la fraction d'hémoglobine
Marquage CE (Oui/Non) :	OUI
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	D171 et D172

Equipement (instrument, analyseur, etc.) :	<p>Analyseur</p> <ul style="list-style-type: none"> - Variant NBS BioRad : référence : 2003010, numéro de série : 10298 <p>Intermédiaire</p> <ul style="list-style-type: none"> - DBS Puncher Wallac 1296-071 Delfia dried 02P500723 – n° 2963222 – référence : 1296-071 - Microplaques 96 puits Falcon : référence : 353910 - Réfrigérateur n°590 contrôlé par des sondes étalonnées et dédié pour les réactifs (marqueurs de temps de rétention, primer) - Placard pour stockage tampons et solution de lavage (pièce HX 573 – 574) - Multitubes vortexer Corning® 4010 – n°série 1980 – Cat n°472203 <p>Informatique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Computer HP model 5800 : référence : 12000136/D7W69UC#ABA, numéro de série : 2UA61224R8 - GDM Workstation – ref 2503016 - CD-ROM de paramétrages - ref : 250-3020 - PDH Datalogic barcode scan : référence: 4260161, numéro de série : N/A
Référence du réactif :	<ul style="list-style-type: none"> - Tampon 1 : ref : 250-3001 - Tampon 2 : ref : 250-3002 - Colonne échangeuse de cations - ref : 250-3003 - Marqueurs de temps de rétention FAES/FACD : ref : 250-3004 - Solution de lavage : ref : 250-3008 - Primer : ref : 250-3009
Matériau d'étalonnage (références) :	Marqueurs de temps de rétention FAES/FACD : <i>lot : 64125637 - ref : 250-3004</i>
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	<ul style="list-style-type: none"> - HbA : temps de rétention - HbF : temps de rétention - HbE : temps de rétention - HbD : temps de rétention - HbC : temps de rétention
Raccordement métrologique	<ul style="list-style-type: none"> - Variant NBS = système fermé - Pipettes dédiées - Réfrigérateur n°590 contrôlé par des sondes étalonnées et dédié pour les réactifs (marqueurs de temps de rétention, primer)

3) Maîtrise des risques

L'analyse de risque est effectuée à partir de la grille EN-QUA-401, selon l'instruction IN-QUA-400, P13A (documents qualité du Pôle). La grille permet de définir la GRAVITE, la FREQUENCE, la DETECTABILITE :

Gravité G	Fréquence F	DéTECTABILITÉ D
<u>1 - MINEUR</u> : Impact minime, pas d'impact sur le résultat	<u>1 -EXCEPTIONNEL</u> <1/an, 1/10 000	<u>1 -IMMANQUABLE</u>
<u>2 - MODERE</u> :Impact sur le travail du laboratoire, mais pas sur le résultat	<u>2 - RARE</u> : <1/trimestre, <1/1000	<u>2 - FACILE</u> moyen de détection simple et systématique
<u>3 - SIGNIFICATIF</u> : Impact sur le travail du laboratoire, le résultat mais pas la prise en charge du patient	<u>3 - PEU FREQUENT</u> <1/mois, <1/500	<u>3 - ALEATOIRE</u> moyen de détection simple mais sporadique
<u>4 - IMPORTANT</u> : Impact sur le travail du laboratoire, le résultat et sans conséquence grave pour le patient	<u>4 - FREQUENT</u> <1/semaine, <1/100	<u>4 - DIFFICILE</u> moyen de détection difficile et sporadique
<u>5 - MAJEUR</u> : Impact majeur sur la prise en charge du patient	<u>5 - TRES FREQUENT</u> <1/jour, <1/10	<u>5 - INDETECTABLE</u>

L'indice de criticité relative (ICR) est un calcul : $ICR = G \times F \times D$
Un $ICR > 20$ correspond à un seuil de priorisation d'action.

Le calcul de l'ICR s'applique aux 5M :

- Maîtrise échantillon
- Maîtrise milieu
- Maîtrise matériels (équipements, réactifs)
- Maîtrise de la méthode
- Maîtrise de la main d'œuvre

Cette évaluation de la maîtrise de risques doit être réalisée à l'installation et à nouveau chaque année ou lors d'une modification majeure (déménagement par ex.).

Ainsi, les données recueillies lors de la mise en place du dépistage néonatal de la drépanocytose par le Varaint NBS sont répertoriées dans le SH-FORM 43 et sont présentées ci-dessous.

Tableau 8 : Maitrise des risques

MAITRISE DES RISQUES				
<i>(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé) – se baser sur l'analyse de risque du processus (EN-QUA-16-1836)</i>				
5M	Points critiques	Indice de criticité	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
Matière (échantillons)	Concernant la phase pré-analytique, si elle est réalisée en dehors du laboratoire de biologie médicale, elle implique la mise en œuvre des conventions prévues aux articles L. 6211-14 (en cas de réalisation en dehors d'un établissement de santé) ou L. 6211-15 du CSP (en cas de réalisation au sein d'un établissement de santé).			
	Identité	30	Formation et information du personnel Contacter le CRDN pour demander un nouveau prélèvement si incohérence (non-conformité)	Procédure écrite et diffusée par le secrétariat du CRDN + Sensibilisation des professionnels de santé* Sensibiliser les techniciens et biologistes sur retour de l'information auprès du secrétariat du CRDN
	Préparation du patient	5	Information des patients et préleveurs Prélèvement au mieux 72h après la naissance et en aucun cas avant 48 heures	Procédure écrite et diffusée par le secrétariat du CRDN Informations et dépliants donnés aux parents
	Type de contenant	15	Cartons Guthrie en nombre suffisant Savoir faire le prélèvement Contacter le CRDN pour demander un nouveau prélèvement si papier buvard absent ou périmé (non-conformité)	Envoi systématiquement aux services préleveurs un nombre de papiers-buvards, enveloppes T (pré affranchie au tarif urgent) et dépliants en adéquation avec le nombre de naissances Envoi du matériel nécessaire avec action de formation à son utilisation par procédure écrite et diffusée par le secrétariat du CRDN Vérification systématique de l'exhaustivité par le secrétariat du CRDN Sensibilisation du secrétariat du CRDN et des professionnels de santé*
	Nature et volume de l'échantillon	15	Contrôle à réception : prélèvement en quantité insuffisante ou non conforme (dépôts successifs, prélèvements décolorés, humides, tâche de sang partiellement « traversante » ...) Contacter le CRDN pour un nouveau prélèvement (non-conformité)	Procédure écrite et diffusée par le secrétariat du CRDN + Sensibilisation des professionnels de santé* Sensibiliser les techniciens et biologistes sur retour de l'information auprès du secrétariat du CRDN

MAITRISE DES RISQUES

(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé) – se baser sur l'analyse de risque du processus (EN-QUA-16-1836)

5M	Points critiques	Indice de criticité	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
	Délai et température avant traitement analytique :	30	<p>Enveloppe T en nombre suffisant</p> <p>Délai d'envoi optimal compris entre 1 et 4 jours maximum à température ambiante</p> <p>Contacter le CRDN pour un nouveau prélèvement (si >5jours, <2jours) (non-conformité)</p>	<p>Envoi systématiquement aux services préleveurs un nombre de papiers-buvards, enveloppes T (pré affranchie au tarif urgent) et dépliants en adéquation avec le nombre de naissances</p> <p>Procédure écrite et diffusée par le secrétariat du CRDN</p> <p>+ Sensibilisation des professionnels de santé*</p>
	<p>* : Le CRDN doit réaliser régulièrement en coopération régulière avec les réseaux de santé en périnatalité pour mise en place de sessions de formation auprès des professionnels impliqués pour la bonne pratique (qualité du prélèvement, remplissage de tous les items demandés, délai d'envoi optimal compris entre 1 et 4 jours maximum). Par ailleurs, toute réception supérieure à 4 jours ouvrables donne lieu de la part du CRDN à des rappels tracés (par téléphone, mail, courrier) auprès des préleveurs et/ou transporteurs concernés (indicateur qualité).</p>			
	Prétraitement	5	<p>Poinçonnage</p> <p>Volume d'élution</p> <p>Agitation</p>	<p>Protocole de traitement préanalytique</p> <p>Formation du personnel médico-technique au poinçonnage</p> <p>Fiche d'habilitation du personnel médico-technique</p>
	Interférences	5	<p>Positionnement des papiers buvards entre eux à réception</p>	<p>Formation du personnel du secrétariat du CRDN</p>
Milieu	Conditions de conservation des échantillons (t°, ...)	5	<p>Conservation :</p> <ul style="list-style-type: none"> - des papiers buvards à +5°C dans réfrigérateur « prélèvements » du secteur Protéines - des contrôles et primer à +5°C au réfrigérateur 590 - des tampons et solution de lavage à température ambiante dans la pièce « Protéines 02HX573-574 ». 	<p><u>Vérification :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - de la date de péremption et date limite d'utilisation après ouverture, - des conditions de reconstitution, - des conditions de conservation avant et après ouverture <p>= mode opératoire / instructions / fiche de protocole établie et mise dans classeur de vie de l'appareil sur la base des instructions « fournisseur » de conservation</p> <p>Formation et habilitation du personnel</p> <p>Métrologie : suivi des températures des pièces et enceintes réfrigérées par sondes reliées à un système informatisé de contrôle continu des températures</p>
	Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs (t°, ...)	5		

MAITRISE DES RISQUES

(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé) – se baser sur l'analyse de risque du processus (EN-QUA-16-1836)

5M	Points critiques	Indice de criticité	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
	Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur :	15	Conditions environnementales (statiques et/ou dynamiques dans le temps) - emplacement du VNBS à l'abri de la lumière directe du soleil - température ambiante : 15-30°C - VNBS doit être posé sur une table ou paillasse horizontale stable et sans vibrations pouvant supporter 90 kg - emplacement de la colonne : 35°C - analyse des échantillons : 9 °C - lecture des résultats à température ambiante - poste informatique aussi proche que possible du variant NBS	Vérification et relevé quotidiens des températures par les techniciens (sondes étalonnées pour pièce technique / réfrigérateurs) reliées à un système informatisé de contrôle continu des températures Pièce climatisée : attention climatiseur avec ailettes vers le haut pas trop dirigé vers la colonne
Matériel (équipements)	Qualité de l'eau	5	Nécessité d'utiliser de l'eau distillée	Formation du personnel Traçabilité des vérifications
	Surveillance des dérives	30	Périodicité des maintenances - Nettoyage aiguille pompe et station à la javel 0,5% à réaliser tous les matins - Changement de colonne au bout de 500 analyses et des tampons ⇒ Maintenance 2 fois par mois Suivi des CIQ et EEQ Raccordement métrologique	Formation initiale du personnel et habilitation, réévaluation périodique Mode opératoire à disposition Enregistrements des maintenances, fiche de suivi des EEQ Variant NBS = système fermé Pipettes dédiées Réfrigérateurs contrôlés par des sondes étalonnées, et dédiés pour : - les prélèvements - les réactifs et contrôles
	Contamination	30	Respect des conditions opératoires du fournisseur Contamination inter-échantillons	Formation et habilitation du personnel Essai de contamination réalisé sur site
	Informatique embarquée	15	- Logiciel GDM - Logiciel « voozanoo » - Logiciel néonat Paramétrage, étalonnage, connexions, archivage des données. Transmission Variant NBS - Voozanoo et Voozanoo-Néonat	Enregistrements des jeux d'essai, sauvegardes régulières (à chaque changement de colonne, ou 2 fois par mois) Formation du personnel en cas de procédure dégradée

MAITRISE DES RISQUES

(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé) – se baser sur l'analyse de risque du processus (EN-QUA-16-1836)

5M	Points critiques	Indice de criticité	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
Matériel (réactifs)	Conservation et conditions d'utilisation	24	<p>Métrologie des enceintes (cartographie et suivi des températures) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Primer et contrôles FAES/FADC à 5°C - Colonne : 34°C - Analyse échantillons : 9 °C - Tampons 1, 2 et solution de lavage à température ambiante <p>Conditions d'utilisation</p>	<p>Traçabilité métrologique</p> <p>Réfrigérateurs (+2/+8°C) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1 dédié pour les prélèvements, 1 dédié pour primer et les contrôles (n°590) - Température vérifiée par sondes reliées à un système informatisé de contrôle continu des températures - Dans le cas de pannes avec élévation des températures > 8°C, la totalité des réactifs est éliminée <p>Sondes température :</p> <ul style="list-style-type: none"> - étalonnées 1 fois/an par la métrologie du CHU <p>Formation et habilitation du personnel</p>
	Gestion des stocks	3	<p>Contrôles à réception des réactifs (température, volume...)</p> <p>Gestion des stocks</p> <p>Enregistrement d'une non-conformité</p> <p>Renvoi au fournisseur et nouvelle commande</p>	<p>PR-EQU-500</p> <p>Formation du personnel</p>
	Reconstitution des réactifs, étalons, contrôles :	18	<ul style="list-style-type: none"> - Primer + 0,5mL d'eau distillée - Contrôles FAES/FADC + 5mL d'eau distillée <p>Métrologie des pipettes</p> <p>Respect du mode opératoire de reconstitution et gestion des stocks</p>	<p>Formation initiale du personnel et habilitation, réévaluation périodique</p> <p>Mode opératoire à disposition</p>
Méthode	Utilisation du puncher et dépôt des disques dans puits des plaques	30	<p>Adéquation entre papiers buvards et disques dans puits</p>	<p>Formation et habilitation du personnel pour l'utilisation du puncher</p> <p>Au moindre doute, refaire la plaque</p>
	Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences, ...)		<p>Sensibilité et spécificité, limite de détection, linéarité du détecteur de longueur d'onde et interférences</p>	<p>Références bibliographiques du fournisseur</p>
	Causes d'incertitude de mesure		<p>Calcul des incertitudes de mesure (non quantifiable pour les méthodes qualitatives)</p>	<p>N/A</p>
Main d'œuvre	Compétence et maintien de compétence du personnel	15	<ul style="list-style-type: none"> - Formation et évaluation des compétences du personnel - plan de formation - Disponibilité du personnel pour assurer le respect de la procédure 	<p>Fiche de poste</p> <p>Fiches de tutorat, d'évaluation, d'habilitation techniciens et biologistes</p> <p>Traçabilité de l'occupation des postes de travail</p>

4) Evaluation des performances de la méthode

L'HPLC du Variant NBS (BioRad) est une méthode quali-quantitative en portée A. Les différents tests réalisés pour cette vérification de méthode sont : la répétabilité, la fidélité intermédiaire, la variabilité inter-opérateurs, l'exactitude, la sensibilité et spécificité analytique, limite de détection, la comparaison de méthodes, interférences et l'essai de contamination.

L'essai de répétabilité consiste à analyser un même échantillon dans les conditions suivantes : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage dans un délai le plus court possible. L'objectif est de caractériser la meilleure performance possible, dans des conditions optimales, et de vérifier le bon fonctionnement du système (instrument/réactif) pour l'analyte concerné. L'évaluation de la répétabilité est indispensable lors de l'installation d'un nouvel analyseur afin de connaître les performances initiales et doit être réalisée une fois par an à faire coïncider avec changement de lot de CIQ, ou après une panne automate nécessitant une vérification de méthode.

L'effectif idéal est de 30 passages mais le nombre de 20 a été choisi compte tenu de la très grande reproductibilité reconnue de la technique et le coût financier des échantillons.

Ainsi, le contrôle FAES (marqueur de temps de rétention contenant de l'hémoglobine F, A, E et S) a été passé 20 fois et le contrôle FADC (marqueur de temps de rétention contenant de l'hémoglobine F, A, D et C) 21 fois, par le même opérateur (Interne de biologie), avec le même lot de réactifs et le même jour. Les moyennes des aires spécifiques, écarts type et coefficient de variation (CV = écart type/moyenne *100) ont été calculés, le CV obtenu a été comparé au CV indiqué par Probioqual et le réseau DGOS. Les CV obtenus étaient inférieurs à ceux de Probioqual et de DGOS, indiquant la conformité du test (Tableau 9).

Tableau 9 : résultats de l'essai de répétabilité

REPETABILITE Applicable ; non applicable (à justifier)							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%) = ET/Moyenne *100	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source : probioqual)	Conclusion
contrôle FAES (sang total) Hb F	20	57	0,15	0,3	/	15 source : réseau DGOS	conforme
contrôle FAES (sang total) Hb A	20	22	0,12	0,6	/	8	conforme
contrôle FAES (sang total) Hb E	20	5	0,05	0,9	/	10	conforme
contrôle FAES (sang total) Hb S	20	6	0,04	0,8	/	10 Source : réseau DGOS	conforme
contrôle FADC (sang total) Hb F	21	65	0,84	1,3	/	15	conforme
contrôle FADC (sang total) Hb A	21	17	1,05	6,1	/	8	conforme
contrôle FADC (sang total) Hb D	21	6	0,09	1,6	/	10	conforme
contrôle FADC (sang total) Hb C	21	6	0,10	1,7	/	10	conforme

L'essai de fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire) consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages, ... Il permet de paramétrer les critères d'acceptation des antériorités en combinaison avec les variations biologiques notamment dans le cas de systèmes d'aide à la décision. L'évaluation de la la fidélité intermédiaire est indispensable à distance de l'installation d'un nouvel analyseur afin de connaître les performances initiales, et doit être réalisée une fois par an en même temps que celle de la répétabilité, ou après une panne automate nécessitant une vérification de méthode et à distance proche de la remise en ordre du marche de l'automate.

Les contrôles FAES et FADC ont été passés 31 fois sur une période de 15 jours : le temps a été la variable lors de cette évaluation. Les moyennes des aires spécifiques, écarts type et coefficient de variation (CV = écart type/moyenne *100) ont été calculés, le CV obtenu a été comparé au CV indiqué par Probioqual et le réseau DGOS. Les CV obtenus étaient inférieurs à ceux de Probioqual et de DGOS, indiquant la conformité du test (Tableau 10).

Tableau 10 : résultats obtenus lors des essais de fidélité intermédiaire

FIDELITE INTERMEDIAIRE Applicable ; non applicable (à justifier)							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source ⁴)	Conclusion ⁵
contrôle FAES (sang total) Hb F	31	57,3	0,63	1,1	/	15 source : réseau DGOS	conforme
contrôle FAES (sang total) Hb A	31	22,0	0,45	2,0	/	8	conforme
contrôle FAES (sang total) Hb E	31	5,3	0,30	5,6	/	10	conforme
contrôle FAES (sang total) Hb S	31	5,6	0,35	6,2	/	10 Source : réseau DGOS	conforme
contrôle FADC (sang total) Hb F	31	65,2	1,47	2,2	/	15	conforme
contrôle FADC (sang total) Hb A	31	16,8	0,81	4,8	/	8	conforme
contrôle FADC (sang total) Hb D	31	5,5	0,23	4,3	/	10	conforme
contrôle FADC (sang total) Hb C	31	5,8	0,22	3,8	/	10	conforme

La variabilité inter-opérateurs constitue un indicateur de la maîtrise de la réalisation des méthodes non automatisées. Un moyen d'assurer cette maîtrise repose sur la vérification de la compétence des opérateurs (habilitation).

29 buvards de nouveau-nés différents ont été traités : chaque buvard a été poinçonné par deux ou trois personnels techniciens/interne différents. Les résultats ont été comparés et 100% de conformité ont été obtenus.

L'exactitude est définie comme l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et la valeur vraie d'un mesurande. Les laboratoires évaluent l'exactitude à partir des résultats des Evaluations Externes de la Qualité (EEQ).

Une étude d'exactitude correspond à la comparaison du résultat d'un seul dosage d'un échantillon inconnu à une valeur cible consensuelle (cf. §6.1.3). L'écart observé correspond à l'inexactitude (erreur d'exactitude).

Un programme international UK NEQAS « Haematology and Transfusion » a développé un programme d'EEQ pour le dépistage néonatal de la drépanocytose. Le service de Biochimie y est inscrit. La périodicité est une évaluation par mois avec trois papiers buvards à analyser à chaque fois, et à traiter comme un patient. Il est attendu un résultat qualitatif, le résultat de l'interprétation du profil des hémoglobines. Jusqu'à présent, il n'a pas été relevé de non-conformité de rendu des résultats.

La sensibilité et la spécificité analytiques sont étudiées pour les tests dichotomiques (oui/non, positif/négatif, etc.). La sensibilité et la spécificité d'un test donnent une appréciation de sa validité intrinsèque. La valeur prédictive positive (VPP) est la probabilité que la maladie soit présente lorsque le test est positif. La valeur prédictive négative (VPN) est la probabilité que la maladie ne soit pas présente lorsque le test est négatif. Une méthode qualitative sera d'autant plus fidèle et juste que les valeurs obtenues seront proches de 100 lorsqu'elles sont exprimées en %.

La sensibilité correspond à la probabilité que le test soit positif si la maladie est présente. Elle se calcule selon : $\text{Sensibilité} = \text{VP} / (\text{VP} + \text{FN})$ avec VP = vrai positif et FN = faux négatif.

La spécificité est la probabilité d'obtenir un test négatif chez les non-malades. Elle se calcule selon : $\text{spécificité} = \text{VN} / (\text{VN} + \text{FP})$ avec VN = vrai négatif et FP = faux positif.

Pour le Variant NBS, les VP correspondent aux buvards identifiés positifs au laboratoire de Marseille (homozygotes, hétérozygotes composites), les VN correspondent aux buvards identifiés négatifs au laboratoire de Marseille (profils Hb FA), les FP correspondent aux buvards identifiés comme positifs par le Variant NBS alors que le laboratoire de Marseille rendait négatifs et les FN correspondent aux buvards identifiés comme négatifs par le Variant NBS alors que Marseille les rendait positifs. 100% de concordance ont été obtenus (nombre de VP = 41 et FP = 0, nombre de VN = 40 et FN = 0).

Le terme **limite de détection** est utilisé pour décrire la plus petite valeur de mesurande dont une procédure analytique peut indiquer la présence avec un niveau de confiance spécifié.

Elle est également appelée «concentration détectable minimale».

Pour le Variant NBS, la limite de détection est de 1% d'après les données fournisseurs.

La **comparaison de méthode** est nécessaire dans le cas du dépistage néonatal de la drépanocytose puisque une 2^{nde} technique est utilisée si profil d'hémoglobines anormal ou si doute (électrophorèse capillaire).

76 papiers buvards ont été analysés et les profils obtenus par le Variant NBS et par le Capillarys 2 ont été comparés : une concordance des profils à 100% a été obtenue.

Le laboratoire doit effectuer a minima une étude bibliographique des **interférences** potentielles décrites dans la notice fournisseur. Aucune interférence (lactescence, ictère, ...) n'a été décrite sur le Variant NBS par le fournisseur.

Enfin, le laboratoire doit évaluer et maîtriser les potentiels cas de **contamination inter-échantillons et/ou inter-réactifs**. Pour ce dernier point, compte tenu qu'il s'agit d'une portée A, on s'est appuyé sur les données du fournisseur. Pour faite de test de contamination inter-

échantillons, trois contrôles FAES suivis de trois papiers buvards d'enfants « sains » (= non atteints) ont été passés, et ceci trois fois. Le même test a été réalisé avec le contrôle FADC. Aucune contamination n'a été révélée sur les résultats des nouveau-nés « sains ».

E. Mise en place d'indicateurs de qualité

Selon l'arrêté du 22 février 2018 relatif à l'organisation du programme national de dépistage néonatal recourant à des examens de biologie médicale (51) :

Chaque CRDN enregistre et suit systématiquement les indicateurs ci-dessous. Il transmet ces données au Centre national de coordination du dépistage néonatal selon la fréquence définie par ce dernier.

a) Concernant l'étape pré-analytique

- Information des parents par les maternités : nombre de plaquettes d'information sur le dépistage distribuées à chaque maternité par le CRDN / nombre des naissances pour cette maternité ;
- Refus : nombre de refus parental de réaliser le dépistage ;
- Date du prélèvement (notamment nombre de prélèvements hors délai / nombre de prélèvements réalisés) ;
- Délai d'acheminement du prélèvement (notamment nombre d'examens hors délai d'acheminement / nombre d'examens acheminés) ;
- Qualité du prélèvement : taux de prélèvements non conformes nécessitant un 2nd prélèvement (nombre de prélèvements non-conformes / nombre de naissances) au total, et par maternité ou service accueillant le nouveau-né et en ville.

b) Concernant l'étape analytique

- Délai de réalisation des examens biologiques de dépistage par rapport à la réception du prélèvement.

c) Concernant l'étape post-analytique

- Délai de rendu du résultat du dépistage (date de validation du résultat du dépistage en comparaison avec date de prélèvement) au total, et par maternité ou service accueillant le nouveau-né et en ville.
- Résultats du DNN: nombre de résultats anormaux et négatifs / nombre de nouveau-nés dépistés, nombre de faux positifs et faux négatifs et VPP, taux de résultats nécessitant une nouvelle mesure (résultat limite) / nombre total d'analyses réalisées.

d) Concernant l'étape de confirmation diagnostique

- Délai médian et valeurs extrêmes entre la 1^{ère} consultation diagnostique et la naissance ;
- Délai médian et valeurs extrêmes de la confirmation diagnostique par rapport à la naissance ;
- Nombre de consultations et de tests de confirmation diagnostique réalisés ;
- Taux de nouveau-nés confirmés malades et suivis / nombre de nouveau-nés confirmés malades).

e) Concernant le dépistage dans son ensemble

- Exhaustivité : taux de nouveau-nés dépistés (nombre de nouveau-nés dépistés/nombre nouveau-nés pour lesquels les titulaires de l'autorité parentale ont autorisé le dépistage dans le territoire du CRDN) par maladie dépistée; et taux de refus.

F. Gestion documentaire

Afin que les techniciens puissent utiliser l'automate Variant NBS et le maîtriser parfaitement et uniformément, un mode opératoire de l'utilisation du Variant NBS a été écrit, décrivant de façon détaillée l'utilisation de l'automate.

Pour cela, tout d'abord, des ingénieurs de chez BioRad sont venus quelques jours sur site afin de former l'Interne. Celui-ci a ensuite rédigé le mode opératoire de façon détaillée aux regards de la documentation du fournisseur puis formé et évalué les techniciens pour qu'ils soient habilités à utiliser le Variant NBS.

G. Formation, évaluation et habilitation du personnel médico-technique et médical

La **formation professionnelle** est le processus d'apprentissage qui permet à un individu d'acquérir le savoir et le savoir-faire (habileté et compétences) nécessaires à l'exercice d'un métier ou d'une activité professionnelle. Ce processus doit être continu lors de l'activité professionnelle de l'individu et lui permet de maintenir ses connaissances et d'en acquérir de nouvelles. Cette formation peut être externe, délivrée par des organismes de formation reconnus, agréés ou non, ou interne, par des biologistes, référent qualité, informaticien ou référent au poste. La formation effectuée par les fournisseurs peut, quant à elle, être externe ou interne.

Ici, pour répondre au besoin de formation au dépistage néonatal de la drépanocytose, un planning de formation des personnels médico-technique et médical a été établi. Une formation sur site par les fournisseurs BioRad et SEBIA a été réalisée. L'appropriation rapide de l'outil analytique par l'Interne ainsi que l'établissement de la grille « maîtrise des risques » a permis de réaliser un mode opératoire et une fiche de tutorat favorisant ainsi l'apprentissage et l'appropriation de l'outil analytique par les techniciens du secteur Protéines (Annexe). Enfin, un stage hors site pour l'un des biologistes a permis d'acquérir des compétences dans l'interprétation des profils.

L'évaluation est l'opération qui consiste à valider des connaissances et compétences acquises par la réponse aux questions sur un support écrit et/ou l'observation par un référent (ici le biologiste) de l'exactitude des données saisies ou de la conformité de la pratique (Annexe).

La rédaction d'une fiche d'évaluation nécessite une parfaite connaissance des différentes étapes analytiques et maintenances de l'automate ainsi que des étapes péri-analytiques.

Suite à l'évaluation, **l'habilitation** peut être délivrée.

D'après la norme NF ISO 15189, la compétence est la capacité démontrée à appliquer des connaissances et savoir-faire. Nous sommes sur un triptyque où la personne possède les diplômes (le savoir), l'habileté supposée (le savoir-faire) et le comportement (le « savoir-être »). La personne possède donc théoriquement les connaissances et les capacités sans qu'elle soit encore reconnue par l'employeur.

D'après le SH GTA 01(66), la qualification professionnelle correspond à l'attribution ou à la reconnaissance de compétence ou d'une aptitude (à exécuter des tâches, des actions, ...). La qualification est donc la reconnaissance des connaissances et compétences nécessaires pour l'exercice d'une activité professionnelle au travers de moyens et de critères pour y parvenir. Cette qualification est acquise par une formation spécifique : BTS pour les techniciens de laboratoire médical, docteur en pharmacie ou médecine avec, éventuellement, une qualification en biologie médicale.

D'après le SH ref 02 et SH GTA 01(66,67), l'habilitation correspond quant à elle à l'autorisation d'exécuter (des tâches, des actions, ...), c'est la désignation écrite par l'employeur des attributions

ou des opérations qui peuvent être confiées à une personne. La qualification est donc à différencier de l'habilitation et constitue une condition préalable à l'habilitation. Cette habilitation est l'étape ultime d'un processus de management des ressources humaines lorsqu'elles celles-ci doivent se former à une nouvelle technique pour répondre à nouveau besoin et, par conséquent, être évaluées. La fiche d'habilitation se remplit au regard des exigences de la fiche de poste qui décrit les différentes activités selon le niveau requis (pratique courante, maîtrise, expert), et de la fiche d'évaluation (Annexe).

La synthèse des habilitations acquises à un poste de travail est réalisée dans la matrice des compétences (ou grille de compétences).

Au CHU de Bordeaux, la durée de validité de l'habilitation est de trois ans sauf si interruption d'activité au-delà de six mois. Néanmoins, une réévaluation des connaissances et compétences est réalisée en entretien annuel avec la cadre de santé qui s'entretient au préalable avec le biologiste responsable.

V) Bilan 1^{ère} année

Le personnel médico-technique s'est très bien approprié les méthodes utilisées pour le dépistage néonatal de la drépanocytose.

Le personnel médical a acquis des compétences très rapidement, adossé d'une part au CHU de Marseille (Pr Badens) qui a pris en charge ce dépistage jusqu'à ce que le CHU de Bordeaux soit opérationnel permettant ainsi une comparaison de résultats et un dialogue biologico-biologique sur les résultats douteux. A noter aussi les précieux conseils provenant de Lille et de Paris.

Le 1^{er} bilan d'activités du CRDN Nouvelle-Aquitaine fait état d'un ensemble d'indicateurs de qualité :

Pour la phase préanalytique :

- Nombre de dépliants « J3, l'âge du dépistage », distribués aux services préleveurs
- Adéquation entre le nombre de dépliants distribués et le nombre de naissances
- Nombre de refus
- Signalement des prélèvements précoces (<48 heures) et les prélèvements tardifs (>5 jours) sont signalés aux préleveurs (indicateurs qualité).
- Rappels tracés (par téléphone, mail, courrier) auprès des préleveurs et/ou transporteurs concernés de toute réception supérieure à 4 jours ouvrables
- Signalement des prélèvements non-conformes nécessitant un 2nd prélèvement

Pour la phase analytique : CIQ, EEQ, taux de panne des automates

Pour la phase post-analytique : délai de rendu des résultats, nombre de nouveau-nés devant être convoqués

Le bilan d'activités 2018 montre notamment pour le dépistage néonatal de la drépanocytose :

- 8594 nouveau-nés testés dont 8618 réalisés, la différence étant en relation avec un 2nd prélèvement demandé pour cause de non-conformité
- Nombre de refus pour l'ensemble des maladies dépistées = 9 mais sans possibilité de savoir si cela concerne le dépistage de la drépanocytose
- Age médian du nouveau-né au prélèvement = 3 jours
- Sur les 8594 nouveau-nés testés du 1^{er} mars 2018 au 31/12/2018, 5936 l'ont été au CHU de Bordeaux (démarrage analyse en juin 2018)

- Les prélèvements sont techniqués chaque jour ouvré (lundi au vendredi). Les sangs prélevés sur papier-filtre peuvent être conservés 15 jours à température ambiante (de 15 à 30 °C) pour ré-analyse si nécessaire. Au-delà, fractions HbF dégradée, HbA dégradée, apparition de metHb.
- La validation biologique et le rendu des résultats sont réalisés une fois par semaine selon le diagramme édité au niveau national (Figure 34) avec contact du pédiatre référent en cas de résultat suspect => tous les nouveau-nés avec un dépistage suspect ont été convoqués par le pédiatre référent (Bordeaux, Limoge, ou Poitiers).
- Aucun faux négatif
- La répartition est consignée dans le Tableau 11.

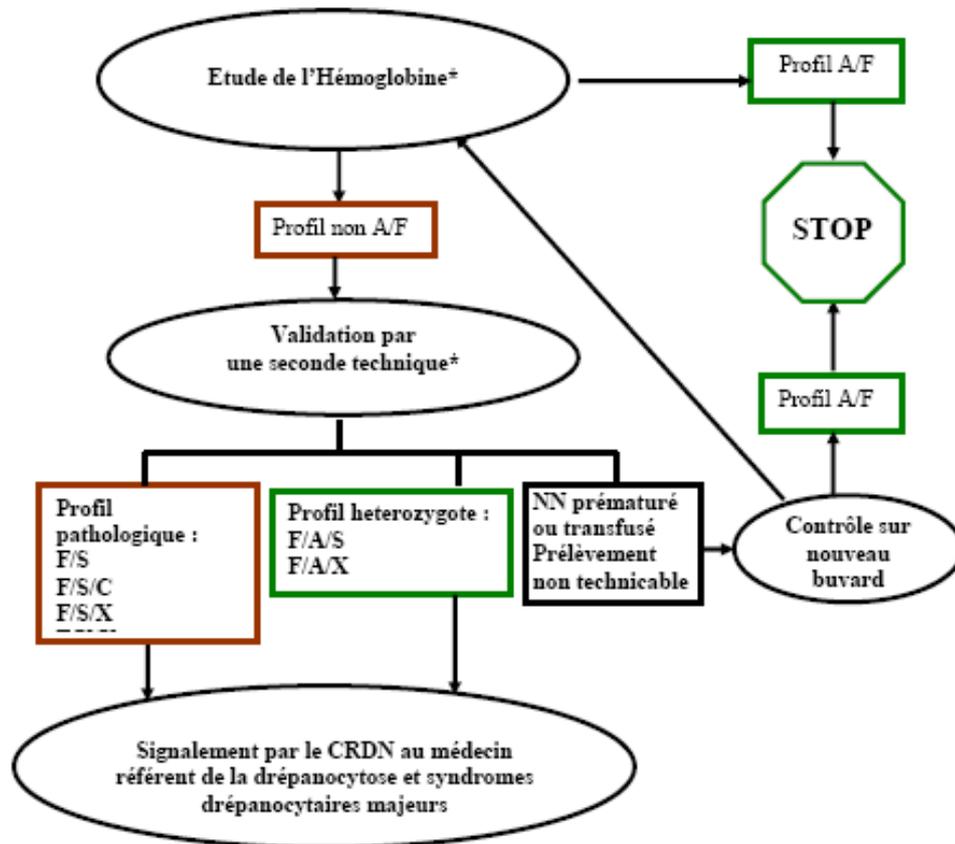


Figure 37 : Arbre décisionnel de la démarche du dépistage néonatal de la drépanocytose

Tableau 11 : Résultats du Dépistage néonatal de la drépanocytose obtenus au CHU de Bordeaux en 2018

Nombre de nouveau-nés testés	5936 (Bordeaux)
SDM	SS ou S β thal : 11 SC : 4
Bêta-thalassémie probable	1 (profil FF)
Syndromes thalassémiques probables	1 (FA+Bart's, FA avec A basse, ...)
Autres homozygotes ou hétérozygotes composites	CC : 0 Autres : 0
Hétérozygotes	AS : 203 AC : 37 Autres (FAE, FAOArab, ...) : 19

Pour illustrer, quelques exemples de résultats ci-après.

↪ Profil FA :

Bio-Rad VARIANTnbs System
Bio-Rad VARIANTnbs Instrument SN 10298

Site Number:

NeoHb

Sample ID:	1418027896	Analysis Performed:	08/08/2018 09:31:04
Run Date:	08/08/2018	Injection Number:	2717
Run Number:	1	Report Generated:	08/08/2018 09:34:07
Tray Type:	1ere Plaque	Operator ID:	LEB
Tray Position:	1		
Well#:	A3		

Peak	Peak Name	Retention Time (min)	Height	Area	Area%
1	FAST	0.117	25807	60861	4.6
2	Unknown	0.195	17186	26383	2.0
3	F1	0.262	126088	378739	28.9
4	F	0.467	251045	688160	52.5
5	OTHER(1)	0.702	6750	15449	1.2
6	A	0.812	56062	142347	10.9

Pattern: FA
Total Area: 1311938

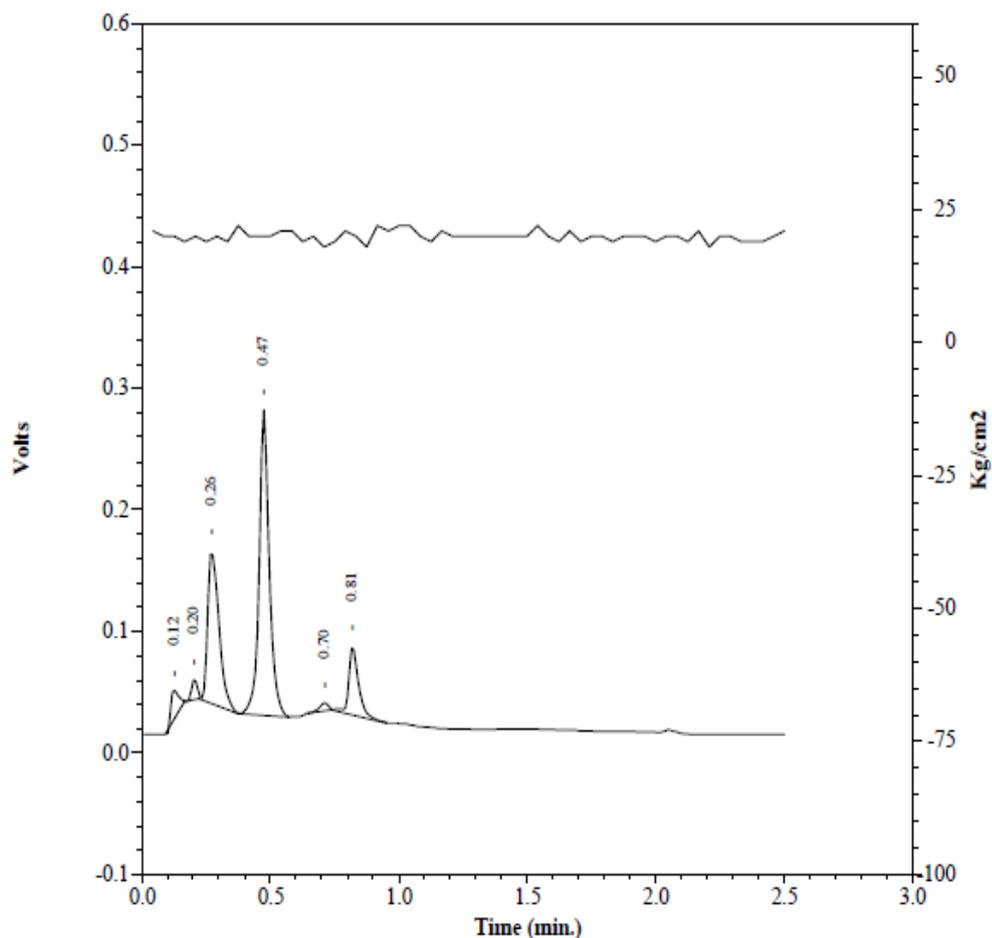


Figure 38 : Profil d'un enfant sain sur le Variant NBS

↳ Profil post-transfusion :

Bio-Rad VARIANTubs System
Bio-Rad VARIANTubs Instrument SN 10298

Site Number:

NeoHb

Sample ID:	1418028099	Analysis Performed:	08/08/2018 12:26:58
Run Date:	08/08/2018	Injection Number:	2767
Run Number:	1	Report Generated:	08/08/2018 12:30:03
Tray Type:	1ere Plaque	Operator ID:	LEB
Tray Position:	1		
Well#:	E5		

Peak	Peak Name	Retention Time (min)	Height	Area	Area%
1	FAST	0.110	24350	50253	5.4
2	Unknown	0.194	6786	9685	1.0
3	F1	0.256	54950	143495	15.4
4	F	0.462	72546	230590	24.8
5	OTHER(1)	0.669	17480	63891	6.9
6	A	0.799	155912	420784	45.3
7	E/A2	0.992	3069	10316	1.1

Pattern: AF
Total Area: 929014

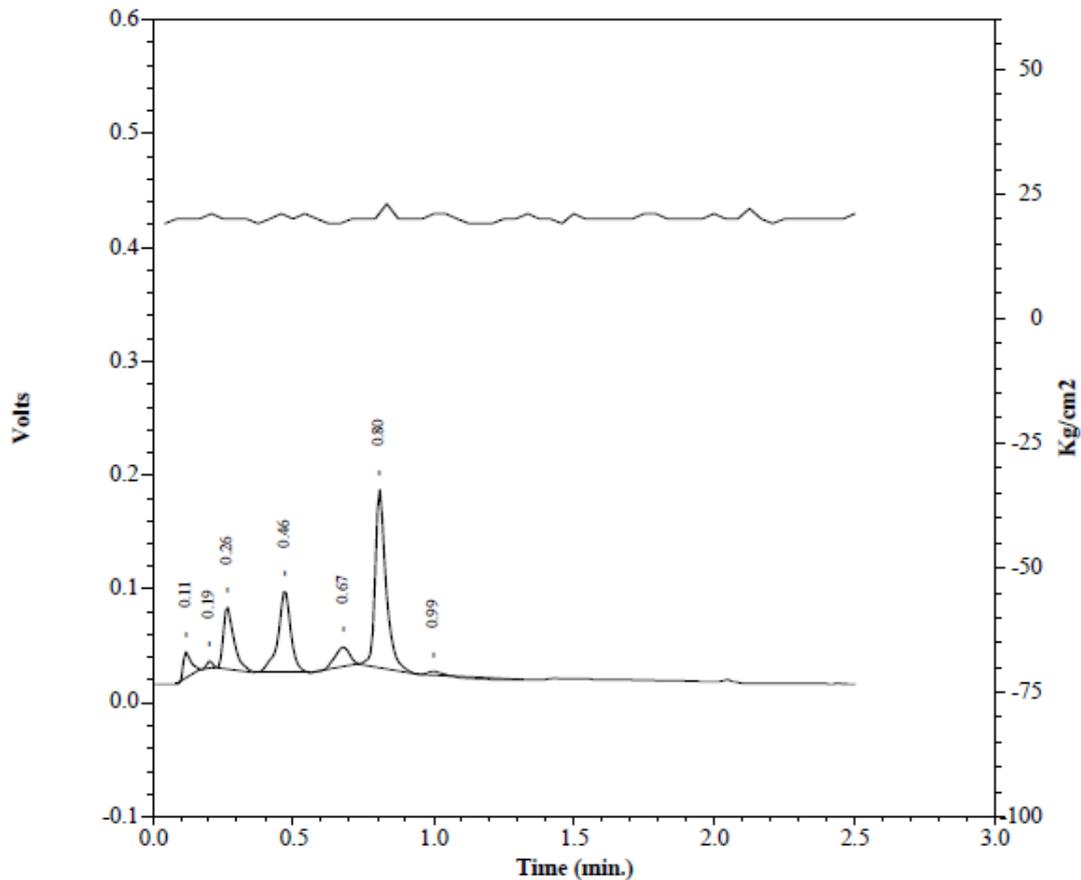


Figure 39 : Profil d'un nouveau-né transfusé sur le Variant NBS

⇒ Courrier envoyé aux parents :

		
CHU de Bordeaux Pôle Biologie et Pathologie Chef de pôle : Dr Agnes Georges-Walryek		
Centre Régional du Dépistage Néonatal Nouvelle Aquitaine Responsable Médical : Pr Didier Lacombe Service de Biochimie Chef de service : Dr Annie Bérard Biologistes : Dr Annie Bérard, Dr Julian Boutin, Pr François Moreau-Gaudry		
Secrétariat Médical – tél 05 56 79 87 00 (CRDN), 05 56 79 55 11 (Biochimie)		
<p>Madame, Monsieur,</p> <p>Veillez trouver ci-joint le résultat de l'étude de l'hémoglobine qui a été effectuée dans le cadre du dépistage néonatal de la drépanocytose sur prélèvement sanguin à la naissance de votre enfant.</p> <p>L'analyse est <u>ininterprétable car l'enfant est transfusé</u>, vous devez prendre rendez-vous avec votre médecin traitant ou pédiatre afin de prévoir un contrôle de l'étude de l'hémoglobine.</p> <p>Je vous prie de croire, Madame, Monsieur, à l'assurance de nos salutations les meilleures.</p>		
<p>Bordeaux – Gironde – Landes – Lot et Garonne – Pyrénées Atlantique Drs Camille Runel-Belliard et Marie Lagarde Centre de compétence de la drépanocytose Hôpital Pellegrin Enfants Place Amélie Raba –Léon 33076 Bordeaux Cedex Tél. : 05.56.79.59.12</p>	<p>Charente – Charente Maritime – Deux Sèvres – Vienne Docteur Tackwa Khalifeh Centre de compétence de la drépanocytose Service Médico-chirurgical Pédiatrie CHU Jean Bernard 2, rue de la Milétrie CS 90577 86 021 POITIERS Cedex Tél. : 05.49.44.43.90</p>	<p>Corrèze – Creuse – Haute Vienne Docteur Christophe Piguat Centre de compétence de la drépanocytose Service Pédiatrie Hôpital Mère – Enfant 8, Ave Dominique Larrey 87042 Limoges Tél. : 05.55.05.68.01</p>

Un courrier équivalent est adressé au médecin référent.

↳ Profils pathologiques :

Bio-Rad VARIANTubs System
Bio-Rad VARIANTubs Instrument SN 10298

Site Number:

NeoHb

Sample ID:	1418027334	Analysis Performed:	03/08/2018 14:07:58
Run Date:	03/08/2018	Injection Number:	2578
Run Number:	1	Report Generated:	03/08/2018 14:11:00
Tray Type:	1ere Plaque	Operator ID:	egm
Tray Position:	1		
Well#:	F6		

Peak	Peak Name	Retention Time (min)	Height	Area	Area%
1	FAST	0.110	23962	47526	5.6
2	Unknown	0.194	9012	13915	1.6
3	F1	0.259	73885	213729	25.0
4	F	0.467	136416	397755	46.5
5	E/A2	0.973	4496	24778	2.9
6	S	1.185	41990	158324	18.5

Pattern: *FS
Total Area: 856027

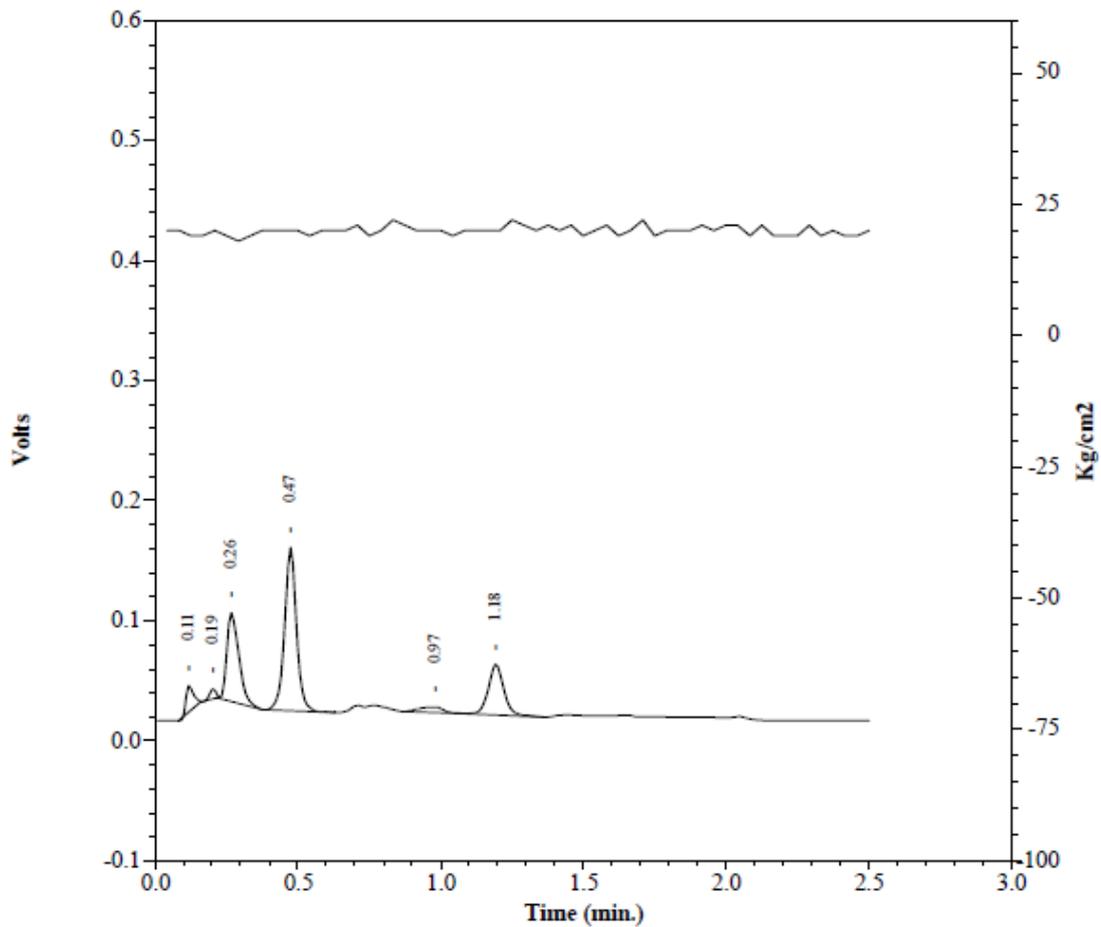


Figure 40 : Profil homozygote FS d'un nouveau-né sur obtenu sur le Variant NBS

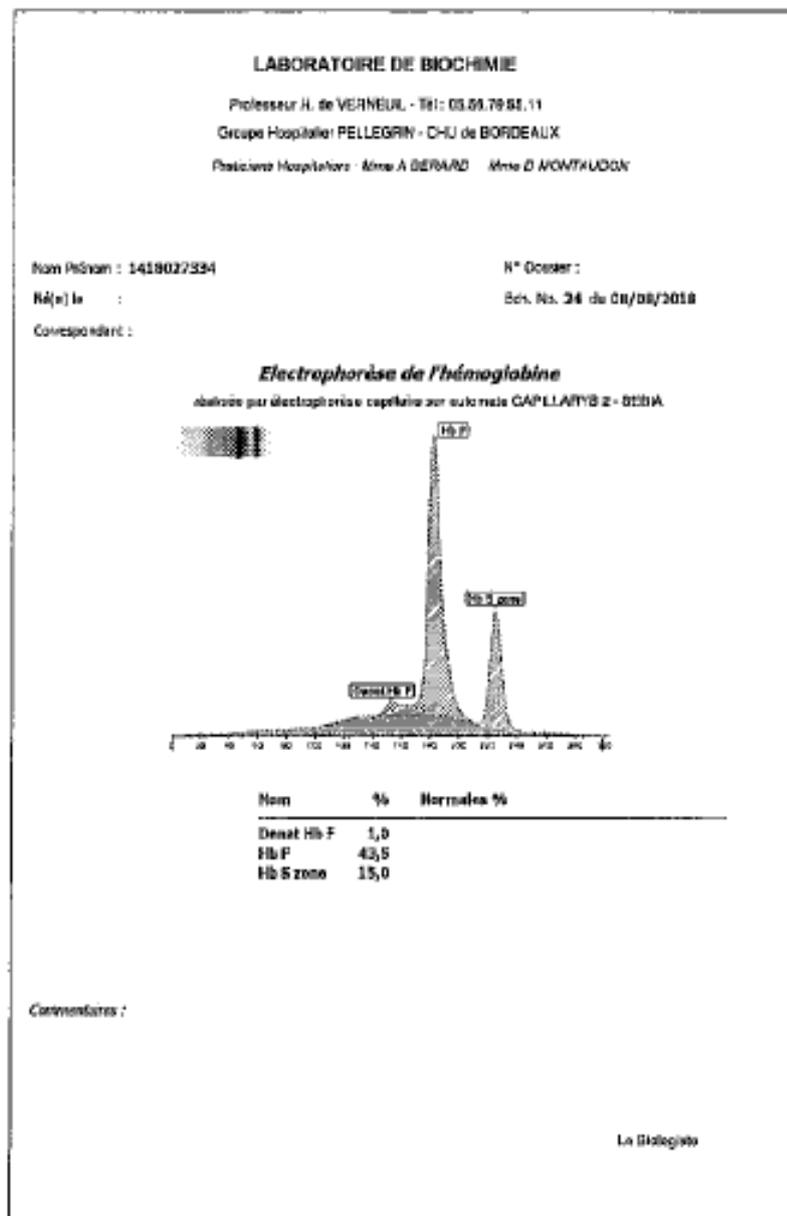


Figure 41 : Confirmation diagnostique du profil homozygote du nouveau-né obtenu sur le Capillarys 2

Sample ID:	1418027858	Analysis Performed:	07/08/2018 14:32:09
Run Date:	07/08/2018	Injection Number:	2705
Run Number:	1	Report Generated:	07/08/2018 14:35:13
Tray Type:	1ere Plaque	Operator ID:	egm
Tray Position:	1		
Well#:	G6		

Peak	Peak Name	Retention Time (min)	Height	Area	Area%
1	FAST	0.113	39224	92656	4.7
2	Unknown	0.207	7349	23035	1.2
3	F1	0.269	148399	522586	26.4
4	F	0.468	305622	917360	46.4
5	OTHER(1)	0.687	6157	17436	0.9
6	A	0.802	83786	241832	12.2
7	S	1.185	38866	161179	8.2

Pattern: FAS
 Total Area: 1976083

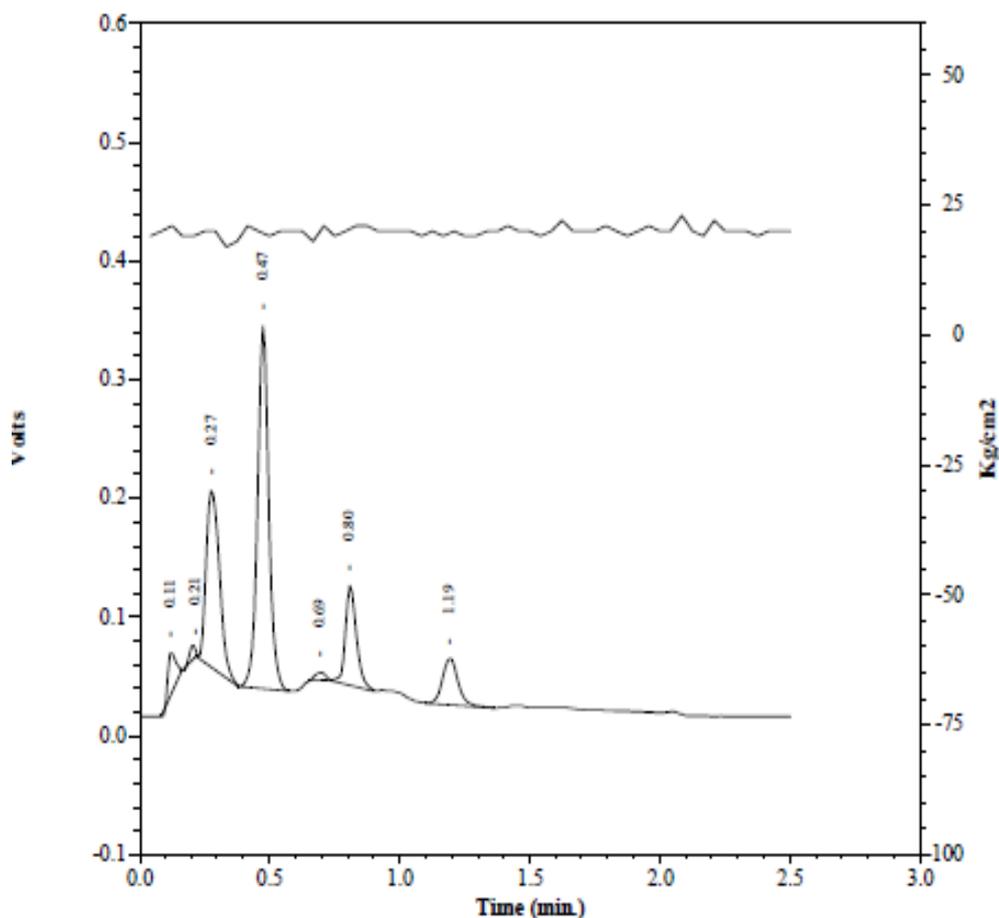


Figure 42 : Profil hétérozygote FAS d'un nouveau-né obtenu sur le Variant NBS

⇒ Courrier envoyé au médecin référent :



CHU de Bordeaux
Pôle Biologie et Pathologie
Chef de pôle : Dr Agnès Georges-Walryek

Centre Régional du Dépistage Néonatal Nouvelle Aquitaine
Responsable Médical : Pr Didier Lacombe
Service de Biochimie
Chef de service : Dr Annie Bérard
Biologistes : Dr Annie Bérard, Dr Julian Boutin, Pr François Moreau-Gaudry
Secrétariat Médical – tél 05 56 79 87 00 (CRDN), 05 56 79 55 11 (Biochimie)

Docteur,

Veuillez trouver ci-joint le résultat du dépistage néonatal ciblé de la Drépanocytose effectué sur papier buvard (test de guthrie) et ce, pour l'enfant :

Nom, Prénom:

Date de naissance :

Adresse des parents :

Tél. : - - - - / - - - -

Le résultat de l'étude de l'hémoglobine montre la présence d'une hémoglobine hétérozygote drépanocytaire AS sans danger pour la santé de ce nouveau-né. Cela peut cependant avoir un intérêt, comme vous le savez sûrement, sur les grossesses ultérieures (risque de drépanocytose homozygote si présence de la modification génétique dans les globules rouges des 2 parents).

Il semble par conséquent souhaitable de proposer d'effectuer à partir d'une simple prise de sang l'étude de l'hémoglobine des 2 parents – via une électrophorèse de l'hémoglobine associée à une NFS.

Afin que vous puissiez transmettre dans les meilleures conditions possibles ce résultat à la famille nous vous adressons la brochure « Etre hétérozygote, et alors... », support écrit comportant les principales explications de ce dépistage ciblé.

Si vous étiez en difficulté pour transmettre et expliquer ces résultats à la famille nous pouvons vous proposer de contacter un des médecins référents pour un avis téléphonique ou par email. Enfin, si cela vous paraît nécessaire, les médecins référents peuvent revoir les parents avec leur électrophorèse de l'hémoglobine respective afin de mieux évoquer avec eux les risques éventuels pour une grossesse ultérieure.

Nous vous remercions de votre précieuse collaboration et vous prions d'agréer, Docteur, nos très respectueuses salutations.

Dordogne – Gironde – Landes – Lot et Garonne
- Pyrénées Atlantique
Drs Camille Runel-Belliard et Marie Lagarde
Centre de compétence de la drépanocytose
Hôpital Pellegrin Enfants
Place Amélie Raba –Léon
33076 Bordeaux Cedex
Tél. : 05.56.79.59.12

Charente – Charente Maritime – Deux Sèvres
Vienne
Docteur Tackwa Khalifeh
Centre de compétence de la drépanocytose
Service Médico-chirurgical Pédiatrie
CHU Jean Bernard
2, rue de la Milétrie
CS 90577 86 021 POITIERS Cedex
Tél. : 05.49.44.43.90

Corrèze – Creuse - Haute Vienne
Docteur Christophe Piguat
Centre de compétence de la drépanocytose
Service Pédiatrie
Hôpital Mère – Enfant
8, Ave Dominique Larrey
87042 Limoges
Tél. : 05.55.05.68.01

⇒ Courrier envoyé aux parents :



CHU de Bordeaux
Pôle Biologie et Pathologie
Chef de pôle : Dr Agnes Georges-Walryck

Centre Régional du Dépistage Néonatal Nouvelle Aquitaine
Responsable Médical : Pr Didier Lacombe

Service de Biochimie

Chef de service : Dr Annie Bérard

Biologistes : Dr Annie Bérard, Dr Julian Boutin, Pr François Moreau-Gaudry

Secrétariat Médical – tél 05 56 79 87 00 (CRDN), 05 56 79 55 11 (Biochimie)

Madame, monsieur,

Veillez trouver ci-joint le résultat du dépistage néonatal ciblé de l'étude de l'hémoglobine effectué sur papier buvard (test de Guthrie) pour votre enfant.

Le résultat de l'étude de l'hémoglobine montre la présence d'une **hémoglobine hétérozygote drépanocytaire AS** sans danger pour la santé de votre enfant.

Le fait d'avoir découvert cette anomalie peut cependant avoir un intérêt pour deux raisons :

- Un intérêt pour vos grossesses ultérieures. Il semble souhaitable de vous proposer d'effectuer une simple prise de sang - que peut-vous prescrire votre médecin traitant - pour étudier votre hémoglobine (via une électrophorèse de l'hémoglobine associée à une NFS). Vous pouvez donc le contacter si vous souhaitez avoir une prescription.
- Un intérêt pour votre enfant dans son futur. Quand il sera adulte il doit savoir qu'il a une anomalie de l'hémoglobine sans conséquence sur sa santé mais pouvant se transmettre à ses enfants et pouvant donner une maladie si le/la conjoint avait lui aussi une autre anomalie de l'hémoglobine. Il faudrait donc pouvoir proposer que le futur conjoint fasse lui aussi une analyse de l'hémoglobine avant de décider d'une grossesse.

Nous vous adressons également la brochure « Etre hétérozygote, et alors... », support écrit comportant les principales explications de ce dépistage ciblé.

Nous restons à votre disposition pour plus de renseignements si nécessaire.

Cordialement.

Dordogne – Gironde – Landes – Lot et Garonne
- Pyrénées Atlantique
Drs Camille Runel-Belliard et Marie Lagarde
Centre de compétence de la drépanocytose
Hôpital Pellegrin Enfants
Place Amélie Raba – Léon
33076 Bordeaux Cedex
Tél. : 05.56.79.59.12

Charente – Charente Maritime – Deux Sèvres
Vienne
Docteur Tackwa Khalifeh
Centre de compétence de la drépanocytose
Service Médico-chirurgical Pédiatrie
CHU Jean Bernard
2, rue de la Milétrie
CS 90577 86 021 POITIERS Cedex
Tél. : 05.49.44.43.90

Corrèze – Creuse - Haute Vienne
Docteur Christophe Piguet
Centre de compétence de la drépanocytose
Service Pédiatrie
Hôpital Mère – Enfant
8, Ave Dominique Larrey
87042 Limoges
Tél. : 05.55.05.68.01

Sample ID:	1418027689	Analysis Performed:	07/08/2018 12:58:21
Run Date:	07/08/2018	Injection Number:	2675
Run Number:	1	Report Generated:	07/08/2018 13:01:25
Tray Type:	1ere Plaque	Operator ID:	egm
Tray Position:	1		
Well#:	D12		

Peak	Peak Name	Retention Time (min)	Height	Area	Area%
1	FAST	0.111	45002	94066	5.3
2	Unknown	0.196	15368	23747	1.3
3	F1	0.266	147480	499265	28.2
4	F	0.462	315370	935257	52.8
5	OTHER(1)	0.698	6539	14173	0.8
6	A	0.806	46382	129282	7.3
7	D	1.064	23136	76659	4.3

Pattern: FAD
 Total Area: 1772447

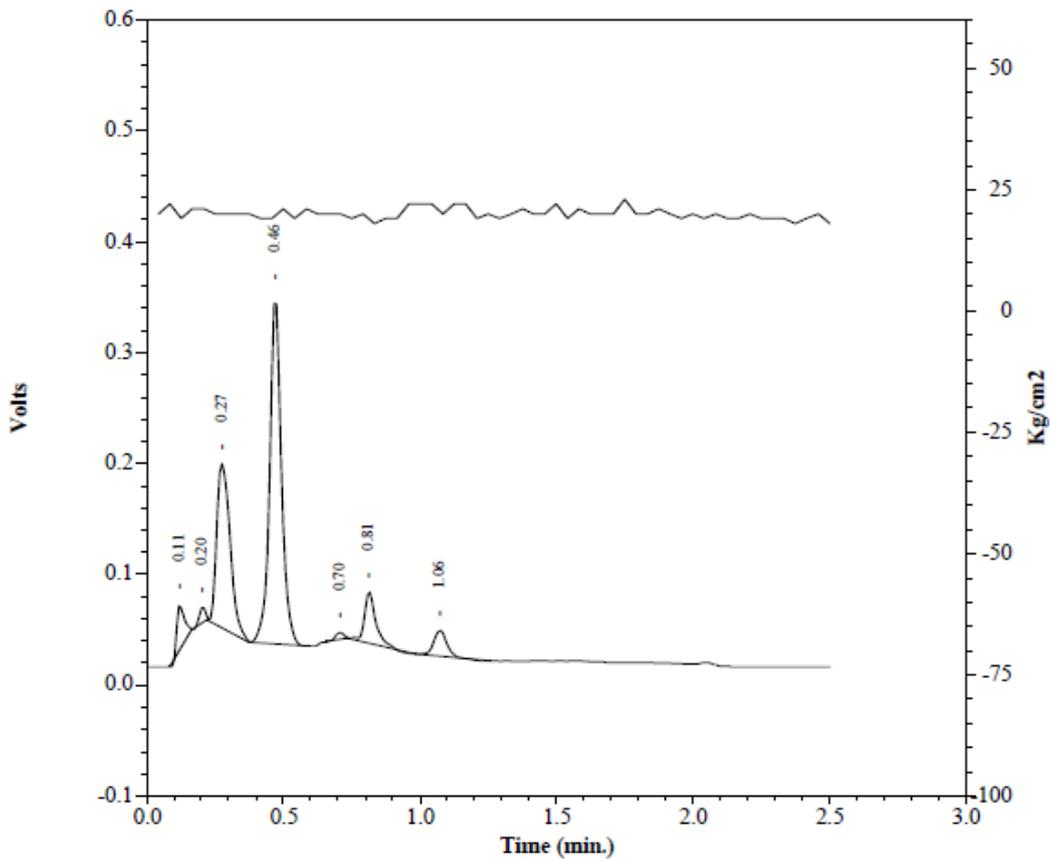


Figure 44 : Profil hétérozygote FAD d'un nouveau-né obtenu sur le Variant NBS

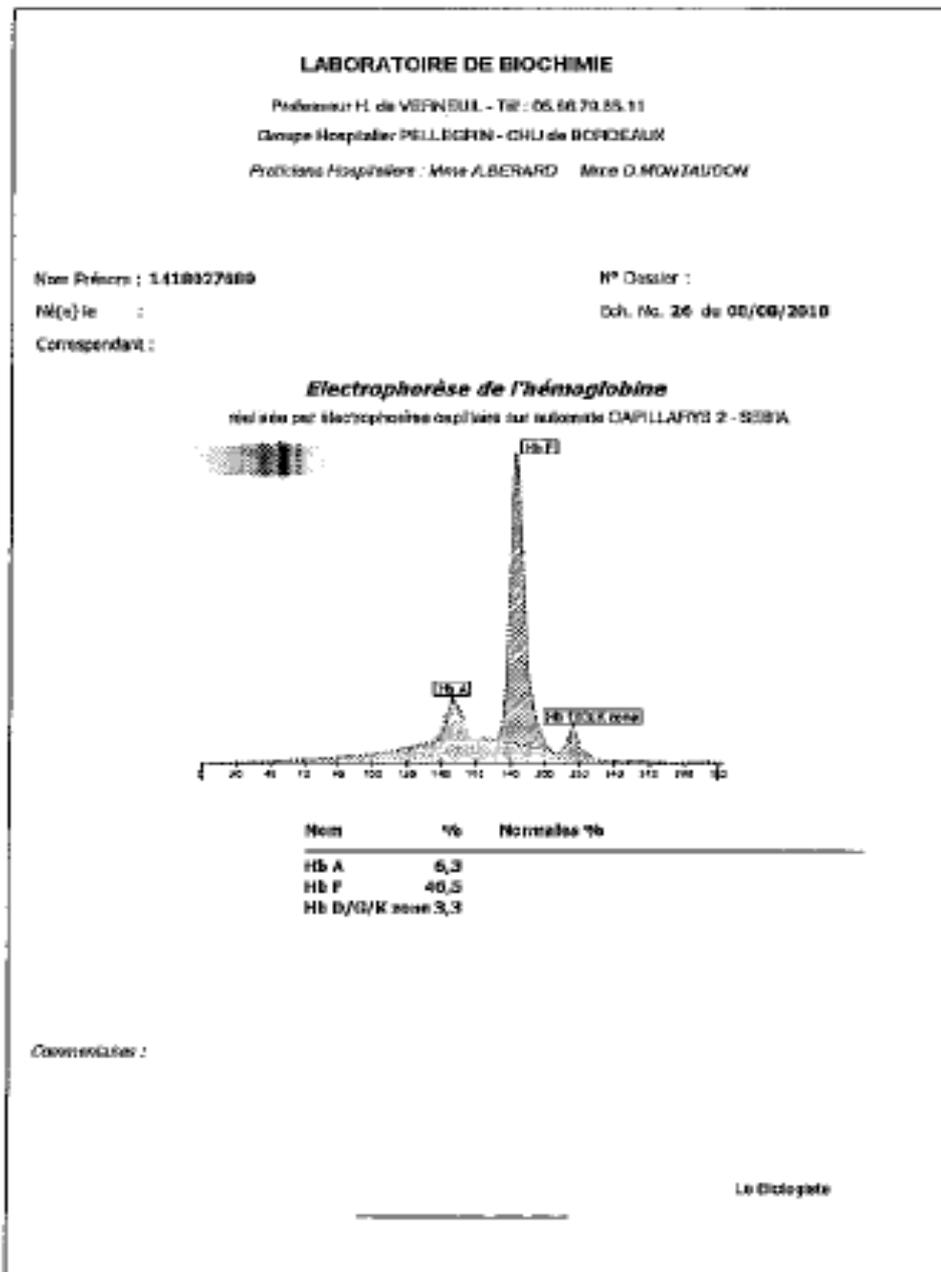


Figure 45 : Confirmation diagnostique du profil hétérozygote FAD du nouveau-né obtenu sur le Capillarys 2

Sample ID:	1418026973	Analysis Performed:	03/08/2018 11:00:02
Run Date:	03/08/2018	Injection Number:	2518
Run Number:	1	Report Generated:	03/08/2018 11:03:06
Tray Type:	1ere Plaque	Operator ID:	egm
Tray Position:	1		
Well#:	A6		

Peak	Peak Name	Retention Time (min)	Height	Area	Area%
1	FAST	0.111	27263	55655	5.0
2	Unknown	0.194	16879	27200	2.4
3	F1	0.262	96517	313317	28.1
4	F	0.466	217712	549287	49.3
5	OTHER(1)	0.693	7123	16572	1.5
6	A	0.807	37692	86218	7.7
7	C	1.688	27258	65954	5.9

Pattern: FAC
 Total Area: 1114204

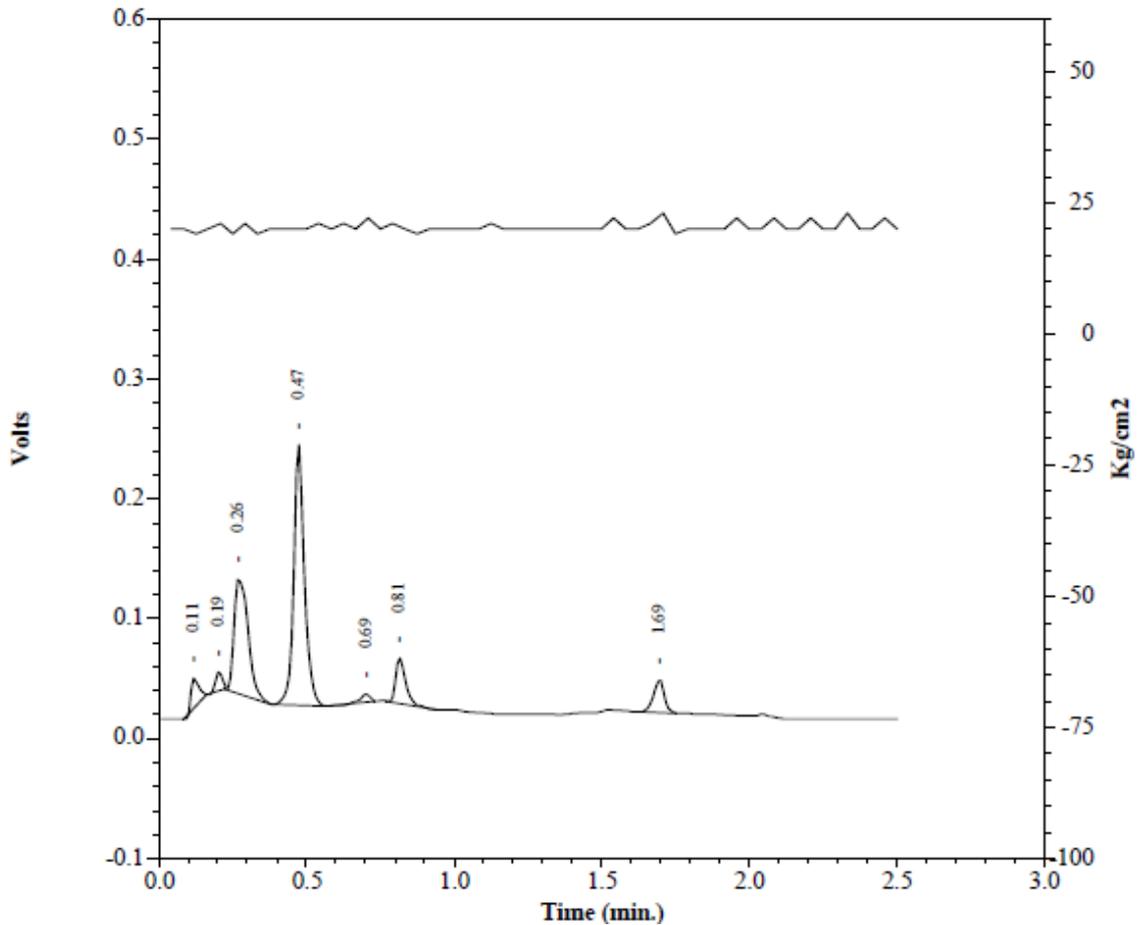


Figure 46 :Profil hétérozygote FAC d'un nouveau-né obtenu sur le variant NBS

Sample ID:	1418027603	Analysis Performed:	07/08/2018 11:36:59
Run Date:	07/08/2018	Injection Number:	2649
Run Number:	1	Report Generated:	07/08/2018 11:40:03
Tray Type:	1ere Plaque	Operator ID:	egm
Tray Position:	1		
Well#:	B10		

Peak	Peak Name	Retention Time (min)	Height	Area	Area%
1	FAST	0.111	38016	79271	4.5
2	Unknown	0.194	17627	27440	1.6
3	F1	0.265	140741	462661	26.2
4	F	0.463	385076	938384	53.2
5	OTHER(1)	0.694	8254	23970	1.4
6	A	0.803	52182	129403	7.3
7	OTHER(5)	1.528	39938	101924	5.8

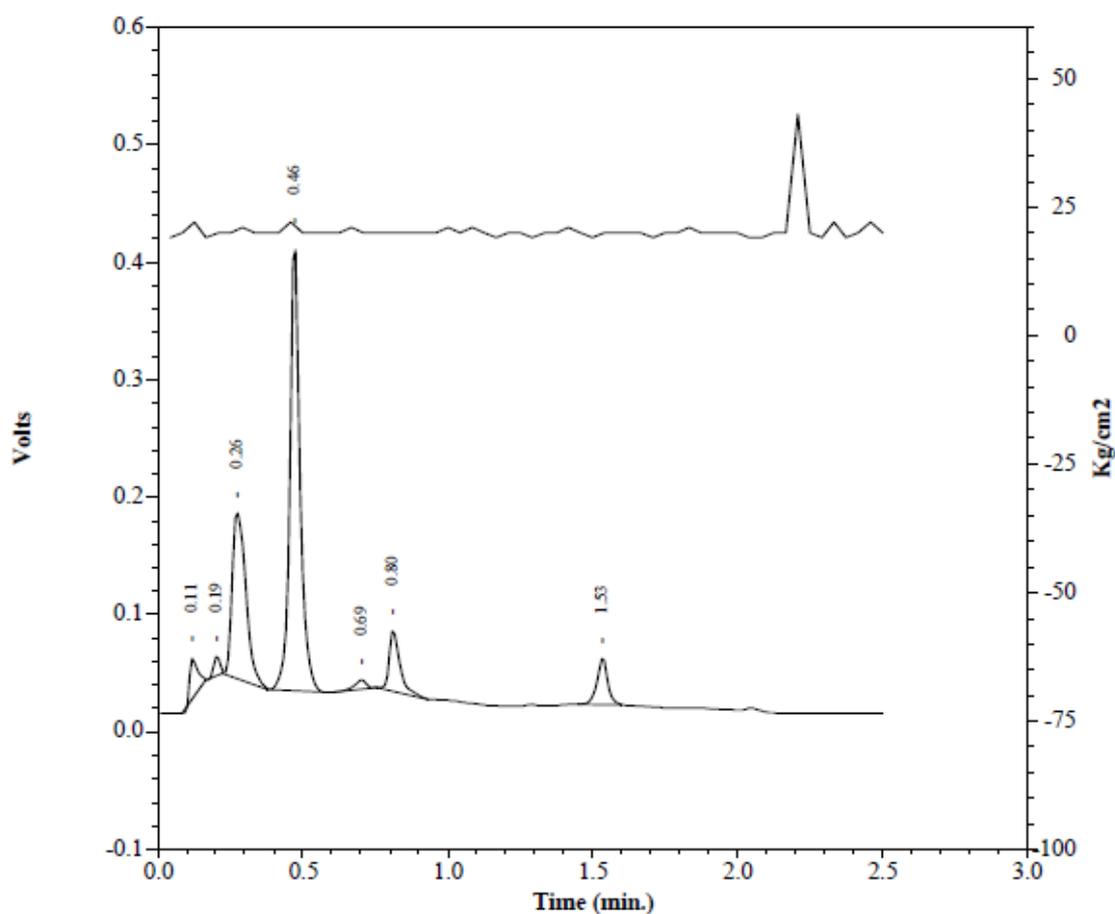


Figure 48 : Profil hétérozygote FA « other » d'un nouveau-né obtenu sur le Variant NBS

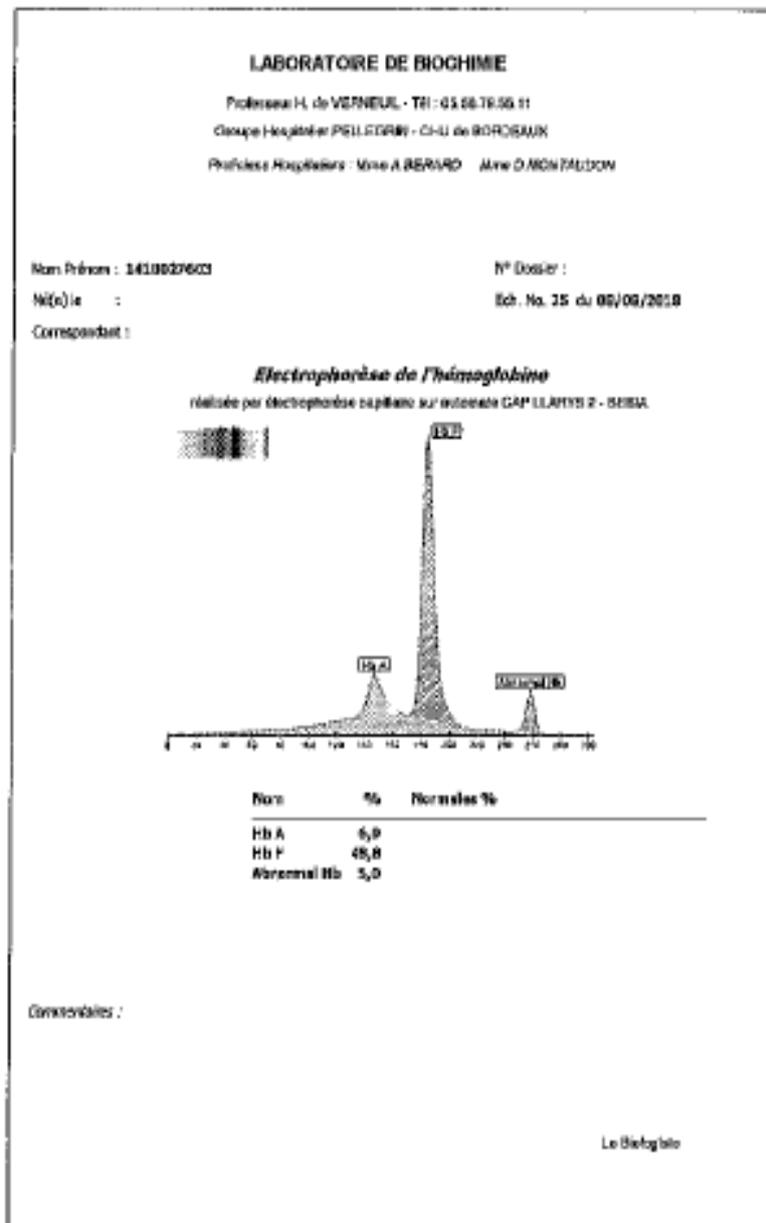


Figure 49 : Confirmation diagnostic du profil hétérozygote FAOArab du nouveau-né obtenu sur le Capillarys 2

Sample ID:	1418020542	Analysis Performed:	20/06/2018 12:37:41
Run Date:	20/06/2018	Injection Number:	1043
Run Number:	2	Report Generated:	20/06/2018 12:40:44
Tray Type:	1ere Plaque	Operator ID:	ALC
Tray Position:	1		
Well#:	B8		

Peak	Peak Name	Retention Time (min)	Height	Area	Area%
1	FAST	0.111	27690	54224	3.9
2	Unknown	0.195	16341	25487	1.8
3	F1	0.264	110376	353072	25.2
4	F	0.468	295860	737803	52.7
5	OTHER(1)	0.698	4666	7619	0.5
6	A	0.810	62849	153636	11.0
7	E/A2	0.963	23155	68160	4.9

Pattern: FAE
 Total Area: 1400001

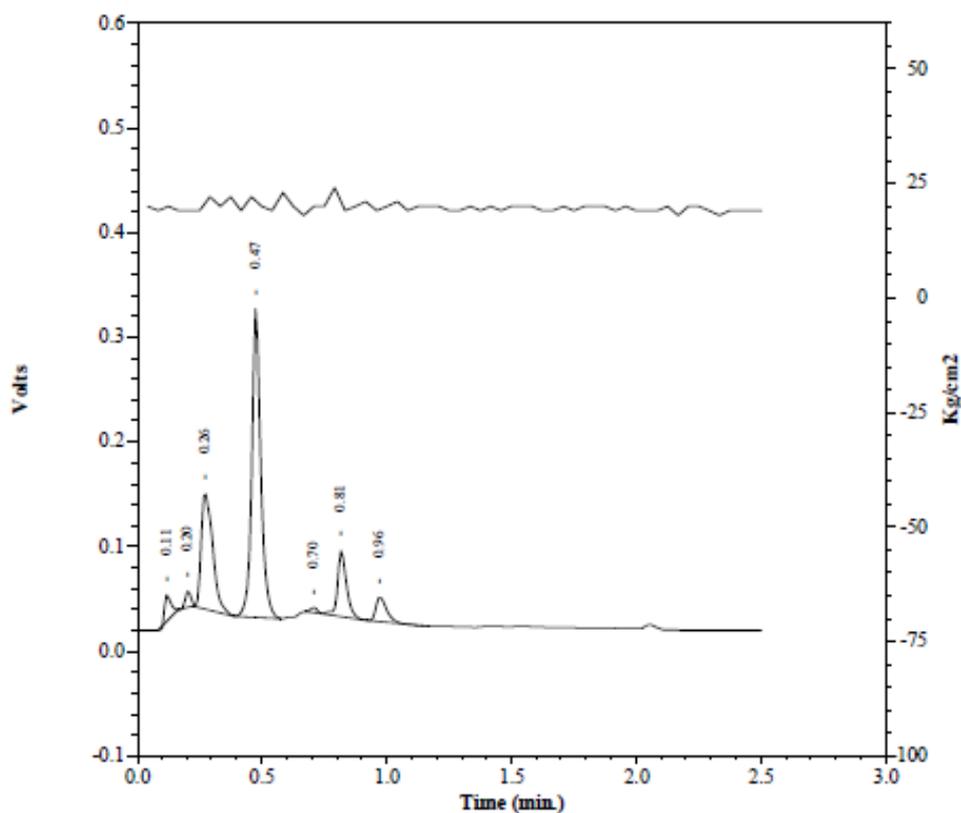


Figure 50 : Profil hétérozygote FAE d'un nouveau-né obtenu sur le variant NBS

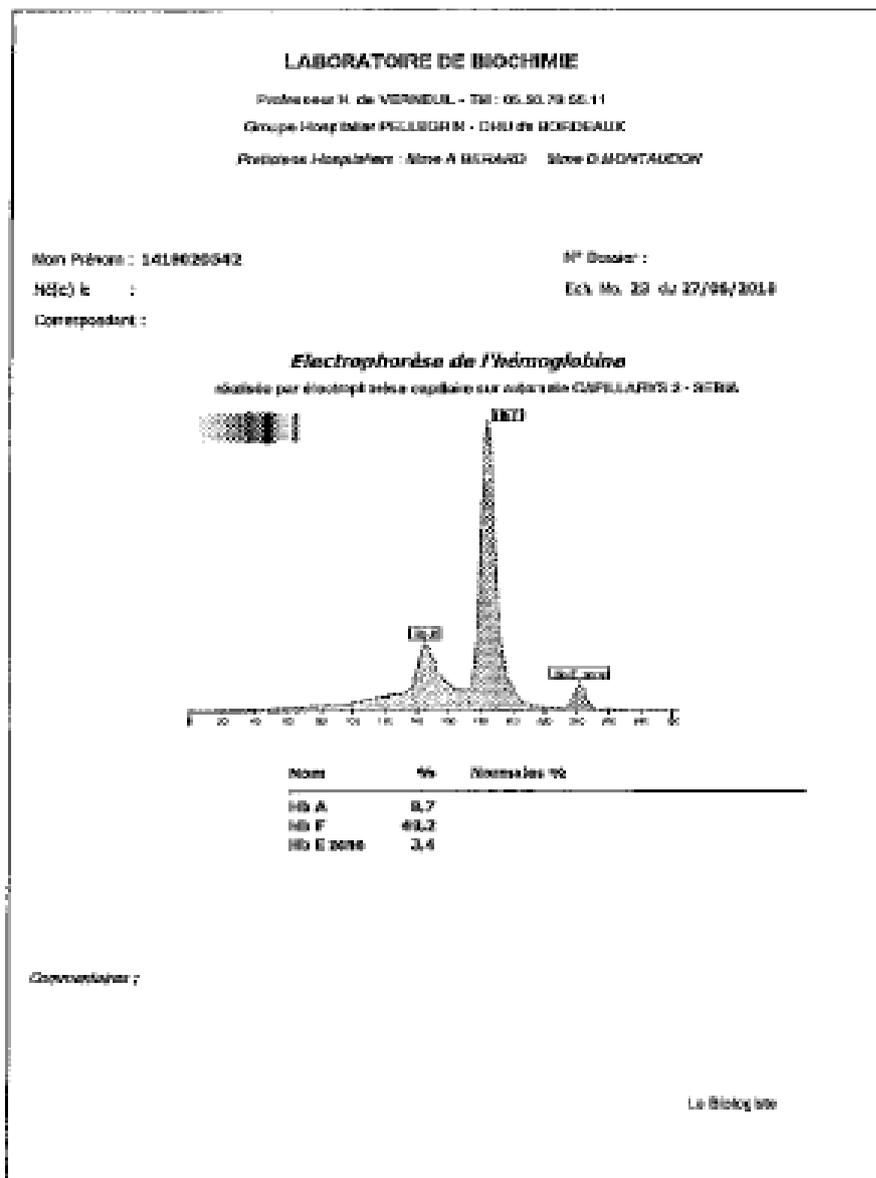


Figure 51 : Confirmation diagnostique du profil hétérozygote FAE du nouveau-né obtenu sur le Capillarys 2

⇒ Courrier envoyé au médecin référent :



CHU de Bordeaux
Pôle Biologie et Pathologie
Chef de pôle : Dr Agnes Georges-Walryek

Centre Régional du Dépistage Néonatal Nouvelle Aquitaine

Responsable Médical : Pr Didier Lacombe

Service de Biochimie

Chef de service : Dr Annie Bérard

Biologistes : Dr Annie Bérard, Dr Julian Boutin, Pr François Moreau-Gaudry

Secrétariat Médical – tél 05 56 79 87 00 (CRDN), 05 56 79 55 11 (Biochimie)

Docteur,

Veuillez trouver ci-joint le **résultat du dépistage néonatal ciblé de la Drépanocytose** effectué sur papier buvard (test de guthrie) et ce, pour l'enfant :

Nom, Prénom:

Date de naissance :

Adresse des parents :

Tél. : - - - - / - - - -

Le résultat de l'étude de l'hémoglobine montre la **présence d'une hémoglobine hétérozygote non drépanocytaire de type AC/AD/AE/AX** sans danger pour la santé de ce nouveau-né.

Cela peut cependant avoir un intérêt, comme vous le savez sûrement, sur les grossesses ultérieures du couple (risque de drépanocytose hétérozygote si un des parents présentent une hémoglobine AS).

Il semble par conséquent souhaitable de proposer d'effectuer à partir d'une simple prise de sang l'étude de l'hémoglobine des 2 parents – via une électrophorèse de l'hémoglobine associée à une NFS.

Afin que vous puissiez transmettre dans les meilleures conditions possibles ce résultat à la famille nous vous adressons la **brochure « Etre hétérozygote, et alors... »**, support écrit comportant les principales explications de ce dépistage ciblé.

Si vous étiez en difficulté pour transmettre et expliquer ces résultats à la famille nous pouvons vous proposer de contacter un des médecins référents pour un avis téléphonique ou par email. Enfin, les médecins référents peuvent revoir les parents avec leur électrophorèse de l'hémoglobine respective afin de mieux évoquer avec eux les risques éventuels pour une grossesse ultérieure – notamment si un des parents étaient porteurs AS.

Nous vous remercions de votre précieuse collaboration et vous prions d'agréer, Docteur, nos très respectueuses salutations.

Dordogne – Gironde – Landes – Lot et Garonne
- Pyrénées Atlantique
Drs Camille Runol-Bellard et Marie Lagarde
Centre de compétence de la drépanocytose
Hôpital Pellegrin Enfants
Place Amélie Raba –Léon
33076 Bordeaux Cedex
Tél. : 05.56.79.59.12

Charente – Charente Maritime – Deux Sèvres
Vienne
Docteur Tackwa Khalifeh
Centre de compétence de la drépanocytose
Service Médico-chirurgical Pédiatrie
CHU Jean Bernard
2, rue de la Milétrie
CS 90577 86 021 POITIERS Cedex
Tél. : 05.49.44.43.90

Corrèze – Creuse – Haute Vienne
Docteur Christophe Piguat
Centre de compétence de la drépanocytose
Service Pédiatrie
Hôpital Mère – Enfant
8, Ave Dominique Larrey
87042 Limoges
Tél. : 05.55.05.68.01

⇒ Courrier envoyé aux parents :



CHU de Bordeaux
Pôle Biologie et Pathologie
Chef de pôle : Dr Agnes Georges-Walryck

Centre Régional du Dépistage Néonatal Nouvelle Aquitaine

Responsable Médical : Pr Didier Lacombe

Service de Biochimie

Chef de service : Dr Annie Bérard

Biologistes : Dr Annie Bérard, Dr Julian Boutin, Pr François Moreau-Gaudry

Secrétariat Médical – tél 05 56 79 87 00 (CRDN), 05 56 79 55 11 (Biochimie)

Madame, monsieur,

Veuillez trouver ci-joint le résultat du dépistage néonatal ciblé de l'étude de l'hémoglobine effectué sur papier buvard (test de guthrie) pour votre enfant.

Le résultat de l'étude de l'hémoglobine montre la présence d'une hémoglobine hétérozygote non drépanocytaire de type AC/AD/AE/AX sans danger pour la santé de votre enfant.

Le fait d'avoir découvert cette anomalie peut cependant avoir un intérêt pour deux raisons :

- Un intérêt pour vos grossesses ultérieures. Il semble souhaitable de vous proposer d'effectuer une simple prise de sang - que peut-vous prescrire votre médecin traitant - pour étudier votre hémoglobine (via une électrophorèse de l'hémoglobine associée à une NFS). Vous pouvez donc le contacter si vous souhaitez avoir une prescription.
- Un intérêt pour votre enfant dans son futur. Quand il sera adulte il doit savoir qu'il a une anomalie de l'hémoglobine sans conséquence sur sa santé mais pouvant se transmettre à ses enfants et pouvant donner une maladie si le/la conjoint avait lui aussi une autre anomalie de l'hémoglobine. Il faudrait donc pouvoir proposer que le futur conjoint fasse lui aussi une analyse de l'hémoglobine avant de décider d'une grossesse.

Nous vous adressons également la brochure « Etre hétérozygote, et alors... », support écrit comportant les principales explications de ce dépistage ciblé.

Nous restons à votre disposition pour plus de renseignements si nécessaire.

Cordialement.

Dordogne – Gironde – Landes – Lot et Garonne
- Pyrénées Atlantique
Drs Camille Runel-Belliard et Marie Lagarde
Centre de compétence de la drépanocytose
Hôpital Pellegrin Enfants
Place Amélie Raba –Léon
33076 Bordeaux Cedex
Tél. : 05.56.79.59.12

Charente – Charente Maritime – Deux Sèvres
Vienne
Docteur Tackwa Khalifeh
Centre de compétence de la drépanocytose
Service Médico-chirurgical Pédiatrie
CHU Jean Bernard
2, rue de la Milétrie
CS 90577 86 021 POITIERS Cedex
Tél. : 05.49.44.43.90

Corrèze – Creuse - Haute Vienne
Docteur Christophe Piguet
Centre de compétence de la drépanocytose
Service Pédiatrie
Hôpital Mère – Enfant
8, Ave Dominique Larrey
87042 Limoges
Tél. : 05.55.05.68.01

CONCLUSION

L'hémoglobine, transporteur du dioxygène dans l'organisme, est un constituant essentiel à la vie des individus. Ainsi, il est aisé de comprendre qu'une anomalie de l'hémoglobine entraîne des conséquences néfastes voire mortelles. C'est le cas de la drépanocytose, anomalie qualitative de l'hémoglobine, très répandue dans les zones où sévit le paludisme du fait du caractère protecteur conféré par l'hémoglobine S, présentant de nombreuses complications telles que les CVO ou encore le syndrome thoracique aigu.

Cependant, à la naissance, les enfants atteints de drépanocytose sont asymptomatiques, d'où l'importance de la mise en place, en France, d'un dépistage néonatal au troisième jour de vie.

Ce dépistage permet la mise en place d'un traitement préventif chez l'enfant à titre de vaccins ou d'antibioprophylaxie afin d'éviter toutes complications infectieuses, à l'origine d'une grande mortalité chez ces enfants.

L'organisation nationale et régionale du dépistage en France, permet une égalité d'accès soins ainsi qu'une prise en charge rapide des enfants. Cependant, contrairement aux autres pathologies dépistées à la naissance chez les nouveau-nés, la drépanocytose n'est dépistée uniquement chez les enfants à risque en métropole. En revanche, dans les DOM tous les enfants bénéficient d'un dépistage systématique. De nombreuses études ont travaillé sur la mise en place du dépistage néonatal systématique de la drépanocytose chez tous les enfants en France. Il a été conclu, qu'en raison de la prévalence de la pathologie et du coût du dépistage, qu'il n'était pas nécessaire d'étendre le dépistage à tous les nouveau-nés. En effet, le nombre d'enfant atteint de la drépanocytose en France métropolitaine est stable alors que la part de la population dépistée augmente et le nombre de cas potentiellement manqué est faible.

Ce dépistage s'effectue sur papier buvard (carton Guthrie), comme les autres pathologies détectées à la naissance, et fait appel à deux techniques. La première est la chromatographie liquide à haute performance. Dès qu'un variant de l'hémoglobine est détectée par cette dernière, une confirmation diagnostic est essentielle notamment par électrophorèse capillaire.

Actuellement, seuls six laboratoires en France assurent ce dépistage. C'est le cas du CHU de Bordeaux, site Pellegrin, dernier laboratoire à l'avoir mis en place.

Dans un contexte d'accréditation, une vérification de méthode a été effectuée sur le nouvel automate Variant NBS. Ainsi, un mode opératoire, une fiche tutorat et une fiche d'habilitation ont été rédigés. La fiche d'habilitation a servi à définir les connaissances et compétences nécessaires pour l'exercice d'une activité professionnelle au travers de moyens et de critères pour y parvenir, et autorise les techniciens à réaliser les activités pour lesquelles ils sont qualifiés par la direction.

Les deux visions (technique et biologique), parfois très différentes ont pu être associées dans ce travail grâce à la coopération entre biologistes et techniciens. Ainsi, les deux partis en sortent enrichis : le biologiste comprend mieux les difficultés inhérentes à la technique et le technicien comprend plus l'importance de libérer des résultats de qualité ; ceux-ci servant ensuite à la validation biologique.

Le biologiste donne sa « confiance » à un technicien en ce qui concerne ses compétences techniques. En contrepartie, le technicien attend que le biologiste soit compréhensif et apporte des solutions en cas de soucis techniques le dépassant ou de problèmes cliniques.

On assiste actuellement à un élargissement croissant des panels de maladies dépistées sur taches de sang avec notamment le dosage de l'activité GALT pour le dépistage de la galactosémie congénitale ou encore les activités des enzymes impliquées dans les pathologies héréditaire lysosomales (Fabry, Pompe, Gaucher). Ces dosages ne sont pas encore réalisés au CHU de Bordeaux.

BIBLIOGRAPHIE

- Bibliographie du texte :

1. Fitzsimmons R, Amin N, Uversky VN. Understanding the roles of intrinsic disorder in subunits of hemoglobin and the disease process of sickle cell anemia. *Intrinsically Disord Proteins*. janv 2016;4(1):e1248273.
2. Manning LR, Russell JE, Padovan JC, Chait BT, Popowicz A, Manning RS, et al. Human embryonic, fetal, and adult hemoglobins have different subunit interface strengths. Correlation with lifespan in the red cell. *Protein Sci Publ Protein Soc*. août 2007;16(8):1641-58.
3. Hémoglobinopathies.pdf [Internet]. [cité 4 mars 2019]. Disponible sur: <http://www.lbmroanne.com/docs/hemato/H%C3%A9moglobinopathies.pdf>
4. Électrophorèse des protéines du LCR.
5. Bain BJ. Haemoglobinopathy Diagnosis [Internet]. New York, NY: John Wiley & Sons; 2008 [cité 4 mars 2019]. Disponible sur: <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:101:1-2014111115044>
6. Physio Ch 4-1 Transport d'O₂ et de CO₂ [Internet]. [cité 4 mars 2019]. Disponible sur: <http://coproweb.free.fr/pagphy/physioan/ch4s1.htm>
7. Jensen FB. Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport. *Acta Physiol Scand*. nov 2004;182(3):215-27.
8. Ryan K, Bain BJ, Worthington D, James J, Plews D, Mason A, et al. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *Br J Haematol*. avr 2010;149(1):35-49.
9. Bardakdjian-Michau, Dhondt, Ducrocq. Bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1 juill 2003;61(4):401-9.
10. Labie D, Krishnamoorthy R. Activation des gènes de l'hémoglobine au cours du développement. *médecine/sciences*. 1988;4(7):427.
11. Electrophorèse de l'hémoglobine [Internet]. [cité 4 mars 2019]. Disponible sur: https://www.eurofins-biomnis.com/referentiel/liendoc/precis/ELECTROPHORESE_HEMOGLOBINE.pdf
12. Arbres décisionnels pour le diagnostic et la caractérisation moléculaire des hémoglobinopathies. *Ann Biol Clin (Paris)*. juill 2010;(4):455-464.
13. Haute Autorité de Santé - Hémoglobinopathies, hémolyses chroniques constitutionnelles et acquises sévères [Internet]. [cité 29 avr 2019]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_680249/fr/hemoglobinopathies-hemolyses-chroniques-constitutionnelles-et-acquises-severes
14. Pauling L, Itano HA. Sickle cell anemia a molecular disease. *Science*. 25 nov 1949;110(2865):543-8.

15. Ingram VM. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature*. 13 oct 1956;178(4537):792-4.
16. Siguret V., Andreux J-P. Diagnostic biologique des hémoglobinopathies par analyse du phénotype. *Ann Biol Clin (Paris)*. mars 1997;55(2):103-12.
17. Syndromes drépanocytaires majeurs de l'adulte et de l'enfant [Internet]. [cité 4 mars 2019]. Disponible sur:
https://www.orpha.net/data/patho/Pro/fr/PNDS_SyndromesDrepanocytairesMajeursAdulteEnfant.pdf
18. Nagel RL, Labie D. La résistance innée au paludisme due aux anomalies de l'hémoglobine. *Hématologie*. 17 mars 2003;8(6):405-13.
19. Taylor SM, Parobek CM, Fairhurst RM. Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. juin 2012;12(6):457-68.
20. Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW, Dewi M, et al. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *Lancet Lond Engl*. 12 janv 2013;381(9861):142-51.
21. Diagnostic d'une hémoglobinopathie - PDF [Internet]. [cité 4 mars 2019]. Disponible sur:
<https://docplayer.fr/12986645-Diagnostic-d-une-hemoglobinopathie.html>
22. Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ*. juin 2008;86(6):480-7.
23. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ*. 2001;79(8):704-12.
24. Bilan activité 2012 de l'afdphe [Internet]. [cité 4 mars 2019]. Disponible sur:
https://identitairepur.files.wordpress.com/2013/12/afdphe-bilan_activite_2012.pdf
25. GOMES DO ESPERITO SANTO E, GOULET V, CASTETBON K. Mortalité liée à la drépanocytose en France : âge de décès et causes associées (1979-2010). *Bull Epidemiol Hebd*. 10 mars 2015;(8):142-50.
26. Steinberg MH, Chui DHK, Dover GJ, Sebastiani P, Alsultan A. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: a glass half full? *Blood*. 23 janv 2014;123(4):481-5.
27. Bender MA. Sickle Cell Disease. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al., éditeurs. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cité 4 mars 2019]. Disponible sur:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1377/>
28. Gill FM, Sleeper LA, Weiner SJ, Brown AK, Bellevue R, Grover R, et al. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. *Cooperative Study of Sickle Cell Disease*. *Blood*. 15 juill 1995;86(2):776-83.
29. Miller ST, Sleeper LA, Pegelow CH, Enos LE, Wang WC, Weiner SJ, et al. Prediction of Adverse Outcomes in Children with Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 13 janv 2000;342(2):83-9.

30. Hemoglobinoses.pdf [Internet]. [cité 4 mars 2019]. Disponible sur: <http://medecinotropicale.free.fr/cours/hemoglobinoses.pdf>
31. Quint R, Lillo-Le Louet A, Pouchot J, Arlet J-B. Priapism in sickle cell disease: Beware of neuroleptics. *Am J Hematol.* août 2018;93(8):E211-3.
32. Yawn BP, John-Sowah J. Management of Sickle Cell Disease: Recommendations from the 2014 Expert Panel Report. *Am Fam Physician.* 15 déc 2015;92(12):1069-76.
33. John AB, Ramlal A, Jackson H, Maude GH, Sharma AW, Serjeant GR. Prevention of pneumococcal infection in children with homozygous sickle cell disease. *Br Med J Clin Res Ed.* 26 mai 1984;288(6430):1567-70.
34. Archer N, Galacteros F, Brugnara C. 2015 Clinical trials update in sickle cell anemia. *Am J Hematol.* 2015;90(10):934-50.
35. McGann PT, Ware RE. Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. *Expert Opin Drug Saf.* 2015;14(11):1749-58.
36. Lebensburger JD, Pestina TI, Ware RE, Boyd KL, Persons DA. Hydroxyurea therapy requires HbF induction for clinical benefit in a sickle cell mouse model. *Haematologica.* sept 2010;95(9):1599-603.
37. Elford HL. Effect of hydroxyurea on ribonucleotide reductase. *Biochem Biophys Res Commun.* 10 oct 1968;33(1):129-35.
38. Alvino GM, Collingwood D, Murphy JM, Delrow J, Brewer BJ, Raghuraman MK. Replication in hydroxyurea: it's a matter of time. *Mol Cell Biol.* sept 2007;27(18):6396-406.
39. Koç A, Wheeler LJ, Mathews CK, Merrill GF. Hydroxyurea Arrests DNA Replication by a Mechanism That Preserves Basal dNTP Pools. *J Biol Chem.* 1 févr 2004;279(1):223-30.
40. Baliga BS, Pace BS, Chen H-H, Shah AK, Yang Y-M. Mechanism for fetal hemoglobin induction by hydroxyurea in sickle cell erythroid progenitors. *Am J Hematol.* 2000;65(3):227-33.
41. Stamatoyannopoulos G, Veith R, Galanello R, Papayannopoulou T. Hb F production in stressed erythropoiesis: observations and kinetic models. *Ann N Y Acad Sci.* 1985;445:188-97.
42. Bridges KR, Barabino GD, Brugnara C, Cho MR, Christoph GW, Dover G, et al. A multiparameter analysis of sickle erythrocytes in patients undergoing hydroxyurea therapy. *Blood.* 15 déc 1996;88(12):4701-10.
43. Cokic VP, Smith RD, Beleslin-Cokic BB, Njoroge JM, Miller JL, Gladwin MT, et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. *J Clin Invest.* janv 2003;111(2):231-9.
44. Montalembert M de. Traitement de la drépanocytose par l'hydroxyurée. *Hématologie.* 14 mars 2002;8(1):28-34.
45. Telen MJ. Beyond hydroxyurea: new and old drugs in the pipeline for sickle cell disease. *Blood.* 18 févr 2016;127(7):810-9.

46. Papapetrou EP. Gene and Cell Therapy for β -Thalassemia and Sickle Cell Disease with Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs): The Next Frontier. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1013:219-40.
47. Amaya M, Desai M, Gnanapragasam MN, Wang SZ, Zu Zhu S, Williams DC, et al. Mi2 β -mediated silencing of the fetal γ -globin gene in adult erythroid cells. *Blood.* 25 avr 2013;121(17):3493-501.
48. Bain BJ. Haemoglobinopathy diagnosis: Algorithms, lessons and pitfalls. *Blood Rev.* 1 sept 2011;25(5):205-13.
49. Wilson JMG, Jungner G, Organization WH. Principes et pratique du dépistage des maladies [Internet]. Genève : Organisation mondiale de la Santé; 1970 [cité 4 mars 2019]. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/41503>
50. Association française pour le dépistage et la prévention des handicaps de l'enfant (AFDPHE) | Société Française de Pédiatrie [Internet]. [cité 4 mars 2019]. Disponible sur: <http://www.sfpediatrie.com/page/association-fran% C3% A7aise-pour-le-d% C3% A9pistage-et-la-pr% C3% A9vention-des-handicaps-de-lenfant-afdph>
51. Arrêté du 22 février 2018 relatif à l'organisation du programme national de dépistage néonatal recourant à des examens de biologie médicale.
52. Pour un dépistage néonatal évolutif en fonction des avancées scientifiques et technologiques [Internet]. [cité 4 mars 2019]. Disponible sur: <http://www.rare2017paris.fr/medias/files/5-ra-gis-coutant.pdf>
53. Dhondt J-L, Association française pour le dépistage et la prévention des handicaps de l'enfant (AFDPHE). [Heel lance versus venepuncture in blood sampling for newborn screening]. *Arch Pediatr Organe Off Soc Francaise Pediatr.* oct 2010;17(10):1394-7.
54. ADR Road map for accession and implementation [Internet]. [cité 4 mars 2019]. Disponible sur: https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/adr/roadmap/ADR_Road_Map_en.pdf
55. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sickle Cell Disease. *N Engl J Med.* 20 2017;376(16):1561-73.
56. Couque N, Girard D, Ducrocq R, Boizeau P, Haouari Z, Missud F, et al. Improvement of medical care in a cohort of newborns with sickle-cell disease in North Paris: impact of national guidelines. *Br J Haematol.* 2016;173(6):927-37.
57. Hachani J, Duban-Deweere S, Pottiez G, Renom G, Flahaut C, Périni J-M. MALDI-TOF MS profiling as the first-tier screen for sickle cell disease in neonates: matching throughput to objectives. *Proteomics Clin Appl.* août 2011;5(7-8):405-14.
58. Arbres décisionnels hémoglobinopathies [Internet]. [cité 4 mars 2019]. Disponible sur: <http://sfh.hematologie.net/hematolo/UserFiles/File/Arbres% 20decisionnels% 20hemoglobinopathies-1.pdf>
59. La chromatographie [Internet]. Planet-Vie. [cité 4 mars 2019]. Disponible sur: <https://planet-vie.ens.fr/article/1931/chromatographie>

60. VARIANTs Sickle Cell Program Instruction Manual. BIO-RAD; 2014.
61. CAPILLARYS NEONAT Hb Ref. 2006. SEBIA; 2017.
62. Kaddari F, Moradkhani K. Hémoglobinopathies du phénotype à la génétique. :64.
63. Blessum C, Jeppsson JO, Aguzzi F, Bernon H, Bienvenu J. L'électrophorèse capillaire : principe et applications au laboratoire de biologie clinique. Ann Biol Clin (Paris). 24 nov 1999;57(6):643-57.
64. SH-INF-50_rev_06.pdf [Internet]. [cité 4 mars 2019]. Disponible sur: https://www.cofrac.fr/fileadmin/SH-INF-50_rev_06.pdf
65. Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale [Internet]. [cité 4 mars 2019]. Disponible sur: <http://spiralconnect.univ-lyon1.fr/spiral-files/download?mode=inline&data=4493263>
66. SH-GTA-01.pdf [Internet]. [cité 4 mars 2019]. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-01>
67. SH-REF-02.pdf [Internet]. [cité 4 mars 2019]. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-REF-02>

- Source des illustrations :

Figures 2 et 3 : tirée de « Structure et fonction de l'hémoglobine » [Internet]. [cité 4 sept 2013]. Disponible sur <http://acces.ens-lyon.fr/biotic/gpe/dossiers/drepanocytose/html/hbstr.htm>

Figure 4 : tirée de Haemoglobinopathy Diagnosis, BAIN BJ. John Wiley & Sons; 2008.

Figure 5 : tirée du cours de biochimie générale Jmol JSmol de Pierre Stouff « De la structure à la fonction d'une protéine : l'hémoglobine... et du délicat usage des notions de génotype et de phénotype pour cette molécule »

Disponible sur pst.chez-alice.fr

Figure 6 : tirée de « étude de la relation structure-fonction des macromolécules, hémoglobine 1

Disponible sur <http://www1.ucam.ac.ma/biochimie-genetique-S5/biomolecules-plateforme/MOLECULES-3D/StructureHemoglobine1.html>

et de Orthologs [Internet]. [cité 4 sept 2013]. Disponible sur:

<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2005/Heiner/ortholog.html>

Figure 7 : tirée du chapitre 6 « Relation structure activité des protéines.pdf » cité 4 sept 2013. Disponible sur:

<http://www.polyprepas.com/images/files/Chapitre%206%20Relation%20structure%20activi%C3%A9%20des%20prot%C3%A9ines.pdf>

Figure 8 : tirée du chapitre 6 « Relation structure activité des protéines.pdf » cité 4 sept 2013. Disponible sur:
<http://www.polyprepas.com/images/files/Chapitre%206%20Relation%20structure%20activi%C3%A9%20des%20prot%C3%A9ines.pdf>

Figure 10 : tirée de chapitre 6 Relation structure activité des protéines.pdf [Internet]. [cité 4 sept 2013]. Disponible sur: <http://www.polyprepas.com/images/files/Chapitre%206%20Relation%20structure%20activit%C3%A9%20des%20prot%C3%A9ines.pdf>

Figure 11 : tirée de « l'exemple du transport du dioxygène : myoglobine et hémoglobine » Chapitre 6 Relation structure activité des protéines.pdf, cité 4 sept 2013. Disponible sur:
<http://www.polyprepas.com/images/files/Chapitre%206%20Relation%20structure%20activit%C3%A9%20des%20prot%C3%A9ines.pdf>

Figure 12 : tirée de « Hémoglobine » Disponible sur <http://www.wikiwand.com/fr/H%C3%A9moglobine>

Figure 13 : tirée du cours sur le transport du dioxygène de l'Université Médicale Virtuelle Francophone, par le Collège National des Enseignants de Réanimation Médicale Disponible sur http://campus.cerimes.fr/reanimation-medicale/enseignement/reamed_1/site/htm1/1_13_131_1.html

Figures 15 et 16 : tirée de Haemoglobinopathy Diagnosis BAIN BJ, John Wiley & Sons; 2008, p6

Figure 17 : tirée de Haemoglobinopathy Diagnosis BAIN BJ, John Wiley & Sons; 2008, p6

Figure 18: tirée de « The normal structure and regulation of human globin gene clusters. Disord » de FORGET BG, HARDISON RC. Hemoglobin Genet Pathophysiol Clin Manag 2nd Edn Ed MH Steinberg BG Forget DR Higgs DJ Weather. 2009;46-61.

Figure 19 : Synthèse. Familles multigéniques: la famille des globines (en ligne). cité 4 sept 2013. Disponible sur: <http://acces.ens-lyon.fr/biotic/evolut/mecanismes/globines/html/synthese.htm>

Figure 20 : tirée de « The normal structure and regulation of human globin gene clusters. Disord » de FORGET BG, HARDISON RC. Hemoglobin Genet Pathophysiol Clin Manag 2nd Edn Ed MH Steinberg BG Forget DR Higgs DJ Weather. 2009;46-61.

Figure 21 : tirée de « Drépanocytose, la maladie génétique la plus fréquente en France » Disponible sur <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/drepanocytose>

Figure 22 : tirée de Piel et al ; PLOS Med, 2013-10(7)

Figure 23 : tirée de « Mortalité liée à la drépanocytose en France : âge de décès et causes associées (1979-2010) », bulletin épidémiologique hebdomadaire. Disponible sur <http://fulltext.bdsp.ehesp.fr/Invs/BEH/2015/08/1.pdf>

Figure 24 : tirée de La drépanocytose. Anémie falciforme. Anémie à hématies falciformes GALACTEROS F, LIONNET F, HABIBI A, STANKOVIC K, ARLET JB, RIBEIL JA, et al.

Encyclop Orphanet Grand Public 2011; mars.

Disponible sur <https://www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/Drepanocytose-FRfrPub125v01.pdf>

Figure 25 : tirée de l'article bases physiopathologiques, moléculaires et cellulaires du traitement de la drépanocytose (base de données John Libbey Eurotext), Jacques Elion et Dominique Labie, disponible sur : http://www.jle.com/fr/revues/hma/e-docs/bases_physiopathologiques_moleculaires_et_cellulaires_du_traitement_de_la_drepanocytose_140262/article.phtml?tab=images

Figure 26 : tirée de TD3 sur les maladies héréditaires

publié le 27 septembre 2013 par MARTIN Vincent

Disponible sur <http://wissembourgbphst2s.blogspot.com/2013/09/td-3-sur-les-maladies-hereditaires.html>

Figure 27 : tirée de « Pathologies des plaquettes »

BERNADOU Alain Médecin honoraire de l'Hôtel-Dieu de Paris, Professeur honoraire de l'Université Paris VI

Disponible sur <http://www.cytologie-sanguine.com/html/plaquettes.php>

Figure 28: tirée de Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia

McGANN Patrick T, MD MS and WARE Russell E, MD PhD

HHS Public Access, publié le 14 septembre 2015

Figure 29 : tirée de « pour un dépistage néonatal évolutif en fonction des avancées scientifiques et technologiques » Société Française de Dépistage Néonatal

Disponible sur <http://www.rare2017paris.fr/medias/files/5-ra-gis-coutant.pdf>, diapo 16

Figure 30 : tirée du site de l'AFDPHE, « 3 jours, l'âge du dépistage », édition 2017

Disponible http://www.afdphe.org/sites/default/files/3j_le_depistage_neonatal.pdf

Figure 31 : tirée du « le dépistage néonatal : comment ça marche ? »

Disponible sur <https://www.gralon.net/articles/sante-et-beaute/medecine/article-le-depistage-neonatal---comment-ca-marche--6500.htm>

Figure 32 : tirée du manuel d'utilisation VARIANT nbs New Born Screening system

Biorad, Août 2014

Figure 33 : tirée de L'électrophorèse capillaire : principe et applications au laboratoire de biologie clinique

BLESSUM.C, JEPSSON.J-O, AGUZZI.F, BERNON.H, BIENVENU.J

John Libbey Eurotext [en ligne]

Décembre 1999, volume57, numéro 6

Disponible sur:[http://www.jle.com/fr/revues/abc/e-](http://www.jle.com/fr/revues/abc/e-docs/lelectrophorese_capillaire_principe_et_applications_au_laboratoire_de_biologie_clinique_50207/article.phtml?tab=texte)

[docs/lelectrophorese_capillaire_principe_et_applications_au_laboratoire_de_biologie_clinique_50207/article.phtml?tab=texte](http://www.jle.com/fr/revues/abc/e-docs/lelectrophorese_capillaire_principe_et_applications_au_laboratoire_de_biologie_clinique_50207/article.phtml?tab=texte)

Figure 35 : issue du manuel qualité du laboratoire

Figure 36 : issue du Variant NBS

Figures 37-39 : issue de la vérification de méthode du laboratoire

Figure 41 : tirée de LegiFrance, Arrêté du 22 février 2018 relatif à l'organisation du programme national de dépistage néonatal recourant à des examens de biologie médicale [en ligne]

JORF n°0049 du 28 février 2018, texte n°18

Disponible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/affichText.do?cidTexte=JORFTEXT00003650121>

Figures 42-56 : issues du Variant NBS et du capillarys

- Bibliographie des Tableaux :

Tableau 1 : tiré de génétique et biologique de la drépanocytose

Dr Françoise Balédent, Biologiste, Paris, Pr Robert Girot, pédiatre, Paris

01 décembre 2016

Disponible sur <https://devsante.org/articles/genetique-et-biologie-de-la-drepanocytose>

Tableau 2: Modell's Haemoglobinopathologist's Almanac. Epidemiological estimates for Haemoglobin disorders compiled by B. Modell & M. Darlinton. UCL (University College of London) Centre for Health Informatics and Multiprofessional Education (CHIME) and WHO Collaborating Centre for the Community Control of Hereditary Disorders.

Tableaux 3 et 4: tirés du bilan d'activité AFDPE 2015.

Tableau 5: tiré du bilan global d'activité de l'AFDPE sur la période 1995-2015 du dépistage néonatal de la drépanocytose en France

Tableau 6 : tiré de génétique et biologique de la drépanocytose

Dr Françoise Balédent, Biologiste, Paris, Pr Robert Girot, pédiatre, Paris

01 décembre 2016

Disponible sur <https://devsante.org/articles/genetique-et-biologie-de-la-drepanocytose>

Tableau 7 : tiré de Hémoglobinopathies

Laboratoire Cerba, 15p

Disponible sur <http://www.lab-cerba.com/files/live/sites/Cerba/files/documents/FR/0273F.pdf>

Tableaux 8-10 : issu de la vérification de méthode du laboratoire

Tableau 11 : issu des données du CRDN

ANNEXES : Fiches de tutorat, évaluation, habilitation du personnel médico-technique pour le Variant NBS

	Entité d'application : PBP- --- - Organisation	EN_GRH_16_665
	Emetteur : PBP - P4 - ---	Ind : 06
DOCUMENT D'ENREGISTREMENT		Page : 1/4
FICHE TUTORAT PERSONNEL PARAMEDICAL		

EMPLOI-TYPE :

Cocher la case concernée :

- Technicien de laboratoire
 OPQ/MO/AL
 Ingénieur
 Autres :

Objectif :

Lister les compétences à acquérir par le personnel médical (techniciens) en vue de son habilitation au poste de travail.

Site hospitalier : Pellegrin

Discipline : BIOCHIMIE

Secteur d'activités : PROTEINES

Nom de l'automate ou poste de travail : Variant NBS

Niveau requis au regard des activités définies dans la fiche de poste selon niveau :

- pratique courante
 maîtrise
 expert

<p>NOM, Prénom de l'agent tuteur :</p> <p>Code agent :</p> <p>Nom du (ou des) agent(s) tuteur(s) :</p> <p>Période de compagnonnage :</p>	
<p>Conclusion fin de période de compagnonnage/tutorat :</p> <p>- Checklist complète <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON</p> <p>- Aptitude pressentie à l'habilitation <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON</p>	

	Entité d'application : PBP- ---- - Organisation	EN_GRH_16_665
	Emetteur : PBP - P4 - ---	Ind : 06
DOCUMENT D'ENREGISTREMENT		Page : 2/4
FICHE TUTORAT PERSONNEL PARAMEDICAL		

Abréviations :

- CAT, conduite à tenir
- CIQ, contrôle interne de qualité
- EEQ, évaluation externe de la qualité

1- Documents Qualité :

- lecture des documents (fiche attestation de lecture)
- savoir retrouver un document qualité

2- Pré-analytique :

- papiers buvards
 - o vérification identité, renseignements cliniques
 - o vérification date de péremption des papiers buvards
 - o vérification conformité des tâches sur buvard
 - o conservation avant analyse
 - o délai avant traitement analytique
 - o pré-traitement (poinçonnage) :
 - allumer l'ordinateur, rentrer mot de passe et aller sur le logiciel WDBSMgr-shortcut
 - savoir scanner et poinçonner les papiers buvards
 - savoir comment finir la plaque et éteindre le logiciel
 - ajouter eau distillée, attendre 10 minutes et agiter la plaque

3- Connaissances de l'appareil :

- VNAS (échantillonneur automatique)
- VNCS (station chromatographique)
- Plan de plaque 96 puits
- Principe de la méthode

VU	ACQUIS	Nécessite une formation complémentaire	Initiales tuteur

	Entité d'application : PBP- ---- - Organisation	EN_GRH_16_665
	Emetteur : PBP - P4 - ----	Ind : 06
DOCUMENT D'ENREGISTREMENT		Page : 3/4
FICHE TUTORAT PERSONNEL PARAMEDICAL		

4- Connaissances du logiciel :

- Mise en marche de l'automate et lancement du logiciel
 - o Menu SET-UP et sous-menus
 - o Menu RUN et sous-menus
 - o Menu DATA et sous-menus
 - o Menu MAINTAIN
- La barre d'état
 - o Indicateur de volume des tampons d'éluion
 - o Débit
 - o Pression
 - o Température colonne
 - o Température module échantillon
- Fermeture du logiciel et extinction de l'automate

5- Utilisation en routine :

- Avoir lu le mode opératoire (+ attestation de lecture)
- Installation du nouveau kit (maintenance occasionnelle)
 - o Connaitre l'ordre des étapes
 - o Connaitre le menu dans lequel on se place pour effectuer la mise à jour automatique des numéros de lots des tampons et cartouche
 - o Avoir fait une installation de A à Z a minima 1 fois
- Calibration :
 - o Quand
 - o Comment
 - o CAT si non acceptée
- CIQ (= marqueurs de temps de rétention) :
 - o Intérêt
 - o Quand ? Comment ?
 - o Vérification des pourcentages d'aires
 - o CAT si non acceptés
 - o Vérification de méthode et mise à jour des données pour les CIQ
- Lancement d'une série :
 - o Passage de la plaque primer et plaque échantillon
 - o Connaitre le menu RUN
 - o Import de la liste de travail
 - o Repassage

VU	ACQUIS	Nécessite une formation complémentaire	Initiales tuteur

	Entité d'application : PBP- ---- - Organisation Emetteur : PBP - P4 - ----	EN_GRH_16_665 Ind : 06
	DOCUMENT D'ENREGISTREMENT	Page : 4/4
FICHE TUTORAT PERSONNEL PARAMEDICAL		

- Conduite à tenir devant un résultat de patient
LOW INDETERMINED AREA
- Vérification technique et interprétation
 - o Avoir lu l'instruction
 - o Connaître les différentes CAT en fonction des résultats
- Edition des résultats
- Maintenances quotidiennes pré-analytiques
 - o Connaître l'ordre des différentes étapes
- Maintenance hebdomadaire
- Maintenance bimensuelle
- Maintenance mensuelle
- Gestion des relevés des actions de maintenance utilisateur
- Décontamination
- Sauvegarde et gestion des données
- EEQ :
 - o Intérêt
 - o Quand et comment ?
 - o Procédure de prise en charge
 - o Avoir gérer seul un EEQ
- Prise en charge d'un incident technique
- Arrêt de l'automate
- Gestion des déchets

VU	ACQUIS	Nécessite une formation complémentaire	Initiales tuteur

	Entité d'application : PBP- ---- - Emetteur : PBP - P4 - ----	EN_GRH_16_6 66 Ind : 02
	DOCUMENT D'ENREGISTREMENT	
FICHE EVALUATION COMPETENCES TECHNICIEN		

Objectif :

Obtenir l'habilitation au poste de travail.

Site hospitalier : Pellegrin

Discipline : BIOCHIMIE

Secteur d'activités : PROTEINES

Nom de l'automate ou poste de travail : Variant NBS

Niveau requis au regard des activités définies dans la fiche de poste selon niveau :

pratique courante

maîtrise

expert

NOM, Prénom du technicien évalué : Code agent : Nom du cadre de santé évaluateur : Nom du biologiste évaluateur : Date de l'évaluation :	<input type="checkbox"/> pratique courante : <input checked="" type="checkbox"/> maîtrise : <input type="checkbox"/> expert :
---	---

	Entité d'application : PBP- --- - Emetteur : PBP - P4 - ---	EN_GRH_16_6 66 Ind : 02
	DOCUMENT D'ENREGISTREMENT	Page : 2/12
FICHE EVALUATION COMPETENCES TECHNICIEN		

1/ Evaluation orale ou observation

L'évaluateur entoure la réponse adéquate :

- En regard de la fiche de tutorat nominative EN_GRH_16_665

ET

- Selon réponses aux questions et/ou l'observation

FC = formation complémentaire dispensée immédiatement ou ultérieurement

1 – Hygiène et Sécurité

▪ Tous niveaux confondus

- Tenue vestimentaire adéquate oui / non / FC
 - Blouse propre et fermée
 - Chaussures de laboratoire ou sur-chaussures
 - Lunettes de protection
 - Port de gants
 - Cheveux longs attachés
 -
- Connaissance des bases de la sécurité au laboratoire oui / non / FC
- Connaissance de la conduite à tenir (selon consignes en vigueur) dans le cas de:
 - AES oui / non / FC
 - début incendie
 - projection de produits chimiques oui / non / FC

2 – Déchets : quel devenir pour ?

▪ Tous niveaux confondus

- effluents oui / non / FC
- papiers buvards oui / non / FC
- gants oui / non / FC
- emballages plastiques et carton des réactifs oui / non / FC
-

	Entité d'application : PBP- --- - Emetteur : PBP - P4 - ---	EN_GRH_16_6 66 Ind : 02
	DOCUMENT D'ENREGISTREMENT	Page : 3/12
FICHE EVALUATION COMPETENCES TECHNICIEN		

3 – Documents qualité

▪ Tous niveaux confondus

- Attestation de lecture oui / non / FC
 - o Vérification signature de tous les documents
- Savoir retrouver une information oui / non / FC
 - o Les conditions de reconstitution des CIQ ou réactifs
 - o Les temps de conservation des réactifs après ouverture
 - o Les pannes et leurs solutions

▪ Niveau MAITRISE et REFERENT

- Savoir quand réviser les documents qualité oui / non / FC
- Participer à la révision des documents qualité oui / non / FC

4 - Connaissances de l'appareil

SANS OBJET :

▪ Tous niveaux confondus

- Poinçonneur : description demandée oui/non
- VNAS (échantillonneur automatique) : description demandée oui/non
- VNCS (station chromatographique) : description demandée oui/non

4 - Connaissances du logiciel

SANS OBJET :

▪ Tous niveaux confondus ou à différencier en niveau

- Mise en marche de l'automate et lancement du logiciel
 - o Menu SET-UP et sous-menus oui / non / FC
 - o Menu RUN et sous-menus oui / non / FC
 - o Menu DATA et sous-menus oui / non / FC
 - o Menu MAINTAIN oui / non / FC
- Barre d'état (indicateur de volume des tampons d'éluion, débit, pression) oui / non / FC
- Fermeture du logiciel et extinction de l'automate oui / non

	Entité d'application : PBP- ---- Emetteur : PBP - P4 - ----	EN_GRH_16_6 66 Ind : 02
	DOCUMENT D'ENREGISTREMENT	Page : 4/12
FICHE EVALUATION COMPETENCES TECHNICIEN		

5 - Utilisation en routine

▪ Niveau UTILISATEUR

- Edition et import de la liste de travail oui / non / FC
- Préparation et gestion des réactifs oui / non / FC
 - Vérifier si les dates d'ouverture / éventuelle reconstitution et de péremption sont bien gérées
 - Vérifier le relevé des températures (pièce, frigos)
 - Vérifier la connaissance des différents standards et CIQ
- Mise en marche :
 - ordre de mise en marche (analyseur PUIS ordinateur) oui / non / FC
 - saisie du mot de passe oui / non / FC
- CIQ :
 - Combien de types de CIQ à gérer, les citer oui / non / FC
- Lancement d'une série :
 - Saisie liste de travail manuellement et import de la liste oui / non / FC
 - Chargement échantillons et réactifs oui / non / FC
 - Gestion des repassages oui / non / FC
- Vérification technique et interprétation des messages d'erreur oui / non / FC
- Edition du journal des résultats oui / non / FC
- Sauvegarde des données oui / non / FC
- Arrêt de l'appareil oui / non / FC
- Maintenances quotidiennes pré-analytiques oui / non / FC
- Gestion des relevés des actions de maintenance utilisateur oui / non / FC
- Analyse et gestion des EEQ tous fournisseurs confondus oui / non / FC
- Démarche d'aller vers les techniciens niveau maîtrise et les biologistes si problème oui / non / FC

	Entité d'application : PBP- --- - Emetteur : PBP - P4 - ---	EN_GRH_16_6 66 Ind : 02
	DOCUMENT D'ENREGISTREMENT	Page : 5/12
FICHE EVALUATION COMPETENCES TECHNICIEN		

▪ **Niveau MAITRISE**

- Import de la liste de travail oui / non / FC
- Vérifier le relevé des températures (pièces, frigos) oui / non / FC
- Préparation et gestion des réactifs oui / non / FC
 - o Connaissances des différents réactifs, comment sont-ils régénérés (Primer, marqueurs de temps de rétention) oui / non / FC
 - o Connaissance des délais d'utilisation des réactifs (Primer, marqueurs de temps de rétention) oui / non / FC
 - o Vérifier si les dates d'ouverture / éventuelle reconstitution et de péremption sont bien gérées oui / non / FC
- Mise en route de l'automate :
 - o Savoir quand ?
 - o Connaitre l'ordre de mise en marche (Colonne, module échantillon, ordinateur, logiciel) oui / non / FC
 - o saisie du login et mot de passe oui / non / FC
- savoir préparer une série : primer, échantillons et marqueurs de temps de rétention
 - o primer oui / non / FC
 - o marqueurs de temps de rétention oui / non / FC
 - o connaitre l'ordre de passage des différents réactifs et échantillons avec encadrement d'une série patients avec les 2 niveaux de CQI oui / non / FC
- faire la démonstration du passage d'une nouvelle série de patients
- Calibration :
 - o Savoir quand ? oui / non / FC
 - o Connaitre la CAT devant problème oui / non / FC
- CIQ :
 - o Combien de types de CIQ à gérer, les citer oui / non / FC
 - o Intérêt oui / non / FC
 - Contrôle ponctuel avant passage d'échantillons patients
 - Vérification de méthode

	Entité d'application : PBP- ---- Emetteur : PBP - P4 - ----	EN_GRH_16_6 66 Ind : 02
	DOCUMENT D'ENREGISTREMENT	Page : 6/12
FICHE EVALUATION COMPETENCES TECHNICIEN		

- Programmation changement n° de lot oui / non / FC
- CAT si problème oui / non / FC
 - Savoir donner le logigramme préconisé
- Optimisation de l'analyse :
 - A propos du conditionnement des cartouches analytiques neuves oui / non / FC
 - En fonction du nombre d'injections (changement colonne) oui / non / FC
- Vérification technique et interprétation :
 - = basée sur les résultats de l'évaluation écrite ci-jointe oui / non / FC
- Edition du journal des résultats oui / non / FC
- Sauvegarde et gestion des données informatisée oui / non / FC
- Arrêt de l'appareil oui / non / FC
- Maintenances quotidiennes pré-analytiques oui / non / FC
 - Vérification des niveaux de flacons (tampon, wash et déchets) oui / non / FC
 - Nettoyage de l'aiguille de prélèvement oui / non / FC
 - Nettoyage de la station de lavage oui / non / FC
 - Vérification si présence de fuites oui / non / FC
 - Vérification de la pression pompe A / pompe B
 - CAT si variation de pression > 5% ou pressions faibles oui / non / FC
 - CAT si pression >150 oui / non / FC
 - CAT si pression <25 oui / non / FC
 - Savoir rincer la vanne joint/piston oui / non / FC
 - Savoir faire le décompte des injections de la colonne oui / non / FC
- Maintenance hebdomadaire :
 - Savoir nettoyer l'injecteur oui / non / FC
- Entretien mensuel oui / non / FC
 - Vérifier depuis quand l'agent a effectué cette maintenance seule < ou > 4 mois
: si > 4 mois, envisager dans les plus brefs délais une formation complémentaire
 - ➔ Date prévue pour compagnonnage :
 - ➔ Date prévue pour évaluation

	Entité d'application : PBP- ---- Emetteur : PBP - P4 - ----	EN_GRH_16_6 66 Ind : 02
	DOCUMENT D'ENREGISTREMENT	Page : 7/12
FICHE EVALUATION COMPETENCES TECHNICIEN		

➔ Résultats évaluation selon items suivants

- Savoir en quoi consiste un entretien mensuel (nettoyage surfaces intérieures et extérieures) oui / non
- Installation d'un nouveau kit :
 - Vérifier depuis quand l'agent a effectué cette maintenance seul < ou > 4 mois
Si > 6 mois, envisager dans les plus brefs délais une formation complémentaire
 - ➔ Date prévue pour compagnonnage :
 - ➔ Date prévue pour évaluation :
 - ➔ Résultats évaluation selon items suivants :
 - Connaitre les étapes oui / non / FC
 - savoir conditionner et étalonner la cartouche analytique oui / non / FC
- maintenance bimensuelle :
 - Savoir nettoyer et décontaminer le passage des liquides d'échantillonnage oui / non / FC
 - Savoir nettoyer le lecteur code-barres
 - Savoir sauvegarder des données à partir du logiciel GDM oui / non / FC
- Gestion des relevés des actions de maintenance utilisateur oui / non / FC
- EEQ :
 - Analyse et gestion des EEQ tous fournisseurs confondus oui / non / FC
 - Intérêt de l'EEQ oui / non / FC
- Prise en charge d'un incident technique, d'un problème
 - Remplissage fiche incident oui / non / FC
 - Savoir où se trouve l'information oui / non / FC
 - Savoir que faire si incident oui / non / FC
 - Savoir que faire si panne avec intervention sur site d'un technicien fournisseur oui / non / FC
- Archivage données oui / non / FC

	Entité d'application : PBP- ---- -	EN_GRH_16_6
	Emetteur : PBP - P4 - ---	66
DOCUMENT D'ENREGISTREMENT		Ind : 02
		Page : 8/12
FICHE EVALUATION COMPETENCES TECHNICIEN		

▪ **Niveau REFERENT**

Prévoir d'inclure des questions qui permettent de balayer le niveau « maîtrise »

- Participer à l'élaboration et à la réactualisation des documents qualité oui / non
 - Vérification de la mise à jour des fiches de sécurité oui / non
 - Vérifier les données sur le catalogue de Biologie et Pathologie oui / non / FC
 - Gestion des pipettes (en relation avec le Métrologie) oui / non / sans objet
 - Vérification de la gestion des données y compris CIQ oui / non / FC
- (sauvegarde informatisée et contrôle de l'archivage des données papier)
- Vérification des indicateurs de qualité (délai du rendu de résultats) oui / non / FC
 - Formation des techniciens niveau maîtrise ce qui nécessite une parfaite autonomie sur le poste de travail sans recours systématique aux documents qualité oui / non / FC

	Entité d'application : PBP- ----	EN_GRH_16_6
	Emetteur : PBP - P4 - ----	66
DOCUMENT D'ENREGISTREMENT		Ind : 02
		Page : 9/12
FICHE EVALUATION COMPETENCES TECHNICIEN		

2/ Evaluation écrite

Sous forme de QCM dans la mesure du possible

A remplir par le technicien évalué et à corriger par le biologiste évaluateur

L'évaluation écrite est validée si 80% des réponses sont correctes soit : 16 / 20 bonnes réponses

1. Quel est le type de chromatographie utilisé sur variant NBS?

- Chromatographie d'adsorption
- Chromatographie de partage
- Chromatographie d'exclusion
- Chromatographie échangeuse d'ions

2. A propos des tampons A, B et solution wash?

- Les tampons A et B sont identiques
- La solution de lavage wash est une solution d'éthanol
- Il faut changer le tampon B à chaque changement de colonne
- Le flacon 1 correspond au tampon B et le 2 au tampon A
- Lorsque le tampon A est vide un message d'alerte apparaît à l'écran du GDM

3. Le variant NBS :

- Est utilisé pour le dépistage néonatal de la drépanocytose
- Permet de détecter les différentes fractions de l'hémoglobine du nouveau-né
- Est une méthode utilisée pour détecter les différentes fractions de l'hémoglobine de l'adulte
- Travaille qu'avec des papiers buvards poinçonnés au niveau d'une plaque 96 puits

4. Le variant NBS :

- est constitué d'un module chromatographique
- est constitué d'un module échantillon
- la colonne doit être à 35°C
- le module échantillon doit être à 9°C

5. Quelles sont les conditions de conservation des papiers buvards?

- Quelques jours entre +2°C et +8°C
- 7 jours à température ambiante
- 3 mois entre +2°C et +8°C
- Stockés à la chambre froid et conservés pendant 1 an

	Entité d'application : PBP- ---- Emetteur : PBP - P4 - ----	EN_GRH_16_6 66 Ind : 02
	DOCUMENT D'ENREGISTREMENT	Page : 10/12
FICHE EVALUATION COMPETENCES TECHNICIEN		

6. A propos du poinçonnage :

- La poinçonneuse permet de faire des disques de 4.7mm
- Il n'y a pas besoin de scanner les papiers buvards, il faut créer la liste de travail manuellement
- Il faut sélectionner dans le menu déroulant le programme variant à l'écran d'ordinateur
- Le logiciel de poinçonnage s'appelle WDBSMgr-shortcut

7. La maintenance quotidienne consiste à :

- Nettoyer l'aiguille de prélèvement
- Nettoyer la station de lavage
- Rincer la vanne d'injection à l'eau distillée
- Vérifier les pressions

8. La maintenance bimensuelle :

- Doit s'effectuer 2 fois par mois
- Il faut nettoyer et décontaminer le passage des liquides
- La colonne factice se nomme Dummy
- Le nettoyage du lecteur code-barres fait partie de la maintenance bimensuelle

9. A propos des tests de fidélité :

- On parle aussi de tests de reproductibilité
- C'est une évaluation inter-série d'un même appareil dans un même laboratoire Pour un paramètre donné
- Il s'agit d'analyser un CQI de même n° de lot dans des conditions différentes Faisant varier au moins 1 des facteurs suivants : opérateur, temps, lot..
- Il doit se faire au moins une fois par an

10. La vérification des CQI :

- Se fait en regardant les pourcentages d'aires sous la courbe
- L'aire sous la courbe totale doit être comprise entre 750000 et 6 millions
- Les CQI sont les marqueurs de temps de rétention FAES et FACD
- Les CQI doivent encadrer toutes les séries : passage des 2 niveaux de contrôle En début et fin de série

11. Quand doit-on calibrer la cartouche ?

- A chaque changement de cartouche
- Après une décontamination
- Avant chaque série
- Trois fois par mois

	Entité d'application : PBP- ---- - Emetteur : PBP - P4 - ----	EN_GRH_16_6 66 Ind : 02
	DOCUMENT D'ENREGISTREMENT	Page : 11/12
FICHE EVALUATION COMPETENCES TECHNICIEN		

- Après le nettoyage de l'aiguille

12. Comment reconstituez-vous les primer et marqueurs de temps de rétention ?

13. Qu'est-ce que le Primer ? A quoi sert-il ?

14. Est-il normal de retrouver un pic d'HbF supérieur à celui d'Hb A chez le nouveau-né ?

15. Quelles sont les taux normaux d'Hb retrouvés chez le nouveau-né ?

16. Donner les profils obtenus chez un nouveau-né drépanocytaire homozygote ? et chez l'hétérozygote ?

	Entité d'application : PBP- ----	EN_GRH_16_6
	Emetteur : PBP - P4 - ----	66 Ind : 02
DOCUMENT D'ENREGISTREMENT		Page : 12/12
FICHE EVALUATION COMPETENCES TECHNICIEN		

17. Comment détecte-t-on qu'un nouveau-né a été transfusé au niveau du chromatogramme ?

18.A propos de la drépanocytose :

- Elle fait partie des hémoglobinopathies
- Le dépistage est réalisé chez tous les nouveau-nés systématiquement
- Le prélèvement est effectué à 48h après la naissance au pli du coude de l'enfant
- Résulte d'une anomalie qualitative de l'Hb : mutation au niveau de la chaîne β de la globine

19.A propos des techniques de dépistage :

- L'HPLC du variant NBS est une technique de dépistage
- L'électrophorèse capillaire est une méthode de confirmation
- Il n'est pas nécessaire de réaliser une étape de confirmation diagnostique, Les résultats du variant NBS suffisent
- Nous devons communiquer tous résultats pathologiques au médecin prescripteur

20. Gestion des déchets

- Les effluents sont directement éliminés dans l'évier
- Les gants peuvent être jetés dans une poubelle noire s'ils sont non souillés
- Les gants souillés doivent être jetés dans une poubelle jaune DASRI
- Les emballages plastiques et carton des réactifs doivent être déposés dans Une poubelle jaune

FICHE D'HABILITATION :

EMPLOI-TYPE :

Cocher la case concernée :

- Technicien de laboratoire
- OPQ / MO / Aide de laboratoire
- Ingénieur
- Autres :

La fiche d'habilitation est remplie au regard des résultats inscrits sur la fiche d'évaluation (EN-GRH-16_666), fiche qui mentionne précisément les différents critères nécessaires pour évaluer / habilitier un agent.

<p>Site Hospitalier</p> <p>Discipline</p> <p>Secteur d'activités</p> <p>Nom de l'automate ou poste de travail</p> <p>Nom, Prénom de l'agent évalué</p> <p>Code agent</p> <p>Période(s) de tutorat</p> <p>(nombre de journées en binôme, nombre de journées d'encadrement)</p> <p>Habilitation :</p> <p>Niveau d'habilitation requis</p>	<p><input type="checkbox"/> 1^{ère} <input type="checkbox"/> réhabilitation</p> <p>Si réhabilitation, mentionner la date de la dernière habilitation :</p> <p>La durée de validité de l'habilitation : 3 ans</p> <p>sous réserve d'absence > 6 mois</p> <p>ou de modification du poste nécessitant une réhabilitation partielle</p> <p><input type="checkbox"/> pratique courante</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> maîtrise</p> <p><input type="checkbox"/> expert</p>
---	---

Critères objectifs	évaluation			Commentaires éventuels
	NA	EC	A	
Tous les items en bleu et italique sont cités à titre d'exemple				
TRONC COMMUN				
<i>Hygiène et Sécurité</i>				
<i>Savoir gérer les déchets</i>				
<i>Informatique</i>				
SECTEUR D'ACTIVITES ou POSTE				
NIVEAU UTILISATEUR : <i>Mentionner si l'ensemble des items doit être acquis</i> <i>Sinon mettre une * à tout item qui doit être acquis</i>				
<i>Documents qualité</i>				
<i>Savoir lancer une série (CQI, patients, EEQ)</i>				
<i>Savoir libérer les résultats patients</i>				
NIVEAU MAITRISE : <i>Mentionner si l'ensemble des items doivent être acquis</i> <i>Sinon mettre une * à tout item qui doit être acquis</i>				
<i>Documents qualité</i>				
<i>Connaître les conditions pré-analytiques</i>				
<i>Connaître le principe de mesure</i>				
<i>Connaître les différents éléments de l'analyseur</i>				
<i>Savoir utiliser le logiciel</i>				
<i>Gestion des réactifs</i>				
<i>Savoir utiliser en routine l'automate : lancement d'une sé</i>				
<i>Savoir lancer et analyser une calibration</i>				

<i>Savoir gérer les CQI</i>				
<i>Savoir libérer les résultats patients</i>				
<i>Savoir gérer les EEQ</i>				
<i>Savoir gérer les maintenances</i>				
<i>Savoir gérer les données (sauvegarde et retrouver donnée)</i>				
<i>Savoir gérer les incidents techniques et pannes</i>				
<u>Facultatif :</u> <i>Connaître les principes de vérification d'une méthode</i>				
<u>Facultatif :</u> <i>Intérêt des marqueurs dosés</i>				
<i>Présence aux sessions de formation continue pour acquis et maintien des connaissances / compétences</i>				
NIVEAU REFERENT <i>Mentionner si l'ensemble des items doivent être acquis</i> <i>Sinon mettre une * à tout item qui doit être acquis</i>				
<i>Participation à l'élaboration et à la réactualisation documents qualité</i> <i>Vérification de la mise à jour des fiches de sécurité</i> <i>Vérification des données sur le catalogue de Biologie Pathologie</i> <i>Vérification de la gestion des données y compris (sauvegarde)</i> <i>Gestion des pipettes en relation avec la Métrologie</i> <i>Gestion des vérifications de méthode (quand et comment)</i> <i>Vérification des indicateurs de qualité (délai du rendu résultats)</i> <i>Formation des techniciens niveau maîtrise ce qui nécessite une parfaite maîtrise et autonomie au poste de travail</i> <i>recours systématique aux documents qualité</i> <i>Formation des techniciens niveau référent</i>				

LEGENDE : Non Acquis : NA En cours d'acquisition : EC Acquis : A

HABILITATION : OUI NON **Niveau :**

Si oui, délivrée le : _____

SIGNATURES :

BIOLOGISTE DU SECTEUR *D'ACTIVITES, SI NECESSAIRE :*

CADRE DU SECTEUR :

CHEF DE SERVICE DE LA *DISCIPLINE, SI NECESSAIRE :*

AGENT EVALUE :

Pour les prochaines (ré)habilitations, veuillez créer autant de fois que nécessaire le pavé suivant à remplir au regard d'une nouvelle fiche d'évaluation si nécessaire (dernière habilitation > 3 ans, absence > 6 mois, modification du poste) :

(RE)HABILITATION : OUI NON **Niveau :**

Si oui, délivrée le : _____

Veillez mentionner les items modifiés ou ajoutés par rapport à l'habilitation précédente, si évolution des tâches / du niveau acquis sur le poste :....

SIGNATURES :

BIOLOGISTE DU SECTEUR *D'ACTIVITE, SI NECESSAIRE :*

CADRE DU *SECTEUR :*

CHEF DE SERVICE DE LA *DISCIPLINE, SI NECESSAIRE :*

AGENT EVALUE :

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

MISE EN PLACE DU DEPISTAGE NEONATAL DE LA DREPANOCYTOSE EN NOUVELLE AQUITAINE

RESUME en français

A l'heure actuelle en France Métropolitaine, cinq pathologies sont dépistées à la naissance. Quatre d'entre elles le sont systématiquement chez tous les nouveau-nés : il s'agit de la phénylcétonurie, l'hypothyroïdie congénitale, l'hyperplasie congénitale des surrénales et la mucoviscidose.

Quant à la drépanocytose, son dépistage néonatal ne s'effectue que chez les enfants à risque. Cette hémoglobinopathie est un problème de santé publique mondial avec apparition de nombreuses complications, d'où l'importance de la mise en place de ce dépistage néonatal pour une prise en charge rapide et optimale avant même l'apparition de signes cliniques.

Le dépistage néonatal de la drépanocytose fait partie intégrante d'un programme élaboré et coordonné au niveau national par le Centre National du Dépistage Néonatal relayé au niveau régional par les Centres Régionaux de Dépistage Néonatal, eux-mêmes rattachés aux Centres Hospitaliers Universitaires, s'intégrant dans une nouvelle organisation du dépistage néonatal national depuis mars 2018. Le Centre Régional de Dépistage Néonatal de la Nouvelle Aquitaine, agréé par l'Agence Régionale de Santé, a mis en place ce dépistage au Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux. Cette nouvelle offre a impliqué la mise en place d'une procédure de conduite au changement (gestion de portée flexible) selon les exigences de la norme 15189. Les différentes étapes de cette procédure ont constitué le fil conducteur du travail de thèse.

MOTS-CLES :

Dépistage néonatal, drépanocytose, vérification de méthodes, anémie falciforme, hémoglobinopathie, syndrome drépanocytaire majeur, papier buvard

TITRE et RESUME en anglais

ESTABLISHMENT OF NEONATAL SCREENING OF SICKLE CELL DISEASE IN
« NOUVELLE AQUITAINE »

At present in Metropolitan France, five pathologies are detected at birth. Four of these are systematically detected in all newborns: phenylketonuria, congenital hypothyroidism, congenital adrenal hyperplasia and mucoviscidosis. For sickle cell disease, the neonatal screening is only carried out in children at risk. This hemoglobinopathy is a global public health problem with numerous complications, hence the importance of the implementation of this neonatal screening, for rapid and optimal management, even before the appearance of clinical signs. Neonatal screening for sickle cell disease is an integral part of a program developed and coordinated at the national level, by the National Center for Neonatal Screening, relayed at the regional level, by the Regional Centers for Neonatal Screening, which are themselves attached to the University Hospital Centers, integrating into a new organization of national neonatal screening since March 2018. The Regional Center for Neonatal Screening of the “Nouvelle Aquitaine”, approved by the Regional Agency for Health, has set up this screening at the Bordeaux University Hospital Center. This new offer involved the implementation of a change management procedure (flexible scope management) according to the requirements of standard 15189. The various stages of this procedure formed the main theme of the thesis work.

KEY WORDS :

Neonatal screening, sickle disease, verification method, sickle cell anemia, hemoglobinopathy, dried blood spots

DISCIPLINE

Biochimie-Hématologie

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R OU DU LABORATOIRE :

Laboratoire de Biochimie, secteur protéines, dépistage néonatal de la drépanocytose
CHU de Bordeaux, site Pellegrin
Place Amélie Raba Léon
33000 Bordeaux

